



HAL
open science

Utilisation du FlowCAM[®] pour étudier les communautés phytoplanctoniques : comparaison avec les dénombrements microscopiques sur le lac de Parentis-Biscarrosse

Sylvia Moreira, Christophe Laplace-Treytore

► To cite this version:

Sylvia Moreira, Christophe Laplace-Treytore. Utilisation du FlowCAM[®] pour étudier les communautés phytoplanctoniques : comparaison avec les dénombrements microscopiques sur le lac de Parentis-Biscarrosse. INRAE - EABX. 2023, 50 p. hal-04185668

HAL Id: hal-04185668

<https://hal.inrae.fr/hal-04185668>

Submitted on 23 Aug 2023

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.



Utilisation du FlowCAM[®] pour étudier les communautés phytoplanctoniques : comparaison avec les dénombrements microscopiques sur le lac de Parentis-Biscarrosse

**Sylvia Moreira,
Christophe Laplace-Treytore**

2023



SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	3
1 Acquisition des données.....	4
1.1 Positionnement des stations d'échantillonnage.....	4
1.2 Paramètres abiotiques collectés.....	5
1.3 Paramètres biotiques collectés.....	5
1.4 Présentation du FlowCAM®	6
2 Analyse bibliographique des études utilisant le FlowCAM® pour l'étude automatisée du phytoplancton...8	
3 Développement méthodologique du FlowCAM®	10
3.1 Prétraitement de l'échantillon.....	10
3.2 Configuration de l'appareil et acquisition.....	10
3.3 Traitement et analyse des images.....	12
3.4 Validité des mesures.....	13
3.5 Constitution des bibliothèques.....	13
3.6 Classification.....	14
3.7 Calcul de l'abondance.....	15
3.8 Calcul du biovolume.....	16
4 Résultats.....	17
4.1 Identification et quantification microscopique.....	17
4.2 Répartition et quantification par la Fluoroprobe.....	19
4.3 Répartition et quantification par le FlowCAM®	20
4.3.1 Classification.....	20
4.3.2 Calcul de l'abondance et du biovolume.....	22
4.4 Comparaison des résultats des trois méthodes.....	25
4.4.1 Comparaison des richesses taxonomiques.....	25
4.4.2 Comparaison des biovolumes.....	27
4.4.3 Comparaison des biomasses.....	29
4.4.4 Comparaison des biovolumes des cyanobactéries.....	30
4.5 Intérêts du FlowCAM®	32
4.5.1 Avantages du FlowCAM®	32
4.5.2 Inconvénients du FlowCAM®	32
CONCLUSION.....	34
BIBLIOGRAPHIE.....	36
ANNEXES.....	38

INTRODUCTION

Le lac de Parentis-Biscarrosse est régulièrement confronté à des proliférations de cyanobactéries. Ce lac naturel localisé dans le département des Landes est d'un intérêt économique, écologique et touristique majeur en Aquitaine. D'une superficie supérieure à 50 hectares, il est soumis à la directive cadre Européenne sur l'eau (DCE, 2000). Le lac est classé en monomictique de profondeur moyenne, c'est-à-dire qu'il possède une phase de mélange hivernal de ses eaux et une stratification durant l'été plus ou moins marquée et longue. L'étude de la dynamique temporelle des communautés de phytoplancton a fait l'objet d'un suivi scientifique annuel entre 2010 et 2016 par l'équipe ECOVEA de l'UR EABX (Écosystèmes Aquatiques et Changements Globaux) d'INRAE Cestas-Gazinet (Gogin et Laplace-Treyture 2014 ; Laplace-Treyture et Prévost 2014 ; Laplace-Treyture et Moreira 2016 ; Moreira et al. 2016 ; Laplace-Treyture et al. 2017).

La communauté algale du lac est en majorité dominée par le groupe des cyanobactéries et dans une moindre mesure par les diatomées et quelques chlorophycées. Les cyanobactéries sont, présentes tout au long de l'année avec des biomasses et des proportions variables et peuvent dominer fortement la communauté phytoplanctonique en janvier. Très peu présentes en avril et en mai, elles constituent de nouveau la majeure partie de la communauté dès le mois de juin et ce jusqu'en novembre. Vingt-huit taxons différents de cyanobactéries ont été identifiés sur ce plan d'eau en 2016 dont de nombreuses espèces filamenteuses ou coloniales de taille importante connues pour potentiellement pouvoir produire des toxines. Les genres *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* et *Microcystis* potentiellement toxiques sont les plus fréquents. Cependant, aucune toxine n'a été détectée dans les différents échantillons prélevés lors du suivi entre 2010 et 2016 (Laplace-Treyture et al. 2016).

Depuis 2013, l'équipe ECOVEA collabore régulièrement avec les gestionnaires des plans d'eau aquitains face à des épisodes récurrents de prolifération de cyanobactéries sur les zones de baignade afin de mettre en place des protocoles alternatifs de surveillance et d'alerte plus réactif et plus exhaustif que la réglementation. En effet, le suivi réglementaire de la communauté phytoplanctonique est effectué en laboratoire par des observations au microscope optique à partir d'un prélèvement d'échantillon. Les données taxinomiques sur la composition du phytoplancton sont importantes pour les études écologiques, cependant, de telles informations ne sont pas faciles à obtenir. L'observation microscopique consiste à dénombrer et identifier les genres voire les espèces algales présentes selon des clés de détermination basées sur les traits morphologiques des individus. Cette analyse chronophage requiert d'importantes compétences taxonomiques et comporte un délai de réponse d'au moins 36 heures. De plus, elle engendre souvent des coûts financiers importants notamment lors de suivi de multiples zones. Ainsi, l'utilisation de technologies analytiques avancées pourrait permettre une meilleure connaissance et gestion de ces milieux aquatiques par la surveillance à haute fréquence et à moindre coût de la dynamique des populations de micro-algues.

Le FlowCAM® (Yokogawa Fluid Imaging Technologies) a fait son apparition sur le marché en 1998 dans le but d'observer, de compter et de différencier de manière semi-automatisée en quelques minutes des particules en suspension (biologiques ou non) de quelques micromètres à quelques millimètres. Cet outil, de laboratoire, combine les capacités sélectives d'un cytomètre de flux, de microscopie et de détection de fluorescence et permet l'archivage des observations faites par l'enregistrement des images générées

(Ezzedine 2015, Moreira et al. 2019, Barré 2020). La présente étude vise, pour l'équipe ECOVEA de l'UR EABX d'INRAE, à la mise au point opérationnelle du FlowCAM® pour l'identification et le dénombrement semi-automatisés des cyanobactéries à partir d'échantillons naturels récoltés in-situ sur le lac de Parentis-Biscarrosse. Elle doit aussi permettre la comparaison des résultats du FlowCAM® avec les dénombrements microscopiques (méthode par microscope inversé, normalisée) et avec les quantifications obtenues par une sonde fluorimétrique de terrain. Le FlowCAM® pourrait être dans l'avenir utilisé pour des recherches sur l'état écologique des plans d'eau menées par l'équipe.

De plus, cette étude s'inscrit dans le projet LASHA (*LABoratory to Satellite experiments for remote sensing of Harmful Algae*) du pôle R&D ECLA¹, visant aux développements d'outils de télédétection pour la surveillance des algues et cyanobactéries toxigènes. La présente étude va fournir des résultats de dénombrements phytoplanctoniques parmi d'autres données de terrain servant au calage des modèles de télédétection.

1 Acquisition des données

1.1 Positionnement des stations d'échantillonnage

Sept stations réparties sur le lac de Parentis-Biscarrosse ont été échantillonnées le 20 septembre 2022. Ces points ont été choisis pour avoir une bonne couverture du plan d'eau et une bonne représentativité des zones favorables et sujettes à la présence régulière et importante de cyanobactéries et/ou favorables à leur accumulation (positionnement de la zone par rapport aux vents, morphologie de la zone de baignade, etc.). Les coordonnées géographiques des stations sont listées dans le Tableau 1 et la carte de la Figure 1.

Tableau 1: coordonnées GPS des stations de mesures sur le lac de Parentis-Biscarrosse (40) en Lambert 93 (m)

STATION	X-EST	Y-NORD
1	366703	6373780
2	366864	6369453
3	366759	6367243
4	369137	6368903
5	371898	6368776
6	373094	6368486
7	368718	6370291

1 ECLA: Pôle de Recherches & Développement sur les Ecosystèmes Lacustres réunissant l'OFB, INRAE et l'université Savoie Mont Blanc



Figure 1: carte de positionnement des stations de mesures et de prélèvements sur le lac de Parentis-Biscarrosse (40) lors de la campagne du 20 septembre 2022

1.2 Paramètres abiotiques collectés

Sur chacune des stations définies a été réalisée une mesure de la profondeur à l'aide d'un échosondeur (modèle Garmin 188C) et de la transparence de l'eau par l'utilisation d'un disque de Secchi de diamètre 20 cm (NF EN ISO 7027 2000). Les données récoltées ont été répertoriées dans un tableur informatique.

1.3 Paramètres biotiques collectés

La communauté phytoplanctonique a été étudiée selon trois approches : in situ au moyen d'un fluorimètre de terrain, en laboratoire par microscopie et à l'aide d'un FlowCAM®. Ainsi les résultats des trois approches pourront être discutés et comparés.

La quantité de biomasse algale totale et sa répartition au sein des quatre principaux groupes algaux (chlorophycées, cyanobactéries, diatomées, cryptophycées) a été estimée par l'emploi d'un fluorimètre de terrain (BBE Fluoroprobe® Moldaenke). Les données sont obtenues en équivalent de chlorophylle-a. Trente mesures consécutives ont été réalisées sur chaque échantillon récolté en subsurface et placé dans le tube de mesure de la sonde afin d'obtenir une valeur moyenne comparable avec les résultats obtenus par microscopie et par le FlowCAM®.

Ensuite, deux prélèvements d'eau de 180 ml fixés à 0,5 % au Lugol alcalin ont été recueillis sur chaque échantillon analysé avec la Fluoroprobe® afin d'être conservés pour l'analyse ultérieure du phytoplancton en laboratoire. Deux méthodologies ont été menées en parallèle afin d'établir l'analyse qualitative (liste des espèces ou genres rencontrés) et quantitative des peuplements phytoplanctoniques.

La première en suivant la norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscope inversé (NF EN 15204 2006). Les déterminations ont été effectuées dans la mesure du possible au niveau spécifique (à l'aide des ouvrages de taxinomie disponibles). Les échantillons ont été comptés à l'aide du logiciel de comptage du phytoplancton - PHYTOBS v3.2.3 permettant le calcul de l'abondance (nombre de cellules par millilitre) et du biovolume/biomasse (milligramme par litre) de chaque espèce ainsi que l'export des données. Ce logiciel est conforme à la norme citée ci-dessus et respecte le protocole standardisé d'échantillonnage et de dénombrement du phytoplancton dans les plans d'eau (Laplace-Treytore et al. 2017) élaboré pour la mise en œuvre de la DCE.

La deuxième, en utilisant un FlowCAM® pour étudier les mêmes échantillons et ainsi contribuer à sa mise au point opérationnelle.

En effet, la configuration du FlowCAM® est à déterminer pour permettre une observation semi-automatisée optimale du phytoplancton, dont les cyanobactéries, et être intégré comme un outil complémentaire dans le cadre des projets de recherche de l'équipe ECOVEA sur les plans d'eau. Différentes étapes étaient à réaliser afin d'atteindre cet objectif : (i) analyser la bibliographie disponible pour identifier les paramètres généraux valides de calage du FlowCAM®, (ii) définir le paramétrage du FlowCAM® pour l'observation semi-automatisée des échantillons du lac de Parentis-Biscarrosse fixés au lugol alcalin, (iii) acquérir la méthodologie pour l'analyse et le traitement des données acquises dans le but de classifier les individus par taxons et enfin (iv) évaluer la pertinence des résultats obtenus notamment en les comparant avec ceux produits avec les deux autres méthodes.

1.4 Présentation du FlowCAM®

L'équipe ECOVEA s'est dotée en 2013 d'un FlowCAM® Benchtop B3 series VS-IV pourvu des objectifs x4, x10, x20 et d'une caméra couleur 1280 x 960 pixels (Figure 2). Cet outil est pourvu d'un ordinateur interne et d'un logiciel spécifique (VisualSpreadSheet® version 3.4.10) qui permet de configurer l'appareil, d'acquérir des images, de réaliser le post-traitement des images collectées et de classifier des particules observées dans les images.

Le principe de fonctionnement de ce modèle est le suivant. Un échantillon sous forme liquide, est introduit par aspiration grâce à une pompe à seringue dans le système de l'appareil via un cône d'admission. Il traverse ensuite une chambre de passage Flowcell (FC) orientée verticalement par l'intermédiaire d'un fin tuyau en silicone. La FC est maintenue par un support qui permet d'aligner cette dernière dans le champ de vision de l'objectif. La pompe permet de contrôler le débit de pompage de l'échantillon liquide à travers le circuit. Elle influe à la fois sur la qualité de l'image et le nombre de particules qui traverse la FC.

Derrière l'objectif, une caméra couleur capture une image comprenant les particules observées dans le champ. L'ensemble, objectif et caméra, grossit les particules jusqu'à 200 fois. Leur taille réelle est fournie par l'appareil selon le facteur de calibration renseigné (microns par pixel). Les groupes de pixels qui

représentent les particules sont ensuite « segmentées » sur chaque image brute et enregistrées avec toutes les mesures de paramètres associés. Une fois analysé, le liquide part dans un récipient poubelle ou est injecté dans la FC pour une autre analyse par le biais de la seringue.



Figure 2: photo du système FlowCAM®

Le logiciel VisualSpreadSheet® permet d'établir des filtres et des bibliothèques spécifiques pour l'identification et le dénombrement semi-automatique de certains groupes d'objets à partir des images sélectionnées et selon les paramètres définis par l'opérateur. Ces images donnent accès à 64 paramètres de mesures (taille, forme, etc.) permettant ainsi de les classer à partir d'algorithmes statistiques de reconnaissance de formes. Dans ce système, les particules sont imagées dans un espace bidimensionnel lorsqu'elles se déplacent dans la cellule d'écoulement.

L'identification précise et exhaustive des particules analysées requiert donc l'obtention d'images de bonne qualité. Elle 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 FC, objectif utilisé, vitesse d'écoulement, fréquence de prise d'image, etc.) (Barré 2020).

À savoir que l'appareil dispose de deux modes de détection des particules : le mode *Trigger* et le mode *Auto-Image*. 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 *Auto-image* la caméra est configurée pour capturer des images brutes selon un intervalle de temps défini par l'utilisateur. Le mode *Trigger* impose alors pour l'étude du phytoplancton de disposer d'échantillons non fixés par un conservateur alors que le mode *Auto-Image* accepte aussi bien des échantillons bruts que fixés. Le choix de la cellule de passage (FC) est aussi défini par la taille des particules présentes dans l'échantillon, de même que par le grandissement de l'objectif.

Il existe également deux catégories de FC :

- Les cellules standards. Le champ de vision et d'acquisition de la caméra ne couvre qu'une partie de la largeur du champ de passage de la FC.
- Les cellules Field Of View (FOV). Le champ de vision et d'acquisition de la caméra couvre toute la largeur de la FC, ce qui conduit à une meilleure capture des particules dans l'échantillon et donc à une représentation plus précise de la densité cellulaire. Elle est utilisée en règle générale lorsque l'échantillon est peu concentré (<1 000 particules/ml) ou qu'un comptage exact est nécessaire.

