



HAL
open science

Mise au point opérationnelle du FlowCAM® pour l'identification et le dénombrement automatisé des cyanobactéries

Abel Barré

► **To cite this version:**

Abel Barré. Mise au point opérationnelle du FlowCAM® pour l'identification et le dénombrement automatisé des cyanobactéries. Biodiversité et Ecologie. 2020. hal-03442269

HAL Id: hal-03442269

<https://hal.inrae.fr/hal-03442269v1>

Submitted on 23 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

INRAE

la science pour la vie, l'humain, la terre

Abel BARRE

Master 1 Sciences de l'Eau parcours Contaminants Eau Santé

Université de Montpellier – Année 2020

Mise au point opérationnelle du FlowCAM[®] pour l'identification et le dénombrement automatisé des cyanobactéries

Mémoire de stage 1^{ère} année

Stage réalisé en télétravail du 04/05/2020 au 30/06/2020 au sein de l'Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE)

Centre Nouvelle-Aquitaine Bordeaux, site de Gazinet-Cestas

Sous la tutelle de :

- Mme Sylvia MOREIRA, ingénieure d'études à INRAE Bordeaux, Unité EABX, équipe ECOVEA (Ecologie des Communautés Végétales Aquatiques et impact des pressions multiples)
- Mme Hélène FENET et Mme Frédérique COURANT, responsables du Master Sciences de l'Eau à l'Université de Montpellier

RESUME	1
1. INRAE	2
1.1. Présentation de l'institut	2
1.2. L'Unité de Recherche EABX et l'équipe ECOVEA	2
2. CONTEXTE ET OBJECTIFS	3
2.1. La problématique des cyanobactéries	3
2.2. Présentation du FlowCAM	4
2.3. Définition des objectifs	6
3. METHODOLOGIE ET RESULTATS	7
3.1. Recherche et analyse bibliographique	7
3.1.1 Contexte de l'étude	7
3.1.2 Prétraitement de l'échantillon	7
3.1.3 Configuration de l'appareil	7
3.1.4 Paramètres utilisés pour l'analyse des échantillons	8
3.2. Protocole proposé pour la mise au point du FlowCAM	9
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	10

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, mes remerciements vont à Mme Sylvia Moreira, non seulement de m'avoir accepté comme stagiaire au sein de l'équipe ECOVEA, mais également pour l'engagement dont elle a fait preuve pour m'accompagner au cours de mon travail. Pour toute l'aide, les conseils et les critiques qu'elle a pu m'apporter, pour sa disponibilité, et enfin, pour m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi intéressant à mes yeux que celui-ci.

En raison du contexte actuel, ce stage qui devait s'étendre jusqu'à fin août a été raccourci et le sujet a été adapté pour le télétravail. Cependant, il reste une expérience dans laquelle je me suis épanoui, et a été instructif, formateur, et par-dessus tout, intéressant.

Bien que je n'aie pas pu rencontrer les membres de l'équipe ECOVEA autrement que par visioconférence, je tiens également à leur exprimer toute ma reconnaissance pour mon intégration au sein de l'Inrae. Merci également à Mme Hélène Fenet pour les recommandations apportées vis-à-vis de la rédaction de ce rapport.

RESUME

Avec l'élévation de la température moyenne des océans liée au réchauffement climatique global, l'augmentation de la fréquence d'épisodes d'efflorescences* de cyanobactéries (microalgues potentiellement toxiques) est une problématique qui prend de l'ampleur (Wells *et al.*, 2015 ; Gobler *et al.*, 2017). Ce phénomène est également exacerbé par l'eutrophisation* des eaux continentales et côtières liée aux activités anthropiques*. Les conséquences de ces efflorescences sur l'environnement sont multiples : au-delà de l'hypoxie provoquée localement et qui contribue à créer des zones « mortes », certaines proliférations s'accompagnent d'émissions de cyanotoxines* présentant un risque notable pour la santé humaine et animale. De ce fait, leur prolifération est désormais considérée comme un enjeu économique et environnemental important pour les services de l'État et les gestionnaires en charge de la surveillance et de la gestion des ressources en eau.

Afin de pallier le risque lié à la présence des cyanobactéries, la directive européenne 2006/7/CE impose une surveillance et une gestion des cyanobactéries dans les zones de baignade en complément du contrôle de leur qualité microbiologique. Actuellement, ce suivi réalisé par microscopie optique en laboratoire compromet la réactivité des gestionnaires à prendre des mesures adéquates pour protéger la population car les étapes de dénombrement et d'identification sont chronophages et requièrent d'importantes compétences taxonomiques (Jaouen, 2015).

Ces dernières années, le développement des technologies scientifiques analytiques pourrait permettre une meilleure connaissance et gestion de ces milieux aquatiques. Le FlowCAM, outil développé dans les années 2000, est un appareil combinant la microscopie optique et la cytométrie en flux pour la mesure et la classification d'organismes et de particules (de 20 à 200 µm) présents dans un milieu liquide. Générant des images numériques en couleur, il donne accès aux dimensions des cellules et permet leur classement selon des filtres définis par l'opérateur en quelques minutes.

