



HAL
open science

Dynamique et diversité du phytoplancton dans le réservoir Marne (Bassin versant de la Seine)

Anne Rolland

► **To cite this version:**

Anne Rolland. Dynamique et diversité du phytoplancton dans le réservoir Marne (Bassin versant de la Seine). Biodiversité et Ecologie. Université de Savoie, 2009. Français. NNT : . tel-02823324

HAL Id: tel-02823324

<https://hal.inrae.fr/tel-02823324v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

ANNEE 2009

UNIVERSITE DE SAVOIE
Ecole Doctorale SISEO

THESE DE DOCTORAT
DE BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ECOSYSTEMES

Par

Anne ROLLAND

**DYNAMIQUE ET DIVERSITE DU PHYTOPLANCTON DANS
LE RESERVOIR MARNE (BASSIN VERSANT DE LA SEINE)**

Composition du jury :

JACQUET Stéphan	Chargé de recherche, INRA, Thonon	Directeur de thèse
DOMAIZON Isabelle	Maître de Conférence, Université de Savoie, Chambéry	Examinatrice
LEBOULANGER Christophe	Chargé de recherche, IRD, Montpellier	Examineur
DEBROAS Didier	Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand	Examineur
GARNIER Josette	Directrice de recherche, CNRS, Paris	Rapporteuse
LAGADEC Yvan	Professeur, Université de Rennes	Rapporteur

REMERCIEMENTS

Une page va bientôt se tourner, cette thèse s'achève et voici le moment de laisser une trace écrite afin de témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont entourées et encouragées depuis mon arrivée à l'INRA en janvier 2004.

Après un long séjour à Montréal, c'est Jean-Claude Druart qui m'a offert l'opportunité de rentrer en France dans les meilleures conditions. En m'offrant un stage pour me perfectionner en taxonomie du phytoplancton, il m'a apporté toute son expérience et son savoir-faire dans cette discipline. Evidemment, l'histoire ne s'arrête pas là puisqu'il m'a accompagné pendant toute la thèse à la fois moralement et physiquement sur le terrain, deux fois par mois pendant deux ans, avec toujours autant d'enthousiasme, d'ardeur et d'entrain au travail. Pour tout cela Jean-Claude, j'aimerais te dire un grand MERCI et te dire combien j'ai apprécié que tu sois là depuis le départ de l'aventure.

Comme nous le savons tous, les limites d'âge pour obtenir des bourses de thèse en France sont très strictes et lorsqu'à 27 ans on frappe à différentes portes pour obtenir des financements, on ressort souvent, voire tout le temps, bredouille... Fort heureusement, le système CIFRE était là, les partenaires industriels à savoir l'institution « Les Grands Lacs de Seine » à Paris et la société GREBE à Lyon ont accepté de monter une collaboration avec l'INRA de Thonon-les-Bains et ont suffisamment cru en mes compétences pour entreprendre cette aventure. Pour ces raisons, je remercie l'équipe dirigeante de l'institution « Les Grands Lacs de Seine » et plus particulièrement Dominique Amon-Moreau, responsable du secteur Environnement, Philippe Prompt, directeur de la Société GREBE et la direction de l'INRA de Thonon-les-bains, Jean Marcel Dorioz et Jean Guillard. Ma plus profonde reconnaissance à tous les deux pour avoir su être là au moment opportun, être à l'écoute et m'orienter dans des choix éclairés.

Parmi les acteurs de cette thèse, Stéphan Jacquet en est un qui a accepté d'être l'encadrant principal. Merci d'avoir pris ce risque et de m'avoir encouragé durant ces trois années. Merci aussi de m'avoir transmis ta passion pour la plongée et de m'avoir permis de faire cette formation diplômante au CNRS, c'est une aventure que je n'oublierai pas.

Je poursuis ces remerciements pour les gens de terrain de l'institution, Yannik et Gérard qui ont participé à toutes les campagnes de prélèvements pendant deux ans par n'importe quel temps et dieu sait si nous avons expérimenté les pires conditions météorologiques... Merci de vous être fait les guides sur le lac, de m'avoir aidé de façon pratique et ingénue, vous avez fait de ces nombreux courts séjours des moments riches mêlés de joie et de bonne humeur.

Merci également au laboratoire de chimie de l'institution (et une spéciale dédicace à Pascal) qui m'a prêté du matériel et a réalisé certaines analyses durant cette thèse. En parlant de chimie, j'en profite également pour remercier Jérôme et le personnel du laboratoire de chimie de l'INRA (en particulier Pascal P. et Danièle) qui ont accepté de faire toutes mes analyses durant la deuxième année de thèse. Je vous dois une fière chandelle.