2 Analyse bibliographique des études utilisant le FlowCAM® pour l'étude automatisée du phytoplancton

La revue scientifique d'Owen et al. 2022 a évalué l'exhaustivité de la méthodologie FlowCAM® pour imager le phytoplancton rapportés dans 116 études publiées entre 2017 et 2020. L'objectif de cette recherche était d'identifier les étapes clés pour garantir des résultats fiables, comparables et reproductibles. Au cours des deux dernières décennies, il y a eu un recours croissant aux technologies de collecte de données automatisées ou semi-automatisées. Les résultats des études utilisant ces dispositifs dépendent de nombreux aspects très précis tels que les configurations matérielles et logicielles, les méthodes employées, en particulier lorsqu'on les compare aux techniques traditionnelles.

Il existe différents modèles de FlowCAM® avec leur ensemble unique de spécifications techniques (cellule de passage, caméra, objectifs, type de pompe, etc.). Cet article scientifique a identifié au sein de chaque publication le contexte de l'étude, les étapes de préparation des échantillons en amont de l'analyse, la configuration de l'appareil et paramètres utilisés pour l'analyse des échantillons. Il a enfin examiné les résultats obtenus ainsi que les limites et les perspectives identifiées. À savoir que l'utilisateur fait de nombreux choix lors de l'utilisation du FlowCAM® qui conditionnent la qualité des résultats :

- Spécifications techniques des éléments (ex : cellule de passage, objectif, etc.) ;
- Préparation des échantillons (ex : filtration, dilution, désintégration des colonies, etc.) ;
- Types de traitement d'acquisition des données (ex : méthode d'analyse et de capture, etc.) ;
- Post-traitement des images (ex : filtre de mesure, bibliothèques d'images, etc.) ;
- Exploitation des résultats.

La publication rapporte que les études fournissent un contexte limité ou inexistant sur la façon dont l'appareil a été utilisé et différent sensiblement dans le détail des méthodes rendant les comparaisons entre les études difficiles. Ce qui est nuisible à la reproductibilité et donc à la confiance dans l'exactitude des résultats.

Plusieurs études ont montré que la composition de l'échantillon (taxonomie, taille des cellules, densité cellulaire ou présence de sédiments) et sa conservation ont un impact majeur sur la précision et en particulier sur les estimations automatisées de la densité cellulaire. En effet, les échantillons passent dans un tube fin (la cellule d'écoulement ou FC) dont la profondeur varie de 50 à 2 000 µm, ce qui nécessite généralement un pré-filtrage pour éviter les problèmes de colmatage. Pour les échantillons de phytoplancton comportant des taxons de différentes classes de taille, de meilleures performances de traitement et des images de meilleure qualité peuvent être obtenues en filtrant en série les échantillons. Ainsi, les différentes classes de taille de phytoplancton peuvent être imagées séparément en utilisant une série de FC et d'objectifs de microscope de taille différente. Cependant cette méthodologie reste très chronophage.

Ensuite, il peut être nécessaire d'ajuster la concentration de l'échantillon, car le mode *Auto-Image* fonctionne mieux avec des échantillons denses (limités uniquement par les particules qui se chevauchent), tandis que le mode déclenché par fluorescence (*Trigger*) nécessite des échantillons dilués. A savoir que, le mode *Auto-Image* a tendance à sous-estimer l'abondance des cellules. Graham et al. (2018) ont constaté que les estimations de densité cellulaire de cyanobactéries Auto-imaginées étaient significativement similaires aux estimations par microscopie uniquement lorsque la densité cellulaire était < 100 000 cellules/ml.

La conservation des échantillons de phytoplancton affecte également les paramètres de capture qui peuvent être utilisés car la plupart des méthodes de préservation interdisent l'utilisation du mode de capture déclenché par fluorescence. Il a également été constaté que la préservation à l'aide d'une solution de Lugol augmentait considérablement le nombre de cellules de taxons observés par le FlowCAM® en réduisant l'adhésion des taxons à la FC ce qui augmente le ratio de cellules comptées par rapport aux échantillons frais.

Plusieurs études ont rapporté que les images produites par l'appareil, même lorsqu'elles sont classées manuellement, ne fournissent pas des résultats comparables, en termes de composition des échantillons de plancton, à ceux obtenus par des analyses microscopiques traditionnelles. D'autres études ont trouvé que, bien que les résultats étaient comparables à ceux de la microscopie, la résolution taxonomique était inférieure ou supérieure. Il est donc difficile de déterminer ce qui a pu causer ces résultats contradictoires.

3 Développement méthodologique du FlowCAM®

3.1 Prétraitement de l'échantillon

Une inspection initiale de l'échantillon au microscope optique standard est à réaliser systématiquement au préalable pour déterminer la configuration adaptée de l'appareil (cellule de passage, objectif, paramètres d'acquisition, etc.) ainsi que la préparation des échantillons en amont des mesures. Cette observation consiste à définir la composition taxonomique globale, la distribution des tailles (minimales et maximales) et à avoir une idée de l'abondance des genres ou espèces dominants. Pour rappel, la préparation de l'échantillon (filtration, dilution ou concentration) assure que l'analyse ne soit pas perturbée par des problèmes liés au colmatage du système ou à l'agrégation des cellules algales.

La présence d'espèces coloniales et filamenteuses de cyanobactéries (de 70 à 150 μm) d'une densité assez faible et de nombreux débris lors de l'observation microscopique de l'échantillon 1T a démontré qu'il était nécessaire de préfiltrer et de concentrer les échantillons en amont de l'analyse au FlowCAM®.

3.2 Configuration de l'appareil et acquisition

Les informations suivantes sont tirées du rapport d'Ezzedine (2015). Les paramètres de détection et d'acquisition des particules sont différents selon l'organisme étudié (taille, morphologie, etc.). Ils dépendent donc de la nature de l'échantillon qui sera déterminé au préalable par la microscopie optique. Plusieurs autres facteurs peuvent affecter également la qualité des résultats tels que la concentration cellulaire, le débit de l'échantillon et la fréquence d'acquisition des images. Le volume final analysé est déterminé en fonction du champ de vision de la caméra, de la profondeur de la FC et de la concentration des particules. La concentration de particules de l'échantillon est déterminée en divisant le nombre total de particules imagées (comptées) par le volume total du fluide de l'échantillon imagé. Pour que l'analyse ne soit pas limitée par des problèmes d'ordre technique, les dimensions (longueur x profondeur) de la cellule de passage doit être choisie en adéquation avec la taille des cellules obtenue à observer. Plus précisément, la profondeur (depth) de la FC 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 (x4, x10, ou x20). Plus le facteur de grossissement de ce dernier est élevé, plus la taille des cellules capturées sera faible. Le FlowCAM® dispose d'une large gamme de cellules de passage dont la profondeur varie de 50 μm à 600 μm et la largeur de 570 à 6000 μm . Les couples objectif / FC sont recommandés par le fournisseur.

Une fois ces éléments installés deux paramètres primordiaux restent à déterminer pour la détection : la luminosité du fond et les seuils de détection noir et blanc de la particule (Pixels). La couleur du fond passe par la modification du gain de la caméra. Le gain défini en niveaux de gris l'arrière-plan. Il est préférable de choisir un niveau de gris le plus neutre possible. À chaque nouvelle valeur du gain, une intensité moyenne du fond est attribuée. Le constructeur préconise une intensité moyenne autour de 180 pour une caméra couleur. Le mode *Auto-Image* est recommandé pour l'analyse de cellules préservées au Lugol puisqu'il n'a plus de possibilité de mesure par fluorescence chlorophyllienne (mode *Trigger*) du fait de la mort des cellules lors de la fixation. Indépendamment du mode d'analyse utilisé, le passage des échantillons est

également fonction de plusieurs variables telles que la durée de l'analyse, le nombre d'images capturées par seconde (Frame Per Seconde FPS) ou encore le volume imagé conditionné par le volume injecté et le débit (Flow Rate).

Le FlowCAM® est utilisé dans ce projet à des fins de comptage, une cellule de flux FOV80 et l'objectif correspondant x10 ont été choisis pour l'observation et l'analyse des cyanobactéries (tailles des organismes comprises entre 4 et 570 µm) des échantillons du lac de Parentis-Biscarrosse.

Au préalable des analyses, une préfiltration de l'échantillon a été faite sur une toile nylon de 500 µm pour éviter le colmatage dans la FC lors de l'analyse. 100 ml de chaque échantillon ont ensuite été concentrés 30 fois (récupération d'un filtrat de 3,33 ml) par l'usage d'ampoule à décanter. La phase de sédimentation a varié de 72 h à 96 h afin de déterminer le temps le plus adapté. Pour chaque échantillon, les filtres ont été observés au microscope droit optique à x10 ou x20 pour s'assurer de ne pas avoir éliminé de grosses colonies cyanobactériennes d'intérêt.

La cellule FOV, le volume, le débit et le FPS utilisés permettent d'estimer que le temps de passage d'1 ml d'échantillon est de 25 minutes et d'avoir une valeur d'efficacité acceptable. Cette dernière décrit le rapport entre le volume d'eau imagé et le volume total de l'échantillon. Ici, elle est supérieure à 65 % pour nos échantillons. Les données ont été traitées afin de tendre le plus possible vers la méthode microscopique (volume d'échantillon sédimenté et mis en observation de 10 ml).

Le mode d'acquisition *Auto-Image* a été choisi puisque les échantillons sont fixés au Lugol. À savoir que, le processus de fixation au Lugol peut entraîner aussi une réduction du biovolume des cellules présentes (Barré 2020). Les figures suivantes (Figure 3) illustrent les paramètres contextuels principaux utilisés pour la détection des particules.

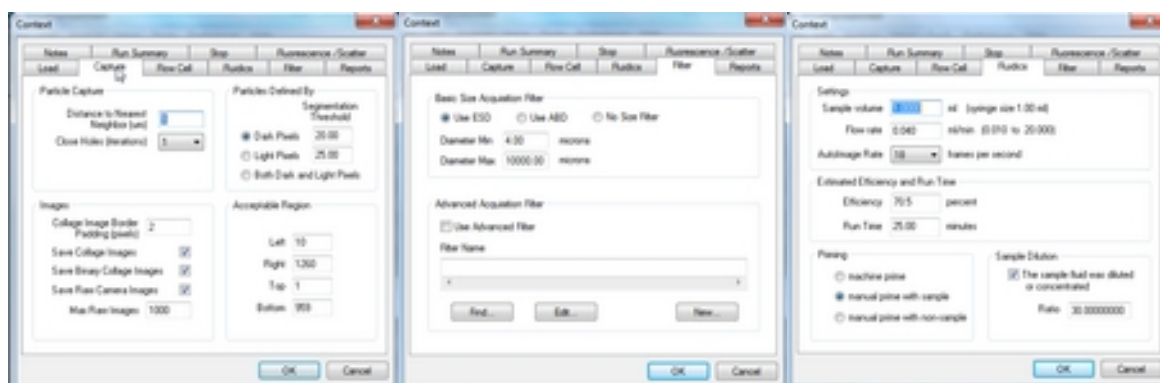


Figure 3 : paramètres contextuels des onglets *Capture*, *Filter* et *Fluidics* du FlowCAM® pour l'analyses des échantillons du lac de Parentis-Biscarrosse (40)

Dans la fenêtre *Capture* de la Figure 3, la distance du voisin le plus proche a été fixée à 1 µm pour l'objectif x10 afin de garantir que les espèces coloniales soient imagées par colonie et non par cellules individuelles. 2 ml (1 ml en duplicat) de chaque échantillon ont été analysés.

3.3 Traitement et analyse des images

Le FlowCAM® génère une photothèque d'images d'échantillons d'algues au format .tif comme celles illustrées dans la Figure 4. Les formes caractérisées et les paramètres morphologiques des images d'algues sont utilisés pour l'identification et la classification appropriées des espèces. Chaque particule photographiée a une ligne associée dans un fichier de sortie (tableur) qui correspond à toutes les mesures effectuées sur cette particule. Il est ainsi possible d'examiner n'importe quelle image de particule et d'afficher automatiquement toutes les mesures associées. Le logiciel permet d'effectuer des opérations de tri et de filtrage sur les données et d'avoir un résumé des statistiques associées (moyennes, écarts types, coefficient de variation, etc.).

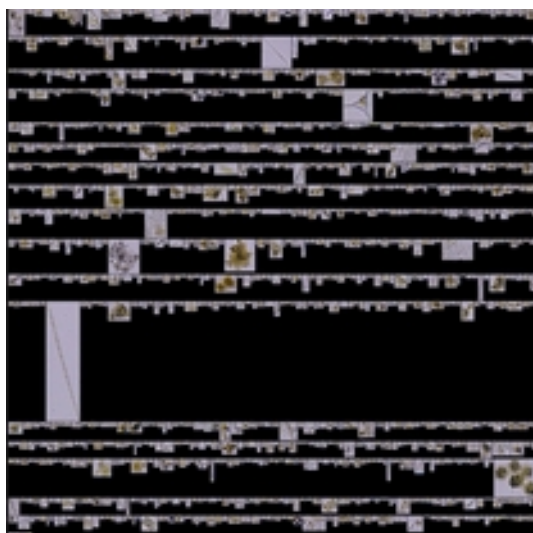


Figure 4: exemples d'images prise par le FlowCAM® sur l'échantillon 7T du lac de Parentis-Biscarrosse (40) le 20 septembre 2022

Le logiciel applique les paramètres contextuels définis par l'opérateur et traite l'image brute. Dans une image en niveaux de gris comme dans la technologie du FlowCAM® chaque pixel de l'image se voit attribuer une valeur correspondant à son intensité entre 0 (noir) et 255 (blanc). L'échelle de gris de chaque pixel est ensuite comparée au niveau normal du fond (paramétré par le gain de la caméra) et si la différence dépasse la valeur seuil (*Threshold*) défini par l'utilisateur, le pixel est compté comme un "pixel de particule". Cela crée une représentation "binaire" de l'image originale, où chaque pixel est classé soit comme "fond", soit comme "particule" (présente ou non). L'image binaire est ensuite scannée par le logiciel pour regrouper les pixels adjacents qui ont été classés comme "particule", ce qui crée des groupes de pixels représentant chaque particule. Une image binaire est définie à partir de sa teinte en codifiant cette plage de 0 à 255 à une simple valeur « on/off » où 0 = noir et 1 = blanc. Par exemple pour un seuil à 150, chaque pixel ayant une valeur d'échelle de gris de 150 ou plus se voit attribuer une valeur binaire de 1 ou blanc tandis que chaque pixel inférieur à 150 se voit attribuer une valeur binaire de 0 ou noir. Il est donc nécessaire de définir avec précision les limites de l'objet que l'on souhaite mesurer et définir un seuil pour la couleur de la matrice de fond c'est-à-dire sans particules.

3.4 Validité des mesures

Ainsi, après chaque acquisition d'un échantillon, les mesures suivantes ont été vérifiées pour s'assurer de la qualité des images capturées :

- Distribution homogène des particules le long des axes de capture x et y de la FC ;
- Superposition des images binaires (l'image binaire est superposée à l'image de collage originale). Cette option sert à extraire les propriétés des particules. Les résultats peuvent être utilisés pour ajuster les paramètres contextuels afin d'optimiser la capture des particules ;
- Tracé du bord de la particule. Les pixels qui composent une particule sont déterminés par le processus de segmentation en fonction des seuils spécifiés par l'utilisateur. Ainsi, lorsque le tracé du bord de la particule est activé, les pixels du bord (limite extérieure) de chaque particule sont affichés avec une valeur définie par l'utilisateur. Si la trace présentée par le logiciel ne correspond pas à la forme de la cellule il faut revoir les paramètres du gain et le Threshold.