L'objectif de ce stage est de finaliser le protocole du FlowCAM pour la surveillance spécifique des cyanobactéries en eau douce dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe ECOVEA d'INRAE Cestas-Gazinet et de définir son périmètre de validité. Le travail réalisé lors de ce stage a consisté à analyser la bibliographie* disponible puis synthétiser les informations pertinentes.

L'INRAE, structure au sein de laquelle ce stage a été réalisé sera présentée dans un premier temps, suivi d'une description du FlowCAM et des objectifs détaillés de cette mission. Enfin, la méthodologie et les résultats obtenus seront présentés partiellement et discutés, de même que les limites et les perspectives de cet outil.

1. INRAE

1.1. Présentation de l'institut

L'INRAE est un Etablissement public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) créé le 1er janvier 2020. Il est le fruit de la fusion de l'INRA, Institut national de la recherche agronomique et de l'IRSTEA, Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture. Il compte 18 centres de recherche dispersés sur le territoire métropolitain et en Outre-Mer, et 14 départements scientifiques.

Ce stage a été réalisé au sein du centre Nouvelle-Aquitaine Bordeaux, qui est dirigé par M. Olivier LAVIALLE et qui comprend 21 unités de recherche. Les activités scientifiques du centre s'articulent autour de 5 thématiques majeures, à savoir (i) Biodiversité, écologie fonctionnelle et évolutive des écosystèmes terrestres et aquatiques, (ii) Biologie intégrative : production, qualité et santé des plantes, (iii) Agroécologie, conception et gestion durable de systèmes de production, (iv) Adaptation aux changements globaux et transitions socio-écologiques dans les territoires, et (v) Nutrition et cerveau.

1.2. L'Unité de Recherche EABX et l'équipe ECOVEA

Au sein du centre Nouvelle-Aquitaine Bordeaux, l'unité EABX : Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux est une unité de recherche en écologie aquatique qui mène des travaux sur la caractérisation et la compréhension des réponses et de l'adaptation de la biodiversité aquatique continentale aux changements globaux à différentes échelles biologiques. Ces recherches mobilisent plusieurs disciplines (écologie, chimie de l'environnement, écotoxicologie), différents modèles biologiques (végétaux aquatiques, crustacés, poissons dont migrateurs amphihalins) dans différents milieux (estuaires, plans d'eau, cours d'eau) à différents niveaux d'organisation (espèces d'intérêt patrimonial ou fonctionnel ; communautés ; réseaux d'interactions). L'unité est organisée en deux équipes de recherches : Fonctionnement et restauration des Ecosystèmes Estuariens et des populations de Migrateurs Amphihalins (FREEMA) et Ecologie des COmmunautés VEgétales Aquatiques et impact des pressions multiples (ECOVEA).

Dans le cadre de mon stage de Master 1, j'ai intégré spécifiquement l'équipe ECOVEA qui comprend une vingtaine de personnes (chercheurs, ingénieurs et personnels techniques). Les recherches menées par l'équipe visent à comprendre le fonctionnement des communautés végétales aquatiques (phytoplancton, phytobenthos et macrophytes) en eaux douces (plans d'eau et cours

d'eau) et à étudier leurs réactions face aux altérations anthropiques (nutriments, matières organiques et pesticides) afin de dresser un état écologique des écosystèmes dans lesquels ces communautés évoluent. Pour répondre à ces questions scientifiques, les travaux de recherche s'appuient sur des données acquises par la réalisation d'études et d'expérimentations menées en laboratoire et en milieu naturel.

L'équipe de recherche ECOVEA est régulièrement sollicitée par les gestionnaires des plans d'eau aquitains qui font face à des épisodes récurrents de prolifération de cyanobactéries (cf. paragraphe 3) sur leurs zones de baignade en plans d'eau (eau douce) et souhaitent avoir un appui scientifique pour mettre en place un protocole de surveillance et d'alerte plus réactif et plus exhaustif que la réglementation. Christophe Laplace-Treytore et Sylvia Moreira (encadrante) ingénieurs d'études sont en charge de la thématique des cyanobactéries au sein de l'équipe.

2. CONTEXTE ET OBJECTIFS

2.1. La problématique des cyanobactéries

Les cyanobactéries (microalgues appartenant au phytoplancton*) sont apparues il y a près de 3,5 milliards d'années, elles présentent à la fois des caractéristiques provenant des bactéries et des caractéristiques provenant des algues (De Revier, 2002, 2003). Les cyanobactéries présentent des formes diversifiées (unicellulaires, colonies ou filaments) et se répartissent dans plus de 150 genres (Figure 1). Elles ont la particularité de pouvoir coloniser rapidement un milieu lorsque les conditions environnementales leurs sont favorables (température supérieure à 20°C, eau stagnante, luminosité modérée à forte, concentration élevée en nutriments notamment en phosphore, principal facteur de développement) et former ainsi une masse colorée visible à l'œil nu que l'on nomme « fleur d'eau », « efflorescence » ou bien encore « bloom » en anglais (Figure 2).