Il y a d'autres personnes à l'INRA que j'aimerais remercier. Tout d'abord, Leslie qui a réalisé certains comptages zooplanctoniques et qui par la même occasion m'a formé à leur détermination, Pascal Chifflet qui a construit la boîte de Schindler-Patalas et qui me l'a livré avec en prime une blague hebdomadaire, merci pour cet humour qui fait du bien, Madame Menthon qui a toujours préparé avec le plus grand soin les milieux de culture lors des expériences de tri au cytomètre, Véro qui s'est toujours rendue disponible pour me commander ou me chercher un article et finalement Rémy pour ses conseils et remarques d'une grande qualité scientifique et qui perpétue le lien avec Montréal.

Depuis mon arrivée sur le site de l'INRA, j'ai eu l'occasion de croiser beaucoup de stagiaires et d'étudiants et j'ai une pensée toute particulière aujourd'hui pour Caro, qui est venue de Belgique avec son rêve de partir en mission en Afrique et qui l'a réalisé, Maria qui a quitté le Venezuela pour venir étudier en France, passionnée par le phytoplancton j'ai continué à collaborer avec elle après son départ, Chiara petite bonne femme italienne pleine d'entrain, d'énergie et d'une gentillesse extraordinaire.

Et puis finalement, le benjamin de la promo... Vince, qui est venu me voir chaque soir ces deux derniers mois pour m'encourager, qui m'a mitonné des petits plats certains soirs, qui a participé aux opérations de chirurgie esthétique sur mes graphiques et qui pour couronner le tout, est responsable, pour une grande part, de la belle mise en page de ce manuscrit.
MERCII !

Maintenant voilà le temps de la transition où on laisse les personnes du travail pour penser aux amis et c'est là qu'on se rend compte que des personnes de notre lieu de travail sont devenues des amis. En écrivant cela, je pense à Lyly, Tom et Seb qui sont maintenant beaucoup plus que des collègues de travail et des voisins de bureau. Vous avez été présents dans les moments de travail, de fête, de bonheur, de rire, de joie, de détresse, de pleurs, nous avons partagé tant de choses au sein de notre travail mais aussi à l'extérieur que j'ai des souvenirs plein la tête. Mais vous savez quoi ? le meilleur... c'est qu'on en a encore des années devant nous et qu'on en a encore des aventures à vivre tous ensemble ! Quand je dis tous ensemble, mes pensées sont aussi bien évidemment tournées vers mes amies les plus proches, Peggy, qui a quitté notre Picardie profonde pour me rejoindre en Haute Savoie, et Mélanie, rencontre issue du fruit du hasard mais pas tant que ça... Je finirai avec ma plus belle rencontre depuis bien des années, Philippe, qui durant ces derniers mois a été l'homme de toutes les situations et m'a vraiment encouragé dans cette dernière ligne droite.

Il y a aussi des personnes qui vous font oublier les soucis de la thèse et que j'ai envie de remercier justement parce qu'à un moment ils ont su me faire complètement déconnecter. Il s'agit des membres du club des Archers de Ripaille (Robert, Marc, Pierre, Alain, Bernard), du club subaquatique du Léman (Jean-Luc, Yves, Pierre, Guy, Christophe Guy, Agnès, Jean-Yves), des écoles de danse (Gégé, Esther, Georges, Agnès, Thierry, Mikaël, David, Alain, Richard) et dans le cadre moins sportif, l'équipe des Gérards (Philippe, Renaud, Guillaume, Vincent, Idriss, Christophe, Zaz).

Finalement, voilà le temps de remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu, qui ont toujours cru en moi et à qui je dois mon épanouissement tant personnel que professionnel. Je remercie également ma sœur, Marie, et mes deux frères, Antoine et Grégoire pour cette relation très privilégiée que nous entretenons et pour les nombreuses manifestations d'encouragement qu'ils m'ont témoigné.

Reste une personne, mon grand père... Je n'avais peut être pas réalisé à quel point cet amoureux des insectes, des oiseaux, des plantes m'avait depuis toute petite, à commencer par nos sorties au jardin des plantes, initié et sensibilisé à la beauté et à la fragilité de la nature. Ces voyages et ces récits toujours gorgés d'exotisme, de paysages incroyables, de faune et de flore étonnantes... Pour tout cet émerveillement que tu manifestes encore aujourd'hui et pour l'intérêt dont tu as toujours fait preuve envers la nature, je te dédicace cette thèse.