3.5 Constitution des bibliothèques

Dans le système d'analyse des particules par imagerie, des attributs d'échelle de gris sont définis tels que l'intensité moyenne et la transparence. La superficie d'une particule est mesurée par rapport au nombre de pixel représentant la forme de la particule selon le seuil défini. Les particules à l'intérieur sont colorées selon une image en niveau de gris. À savoir, des "trous" peuvent se produire dans les images de particules binaires définies comme zone transparente. Dans ce cas, le centre de la particule est "plus clair" et plus proche du niveau de l'échelle de gris du fond. Cette observation est variable et fonction des réglages de niveaux de gris effectués lors de l'acquisition. Il est important d'être conscient de ces "trous" dans les images binaires car ils affectent certaines des mesures des particules. Après l'observation des images acquises sur l'ensemble des échantillons, on observe que l'appareil détecte correctement les cellules de microalgues, mais présente l'inconvénient de pouvoir également détecter des particules indésirables comme des flocs, des bulles d'air et des débris.

L'étape de constitution d'une bibliothèque d'images (ensemble de bibliothèques) est importante dans l'optimisation de la classification automatique. Le nombre d'images inclus dans les bibliothèques a un impact sur la précision des auto-classifications. Le fabricant préconise un nombre d'images par bibliothèque (groupe taxonomique ou taxon donné) compris entre 30 et 100. Cette valeur est plus élevée lorsque la variabilité morphologique des cellules du taxon est importante, notamment pour les espèces coloniales. Les images sélectionnées doivent représenter de manière significative la variabilité naturelle d'un taxon donné, que celle-ci soit intrinsèque (taille des cellules, état physiologique, forme des extensions, longueur des colonies), ou extrinsèque (position du taxon par rapport à l'objectif au moment de l'acquisition d'image, netteté de l'image). Idéalement, il faudrait acquérir un nombre équivalent d'images pour chaque bibliothèque constituées car les bibliothèques qui contiennent un nombre déséquilibré d'images par bibliothèque créée influent sur la représentativité d'un paramètre pour différencier un taxon d'un autre lors de l'étape d'auto-classification.

Aucune bibliothèque d'images était existante, une banque a été créée à partir des images collectées sur l'ensemble des sept stations. Vingt-huit bibliothèques ont été bâties comprenant d'une à 98 images. 10 taxons ont été identifiés pour les algues vertes, 8 pour les diatomées, 7 pour les cyanobactéries, 1 pour les

euglènes et les chrysophycées respectivement ainsi qu'une indéterminée. Les bibliothèques ont été identifiées et définies par taxon en raison des contraintes liées à l'identification du phytoplancton avec cette méthodologie. Une fois constituées, les bibliothèques restent utilisables au fil du temps. Chaque bibliothèque est caractérisée par différentes valeurs de propriétés de particules (taille, forme, etc.). Le logiciel classe automatiquement les particules capturées par la caméra selon les filtres de bibliothèques définies contenues dans la bibliothèque. Le nombre et le type de propriétés des particules utilisées par l'algorithme pour l'auto-classification ont également un impact direct sur la précision du résultat. Une plus grande précision étant observée pour un nombre plus faible de propriétés des particules (Owen et al. 2022). Quinze paramètres de mesure ont été sélectionnés pour constituer le « filtre valeur » de chaque bibliothèque (cf. Figure 5).

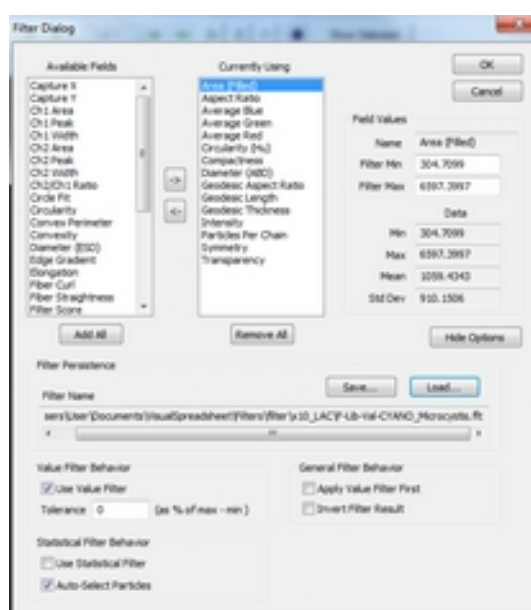


Figure 5: composition du filtre de la bibliothèque d'images du genre *Microcystis*

3.6 Classification

Pour améliorer l'étape finale d'auto-classification des échantillons, les cellules mortes (les individus vides ou sénescents), les débris, les images en double et les particules non identifiées ont été éliminés au préalable pour les sept échantillons par un filtre de positionnement horizontal et de diamètre ABD (« Area Based Diameter » : diamètre d'un cercle équivalent à la particule une fois que les zones vides internes ont été retirées).

Une partie minoritaire des images obtenues sont floues étant donné que l'objectif du microscope et l'appareil photo numérique ne peuvent être parfaitement focalisés que sur un seul plan à l'intérieur de la FC. Certaines images étaient également incomplètes. Une copie de l'enregistrement contenant uniquement les particules identifiées comme appartenant au phytoplancton a été effectuée.

Un premier modèle de classification a été défini à partir des 28 libraires définies selon les filtres de valeurs des 15 paramètres sélectionnés. Aucune stratégie n'a été appliquée concernant l'ordre lecture des librairies. L'auto-classification par le logiciel s'est concentrée uniquement sur les échantillons 6 et 7 (6T et 7T) contenant le maximum de particules de phytoplancton observées. Cette différence s'explique par le temps de sédimentation qui a été plus long soit 96 heures pour ces deux échantillons contre 72 heures pour les autres.

Une seconde classification automatique a été testée avec un deuxième modèle de classification défini à partir de 24 libraires basées cette fois-ci sur des filtres de statistiques des 15 paramètres sélectionnés (cf. Figure 5). Pour réaliser un filtre de statistiques la librairie doit contenir à minima deux images c'est pourquoi le nombre de librairies est inférieur à la première auto-classification (24 au lieu de 28 initialement). Les librairies ont été organisées selon un ordre précis : cyanobactéries, chlorophycées, diatomées, euglènes, chrysophycées et genre indéterminé. Il est en effet important de classées les librairies par ordre d'intérêt pour l'étude : du taxon/librairie ayant le plus grand intérêt vers celui ayant le moins d'intérêt pour l'étude.

Les résultats des auto-classifications obtenus par le logiciel ont montré qu'il restait encore un gros travail de tri à réaliser manuellement par l'opérateur. Certains individus pouvant être mal catégorisés bien que leur image soit incrémentée dans une des librairies. L'ordre de lecture des librairies a donc un impact très fort sur les classifications automatiques. De plus, une grande majorité des particules n'a pas été classée. Pour améliorer la représentation des librairies il faut :

- Constituer plusieurs libraires distinctes pour les taxons présentant une diversité morphologique importante. Par exemple, par vue, transparence ou taille, etc. ;
- Mettre en priorité les taxons d'intérêt dans le modèle de la méthode d'auto-classification ;
- Utiliser des filtres statistiques basés sur les statistiques dérivées plutôt que les filtres de valeurs pour définir les bibliothèques.

3.7 Calcul de l'abondance

Les estimations du nombre total de cellules cyanobactériennes et de la biomasse doivent être calculées selon la méthode de Graham et al. 2018.

La surface totale (ABD) de toutes les particules capturées appartenant à une espèce coloniale ou filamenteuse particulière doit être d'abord déterminée en les triant et en les sauvegardant dans un fichier de liste (LST). Ensuite, des comptages manuels de cellules de quelques-unes des images capturées sont effectués pour estimer l'ABD moyen par cellule. L'ABD total est divisé par l'ABD moyen par cellule pour calculer le nombre total de cellules par unité de volume d'échantillon. Cette valeur peut ensuite être converti en biomasse ou biovolume en faisant correspondre les morphologies avec les formes géométriques les mieux adaptées et leur formule volumétrique.

3.8 Calcul du biovolume

Dans la littérature, les comparaisons directes entre les calculs de biovolumes avec le FlowCAM® et les estimations de biovolumes au microscope sont peu abondantes et plus courantes dans les systèmes marins qu'en milieu d'eau douce.

Certaines comparaisons ont examiné différentes classes de taille de phytoplancton marin plutôt que des groupes taxonomiques ou ciblé une seule espèce de phytoplancton formant des efflorescences plutôt que des communautés entières de phytoplancton. Le logiciel du FlowCAM®, calcule le biovolume en utilisant le diamètre basé sur la surface (ABD), le diamètre sphérique équivalent (ESD) ou les biovolumes spécifiques à la forme (c'est-à-dire cylindrique, sphérique ou ellipsoïde).

L'ABD et l'ESD estiment le biovolume en fonction du volume d'une sphère qui représente chaque particule, mais estiment le diamètre de la sphère à l'aide de méthodes différentes.

La méthode ABD regroupe tous les pixels censés représenter la particule dans un cercle plein, puis utilise le diamètre de ce cercle pour calculer le volume d'une sphère.

L'ESD prend la moyenne de 36 mesures transversales comme diamètre du cercle à partir duquel le volume sphérique est calculé. Le calcul ABD du diamètre dans VisualSpreadsheet a tendance à être privilégié (Hrycik et al. 2019).

4 Résultats

4.1 Identification et quantification microscopique

Les échantillons étudiés par microscopie permettent d'obtenir des informations sur la composition des communautés (richesse et répartition au sein des principaux embranchements phytoplanctoniques) ainsi que sur la biomasse (ou biovolume) de matière présente également au sein des embranchements. Dans les échantillons de subsurface (1T à 7T prélevés dans le tube de mesure de la Fluoroprobe) prélevés le 20 septembre 2022, les richesses varient de 38 à 48 taxons avec les valeurs les plus faibles sur les stations 3 et 4 et les plus élevées sur les stations 5 et 6 (Figure 6). Cela représente alors une richesse moyenne de 43 taxons sur le site.

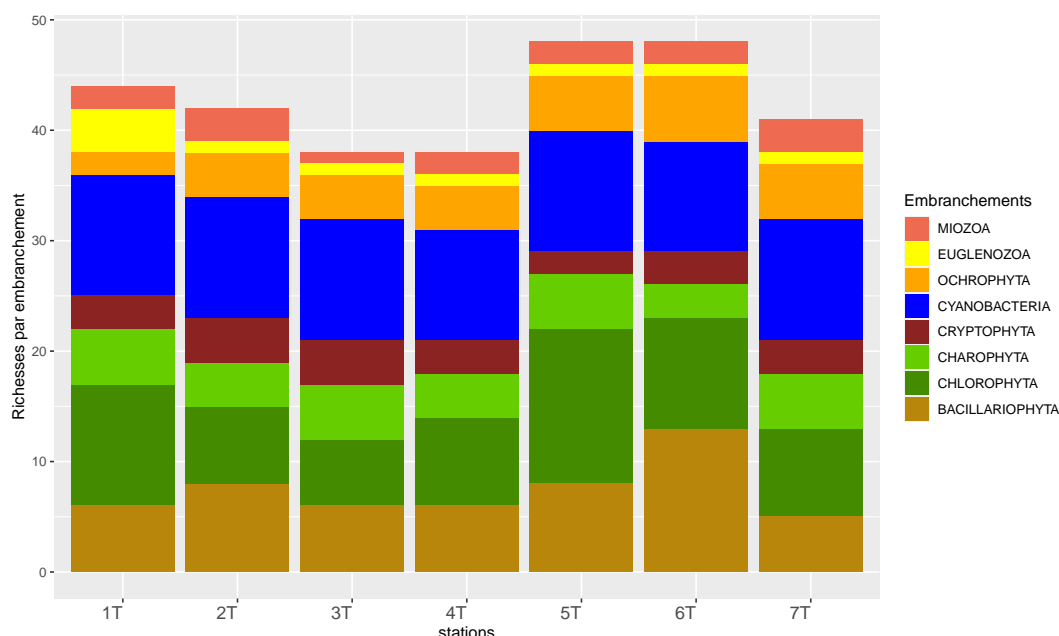


Figure 6: richesses taxonomiques par embranchement des échantillons de phytoplancton prélevés le 20 septembre 2022 sur les sept stations du lac de Parentis-Biscarrosse (40)

Comme l'illustre la Figure 6, le groupe taxonomique des algues vertes (Charophyta et Chlorophyta) est le plus abondant. Il représente de 26 à 39 % des communautés présentes pour respectivement les stations 3 et 5. Cela représente de 11 à 19 espèces (voir le détail en Annexe 1). Les cyanobactéries (Cyanobacteria) arrivent en second dans la répartition sur chacune des stations avec 21 à 29 % (station 6 et 3) soit 10 à 11 espèces différentes par station. 5 à 13 taxons de diatomées (Bacillariophyta), soit 12 à 27 %, composent ensuite les échantillons. Les autres groupes taxonomiques sont nettement moins présents et ne comprennent qu'un à six taxons par échantillon.

En quantité de matière, c'est-à-dire en biovolume, les répartitions au sein des embranchements s'avèrent différentes (Figure 7). Voir aussi le détail de la répartition des biovolumes en Annexe 2. Tout d'abord lors de la campagne, le biovolume moyen toutes stations confondues est de $1,44 \text{ mm}^3/\text{l}$ avec la plus faible valeur pour la station 1 ($1,06 \text{ mm}^3/\text{l}$) et la plus forte pour la station 4 ($2,75 \text{ mm}^3/\text{l}$). Le groupe des algues vertes reste néanmoins dominant avec des proportions qui fluctuent de 29,5 % à 75 % du biovolume total pour les stations 2 et 4 ce qui représente de $0,38 \text{ mm}^3/\text{l}$ à $2,07 \text{ mm}^3/\text{l}$. Ce sont surtout les desmidiées (Charophyta) qui composent la majorité du biovolume de ce groupe notamment en station 4.

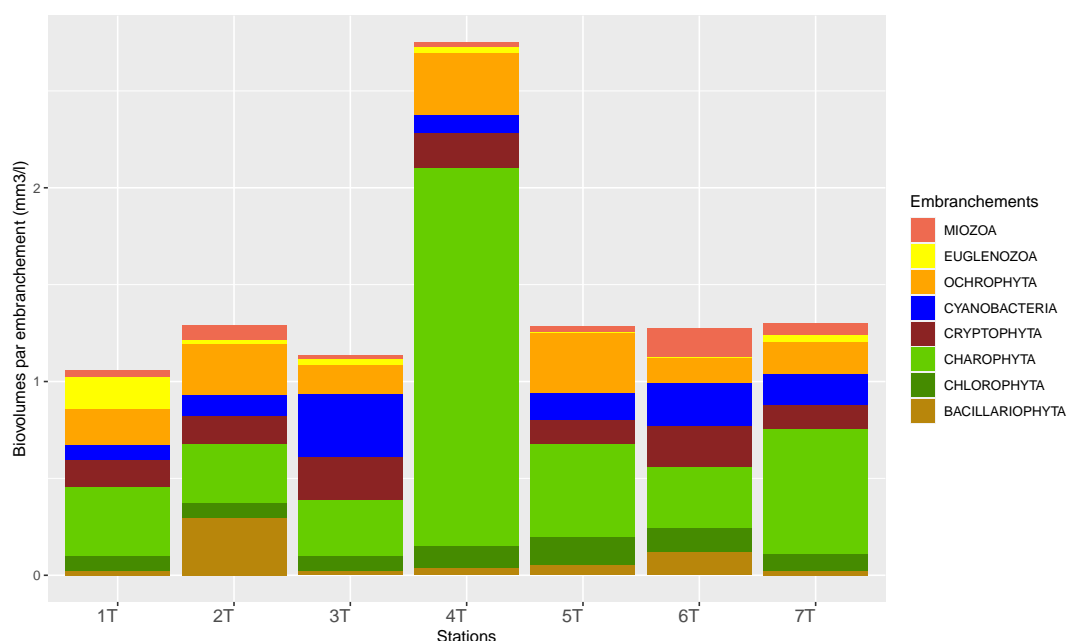


Figure 7: biovolumes par embranchement des échantillons de phytoplancton prélevés le 20 septembre 2022 sur les sept stations du lac de Parentis-Biscarrosse (40)

Les cyanobactéries (Cyanobacteria), recherchées ici pour l'utilisation du FlowCAM®, sont finalement très peu abondantes et ne sont jamais dominantes. Elles ne dépassent pas 29 % de la communauté, maximum relevé en station 3 soit $0,33 \text{ mm}^3/\text{l}$, le minimum étant relevé en station 1 avec seulement $0,07 \text{ mm}^3/\text{l}$. Voir aussi le détail des comptages par taxon en Annexe 3.