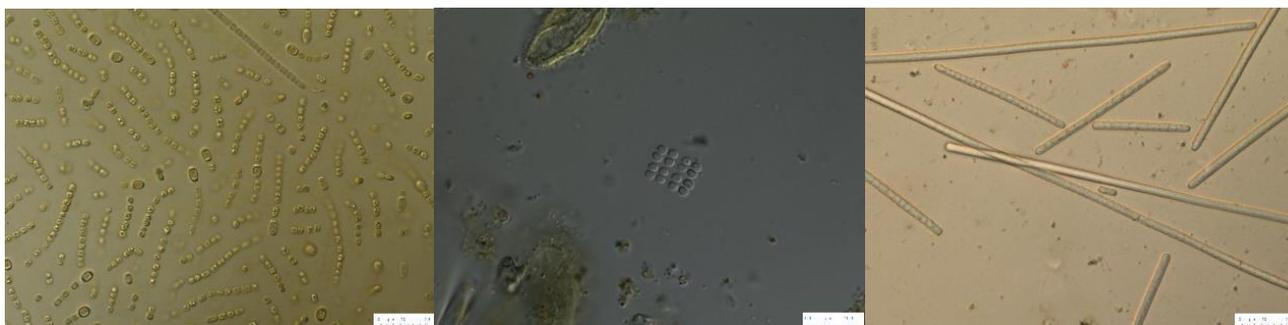


Figure 1 : Trois images de cyanobactéries, avec de gauche à droite *Nodularia spumigena*, *Merismopedia punctata* et *Planktothrix aegardhii*



Figure 2 : quelques exemples d'efflorescences de cyanobactéries observées dans les plans d'eau landais en 2012. Crédit photos, CCGL

Ces blooms de cyanobactéries peuvent induire des problématiques sur les plans sanitaires et écologiques. En effet, l'écosystème est susceptible de se déséquilibrer en raison de la quantité spectaculaire de biomasse ainsi générée, et différents types de cyanotoxines peuvent être synthétisées par les espèces potentiellement toxiques. Pour pallier cela, la directive européenne 2006/7/CE impose la surveillance et la gestion de la qualité des eaux de baignade. A savoir, qu'une densité forte en cyanobactéries conduit à la limitation voire à l'interdiction de la baignade et de toutes autres activités récréatives, ces zones sont alors définies selon plusieurs niveaux de risque (de 0 : pas de précautions particulières à 3b : toutes activités nautiques et tous usages interdits).

Le suivi des cyanobactéries est effectué en laboratoire par des observations au microscope optique moyennant au préalable un prélèvement d'échantillon. L'observation microscopique consiste à dénombrer et identifier les genres de cyanobactéries présentes. Cette analyse chronophage requiert d'importantes compétences taxonomiques et se révèle peu compatible avec la sécurité sanitaire car elle comporte un délai de réponse d'au moins 36 heures. De plus, elle engendre souvent des coûts financiers importants, notamment pour certaines communes ayant à leur charge la gestion de multiples zones récréatives.

2.2. Présentation du FlowCAM

Dans le cadre de la surveillance des zones de baignades des plans d'eau aquitains, l'équipe ECOVEA est régulièrement sollicitée pour aider les gestionnaires dans leur suivi et leur gestion des proliférations des cyanobactéries sur leurs zones de baignade. L'équipe EVOVEA s'est dotée en 2013 d'un FlowCAM[®] Benchtop VS-IV (Fluid Imaging Technologies, USA) pourvu des objectifs suivants : x4, x10, x20. Cet outil est pourvu d'un ordinateur interne et d'un logiciel spécifique (*VisualSpreadSheet*[®]) permettant, la configuration de l'appareil, l'analyse et le traitement des données acquises.



Figure 3 : Vue frontale du FlowCAM[®] de l'unité EABX, INRAE Nouvelle-Aquitaine Bordeaux

Le FlowCAM[®] (Figure 3) est un équipement scientifique de laboratoire couplant la microscopie, la cytométrie en flux et la détection par fluorescence. Ses capacités lui permettent rapidement (en quelques minutes) de déceler, de compter et de reconnaître des particules de tailles variables présentes dans un fluide en mouvement. En outre, il dispose d'une caméra couleur qui peut générer des images numériques pour chaque cellule détectée et donne ainsi accès à nombre de paramètres pouvant les définir (taille, forme, volume). Cet appareil récent et complexe, nécessite un niveau élevé de technicité. Depuis 2018 la mise au point du FlowCAM[®] a été initiée au sein de l'équipe ECOVEA afin que cet outil soit utilisé comme une analyse systématique dans le cadre des recherches vis-à-vis des cyanobactéries.