*« La maturité s'obtient lorsque nous nous sentons en mesure
de nous approprier lucidement notre existence, de nous en
faire l'auteur, de signer chacun de nos choix en notre nom. »*

Vincent Cespedes

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

1. Le phytoplancton, élément de qualité biologique de la Directive Cadre sur l'Eau.....	1
1.1. Généralités sur le phytoplancton	1
1.2. Phylogénie et diversité du phytoplancton	2
1.3. Distribution spatiale	7
1.3.1. Distribution horizontale.....	7
1.3.2. Distribution verticale.....	7
1.4. Dynamique saisonnière : le modèle PEG	8
1.5. Stratégies écologiques « C-R-S ».....	10
1.6. Le phytoplancton comme indicateur de qualité biologique	12
1.6.1. Le choix du phytoplancton.....	12
1.6.2. Classification de l'état écologique des lacs, conditions de référence et intercalibration à l'aide de l'élément de qualité biologique « Phytoplancton ».....	13
1.6.3. Intercalibration de l'élément de qualité biologique « phytoplancton » au sein des groupes d'intercalibration géographiques	15
2. Le réservoir MARNE : une masse d'eau artificielle selon la DCE.....	17
2.1. Le « bon potentiel écologique » selon la DCE : cas des masses d'eau artificielles et des masses d'eau fortement modifiées.	17
2.1.1. Peut-on définir la signification de « bon potentiel écologique » et « potentiel écologique maximum » ?	17
2.1.2. Comment déterminer le PEM et le GEP ?.....	18
2.2. Présentation du site d'étude : le Réservoir Marne.....	20
2.2.1. L'ouvrage et ses canaux	20
2.2.2. Les divers usages du Réservoir Marne.....	22
2.2.3. Bilan biogéochimique et biologique	24
2.2.4. Modélisation du fonctionnement écologique du Réservoir Marne	26
2.2.5. Classification et évaluation de l'état écologique du Réservoir Marne selon une démarche DCE	28
2.2.6. Stratégie d'échantillonnage globale pour le suivi de la qualité de l'eau du Réservoir Marne depuis sa mise en eau	29
3. Problématique, objectifs de la thèse et questions posées	33

CAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1. Introduction	38
2. Instrumentation utilisée pour l'analyse du phytoplancton du Réservoir Marne	44
2.1. La microscopie inversée	44
2.2. L'extraction et le dosage de la chlorophylle <i>a</i>	47
2.3. La cytométrie en flux	49
2.4. La sonde spectrofluorométrique immergeable, Fluoroprobe™ (bbe, Moldaenke)	53
3. Analyses statistiques appliquées aux données : L'Analyse Triadique Partielle (ATP)	55
4. A 2-year survey of phytoplankton in the Marne Reservoir (France): a case study to validate the use of an in-situ spectrofluorometer by comparison to algal taxonomy and chlorophyll <i>a</i> measurements.	58
5. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton	86

CHAPITRE III : RESULTATS

1. Introduction	120
2. Assessing Phytoplankton Structure and Spatio-temporal Dynamics in a Freshwater Ecosystem Using a Powerful Multiway Statistical Analysis	125
3. Variables environnementales associées à la dynamique phytoplancton du réservoir Marne à la station de référence : étude exploratoire.....	161
4. Classification de l'état écologique du réservoir Marne via 3 métriques : Chlorophylle <i>a</i> , Indice planctonique lacustre et Phosphore total	194

CHAPITRE IV : DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GENERALES

1. Les techniques et les méthodes instrumentales	207
2. La stratégie d'échantillonnage	210
3. L'écologie du réservoir Marne et sa classification au regard de la DCE.....	212

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	215
-----------------------------------	-----

ANNEXE1	237
---------------	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 Carte de France localisant le Réservoir Marne (Source : Google Earth, 2008)..... 20

Figure 2 Carte du Réservoir Marne présentant les deux lacs (lac du Der et lac de Champaubert), les deux bassins à vidange différée (Nord-Ouest et Sud-Est), les deux canaux d'amenée (Marne et Blaise), les deux canaux de restitution (Marne et Blaise) et la restitution en Droyes (Source : Google Earth, 2008) 22

Figure 3 Prise de vue du Réservoir Marne (Franck Mulliez, 2008)..... 23

Figure 4 Schéma des processus écologiques pris en compte dans le modèle RIVE (Garnier *et al.* 1998). 27

Figure 5 Nombre total de taxons identifiés par an pour chacune des stations d'échantillonnage entre 1997 et 2004 30

Figure 6 Nombre moyen de taxons identifiés par échantillon pour chacune des stations d'échantillonnage entre 1997 et 2004 31