Pour les stations 6 et 7, d'intérêt pour la comparaison avec les résultats obtenus avec le FlowCAM® (voir ci-dessous), les biovolumes totaux de cyanobactéries sont respectivement de $0,2217$ et de $0,1587 \text{ mm}^3/\text{l}$. Ces biovolumes se répartissent au sein d'une douzaine de taxons différents (12 et 13 taxons respectivement).

4.2 Répartition et quantification par la Fluoroprobe

La Figure 8, ci-dessous, présente les résultats obtenus in situ par la Fluoroprobe® sur les différentes stations suivies. Les mesures présentées ici sont celles réalisées dans le tube de mesure de la Fluoroprobe® sur les échantillons de subsurface (1T à 7T) desquels sont issus les échantillons étudiés par microscopie et par le FlowCAM®. Pour rappel ces mesures sont des moyennes de 30 mesures consécutives (voir le détail en Annexe 4).

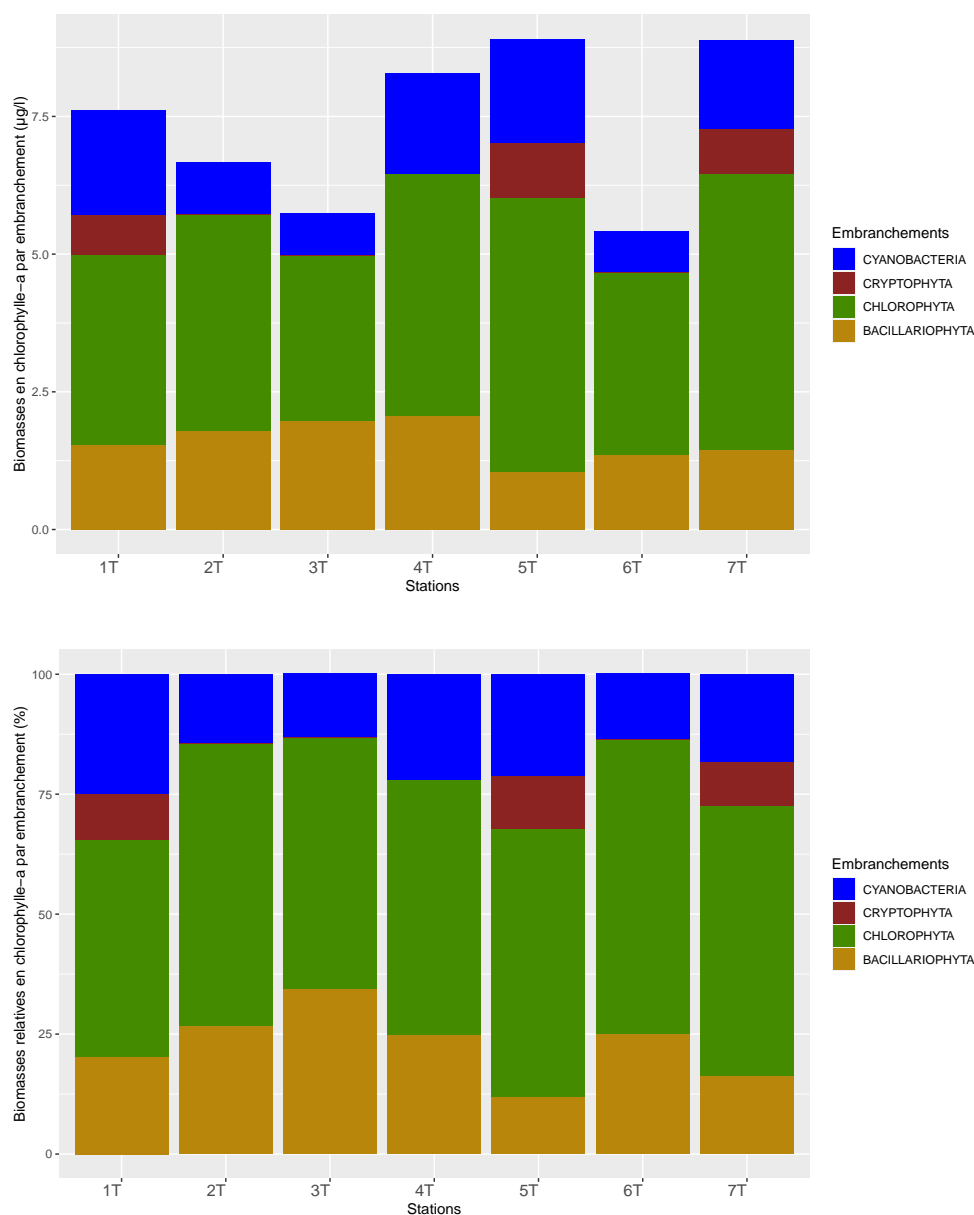


Figure 8: répartition et quantification des communautés phytoplanctoniques des stations du lac de Parentis-Biscarrosse (40) suivies le 20 septembre 2022 au sein des différents groupes algaux attribués par la Fluoroprobe® (biomasses exprimées en chlorophylle-a). Le sous-graphe du haut présente les résultats en microgramme de chlorophylle-a par litre et le sous-graphe du bas présente les mêmes résultats exprimés en quantité relative (%)

La biomasse phytoplanctonique sur l'ensemble des sites est faible. Cette biomasse varie de 5,4 à 8,9 µg/l de chlorophylle-a au total. La station 6 étant la moins concentrée et les stations 5 et 7 les plus concentrées.

La répartition au sein des groupes de phytoplancton, quantifiables par la sonde, semble plutôt comparable sur l'ensemble des stations avec la présence majoritaire des algues vertes. Ces dernières composent de 45 à 61 % du phytoplancton sur l'ensemble des stations soit de 3.0 à 5.0 µg/l en équivalent de chlorophylle-a. Ensuite vient le groupe des diatomées qui représente de 12 à 35 % des communautés, avec une moyenne de 22 % de la communauté soit de 1,1 à 2,1 µg/l d'équivalent chlorophylle-a et une moyenne de 1,6 µg/l. Le groupe des cyanobactéries est moins présent et n'occupe que 13 à 25 % des échantillons, avec une moyenne de 1,4 µg/l (18 %) d'équivalent chlorophylle-a sur l'ensemble des stations.

Bien que les proportions soient peu différentes d'une station à l'autre, en valeur les stations 3 et 6 y affichent les plus faibles concentrations de l'ordre de 0,7-0,8 µg/l. Le maximum de cyanobactéries est mesuré sur les stations 1 et 5 avec 1,9 µg/L d'équivalent chlorophylle-a.

Enfin, les cryptophytes ne sont pas présentes sur toutes les stations échantillonnées. Elles sont quantifiées uniquement sur les stations 1, 5 et 7 et dans d'assez faibles proportions 9 à 11 %.

4.3 Répartition et quantification par le FlowCAM®

4.3.1 Classification

Les résultats des auto-classifications obtenus par le logiciel VisualSpreadsheet®, tant avec des filtres de valeurs que des filtres statistiques, montrent qu'il reste encore un gros travail de tri à réaliser manuellement par l'opérateur : une grande majorité des particules n'a pas été classée et certains individus ont été mal catégorisés bien que leur image soit incluse dans une des bibliothèques.

Ainsi, les résultats de l'auto-classification sur filtres de valeurs ne sont pas présentés ici car ils sont inexploitable. L'auto-classification basée sur des filtres statistiques par le logiciel s'est concentrée sur les échantillons 6 et 7 contenant le maximum de particules de phytoplancton observées. Les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants. Plusieurs individus de morphologie bien dissociée ont été mal catégorisés. Une fois de plus, une minorité de particules a été classée (entre 30 et 49 %). Le FlowCAM® ne permet pas d'obtenir une classification supervisée (auto-classification) satisfaisante.

Une classification manuelle a alors été réalisée sur chaque échantillon à partir des copies d'enregistrements contenant uniquement les individus phytoplanctoniques et selon les 28 bibliothèques créées. Les résultats obtenus des 7 échantillons ont été exportés sous forme de fichier csv (tableur). Le Tableau 2 présente la synthèse de l'analyse obtenue à partir des données FlowCAM®. Ces données serviront comme élément comparatif aux résultats obtenus avec la microscopie traditionnelle.

Tableau 2 : synthèse des résultats des classifications réalisées par le FlowCAM® sur les échantillons prélevés le 20 septembre 2022 sur le lac de Parentis-Biscarrosse (40). Phyto= nombre de particules classées dans le phytoplancton, Classées= nombre de particules rangées dans une librairie, Cyanos= nombre de particules classées dans une librairie de taxon de cyanobactérie, Microcystis= nombre de particules classées dans la librairie Microcystis, xT1 = classification basée sur le passage du 1^{er} millilitre d'échantillon, xT2= classification basée sur le passage du 2^{ème} millilitre d'échantillon ; Phyto/imaginées= pourcentage d'images acquises classées en phytoplancton, Classées/Phyto= pourcentage d'images classées par rapport au Phyto, Cyanos/Phyto= pourcentage d'images classées en cyanobactéries par rapport à celles classées en Phyto, Microcystis/Phyto= pourcentage d'images classées en Microcystis parmi celles classées en Phyto. En gras sont matérialisés les échantillons d'intérêt car mieux préparés pour l'analyse au FlowCAM®

N°	Particules (nombre)					Pourcentage de particules			
	Imagées	Phyto	Classées	Cyanos	Microcystis	Phyto/ Imagées (en %)	Classées/ Phyto (en %)	Cyanos/ Phyto (en %)	Microcystis/ Phyto (en %)
1T	4379	35	35	12	3	0,8	100	34,3	8,6
2T	1239	7	7	5	3	0,6	100	71,4	42,9
3T1	2465	6	6	4	0	0,2	100	66,7	0
3T2	7364	31	31	12	2	0,4	100	38,7	6,5
4T1	2920	14	14	2	0	0,5	100	14,3	0
4T2	2868	6	6	5	1	0,2	100	83,3	16,7
5T1	1504	9	9	3	0	0,6	100	33,3	0
5T2	1280	7	7	0	0	0,5	100	0,0	0
6T1	4674	82	57	12	8	1,8	69,5	14,6	10
6T2	4870	115	81	30	14	2,4	70,4	26,1	12,2
7T1	6261	57	40	14	8	0,9	70,2	24,6	14
7T2	7343	51	43	13	4	0,7	84,3	25,5	7,8

Le FlowCAM® a permis de compter et donc de prendre en photo de 1239 à 7364 particules par échantillon. Les particules d'intérêt, organismes phytoplanctoniques (« Phyto » du Tableau 2) composent ainsi seulement 0,2 à 2,4 % du nombre total des particules imagées.

Les échantillons 6 et 7 présentent les plus fortes valeurs de particules imagées rattachées au phytoplancton (51 à 115 particules soit 0,7 à 2,4 %) ce qui est dû au temps de sédimentation qui a été supérieur lors de la phase de préparation de ces deux échantillons. Ces échantillons sont alors plus robustes et valables que les cinq premiers pour lesquels les nombres de particules identifiées comme du phytoplancton sont très bas et peu pertinents avec des valeurs inférieures à 35 particules considérées comme du phytoplancton sur le nombre total de particules imagées.

Au sein des images de phytoplancton des échantillons 6 et 7, une forte proportion a pu être classées dans un groupe taxonomique par le traitement de classification (« Classées/Phyto ») avec des valeurs de 69,5 à 84,3 %. Par contre les proportions d'images identifiées comme des cyanobactéries et/ou appartenant au genre *Microcystis* sont faibles : de 14,6 à 26,1 % classées en cyanobactéries soit 12 à 30 particules et seulement 10 à 14 % en *Microcystis* soit 4 à 14 particules dénombrées. Ainsi de 4 à 14 colonies ou parties de colonies de *Microcystis* ont pu être quantifiées par le FlowCAM®.

Les échantillons du lac de Parentis-Biscarrosse sont malheureusement assez peu abondants en phytoplancton et en cyanobactéries lors de cette campagne du 20 septembre 2022 (voir la partie 4.1) ce qui se confirme avec les faibles nombres de particules imagées par échantillon rattachés à ces catégories. Ces quantifications par le FlowCAM® s'avèrent faibles voire trop faibles pour être suffisamment robustes car les dénombrements reposent sur au mieux 81 particules classées dans un groupe phytoplanctonique alors que les dénombrements microscopiques reposent sur 400 individus dénombrés permettant d'avoir une erreur de ± 10 %.

Pour les travaux à venir, le traitement d'image pourrait être testé avec le logiciel Zoo/PhytoImage spécialisé dans le traitement d'images numériques du plancton. Ce logiciel « open source » basé sur le langage R et ImageJ existe depuis 2004. Il a été développé par le laboratoire d'Ecologie Numérique des Milieux Aquatiques de l'Université de Mons (UMONS), l'Ifremer et la politique scientifique belge (BelSpo). Ce logiciel présente une nouvelle technique de détection des particules douteuses, combinée à une modélisation et ensuite, une correction statistique de l'erreur est appliquée. Elle permet de réduire la fraction de vignettes à valider manuellement (par exemple, 20 à 40 % seulement), tout en conservant une erreur de l'ordre de 10 % maximum pour tous les groupes. Une interface graphique utilisateur améliorée est ajoutée pour permettre une validation partielle, manuelle des vignettes avec un confort d'utilisation maximum. En plus de ce traitement, Zoo/PhytoImage gère aussi les métadonnées, le stockage optimisé en espace disque et en vitesse de récupération de l'information. Enfin, ce logiciel calcule et extrait les variables dérivées d'intérêt comme les abondances, les biomasses, les biovolumes et/ou les spectres de tailles totaux et par groupe taxonomique. Il travaille en lot et est capable de traiter toute une série d'échantillons en une seule opération (Grosjean 2014).

4.3.2 Calcul de l'abondance et du biovolume

Sur les échantillons 6 et 7, le FlowCAM® a produit des abondances en particules (cellule, colonie ou filament selon le taxon) par millilitre dans chacune des 28 librairies créées (après la classification manuelle). À partir des images acquises, il a calculé la surface occupée par les taxons et les biovolumes correspondant en se basant sur le volume d'une sphère équivalente (volume calculé à partir du diamètre d'une sphère équivalente – ESD. Voir notice du FlowCAM® et paragraphe supra). Ce qui est parfois très éloigné de la forme du taxon considéré (bâtonnet de diatomée pennée, forme complexe des *Staurastrum*,...) mais permet d'avoir une estimation automatique du biovolume total par taxon (par librairie) exprimable en millimètre cube par litre.

Les biovolumes totaux sur les stations 6 et 7 sont ainsi respectivement de 0,103 et 0,481 mm³/l (Figure 9). Voir l'Annexe 5 pour le détail des données.

Le biovolume total est nettement plus faible sur la station 6 et sa répartition au sein des groupes algaux montre une dominance des cyanobactéries (41,9 %) soit 0,043 mm³/l, suivi par les diatomées (28,8 % - Bacillariophyta) et la partie Chlorophyta des algues vertes (25,8 %). Les autres groupes sont ensuite inférieurs à 3 %.