Le principe de fonctionnement de l'appareil est le suivant : tout d'abord, un volume défini de l'échantillon est aspiré dans le système par une pompe péristaltique au travers de la cellule de passage nommée « FlowCell ». Il existe deux catégories de FlowCells*, à savoir les cellules standards et les cellules Field Of View (FOV). Le choix de la cellule est défini par la taille des particules présentes dans l'échantillon, de même que par le grandissement de l'objectif et par la vitesse de passage de l'échantillon dans le système. Comparé à une FlowCell standard, la FOV permet l'imagerie de l'ensemble du volume d'échantillon indispensable en cas de comptage.

Cet appareil dispose de deux modes de détection des particules : le mode *Trigger* et le mode *AutoImage*. En mode *Trigger*, les particules vont être photographiées en fonction de leur fluorescence ou de leur capacité à diffuser la lumière, alors qu'en mode *AutoImage* la caméra est configurée pour capturer des images brutes selon un intervalle de temps défini par l'utilisateur.

Par la suite, le logiciel *VisualSpreadSheet*[®] permet d'établir des filtres et des bibliothèques spécifiques pour l'identification et le dénombrement de certains groupes à partir des images et selon les paramètres définis par l'opérateur.

2.3. Définition des objectifs

L'identification précise et exhaustive des particules analysées requiert l'obtention d'images de bonne qualité, qui est dépendante de plusieurs facteurs tels que le compartiment biologique étudié (zooplancton, phytoplancton), le milieu analysé (eau douce ou salée) et les paramètres d'acquisition du FlowCAM[®] (cellule de passage ou FlowCell, objectif utilisé, vitesse d'écoulement, fréquence de prise d'image, etc.). La configuration du FlowCAM[®] est à déterminer pour permettre une observation fiable et automatisée des cyanobactéries dans différents domaines d'application (surveillance, culture algale, expérience en laboratoire, etc.).

Pour ce faire, l'objectif de ce travail est (i) d'analyser la bibliographique disponible pour identifier les paramètres généraux valides d'utilisation du FlowCAM[®] au sein d'une banque d'articles, et (ii) établir un protocole spécifique, pour le comptage et l'identification des cyanobactéries en eau douce. En amont de mon stage, une recherche bibliographique dédiée au FlowCAM[®] a été mise en place par mon encadrante (recherche de ressources documentaires à partir de 2000) et sauvegardée via le logiciel Zotero* ainsi qu'une veille bibliographique par le portail Netvibes* afin que cette base reste alimentée lors de la parution de nouveaux articles scientifiques. Cette recherche a permis de créer à ce jour une banque de 143 articles scientifiques.

Dans un premier temps, j'ai étudié les articles scientifiques en lien avec les mots-clés « cyanobactéries » et « FlowCAM[®] » soit 13 au total. Les références utilisées sont disponibles en annexe n°1. Dans un second temps, j'ai analysé les données issues de cette étude (paramétrage et configuration de l'appareil, comparaison des méthodes de comptage) pour proposer un protocole applicable sur des échantillons et de cultures de cyanobactéries d'intérêts conservés en collection par l'équipe ECOVEA. La méthodologie et les résultats sont présentés dans la partie suivante.

3. METHODOLOGIE ET RESULTATS

3.1. Recherche et analyse bibliographique

Tout d'abord, la synthèse bibliographique réalisée visait à identifier au sein de chaque articles (i) le contexte de l'étude, (ii) les étapes de préparation des échantillons en amont de l'analyse, (iii) la configuration de l'appareil, (iv) les paramètres utilisés pour l'analyse des échantillons, et enfin (v) les résultats obtenus ainsi que les limites et les perspectives identifiées. Ces informations ont été regroupées et sauvegardés au sein d'un tableur Excel et classer par ordre de pertinence selon l'objectif du stage.

3.1.1 Contexte de l'étude

Cette partie permet de renseigner l'objectif distal de l'étude et ses objectifs directs, ce qui permet par la suite d'identifier les articles en vue d'un classement par ordre de pertinence. De même, elle décrit les espèces étudiées, le milieu au sein duquel ont été effectués les prélèvements et le logiciel utilisé dans le cadre de l'identification et de la détermination des paramètres morphologiques (taille, biovolume) des cellules.

3.1.2 Prétraitement de l'échantillon

Tout d'abord, la préparation de l'échantillon est déterminante car les étapes de désintégration, de filtration, de dilution ou de concentration de l'échantillon assurent que l'analyse ne soit pas perturbée par des problèmes liés au colmatage du système ou à l'agrégation des cellules (Camoying et Yñiguez, 2016 ; Bergkemper et Weisse, 2018 ; Graham *et al.*, 2018). En outre, le mode AutoImage du FlowCAM® a tendance à sous-estimer l'abondance des cellules lorsqu'elles sont agglomérées et l'obstruction de la cellule de passage peut conduire à la formation de bulles d'air et rendre erroné le taux de capture des images (Alvarez et al., 2011). Également, l'état de l'échantillon (frais ou fixé) est renseigné dans cette partie car le processus de fixation au Lugol ou au formaldéhyde peut entraîner une réduction du biovolume des cellules présentes (Bergkemper et Weisse, 2018).

3.1.3 Configuration de l'appareil

Pour que l'analyse ne soit pas limitée par des problèmes d'ordre technique, il est préférable que les dimensions (longueur x profondeur) de la cellule de passage choisie soient en adéquation avec la

taille des cellules obtenue après filtration. Plus précisément, la profondeur (*depth*) de la FlowCell définit le diamètre maximal des cellules pouvant circuler au travers. Au-delà de la cellule de passage qui spécifie la limite supérieure admissible pour le diamètre des particules, l'analyse dépend également de l'objectif utilisé (2X, 4X, 10X, ou 20X). Plus le facteur de grossissement de ce dernier est élevé, plus la taille des cellules capturées pourra être faible.

L'utilisation d'une filtration séquentielle est récurrente en amont de l'analyse des colonies en mode AutoImage : les petites colonies (<50µm) avec une FC50 (1000µm x 50µm) et un objectif X20 ; les moyennes (50-100µm) avec une FC100 (2000µm x 100µm) et un objectif X10 ; et les grosses colonies (>100µm) avec une FC300 (3000µm x 300µm) et un objectif X4 (Wang *et al.*, 2015 ; Álvarez E., 2016).

Enfin, Le FlowCAM® dispose d'une large gamme de cellules de passage dont la profondeur varie de 50µm à 4000µm, et les couples objectif / cellule de passage recommandés sont 20X/FC50µm, 10X/FC100µm, 4X/FC300µm, et enfin 2X/FC800µm (Cf. Annexe 2).

3.1.4 Paramètres utilisés pour l'analyse des échantillons

Indépendamment du mode d'analyse utilisé, le passage des échantillons est également fonction de plusieurs variables telles que la durée de l'analyse, le volume injecté, le débit (*Flow Rate*), le nombre d'images capturées par seconde ou encore le volume imagé. Ces facteurs sont corrélés selon les formules suivantes :

$$\text{Volume injecté (mL)} = \text{Nombre d'images capturées} \times \text{Volume par image (mL)}$$

$$\text{Volume injecté (mL)} = \text{Temps d'analyse (min)} \times \text{FlowRate (mL/min)}$$

Où le volume par image correspond à la valeur de la surface de champ de la caméra (largeur x hauteur) multipliée par la profondeur de la cellule de passage. Le nombre total d'images capturées est quant à lui défini comme la fréquence de la prise d'images (*Frame Rate*) multipliée par la durée de l'analyse. Le FlowCAM® peut prendre jusqu'à 20 photos par seconde, mais des fréquences plus faibles peuvent être suffisantes pour capturer l'ensemble des particules de l'échantillon. Par exemple, Wang *et al.* utilisent dans le cadre de l'analyse de *Microcystis aeruginosa* des Frame Rates de 20, 10 et 5 images par seconde pour des grossissements X20, X10 et X4, respectivement.

Un autre paramètre décisif est le nombre de particules capturées par image (*Particle Per Used Image*). Idéalement, il doit être inférieur à 1,2 afin qu'une seule cellule soit présente à la fois dans le champ de la caméra. Autrement, l'observation simultanée de plusieurs cellules peut fausser l'estimation de la concentration par le logiciel VisualSpreadSheet® (Menden-Deuer *et al.*, 2020).

3.2. Protocole proposé pour la mise au point du FlowCAM

Les données extraites des 13 articles scientifiques ont donc été utilisées en vue de l'élaboration d'un protocole du FlowCAM®, applicable dans le cadre des programmes de recherche de l'équipe ECOVEA. Dans le cas présent, l'objectif a été d'employer le FlowCAM pour analyser des échantillons naturels et des monocultures de laboratoire ayant préalablement été caractérisés par microscopie optique afin d'en évaluer les capacités techniques et taxonomiques. Pour ce faire, les résultats obtenus au microscope (identification et détermination de la concentration des souches) ont servi de base de réflexion pour le paramétrage du FlowCAM.

Tout d'abord, le choix d'utiliser une cellule de flux FC100 (FloxCell de 100µm) et l'objectif correspondant (X10) pour les cyanobactéries filamenteuses (*Planktothrix sp.*, *Dolichospermum sp.*, *Anabaena sp.* et *Pseudoanabaena sp.*) semble pertinent afin d'éviter le colmatage du système. En effet, si la taille des cellules prises indépendamment est compatible avec une FC50, celle d'un agglomérat de cellules pourrait ne pas l'être. Compte tenu du coût conséquent du matériel employé, il est préférable de ne pas prendre ce risque. Autrement, les cellules respectivement inférieures et supérieures à 50 µm seront analysées avec une FC50/X20 et une FC100/X10. Dans cette même optique, une étape de désintégration sera appliquée pour dissocier les colonies en cellules isolées.