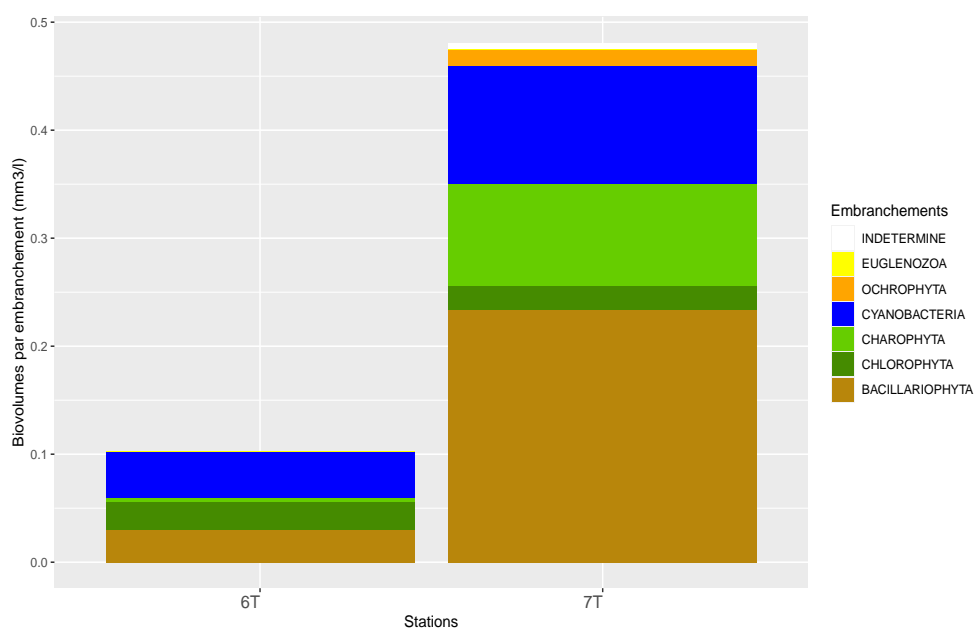


Figure 9: biovolumes par embranchement des échantillons de phytoplancton prélevés le 20 septembre 2022 sur les stations 6 et 7 du lac de Parentis-Biscarrosse (40) calculés avec le FlowCAM®

Sur la station 7, ce sont les diatomées (Bacillariophyta) qui dominent avec 48,6 % du biovolume total, puis viennent les cyanobactéries (Cyanobacteria) occupant 22,7 % soit 0,109 mm³/l et la partie Charophyta des algues vertes avec 19,7 % du biovolume total. Les groupes des algues dorées (Ochrophyta), l'autre partie des algues vertes (Chlorophyta) et les taxons indéterminés représentent moins de 5 % du biovolume total chacun.

Pour les taxons d'intérêt, c'est-à-dire ici, les cyanobactéries dans les échantillons 6 et 7, un travail plus fin a été accompli. Le nombre de cellules par image acquise (donc par colonie) a été compté (ou estimé si les cellules n'étaient pas toutes nettement visibles). Cela permet de disposer des abondances cellulaires par taxon et par échantillon en prenant la moyenne des deux réplicats. En complément, les biovolumes des colonies ont été déterminés en multipliant le biovolume cellulaire individuel par le nombre de cellules par colonie et cela pour chaque image de chaque échantillon. Ainsi, les biovolumes totaux (moyenne des deux réplicats) de chaque taxon d'intérêt ont été produits (Tableau 3). La méthode d'élaboration de ces biovolumes est alors comparable à celle mise en œuvre lors des observations microscopiques.

Tableau 3: abondances cellulaires et biovolumes des échantillons du 20 septembre 2022 sur les stations 6 et 7 de Parentis-Biscarrosse (40) mesurés par le FlowCAM®

station	Taxon	Abondance (cel/ml)	Biovolume (mm ³ /l)
6T	<i>Aphanocapsa</i>	7,8	0,00002
	<i>Microcystis</i>	12,0	0,00060
	<i>Radiocystis geminata</i>	0,5	0,000004
	<i>Woronichinia</i>	2,4	0,00004
7T	<i>Aphanizomenon</i>	0,6	0,00004
	<i>Aphanocapsa</i>	19,0	0,00004
	<i>Microcystis</i>	6,1	0,00030
	<i>Pseudanabaena</i>	1,4	0,00006

Les abondances taxonomiques varient de 0,5 cel./ml pour *Radiocystis geminata* sur la station 6 à 19,0 cel./ml pour *Aphanocapsa* sur la station 7. Avec la conversion en biovolume, *Radiocystis geminata* reste le taxon le moins présent avec 0,000004 mm³/l (ou 0,004 µg/l en biomasse) mais *Microcystis* devient le plus abondant avec 0,0006 mm³/l (soit une biomasse de 0,6 µg/l) sur la station 6.

Le biovolume total des cyanobactéries sur chacune des stations est de 0,00066 mm³/l et 0,00044 mm³/l pour respectivement la station 6 et 7. Ces valeurs obtenues sont très faibles et semblent largement sous-évaluer les biomasses présentes.

4.4 Comparaison des résultats des trois méthodes

Les résultats des stations 6 et 7 obtenus avec le FlowCAM® ont été comparés à ceux obtenus avec la méthode de microscopie traditionnelle, qui fait référence, et avec les données acquises in situ par la Fluoroprobe®.

4.4.1 Comparaison des richesses taxonomiques

Les richesses biologiques des échantillons obtenues par le FlowCAM® sont nettement inférieures à celles obtenues par microscopie (Figure 10) avec seulement 18 et 19 taxons différents pour respectivement les stations 6 et 7 contre 48 et 41 taxons identifiés par microscope (voir la partie 4.1 et l'Annexe 3). Ces fortes différences s'expliquent par l'impossibilité de discriminer et d'identifier les taxons de petite taille avec l'objectif x10 du FlowCAM®. À cela s'ajoute la faible qualité des images acquises, souvent un peu floues, qui ne permet pas de séparer des taxons proches, espèces d'un même genre par exemple.

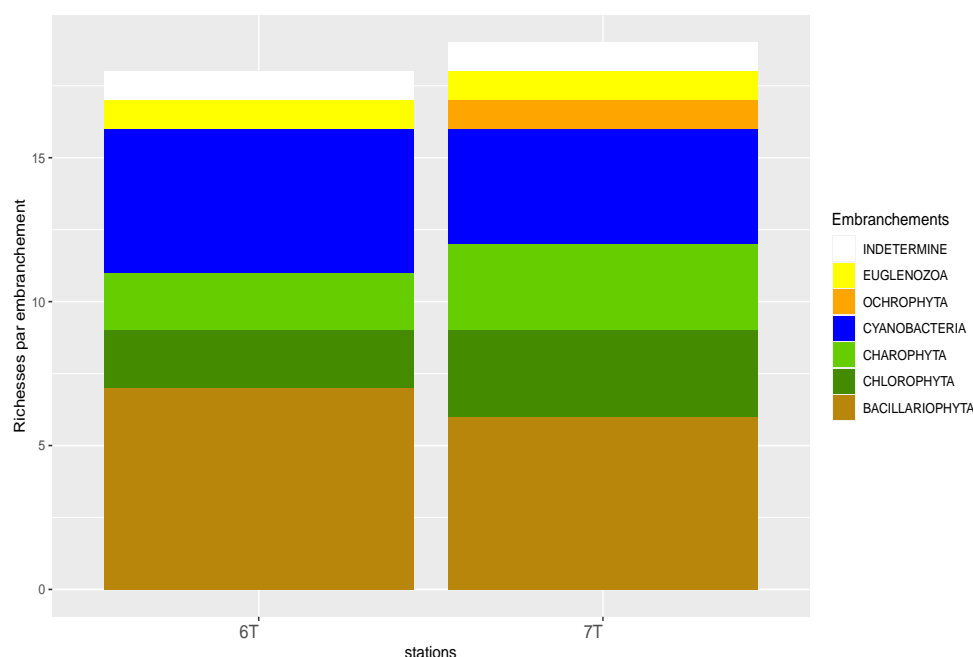


Figure 10: richesses taxonomiques par embranchement des échantillons de phytoplancton prélevés le 20 septembre 2022 sur les stations 6 et 7 du lac de Parentis-Biscarrosse (40) calculées avec le FlowCAM®

Ainsi, la richesse en cyanobactéries est moitié moins élevée avec le FlowCAM® : 5 taxons contre 10 sur la station 6 pour respectivement le microscope et le FlowCAM® et 4 contre 11 taxons sur la station 7. Les chlorophyta sont aussi nettement moins retrouvées par le FlowCAM® avec seulement 2 à 3 taxons contre 8 à 10 par microscopie. En analysant dans le détail les listes taxonomiques, on se rend compte que ce sont les genres et espèces de petites tailles qui ne se retrouvent pas dans les résultats venant du FlowCAM®.

En richesse relative, ce qui permet de gommer un peu les différences de richesses absolues, les distributions ne sont pas identiques mais présentent néanmoins des similitudes (Figure 11). Les algues vertes (Chlorophyta et Charophyta) occupent autour d'un tiers du peuplement : 27 et 22 % sur la station 6 pour respectivement le comptage avec le microscope et avec le FlowCAM® et 32 % sur la station 7 avec les 2 méthodes de dénombrement.

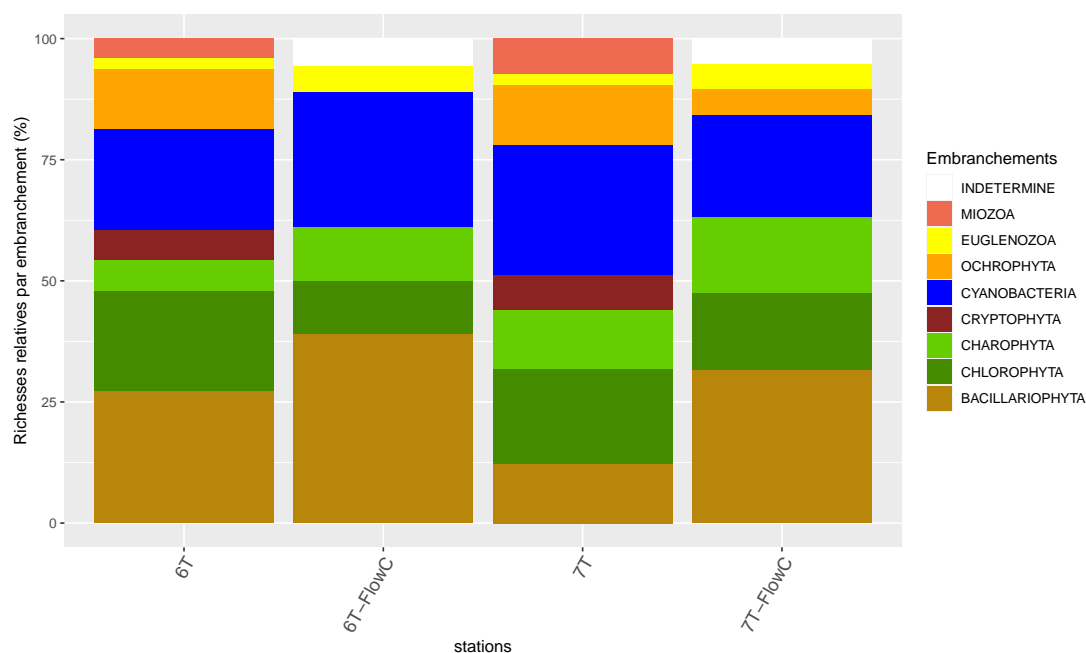


Figure 11: richesses taxonomiques relative (en %) par embranchement des échantillons de phytoplancton prélevés le 20 septembre 2022 sur les stations 6 et 7 du lac de Parentis-Biscarrosse (40) calculées par microscopie (xT) et par le FlowCAM® (xT-FlowC)

Les proportions de cyanobactéries (Cyanobacteria) sont aussi comparables avec 21 et 28 % sur la station 6 et 27 et 21 % sur la station 7. Les autres groupes taxonomiques sont plus différenciés, c'est notamment le cas des diatomées aux proportions de 27 et 39 % sur la station 6 et 12 et 32 % sur la station 7 mais aussi des euglènes (Euglenozoa) et des algues dorées (Ochrophyta). Ce dernier groupe ne se retrouvant pas dans les résultats de l'échantillon FlowCAM® sur la station 6 alors que la proportion est de 12,5 % par microscopie. C'est encore plus prononcé pour les cryptophycées (Cryptophyta) et les dinophycées (Miozoa), qui ne se retrouvent pas du tout dans les résultats de dénombrement avec le FlowCAM®.

4.4.2 Comparaison des biovolumes

Les biovolumes calculés avec les données du FlowCAM® (voir 4.3.2) peuvent être comparés avec ceux élaborés par microscopie.

Dans la Figure 12, graphe du haut, les résultats de quantifications taxonomiques ont été regroupés par embranchement pour les deux méthodes. Il en ressort une très grande différence entre les biovolumes totaux calculés avec chacune des méthodes sur les stations 6 et 7 : 0,1032 et 0,4809 mm³/l avec le FlowCAM® contre 1,2769 et 1,3028 mm³/l par microscopie. Comme pour les richesses, le FlowCAM® sous-évalue fortement les biovolumes phytoplanctoniques présents. La faible proportion de particules imagées classée en phytoplancton (0,7 à 2,4 %, voir supra) ainsi que la difficulté avec le FlowCAM® d'identifier et de classer les taxons de petite taille, expliquent ces différences.

Les résultats des biovolumes de cyanobactéries (Cyanobacteria) du FlowCAM® sont de 0,0433 sur la station 6 et 0,1091 mm³/l sur la station 7. La quantification par microscope donne respectivement 0,2217 et 0,1587 mm³/l. Le FlowCAM® ne quantifie alors que 20 à 69 % du biovolume de cyanobactéries mesuré par microscopie.

Cet écart est encore plus important pour les algues vertes et les algues dorées, qui sont pourtant des groupes taxonomiques plutôt abondants sur Parentis-Biscarrosse. Seuls 7 à 16 % du biovolume des algues vertes n'est retrouvé par le FlowCAM® et 0 à 9 % pour les algues dorées.

Le groupe des diatomées présente des quantifications variables : beaucoup moins sur la station 6 avec le FlowCAM® que par microscopie (0,0297 vs 0,1237 mm³/l) mais l'inverse sur la station 7 avec une sur-quantification par le FlowCAM® (0,2335 vs 0,0206 mm³/l) soit plus de 1133 % de différence.

Les autres groupes Euglenozoa, Miozoa et Cryptophyta (euglénophycées, dinophycées et cryptophytes) ne sont pas retrouvés dans les résultats du FlowCAM®.