Ensuite, une filtration sur 50 µm sera effectuée sur une partie aliquote des échantillons présentant une diversité de genres ou d'espèces ayant des dimensions en-deçà et au-delà de ce seuil, afin d'analyser séparément les deux catégories de tailles.

Des facteurs de dilution de 10 et 100 ont été choisis lorsque la concentration d'une espèce au sein d'un échantillon dépassait 100 000 et 1 000 000 cellules par millilitre, respectivement, car l'exactitude des résultats obtenus n'est plus garantie au-delà (Graham et al., 2018). L'OMS a défini à 100 000 cellules par millilitre le seuil de risque modéré pour la santé lors de l'évaluation de la qualité de l'eau, car la probabilité que *Microcystis sp.* (Qui sécrète de la Microcystine, une hépatotoxine) forme de l'écume ou de la mousse à la surface de l'eau est accrue (WHO, 2011).

Enfin, les autres paramètres fixés ont été :

- Flow Rate de 0,05 ml/min (FC50/X20) à 0,2 ml/min (FC100/X10) ;
- Volume d'échantillon de 0,25 ml (FC50/X20) et 1 ml (FC100/X10) ;
- Nombre de passages : 6 pour les échantillons dilués afin de pallier l'incertitude intrinsèque à la réalisation d'une dilution et 3 pour les échantillons non dilués ;
- Nombre de particules par image de 1,2 afin d'éviter des erreurs lors du dénombrement ;

- Fréquence de prise d'images : 20 images/sec (FC50/X20) et 10 images/sec (FC100/X10).

Les volumes et les débits utilisés permettent d'estimer que le temps de passage sera de 5 minutes, soit 15 minutes pour les analyses réalisées en triplicata et 30 minutes pour les échantillons mesurés 6 fois. En comparaison, l'analyse au microscope a requis environ 30 minutes pour les monoculture et jusqu'à 4h pour les échantillons contenant diverses espèces et issus de sites inconnus. Le FlowCAM devrait donc permettre de réduire le temps consacré à chaque échantillon.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les activités anthropiques contribuent à l'augmentation de la fréquence et de l'amplitude des phénomènes d'eutrophisation de manière directe (notamment *via* le lessivage des sols agricoles chargés en éléments azotés et phosphorés) et indirecte (réchauffement des eaux côtières et océaniques par l'émission de gaz à effet de serre). De ce fait, le suivi des cyanobactéries est un enjeu majeur aussi bien sur les plans sanitaires qu'environnementaux mais la méthode actuelle de comptage et d'identification au microscope optique est une entrave à la réactivité des gestionnaires.

C'est dans ce contexte que ce stage, qui visait à synthétiser les informations disponibles quant à l'utilisation du FlowCAM et à établir un protocole applicable pour la surveillance spécifique des cyanobactéries en eau douce par l'équipe ECOVEA, a permis de mieux appréhender les forces et les faiblesses de cet appareil.

Si le FlowCAM manque encore aujourd'hui de précision en ce qui concerne l'identification de certains taxons, il devrait toutefois permettre de réduire la durée et le coût de l'analyse d'un échantillon pour les étapes de dénombrement et d'identification. Ses limites actuelles, bien que contraignantes, sont à mettre en perspective avec le fait qu'il intervient de manière complémentaire aux autres méthodes analytiques appliquées aux cyanobactéries. En effet, il ne s'agit pas d'utiliser systématiquement ou exclusivement le FlowCAM dans le cadre de la surveillance des milieux aquatiques, mais plutôt d'avoir accès à une méthode plus rapide pour assurer le suivi routinier des cyanobactéries tout en ayant la possibilité de revenir à la méthode traditionnelle au microscope optique en cas de besoin.

Pour ma part, j'estime qu'un outil ayant des imperfections peut être utilisé si ses marges d'erreurs sont connues, prises en compte lors du traitement des données et que des recherches sont conduites en vue de les minimiser.

BIBLIOGRAPHIE

Álvarez E., López-Urrutia Á., Nogueira E., Fraga S., 2011. How to effectively sample the plankton size spectrum? A case study using FlowCAM. *Journal of Plankton Research*, Volume 33, (7), July 2011, Pages 1119-1133, <https://doi.org/10.1093/plankt/fbr012>

Álvarez E., 2016. Application of FlowCAM for phytoplankton enumeration, identification and estimation of chlorophyll content per cell. Présentation Powerpoint. Conference: British Phycological Society 64th Annual Meeting, Bournemouth, UK.

De Reviere, B., 2002. *Biologie et phylogénie des algues : t.1, Belin Sup Sciences : biologie. Belin, Paris, 352 p.*

De Reviere, B., 2003. *Biologie et phylogénie des algues : t.2, Belin Sup Sciences : biologie. Belin, Paris, 255 p.*

Camoying M. et Yñiguez A. T., 2016. FlowCAM optimization: Attaining good quality images for higher taxonomic classification resolution of natural phytoplankton samples. *Limnology and Oceanography: Methods*, May 2016, Vol. 14 (5), Pages 305–314. <https://doi.org/10.1002/lom3.10090>

Gobler C. J., Doherty O. M., Hattenrath-Lehmann T. K., Griffith A. W., Kang Y., et Litaker R. W., 2017. Ocean warming since 1982 has expanded the niche of toxic algal blooms in the North Atlantic and North Pacific oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, May 2017, Vol. 114 (19), Pages 4975-4980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619575114>

Graham M. D., Cook J., Graydon J., Kinniburgh D., Nelson H., Piliéci S. et Vinebrooke R. D., 2018. High-resolution imaging particle analysis of freshwater cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography: Methods*, October 2018, Vol. 16, (10), Pages 669–679. <https://doi.org/10.1002/lom3.10274>

Jaouen A., 2015. Gestion des risques sanitaires liés aux cyanobactéries dans les plans d'eau morbihannais : modalités, acteurs, enjeux et perspectives. Rapport d'étude, Conseil départemental du Morbihan, DEAE, Service de l'Eau, Novembre 2015, 88 pages.

Menden-Deuer S., Morison F., Montalbano A. L., Franzè G., Strock J., Rubin E., McNair H., Mouw C. et Marrec P., 2020. Multi-Instrument Assessment of Phytoplankton Abundance and Cell Sizes in Mono-Specific Laboratory Cultures and Whole Plankton Community Composition in the North Atlantic, *Frontiers in Marine Science*, April 2020, Volume 7, 254 p. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00254>

World Health Organization, 2011. Algae and cyanobacteria in freshwater, Guidelines for safe recreational water environments, Chapter 8, Pages 136–158.

Wang C., Wu X., Tian C., Li Q., Tian Y., Feng B., et Xiao B., 2015. A quantitative protocol for rapid analysis of cell density and size distribution of pelagic and benthic *Microcystis* colonies by FlowCAM. *Journal of Applied Phycology*, 2015, Vol. 27, Pages 711–720. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0352-0>

Wells M. L., Trainer V. L., Smayda T. J., Karlson B. S. O., Trick C. G., Kudela R. M., Ishikawa A., Bernard S., Wulff A., Anderson D. M., Cochlan W. P., 2015. Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. *Harmful Algae*, November 2015, Vol. 49, Pages 68-93. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.009>

Glossaire

Anthropique : Se dit des activités par lesquelles les populations humaines modifient ou transforment l'environnement naturel telles que la déforestation, l'élevage, l'urbanisation ou l'activité industrielle. Du grec *anthropos* (homme).

Bibliographique : Liste de titres, de références d'ouvrages, de livres ou de périodiques relatifs à un domaine général ou spécialisé.

Cyanotoxines : Molécules synthétisées par les cyanobactéries. Elles peuvent être regroupées selon leur structure chimique (peptides cycliques, alcaloïdes et lipopolysaccharides) ou selon leurs mécanismes de toxicité (hépatotoxines, les neurotoxines et les dermatotoxines).

Efflorescences : Aussi appelées blooms, il s'agit d'une prolifération de cyanobactéries entraînant une modification de l'aspect visuel de l'eau (coloration ou mousses en surface).

Eutrophisation : Enrichissement d'une eau en sels minéraux (nitrates et phosphates, notamment), entraînant des déséquilibres écologiques tels que la prolifération de la végétation aquatique ou l'appauvrissement du milieu en oxygène.

FlowCells : Cellule par laquelle passe l'échantillon lors de son analyse par le FlowCAM ; c'est lorsqu'il traverse la FlowCell qu'il est photographié par la caméra au travers de l'objectif.

Phytoplancton : Plancton végétal, regroupant cyanobactéries et microalgues

Netvibes : Tableau de bord numérique permettant de se tenir à jour de la sortie d'articles sur un sujet particulier. Plus d'informations : <https://www.netvibes.com/fr>

Ubiquitaire : Se dit d'un organisme omniprésent dans un environnement.

Zotero : Logiciel de gestion des données bibliographiques pouvant être intégré au navigateur Web. Plus d'informations : <https://www.zotero.org/>

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Trois images de cyanobactéries, avec de gauche à droite <i>Nodularia spumigena</i> , <i>Merismopedia punctata</i> et <i>Planktothrix agardhii</i>	3
Figure 2 : quelques exemples d'efflorescences de cyanobactéries observées dans les plans d'eau landais en 2012. Crédit photos, CCGL.....	4
Figure 3 : Vue frontale du FlowCAM® de l'unité EABX, INRAE Nouvelle-Aquitaine Bordeaux.....	5

Annexes

Annexe 1 : liste des références bibliographiques

Alvarez E., 2016. Application of FlowCAM for phytoplankton enumeration, identification and estimation of chlorophyll content per cell. Présentation Powerpoint. Conference: British Phycological Society 64th Annual Meeting, Bournemouth, UK.