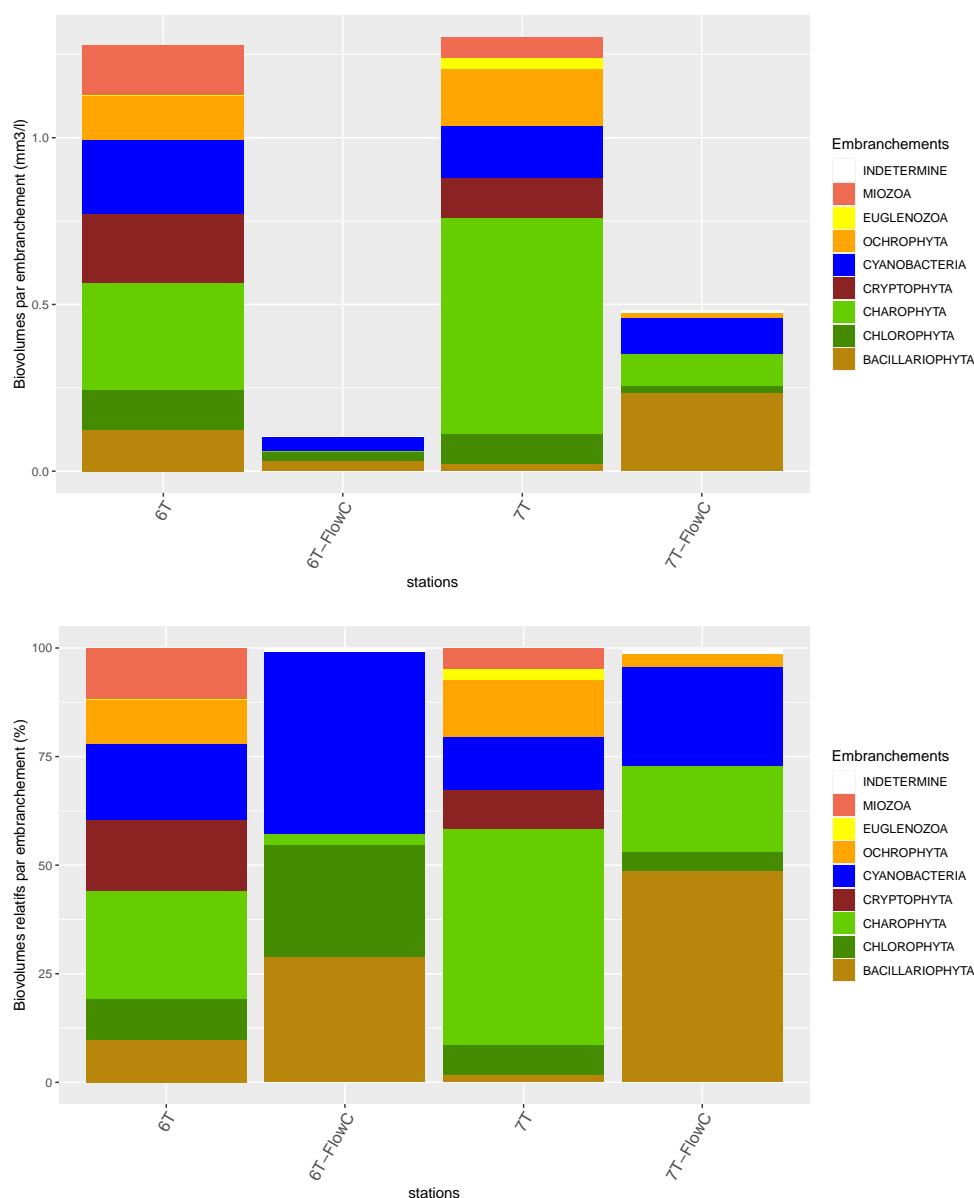


Figure 12: biovolumes par embranchement des échantillons de phytoplancton prélevés le 20 septembre 2022 sur les stations 6 et 7 du lac de Parentis-Biscarrosse (40) calculés par microscopie (xT) et par le FlowCAM® (xT-FlowC). Graphe du haut en biovolumes (mm³/l); graphe du bas en biovolumes relatifs

Pour atténuer ces différences de quantification, les biovolumes peuvent être comparés en valeur relative et non en valeur absolue (graphe du bas de la Figure 12). Cependant le FlowCAM® n'ayant pas permis de quantifier les cryptophycées, les dinophycées et les euglènes et assez peu les algues dorées, les distributions ne sont pas beaucoup plus comparables. Les cyanobactéries, par exemple, représentent 17,4 et 12,2 % de la communauté par microscopie sur respectivement les stations 6 et 7 alors que par le FlowCAM® la proportion atteint 41,9 % sur la station 6 et 22,7 % sur la station 7.

4.4.3 Comparaison des biomasses

L'expression des résultats des quantifications sous la forme de biomasse peut permettre de comparer les résultats des 3 méthodes (microscope, FlowCAM® et Fluoroprobe®). Pour cela seuls les groupes taxonomiques quantifiés par toutes les méthodes ont été conservés dans la Figure 13 : à savoir, les diatomées, les cyanobactéries et les algues vertes.

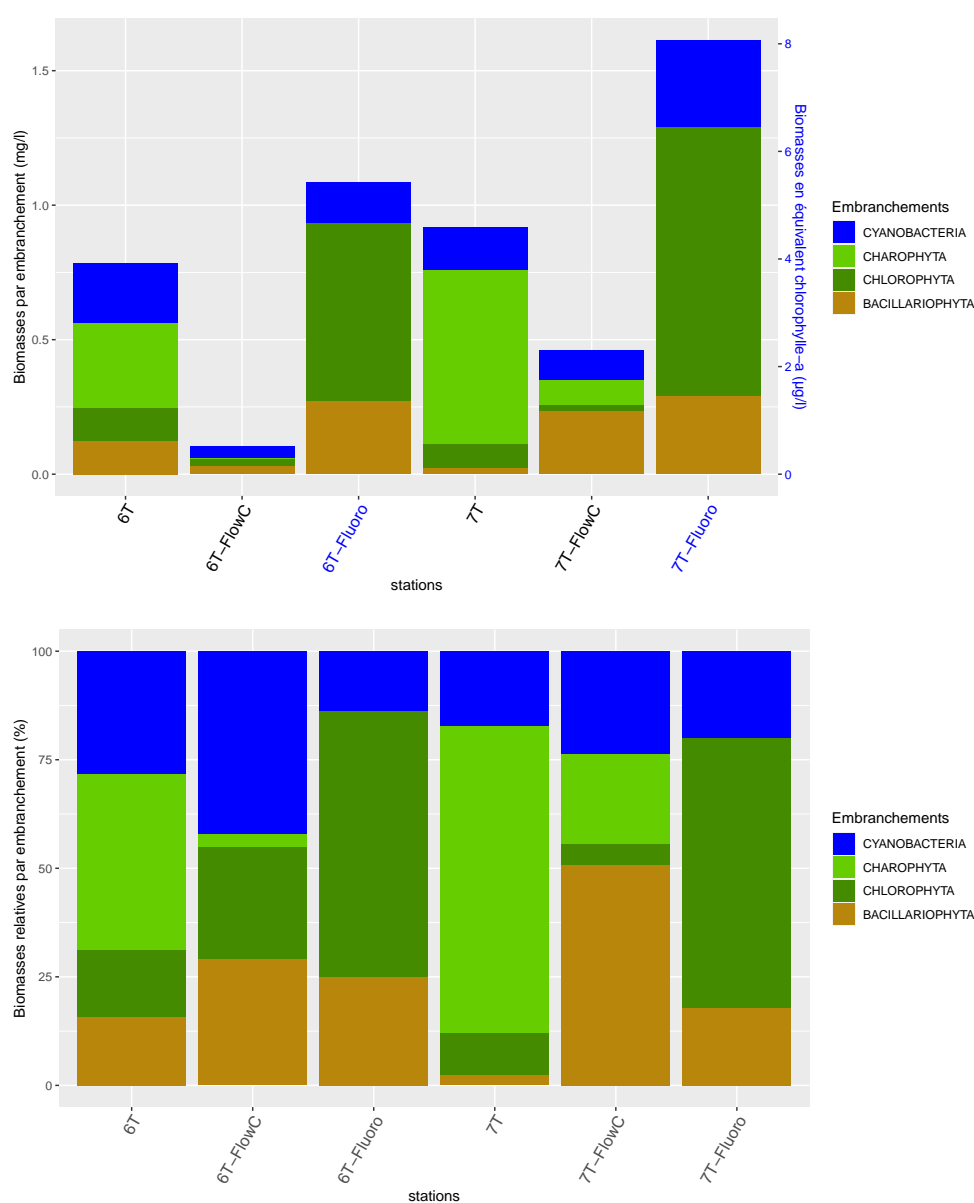


Figure 13: biomasses des embranchements partagés par les 3 méthodes sur les échantillons de phytoplancton prélevés le 20 septembre 2022 sur les stations 6 et 7 du lac de Parentis-Biscarrosse (40) calculées par microscopie (xT), par le FlowCAM® (xT-FlowC) et par la Fluoroprobe® (xT-Fluoro). Graphe du haut en biomasses (mg/l, en noir) pour la microscopie et le FlowCAM® et en biomasses en équivalent de chlorophylle-a (µg/l, en bleu) pour la Fluoroprobe; graphe du bas en biomasses relatives avec les 3 méthodes

Pour ce dernier groupe, les 2 embranchements, Charophyta et Chlorophyta, ont été conservés même si la Fluoroprobe® ne fait pas la distinction mais regroupe tous les taxons de ces 2 embranchements dans l'entité « algues vertes », ici placé sous le nom Chlorophyta pour simplifier.

Le FlowCAM® reste la méthode d'analyse qui sous-évalue les quantités de matière par rapport aux 2 autres. En biomasse relative, graphe du bas de la Figure 13, les distributions des résultats de phytoplancton présentent des similitudes. Les algues vertes dominent les assemblages en microscopie (plus de 55 %) et avec la Fluoroprobe® (plus de 61 %) mais sont moins retrouvées par le FlowCAM®, du fait d'un certain nombre de taxons de petite taille, qui place les cyanobactéries (station 6) et les diatomées (station 7) en groupe dominant avec 42,3 et 50,8 % respectivement.

Avec les différentes méthodes, les cyanobactéries sont bien quantifiées, dans des proportions comparables autour de 20 % sur la station 7, mais plus variables sur la station 6 de 13,8 % (Fluoroprobe) à 42,3 % (FlowCAM®). Pour les diatomées, c'est plutôt l'inverse, quantifiées autour de 20 % sur la station 6 mais de 2,2 % à 50,8 % sur la station 7. C'est alors le FlowCAM® qui semble sur-évaluer ce groupe taxonomique par rapport aux autres.

4.4.4 Comparaison des biovolumes des cyanobactéries

En ce qui concerne les biovolumes, la comparaison peut-être faite pour les taxons d'intérêt, c'est-à-dire, les cyanobactéries qui ont pu être identifiées et dénombrées avec le FlowCAM® (Tableau 4) pour lesquelles un effort supplémentaire a été fait sur chaque image acquise (voir Tableau 3 et paragraphe afférent du 4.3.2).

Les résultats montrent alors des écarts très importants puisque le FlowCAM® semble complètement sous-évaluer les abondances et donc les biovolumes en présence. Les biovolumes totaux sont de 0,2217 et 0,1587 mm³/l en microscopie pour respectivement les stations 6 et 7 contre seulement 0,00067 et 0,00044 mm³/l avec le FlowCAM®.

Les écarts sont aussi importants pour les taxons de cyanobactéries pris individuellement, par exemple le genre *Microcystis* présente un biovolume de 0,08627 mm³/l sur la station 6 en microscopie contre 0,00060 mm³/l avec le FlowCAM® soit 144 fois moins.

Tableau 4: biovolumes comparés pour les taxons de cyanobactéries retrouvés à la fois en microscopie et avec le FlowCAM® sur les stations 6 et 7 du lac de Parentis-Biscarrosse (40) prélevées le 20 septembre 2022

station	Taxon	Biovolume microscopie (mm ³ /l)	Biovolume FlowCAM® (mm ³ /l)
6T	Biovolume total cyanobactéries²	0,2217	0,00067
	<i>Aphanizomenon</i>	0,00716	-
	<i>Aphanocapsa</i>	0,04508	0,00002
	<i>Microcystis</i>	0,08627	0,00060
	<i>Pseudanabaena</i>	0,00098	0,00002
	<i>Radiocystis geminata</i>	-	0,000004
	<i>Woronichinia</i>	0,00249	0,00004
7T	Biovolume total cyanobactéries	0,1587	0,00044
	<i>Aphanizomenon</i>	0,00359	0,00004
	<i>Aphanocapsa</i>	0,01443	0,00004
	<i>Microcystis</i>	0,06743	0,00030
	<i>Pseudanabaena</i>	0,00049	0,00006
	<i>Radiocystis geminata</i>	-	-
	<i>Woronichinia</i>	0,00580	-

Différentes hypothèses sont possibles pour expliquer ces différences. Tout d'abord, la durée de la phase de sédimentation (91 h pour 100 ml) n'est peut-être pas encore suffisante pour permettre à la plus grande partie des taxons de se concentrer dans le sous-échantillon de fond repris pour l'analyse au FlowCAM®. C'est déjà une des raisons pour laquelle les échantillons 1 à 5, qui n'ont sédimentés que 24 h, ont été écartés des analyses et des comparaisons et que la durée de sédimentation a été poussée à 91 h pour les échantillons 6 et 7 restants.

Ensuite, les individus de grande taille (filament et colonie) mais aussi certains de taille plus faible, mais agrégés en groupe, peuvent être retenus par le capillaire d'amenée de l'échantillon et ne jamais être imagés et comptabilisés par le FlowCAM®. Enfin, différents taxons de cyanobactéries, identifiés en microscopie, sont des taxons coloniaux assez petits : *Aphanothece*, *Cyanogranis*, *Synechococcus* que le grossissement de x10 employé sur le FlowCAM® ne permet pas de discriminer et d'identifier dans les clichés acquis. Ces clichés sont alors considérés comme « particules non algales » contribuant à la baisse des particules prises en compte en tant que cyanobactéries.

2 Les biovolumes totaux issus de la microscopie regroupent d'autres taxons, non listés ici car non retrouvés par le FlowCAM®

4.5 Intérêts du FlowCAM®

4.5.1 Avantages du FlowCAM®

Traditionnellement, l'analyse microscopique est utilisée pour caractériser le plancton présent dans un environnement donné à un moment donné. Cependant, cette approche est à la fois longue et laborieuse, car, elle nécessite des spécialistes hautement qualifiés (Kerr et al. 2020).

L'utilisation du FlowCAM® nécessite moins de haute qualification et présente l'avantage d'être reproductible avec des résultats manipulables et consultables après l'analyse par rapport à l'observation microscopique traditionnelle. En effet, elle permet de disposer d'un enregistrement numérique permanent des échantillons dont les images peuvent indéfiniment être triées, enregistrées en tant que composantes de bibliothèques et de librairies et les résultats peuvent être traités ou re-traités ultérieurement. Les bibliothèques, une fois créées, peuvent être continuellement remplies et leurs filtres correspondants être utilisés pour l'auto-classification des images de différents ensembles d'échantillons.

Ainsi, l'acquisition de pools d'images d'espèces d'algues cibles (bien individualisées) est essentielle pour une mesure précise du nombre de cellules algales (Park et al. 2018) et une bonne identification. De plus le FlowCAM® permet, par sa relative rapidité de traitement d'un échantillon, d'augmenter le nombre d'échantillons (augmentation de la fréquence d'échantillonnage) et/ou les volumes analysés par la création rapide de multiples mesures sur des cellules algales.

La technologie FlowCAM® est désormais utilisée pour fournir des données de surveillance du phytoplancton dans le monde entier (Buskey and Hyatt 2006, Lehman et al. 2013).

4.5.2 Inconvénients du FlowCAM®

La résolution taxonomique des logiciels de classification est principalement limitée par la qualité des images produites par ces instruments d'imagerie (Camoying and Yñiguez 2016). Bien que le FlowCAM® soit capable de trier automatiquement les images collectées grâce au logiciel VisualSpreadsheet®, la plupart des études n'utilisent pas la totalité de ses capacités (89 %), utilisant l'appareil uniquement comme un moyen de collecter des images numériques (Owen et al. 2022).