Bergkemper V. et Weisse T., 2017. Phytoplankton response to the summer 2015 heat wave – a case study from prealpine Lake Mondsee, Austria. *Inland Waters*, Vol. 7 (1), Pages 88–99. <https://doi.org/10.1080/20442041.2017.1294352>

Bergkemper V. et Weisse T., 2017. Do current European lake monitoring programmes reliably estimate phytoplankton community changes? *Hydrobiologia*, Vol. 824, Pages 143–162. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3426-6>

Camoying M. et Yñiguez A. T., 2016. FlowCAM optimization: Attaining good quality images for higher taxonomic classification resolution of natural phytoplankton samples. *Limnology and Oceanography: Methods*, May 2016, Vol. 14 (5), Pages 305–314. <https://doi.org/10.1002/lom3.10090>

Graham M. D., Cook J., Graydon J., Kinniburgh D., Nelson H., Piliéci S. et Vinebrooke R. D., 2018. High-resolution imaging particle analysis of freshwater cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography: Methods*, October 2018, Vol. 16, (10), Pages 669–679. <https://doi.org/10.1002/lom3.10274>

Hrycik A. R., Shambaugh A. et Stockwell J. D., 2019. Comparison of FlowCAM and microscope biovolume measurements for a diverse freshwater phytoplankton community. *Journal of Plankton Research*, Vol. 41, Issue 6, November 2019, Pages 849–864. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbz056>

Jakobsen H. H. et Carstensen J., 2011. FlowCAM: Sizing cells and understanding the impact of size distributions on biovolume of planktonic community structure. *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 65, Pages 75–87. <https://doi.org/10.3354/ame01539>

Menden-Deuer S., Morison F., Montalbano A. L., Franzè G., Strock J., Rubin E., Heather McNair H., Mouw C. et Marrec, P., 2020. Multi-Instrument Assessment of Phytoplankton Abundance and Cell Sizes in Mono-Specific Laboratory Cultures and Whole Plankton Community Composition in the North Atlantic. *Frontiers in Marine Science*, April 2020, Volume 7, 254 p. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00254>

Patil J. S. et Anil A.C., 2015. Effect of monsoonal perturbations on the occurrence of phytoplankton blooms in a tropical bay. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 530, 2015, Pages 77–92. <https://doi.org/10.3354/meps11289>

Wacquet G., Grosjean P., Colas F., Hamad D., Artigas L. F., 2015. Version évolutive de l’outil opérationnel de numérisation et d’analyse semi-automatique d’images de phytoplancton, utilisant le matériel FlowCAM et le logiciel ZooPhytoImage. Nouvelles perspectives. *Archive Ifremer, Domaine Outils pour la surveillance environnementale, Action 9 – FlowCAM / ZooPhytoImage, Livrable 1*, 190 p.

Wang C., Wu X., Tian C., Li Q., Tian Y., Feng B., et Xiao B., 2015. A quantitative protocol for rapid analysis of cell density and size distribution of pelagic and benthic *Microcystis* colonies by FlowCAM. *Journal of Applied Phycology*, 2015, Vol. 27, Pages 711–720. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0352-0>

Mise au point opérationnelle du FlowCAM® pour l’identification et le dénombrement automatisé des cyanobactéries

Wert E. C., Dong M. M. et Rosario-Ortiz F. L., 2013. Using digital flow cytometry to assess the degradation of three cyanobacteria species after oxidation processes. *Water Research*, Vol. 47 (11), Pages 3752–3761. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.038>

Annexe 2 : Liste des cellules de passage et des objectifs utilisables avec le FlowCAM

Flow Cell Type	Depth (µm)	Width (µm)	FOV	Tubing Inner Diameter (cm)	Matching Objective(s)
FC50	50	1000		0.16	20X or 10X
FC80FV	80	570	YES	0.16	10X
FC80-7FV	80	700	YES	0.16	10X
FC90FV	90	570	YES	0.16	10X
FC100	100	2000		0.16	10X or 20X
FC200	200	2000		0.16	10X or 4X
FC300	300	3000		0.16	4X
FC300FV	300	1500	YES	0.16	4X
FC600	600	6000		0.40	4X or 2X
FC700	700	7000		0.40	4X or 2X
FC800	800	8000		0.50	4X or 2X
FC1000	1000	10000		0.50	2X
FC1000FV	1000	3000	YES	0.50	2X
FC2000X2	2000	2000		0.24	2X
FC2000X4	2000	4000		0.32	2X
FC2000X6	2000	6000		0.50	2X
FC3000	3000	9000		0.80	2X
FC4000	4000	12000		1.00	2X