Avec la microscopie classique, l'opérateur peut ajuster la mise au point et même faire pivoter les cellules individuelles pour voir les principales caractéristiques d'identification. Dans une analyse FlowCAM®, la particule est, au mieux, caractérisée par une image numérique bidimensionnelle. La mécanique de cette analyse avec des échantillons aspirés à travers une cellule d'écoulement étroite, signifie que certains individus peuvent être plus enclins à l'exclusion, au colmatage ou à l'adhésion à la surface de la cellule d'écoulement. Une pré-filtration de l'échantillon est d'ailleurs souvent nécessaire pour exclure les grosses particules susceptibles d'obstruer la cellule d'écoulement ce qui peut être problématique en présence de nombreuses grandes colonies de cyanobactéries par exemple. La capture d'images de cellules à partir d'un seul point de vue a pour conséquence de manquer certaines des caractéristiques d'identification clés de certains taxons. De plus, étant donné que l'objectif du microscope et l'appareil photo numérique ne peuvent être parfaitement focalisés que sur un seul plan à l'intérieur de la cellule d'écoulement, une

proportion d'images sera toujours plus ou moins floue. Des images floues supplémentaires peuvent aussi être générées en raison de vitesses d'écoulement trop élevées, inversement des images en double, bien que nettes, peuvent être produites si les vitesses d'écoulement sont trop faibles. De même, le gain et l'intensité (paramètres de réglages de l'acquisition) doivent être soigneusement équilibrés pour maintenir une luminosité et un contraste appropriés afin de maximiser la qualité de l'image et l'observabilité des principales caractéristiques d'identification taxonomique.

La résolution taxonomique du FlowCAM® est inférieure à celle de la microscopie optique traditionnelle notamment car le grossissement est fixé à x10 pour une observation de communautés phytoplanctoniques d'eau douce. Un objectif à x20 peut être utilisé mais alors les individus de grandes tailles ne sont plus observables (pré-filtration, champ de l'image inadapté). Le FlowCAM® n'est pas capable de différencier les particules cibles des particules non cibles (détritiques, bulles, débris cellulaires, cellules dupliquées et artefacts d'image) malgré l'auto-classification. Or en fonction du type d'échantillon, les images non ciblées peuvent représenter jusqu'à 95 % des sorties d'images. Ces images doivent donc être supprimées des ensembles de données avec une part non négligeable de post-traitement manuel. D'un autre côté, comme noté par certains auteurs, l'auto-classification n'est pas efficace pour les groupes minoritaires (Kerr et al. 2020).

CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet a été atteint. À savoir acquérir les compétences techniques et mettre au point la méthode d'utilisation du FlowCAM® pour réaliser des analyses rapides d'identification et de dénombrement du phytoplancton au sein d'échantillons récoltés en milieu naturel.

Pour atteindre cet objectif, des échantillons du lac de Parentis-Biscarrosse ont été récoltés le 20 septembre 2022 dans le cadre du projet LASHA et traités selon 3 méthodes différentes : (i) la méthode normalisée par microscopie inversée, (ii) l'acquisition de résultats de fluorescence sur le terrain avec la Fluoroprobe® et (iii) l'utilisation du FlowCAM®.

De la mise au point du FlowCAM®, il ressort différentes conclusions.

Tout d'abord, le paramétrage du FlowCAM® dépend de la nature de l'échantillon qui doit être déterminé au préalable par observation rapide en microscopie optique. Cela permet de définir le besoin de traitement initial de l'échantillon (filtration, concentration, désagrégation, etc.), les volumes d'échantillon à traiter et les vitesses de passage.

Ensuite, il est nécessaire de constituer des bibliothèques différentes pour les taxons présentant une diversité morphologique importante et le choix de l'ordre des bibliothèques est une étape clé pour optimiser les résultats de l'auto-classification. À savoir, il faut placer en priorité les taxons d'intérêt (ici les cyanobactéries).

Enfin, il est nécessaire de définir les bibliothèques qui seront utilisées dans le modèle de classification à partir des filtres statistiques basés sur les statistiques dérivées plutôt que sur les filtres de valeurs. Les résultats sont ainsi de meilleure qualité.

Les échantillons prélevés sur Parentis-Biscarrosse le 20 septembre 2022 ont été peu concentrés en phytoplancton et en cyanobactéries. Sur les 7 stations la richesse moyenne a été de 43 taxons qui étaient répartis au sein des différents groupes taxonomiques : algues vertes, cyanobactéries, diatomées, algues dorées et cryptophytes majoritairement. Le biovolume moyen toutes stations confondues a été de 1,44 mm³/l avec une communauté dominée par les algues vertes, sous-groupe des desmidiées essentiellement. Les cyanobactéries ont été malheureusement peu abondantes (maximum 0,33 mm³/l et 29 % de l'échantillon), bien qu'assez diversifiées, pour pleinement contribuer à la comparaison avec les résultats obtenus in situ par la Fluoroprobe® et au laboratoire avec le FlowCAM®.

Le calage du FlowCAM® a nécessité un certain nombre de tests et d'ajustement ce qui, finalement, n'a pas permis de disposer de résultats complets sur les 7 échantillons prélevés. Seuls les échantillons 6 et 7 ont pu faire l'objet d'une quantification satisfaisante par le FlowCAM® et donc par les 3 méthodes considérées. La comparaison des méthodes sur ces 2 échantillons a montré que le FlowCAM® sous-évalue les abondances et les biovolumes. Cependant, les distributions des communautés phytoplanctoniques entre les différents groupes taxonomiques ont présenté des similitudes avec celles obtenues par la microscopie et par la Fluoroprobe.

La mise au point du FlowCAM® devra, alors, être poursuivie à l'aide d'échantillons plus concentrés provenant de milieux plus riches en micro-algues et en cyanobactéries notamment (lac d'Aureilhan par exemple puisque faisant partie du même bassin versant).

L'objectif sera de comparer de nouveau les résultats de l'abondance et du biovolume obtenus par le FlowCAM® à la méthode de microscopie traditionnelle. Le fournisseur indique que la variance totale de la technologie FlowCAM® est de 20 % (instrument + écart standard) pour l'interprétation des résultats. Le traitement d'image par le logiciel fourni (VisualSpreadSheet) n'est pas satisfaisant et devra être amélioré par son remplacement par le logiciel Zoo/PhytoImage.

BIBLIOGRAPHIE

- Barré, A. 2020. Mise au point opérationnelle du FlowCAM® pour l'identification et le dénombrement automatisé des cyanobactéries. 19.
- Buskey, E.J. & Hyatt, C.J. 2006. Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. *Harmful Algae*. 5:685–92.
- Camoying, M.G. & Yñiguez, A.T. 2016. FlowCAM optimization: Attaining good quality images for higher taxonomic classification resolution of natural phytoplankton samples. *Limnol. Oceanogr. Methods*. 14:305–14.
- Ezzedine, J. 2015. Le flowcam: optimisation pour l'observation de *Gomphonema gracile*. 27.
- Gogin, S., & Laplace-Treyture, C. 2014. Distribution spatio-temporelle des cyanobactéries dans le lac de Parentis-Biscarrosse. Période 2010 - 2013. Irstea.
- Graham, M.D., Cook, J., Graydon, J., Kinniburgh, D., Nelson, H., Pilieci, S. & Vinebrooke, R.D. 2018. High-resolution imaging particle analysis of freshwater cyanobacterial blooms: FlowCam analysis of cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr. Methods*. 16:669–79.
- Grosjean, P. 2014. Guide méthodologique. Version actualisée de ZooPhytoImage avec refonte de l'interface graphique. Action 9. FlowCam ZooPhytoImage. Livrable n°1. Rapport final.
- Hrycik, A.R., Shambaugh, A. & Stockwell, J.D. 2019. Comparison of FlowCAM and microscope biovolume measurements for a diverse freshwater phytoplankton community. *J. Plankton Res.* 41:849–64.
- Kerr, T., Clark, J.R., Fileman, E.S., Widdicombe, C.E. & Pugeault, N. 2020. Collaborative deep learning models to handle class imbalance in flowcam plankton imagery. *IEEE Access*. 8:170013–32.
- Laplace-Treyture, C., Hadoux, E., Plaire, M., Dubertrand, A. & Esmieu, P. 2017. PHYTOBS v3.0 : Outil de comptage du phytoplancton en laboratoire et de calcul de l'IPLAC. Version 3.0. Application JAVA. 3.0.
- Laplace-Treyture, C., & Moreira, S. 2016. Rapport d'activité du suivi scientifique des plans d'eau de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse – Année 2014. Cestas: Irstea, Unité de Recherche Écosystèmes Aquatiques et Changements Globaux.
- Laplace-Treyture, C., Moreira, S., Eon, M., & Jan, G. 2017. Rapport d'activité du suivi scientifique des plans d'eau de Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse – Année 2016. Cestas: Irstea, Unité de Recherche Écosystèmes Aquatiques et Changements Globaux.
- Laplace-Treyture, C., & Prévost, E. 2014. Rapport d'activité du suivi scientifique des plans d'eau de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse. Année 2013. Irstea.
- Moreira, S., Laplace-Treyture, C., Eon, M., & Jan, G. 2016. Rapport d'activité du suivi scientifique des plans d'eau de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse – Année 2015. Cestas: Irstea, Unité de Recherche Écosystèmes Aquatiques et Changements Globaux.
- Lehman, P.W., Marr, K., Boyer, G.L., Acuna, S. & Teh, S.J. 2013. Long-term trends and causal factors associated with *Microcystis* abundance and toxicity in San Francisco Estuary and implications for climate change impacts. *Hydrobiologia*. 718:141–58.
- Moreira, S., Laplace-Treyture, C., Pickhahn, L., Jamoneau, A. & Eon, M. 2019. Dispositif CYANALERT : un système de surveillance et d'alerte des proliférations de cyanobactéries sur les plans d'eau du Born (Landes). *Dyn. Environnementales J. Int. Géosciences L'environnement*. 74–97.

- NF EN 15204 2006. Qualité de l'eau - Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl). [Water quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)].
- NF EN ISO 7027 2000. Qualité de l'eau - Détermination de la turbidité.
- Owen, B.M., Hallett, C.S., Cosgrove, J.J., Tweedley, J.R. & Moheimani, N.R. 2022. Reporting of methods for automated devices: A systematic review and recommendation for studies using FlowCAM® FlowCAM® FlowCAM® for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr. Methods*. 20:400-27.
- Park, J., Kim, Y., Kim, M. & Lee, W.H. 2018. A novel method for cell counting of Microcystis colonies in water resources using a digital imaging flow cytometer and microscope. *Environ. Eng. Res.* 24:397-403.

ANNEXES

Annexe 1 : richesses taxonomiques par embranchement, déterminées par microscopie, dans les échantillons prélevés le 20 septembre 2022 sur les 7 stations du lac de Parentis-Biscarrosse (40)

Embranchements	1T	2T	3T	4T	5T	6T	7T
BACILLARIOPHYTA	6	8	6	6	8	13	5
CHAROPHYTA	5	4	5	4	5	3	5
CHLOROPHYTA	11	7	6	8	14	10	8
CRYPTOPHYTA	3	4	4	3	2	3	3
CYANOBACTERIA	11	11	11	10	11	10	11
EUGLENOZOA	4	1	1	1	1	1	1
MIOZOA	2	3	1	2	2	2	3
OCHROPHYTA	2	4	4	4	5	6	5

Annexe 2 : biovolumes par embranchement (mm³/l), déterminées par microscopie, dans les échantillons prélevés le 20 septembre 2022 sur les 7 stations du lac de Parentis-Biscarrosse (40)

Embranchement	1T	2T	3T	4T	5T	6T	7T
BACILLARIOPHYTA	0,0223	0,2959	0,0205	0,0360	0,0511	0,1237	0,0207
CHAROPHYTA	0,3643	0,3065	0,2901	1,9561	0,4852	0,3185	0,6473
CHLOROPHYTA	0,0725	0,0744	0,0794	0,1125	0,1439	0,1196	0,0903
CRYPTOPHYTA	0,1405	0,1444	0,2177	0,1786	0,1199	0,2097	0,1194
CYANOBACTERIA	0,0732	0,1065	0,3295	0,0899	0,1375	0,2217	0,1587
EUGLENOZOA	0,1656	0,0200	0,0278	0,0318	0,0006	0,0029	0,0320
MIOZOA	0,0328	0,0766	0,0159	0,0215	0,0290	0,1491	0,0644
OCHROPHYTA	0,1887	0,2668	0,1518	0,3244	0,3168	0,1316	0,1699
Total Résultat	1,0600	1,2912	1,1326	2,7508	1,2840	1,2769	1,3028

Annexe 3 : détail des comptages microscopiques des échantillons prélevés le 20 septembre 2022 sur les 7 stations du lac de Parentis-Biscarrosse (40). Résultats en biovolume en mm³/l

Embranchement	Code taxon	Code Sandre	Cf.	Nom taxon	Nom Auteur	Type Compté	1T	2T	3T	4T	5T	6T	7T
BACILLARIOPHYTA	ACONOR	8548		<i>Actinocyclus normanii</i>	(Gregory ex Greville) Hustedt	Cel.		0,25108					
	ASTFOR	4860		<i>Asterionella formosa</i>	Hassall	Cel.	0,00245	0,00186	0,00289	0,00206	0,00311	0,00248	0,00207
	AULAMB	8554	Cf.	<i>Aulacoseira ambigua</i>	(Grunow) Simonsen	Cel.						0,00151	
				<i>Aulacoseira ambigua</i>	(Grunow) Simonsen	Cel.			0,00857	0,00101	0,00557		0,00607
	AULANG	8561		<i>Aulacoseira granulata var. angustissima</i>	(Müller) Simonsen	Cel.	0,00224	0,00090		0,00090	0,00090		
	AULGRA	8559		<i>Aulacoseira granulata</i>	(Ehrenberg) Simonsen	Cel.	0,01339	0,01479		0,01875	0,00538	0,00402	0,00269
	AULSUB	8576		<i>Aulacoseira subarctica</i>	(Müller) Haworth	Cel.						0,00099	
	CYCCOM	8609		<i>Cyclotella comensis</i>	Grunow	Cel.						0,00266	
	CYMSPX	7368		<i>Cymbella</i>	Agardh	Cel.					0,00030		
	DISPSE	8656		<i>Discostella pseudostelligera</i>	(Hustedt) Houk & Klee	Cel.						0,00426	
	ECOSPX	9358		<i>Eucoconeis</i>	Cleve ex Meister	Cel.							
FRACLV	38847		<i>Fragilaria crotonensis subsp. lacus-vulcani</i>	Lange-Bertalot &	Cel.	0,00007	0,00022	0,00014	0,00014	0,00022	0,00043		

			Ulrich									
FRACRO	6666	<i>Fragilaria crotonensis</i>	Kitton	Cel.	0,00158	0,00063	0,00655	0,01310	0,00807	0,00149	0,00926	
FRASPX	9533	<i>Fragilaria</i>	Lyngbye	Cel.		0,02481						
INDCE5	6598	<i>Diatomées centriques indéterminées < 10 µm</i>	A remplir	Cel.					0,00180			
INDPE2	6598	<i>Diatomées pennées indéterminées 10 - 30 µm</i>	A remplir	Cel.	0,00252							
INDPE5	6598	<i>Diatomées pennées indéterminées < 10 µm</i>	A remplir	Cel.		0,00164				0,00261		
INDPEN	6598	<i>Diatomées pennées indéterminées 30 - 100 µm</i>	A remplir	Cel.	0,00005				0,02573			
NAVRAD	8106	<i>Navicula radiosa</i>	Kützing	Cel.						0,09799	0,00060	
NIZSPX	9804	<i>Nitzschia</i>	Hassall	Cel.						0,00008		
STSCON	6761	<i>Staurosira construens</i>	Ehrenberg	Cel.						0,00514		
SURSPX	9468	<i>Surirella</i>	Turpin	Cel.			0,00111					
URSERI	8780	<i>Urosolenia eriensis</i>	Round & Crawford	Cel.			0,00120					
CHAROPHYTA	CLOACV	5530	<i>Closterium acutum var. variable</i>	(Lemmermann) Krieger	Cel.		0,00671					
	CLOINC	24335	<i>Closterium incurvum</i>	Brébisson	Cel.					0,01045		
	COSCEL	33791	<i>Cosmarium contractum var. ellipsoideum</i>	(Elfving) West & G.S. West	Cel.		0,00048	0,00193	0,00145	0,00097	0,00097	
	COSDEN	41905	<i>Cosmarium dentatum</i>	Wolle	Cel.	0,05098						
	MISFUR	33067	<i>Micrasterias furcata</i>	Agardh ex	Cel.	0,00216				0,00434		

				Ralfs								
MOUGRA	5288	Cf.	<i>Mougeotia gracillima</i>	(Hassall) Wittrock	Cel.						0,00061	
			<i>Mougeotia gracillima</i>	(Hassall) Wittrock	Cel.	0,00107						
STAANA	5448		<i>Staurastrum anatinum</i>	Cooke & Wills	Cel.	0,15904	0,20292		1,61690	0,32467		
STAARC	5450		<i>Staurastrum arctiscon</i>	(Ehrenberg) Lundell	Cel.		0,00680		0,01354			0,02039
STALUN	5474		<i>Staurastrum lunatum</i>	Ralfs	Cel.	0,15101	0,09633	0,20127	0,30705	0,15414	0,30705	0,61654
STAPLA	5483		<i>Staurastrum planctonicum</i>	Teiling	Cel.			0,07092				
STDCUS	5501		<i>Staurodesmus cuspidatus</i>	(Brébisson) Teiling	Cel.							0,00010
XANANT	5519		<i>Xanthidium antilopaeum</i>	(Brébisson) Kützing	Cel.			0,00931	0,01861			0,00934
CHLOROPHYTA	ANYLAN	9796	<i>Ankyra lanceolata</i>	(Korshikov) Fott	Cel.	0,02506	0,03304	0,05493	0,04586	0,04604	0,03227	0,06821
	BOTBRA	5599	<i>Botryococcus braunii</i>	Kützing	Col.		0,00070			0,00192	0,00226	0,00244
	CHOGLA	24394	<i>Chlorolobion glareosum</i>	(Hindák) Komárek	Cel.					0,00066		0,00098
	COEAST	5608	<i>Coelastrum astroideum</i>	De Notaris	Cel.					0,00011	0,00023	
	COEMIC	5610	<i>Coelastrum microporum</i>	Nägeli	Cel.							0,00030
	COOFOT	5618	<i>Coenochloris fottii</i>	(Hindák) Tsarenko	Cel.	0,01150				0,02348	0,02339	
	DEDSER	31948		<i>Desmodesmus serratus</i>	(Corda) An, Friedl & Hegewald	Cel.	0,00087					0,00088

INDCHL	3332		<i>Chlorophycées indéterminées > 10 µm</i>	Reichenbach	Cel.		0,01845					
INDCHO	4746		<i>Chlorococcales indéterminées</i>	A remplir	Cel.	0,00713	0,00228	0,00475	0,03626	0,00728	0,02901	0,00728
MONARC	5729		<i>Monoraphidium arcuatum</i>	(Korshikov) Hindák	Cel.							0,00056
MONCIR	5730		<i>Monoraphidium circinale</i>	(Nygaard) Nygaard	Cel.				0,00082		0,00041	
MONCOV	5733		<i>Monoraphidium convolutum</i>	(Corda) Komárkova -Legnerova	Cel.	0,00323						
MONMIN	5736		<i>Monoraphidium minutum</i>	(Nägeli) Komárková -Legnerová	Cel.		0,00381	0,00398	0,00456	0,00610	0,00456	0,00152
MONNAN	9234		<i>Monoraphidium nanum</i>	(Ettl) Hindák	Cel.	0,00010						
MONTOR	5741		<i>Monoraphidium tortile</i>	(West & G.S. West) Komárkova -Legnerova	Cel.	0,01718	0,01485	0,01313	0,01089	0,00830	0,00376	0,00905
OOCLAC	5757		<i>Oocystis lacustris</i>	Chodat	Cel.					0,00521		
OOCSPX	5752	Cf.	<i>Oocystis</i>	Nägeli	Cel.	0,00193						
PEDANG	5767		<i>Pediastrum angulosum</i>	(Ehrenberg) ex Meneghini	Cel.	0,00120				0,00605		
PEDBOR	5769		<i>Pediastrum boryanum</i>	(Turpin) Meneghini	Cel.				0,00244	0,00490		
PEDDUP	5772		<i>Pediastrum duplex</i>	Meyen	Cel.		0,00129					
PEDRUG	5774		<i>Pediastrum duplex var. rugulosum</i>	Raciborski	Cel.					0,00973		

	PEDSIM	5777		<i>Pediastrum simplex</i>	Meyen	Cel.			0,00199	0,00596	0,00100		
	PEDTET	5780		<i>Pediastrum tetras</i>	(Ehrenberg) Ralfs	Cel.						0,02287	
	SCEARM	5808		<i>Scenedesmus armatus</i>	(Chodat) Chodat	Cel.					0,02315		
	SCEPSA	32011		<i>Scenedesmus pseudoarmatus</i>	Hortobágyi	Cel.	0,00151						
	SCESPX	1136		<i>Scenedesmus</i>	Meyen	Cel.			0,00057				
	TEAMIN	5888		<i>Tetraedron minimum</i>	(Braun) Hansgirg	Cel.	0,00281			0,00572			
CRYPTOPHYTA	CHMSPX	6260		<i>Chroomonas</i>	Hansgirg	Cel.							0,00492
	CRYERO	6271		<i>Cryptomonas erosa</i>	Ehrenberg	Cel.		0,03483	0,07278	0,11103		0,07402	0,07431
	CRYMAR	6273		<i>Cryptomonas marssonii</i>	Skuja	Cel.	0,04819	0,01230	0,02569	0,01960	0,05903	0,09799	
	CRYPLA	24409		<i>Cryptomonas platyuris</i>	Skuja	Cel.		0,04202	0,08779				
	CRYS PX	6269		<i>Cryptomonas</i>	Ehrenberg	Cel.	0,05693						
		PLGNAN	9634		<i>Plagioselmis nannoplanctica</i>	(Skuja) Novarino, Lucas & Morrall	Cel.	0,03542	0,05524	0,03147	0,04802	0,06083	0,03773
CYANOBACTERIA	APAELA	6310		<i>Aphanocapsa elachista</i>	West & G.S. West	Cel.	0,01960	0,00902	0,00971	0,00392	0,00984	0,04508	0,01443
					(Lemmermann) Cronberg & Komárek	Cel.		0,00020					
	APAHOL	6312		<i>Aphanocapsa holsatica</i>									
	APHKLE	35569		<i>Aphanizomenon klebahnii</i>	Elenkin ex Pechar	Cel.	0,00048						
	APHSPX	1103		<i>Aphanizomenon</i>	Morren	Cel.		0,00007	0,00250	0,00300	0,00258	0,00421	0,00359

APOCLA	6349		<i>Aphanothece clathrata</i>	West & G.S. West	Cel.						0,00492		
APOMIN	9638		<i>Aphanothece minutissima</i>	(West) Komárková -Legnerová & Cronberg	Cel.	0,00008	0,00010						
APOSMI	9640		<i>Aphanothece smithii</i>	Komárková -Legnerová & Cronberg	Cel.			0,00043					
CHRDIS	6356		<i>Chroococcus dispersus</i>	(Keissler) Lemmermann	Cel.						0,00934	0,00325	
CHRSPX	6355		<i>Chroococcus</i>	Nägeli	Cel.	0,00196	0,00250						
CYGLIB	10184		<i>Cyanogranis libera</i>	Hindák	Cel.	0,00442	0,00574	0,00450	0,00604	0,01345	0,04410	0,01131	
DOLSPX	31962		<i>Dolichospermum</i>	(Ralfs ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek	Cel.	0,00072	0,00087	0,00432	0,00547	0,00058		0,00202	
LIMRED	6448		<i>Limnothrix redekei</i>	(Van Goor) Meffert	Cel.	0,00976						0,00030	
MIOAER	6380		<i>Microcystis aeruginosa</i>	Kützing	Cel.	0,02790	0,01893	0,29174	0,03037	0,06505	0,07688	0,05200	
MIONOV	6382		<i>Microcystis novacekii</i>	(Komárek) Compère	Cel.		0,05767						
MIOWES	6384		<i>Microcystis wesenbergii</i>	Komárek	Cel.			0,00102	0,00356	0,00657	0,00940	0,01543	
PLAAGA	6430	Cf.	<i>Planktothrix agardhii</i>	(Gomont)	Cel.				0,00042				

				Anagnostidis & Komárek								
			<i>Planktothrix agardhii</i>	(Gomont) Anagnostidis & Komárek	Cel.			0,00214		0,00084	0,00042	
	PSELIM	6459	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	(Lemmermann) Komárek	Cel.	0,00161		0,00050	0,00180	0,00115	0,00098	0,00049
	SYCNID	9726	<i>Synechococcus nidulans</i>	(Pringsheim) Komárek	Cel.	0,00064	0,00525	0,00831	0,02273	0,02387	0,02881	0,05004
	WORNAE	6345	<i>Woronichinia naegeliana</i>	(Unger) Elenkin	Cel.	0,00602	0,00615	0,00436	0,01258	0,00868	0,00249	0,00580
EUGLENOZOA	EUGSPX	6479	<i>Euglena</i>	Ehrenberg	Cel.	0,00059				0,00059	0,00295	
	PHASPX	6500	<i>Phacus</i>	Dujardin	Cel.	0,00074						
	TRARUG	6539	<i>Trachelomonas rugulosa</i>	Stein	Cel.	0,03895						
	TRAVOC	6545	<i>Trachelomonas volvocinopsis</i>	Svirenko	Cel.	0,12530	0,01998	0,02783	0,03185			0,03197
MIOZOA	CERFUR	20323	<i>Ceratium furcoides</i>	Round & Maidana	Cel.		0,00267					
	CERHIR	6553	<i>Ceratium hirundinella</i>	(Müller) Bergh	Cel.	0,02381	0,05578	0,01587	0,00794	0,01992		0,01594
	GYMSPX	4925	<i>Gymnodinium</i>	Stein	Cel.							0,02132
	PERCIN	6581	<i>Peridinium cinctum</i>	(Müller) Ehrenberg	Cel.	0,00903	0,01813		0,01354	0,00906	0,00451	0,02719
	PERUMB	6587	<i>Peridinium umbonatum</i>	Stein	Cel.						0,14461	

OCHROPHYTA	CHUSPX	6114		<i>Chromulina</i>	Cienkowski	Cel.						0,00691	
	DINDIV	6130		<i>Dinobryon divergens</i>	Imohf	Cel.			0,00010	0,00021	0,00050		0,00027
	DINSCH	9579		<i>Dinobryon divergens var. schauinslandii</i>	(Lemmermann) Brunn	Cel.						0,00327	
	INDCHR	1160		<i>Chrysophycées indéterminées</i>	Pascher	Cel.		0,00430			0,00689	0,00857	0,00344
	MALSPX	6209		<i>Mallomonas</i>	Perty	Cel.	0,17170	0,21907	0,13349	0,26184	0,21907	0,04364	0,13144
	PDPSPX	4764		<i>Pseudopedinella</i>	Carter	Cel.	0,01703	0,04345	0,01816	0,06232	0,09038	0,06925	0,03476
	PLHSPX	64280	Cf.	<i>Pleurochloris</i>	Pascher	Cel.							
				<i>Pleurochloris</i>	Pascher	Cel.							
Total Résultat							1,05996	1,29115	1,13264	2,75077	1,28400	1,27691	1,30279

Annexe 4 : biomasses phytoplanctoniques en équivalent de chlorophylle-a par embranchement ($\mu\text{g/l}$), température de l'eau et teneurs en substances jaunes, quantifiées par la Fluoroprobe[®], dans les échantillons prélevés le 20 septembre 2022 sur les 7 stations du lac de Parentis-Biscarrosse (40)

Station	Température (°C)	CHLOROPHYTA	CYANOBACTERIA	BACILLARIOPHYTA	CRYPTOPHYTA	Substances Jaunes	Biomasse totale
1T	20,86	3,45	1,89	1,54	0,72	0,99	7,61
2T	22,13	3,94	0,96	1,78	0,00	0,80	6,68
3T	22,31	3,00	0,77	1,98	0,00	0,83	5,74
4T	23,16	4,39	1,83	2,07	0,00	0,78	8,29
5T	22,86	4,98	1,88	1,05	1,00	0,88	8,91
6T	22,61	3,32	0,75	1,35	0,00	0,77	5,41
7T	22,72	5,01	1,62	1,44	0,81	0,83	8,88

Annexe 5 : données de classification manuelle issue du FlowCAM® sur les échantillons 6 et 7 prélevés le 20 septembre 2022 sur le lac de Parentis-Biscarrosse (40)

STATION	Embranchement	Classe FlowCAM®	Nombre moyen de particules comptées	Nombre moyen de particules/ml	Biovolume moyen (ESD) mm ³ /l
6T	BACILLARIOPHYTA	DIAT_Asterionella_formosa	2,5	0,125	0,0083
		DIAT_Aulacoseira	2	0,1	0,0004
		DIAT_Cocconeis	2	0,1	0,0004
		DIAT_Cymbella	1	0,05	0,0003
		DIAT_Fragilaria	2	0,1	0,0034
		DIAT_Fragilaria_2	2	0,1	0,0139
		DIAT_Fragilaria_crotonensis	2	0,1	0,0030
	CHAROPHYTA	CHLORO_Staurastrum_lunatum	1	0,05	0,0009
		CHLORO_Staurastrum_planctonicum	1	0,05	0,0019
	CHLOROPHYTA	CHLORO_Hariotina	3	0,15	0,0075
		CHLORO_Pediastrum_duplex	4	0,2	0,0191
	CYANOBACTERIA	CYANO_Aphanocapsa	5	0,25	0,0016
		CYANO_Microcystis	11	0,545	0,0253
		CYANO_Pseudanabaena	1	0,05	0,0052
		CYANO_Radiocystis_geminata	1	0,05	0,0003
		CYANO_Woronichinia_cf	8	0,4	0,0109
	EUGLENOZOA	EUGL_Trachelomonas	1	0,05	0,0001
INDETERMINE	SP	32,5	1,62	0,0008	
7T	BACILLARIOPHYTA	DIAT_Asterionella_formosa	2	0,1	0,2250
		DIAT_Aulacoseira	1	0,05	0,0022
		DIAT_Fragilaria	4	0,2	0,0013
		DIAT_Fragilaria_2	2	0,105	0,0023
		DIAT_Fragilaria_crotonensis	1	0,05	0,0025
		DIAT_Navicula	1	0,05	0,0003
	CHAROPHYTA	CHLORO_Staurastrum_anatinum	2	0,1	0,0141
		CHLORO_Staurastrum_lunatum	3	0,16	0,0123
		CHLORO_Staurastrum_planctonicum	4,5	0,23	0,0686
	CHLOROPHYTA	CHLORO_Hariotina	1	0,05	0,0155
		CHLORO_Pediastrum_boryanum	1	0,05	0,0019
		CHLORO_Sphaerocystis_schroeteri	9,5	0,485	0,0044
	CYANOBACTERIA	CYANO_Aphanizomenon	1	0,05	0,0149
		CYANO_Aphanocapsa	6	0,305	0,0133
		CYANO_Microcystis	6	0,305	0,0100
		CYANO_Pseudanabaena	1	0,05	0,0710
	EUGLENOZOA	EUGL_Trachelomonas	1	0,05	0,0001
	INDETERMINE	SP	5	0,25	0,0061
	OCHROPHYTA	CHRYSO_Dinobryon_divergens	1	0,05	0,0153



**Centre Nouvelle Aquitaine Bordeaux
site de Gazinet
50 avenue de Verdun
33612 Gazinet Cedex
Tél. : +33 1 (0)5 57 89 08 00**

Rejoignez-nous sur :



<https://www.inrae.fr/centres/nouvelle-aquitaine-bordeaux>