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Figure 1 a) Représentation biparamétrique (cytogramme) de deux mesures optiques (FL3 versus SSC) – b) Représentation monoparamétrique (histogramme de distribution) d'une mesure optique (SSC). (Tiré de Jacquet 2004) 50

Figure 2 Histogrammes biparamétriques d'échantillons estivaux provenant de la mer Wadden (Allemagne). FL3 représente la fluorescence rouge (excitation à 488 nm et émission à 675 nm) indicatrice de la présence de chlorophylle, FL2 exprime la fluorescence orange de la phycoérythrine (excitation à 488 nm et émission à 575 nm). FL4 représente la fluorescence de la phyco cyanine (excitation à 633 nm et émission à 660 nm). FSC fournit une indication sur la taille de la cellule. a) Configuration pour le pico- et nano- phytoplancton. b) Configuration pour le nano- et micro-phytoplancton. Les groupes identifiés sont les suivants : A - *Synechococcus* type I ; B – *Synechococcus* type II ; C - pico-eucaryotes type I ; D – pico-eucaryotes type II ; E – pico-eucaryotes type III ; F – *Leptocylindrus minimus* (diatomée) ; G – *Hemiselmis virescens* (cryptophycée) ; H – *Teleaulax amphioxeia* (cryptophycée) ; I – *Rhodomonas marina* (cryptophycée) ; K – *Nitzschia closterium* (diatomée) ; L – *Thalassiosira minima* (diatomée) ; M – *Fibrocapsa japonica* (raphidophycée) ; X – *Microcystis viridis* (cyanobactérie). (Tiré de Reckermann 2000)..... 52

Figure 3 a) Représentation sous forme de tableaux des données acquises le long de la colonne d'eau b) Représentation sous forme de graphique des données acquises le long de la colonne d'eau. Ces données sont issues d'une campagne de terrain effectuée à la station Giffaumont (H) du Réservoir Marne en juin 2006 (données personnelles)..... 54

Figure 4 Cube de données X présenté sous la forme d'une série spatiale de k tableaux (n dates x p variables) 56

- Figure 5** Relationship between total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the bbe FluoroprobeTM and total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) provided by the spectrophotometric analyses. The dashed line corresponds to the 1:1 relationship..... 66
- Figure 6** Relationships between total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe and total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) provided by the spectrophotometric analyses subdivided into the 5 classes of concentrations (as proposed by the CEMAGREF in the context of the WFD) i.e. a) $<4.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; b) $[4.6-8[\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; c) $[8-12.2[\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; d) $[12.2-21.6[\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; e) $\geq 21.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The dashed line corresponds to the 1:1 relationship..... 68
- Figure 7** Relationship between total phytoplankton biovolume ($\mu\text{m}^3\cdot\text{L}^{-1}$) and total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe..... 69
- Figure 8** Relationships between total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe for each pigment class and total biovolume ($\mu\text{m}^3\cdot\text{L}^{-1}$) for each phytoplankton class i.e. a) the “Browns” associated with the Diatoms, Dinoflagellates and Chrysophyceae (noted DDC) ; b) the “Reds” associated with the Cryptophyceae and the Red Cyanobacteria (noted CRC); c) the “Greens” associated with the Chlorophyceae and Desmidiates (noted CD); d) the “Blue-greens” associated with the Blue-Green Cyanobacteria (noted BGC)..... 70
- Figure 9** Canonical correspondence analysis computed on 243 measures of total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe for each pigment class in relation with the total biovolume ($\mu\text{m}^3\cdot\text{L}^{-1}$) for each phytoplankton class obtained with the Utermöhl technique. The percentage of variance explained is 56.3% in the 2 first axes. The following abbreviations are used in this graph. For the Utermöhl technique: “DDC” corresponds to the sum of biovolumes of the Diatoms, Dinoflagellates and Chrysophyceae, “CRC” to the Cryptophyceae and the Red Cyanobacteria, “CD” to the Chlorophyceae and Desmidiates, and “BGC” to the Blue-Green Cyanobacteria. For the FluoroprobeTM results: ‘Browns’ corresponds to the chl *a* concentrations of Diatoms, Dinoflagellates and Chrysophyceae, “Reds” to the Cryptophyceae and the Red Cyanobacteria, “Greens” to the Chlorophyceae and the Desmidiates, “Blue-greens” to the Blue-Green Cyanobacteria..... 71
- Figure 10** Spatio-temporal dynamics of the “Browns” obtained with the bbe FluoroprobeTM over the two sampling years (2006-2007), at the station H, between the surface and 10 m.... 78
- Figure 11** PE vs. Chla fluorescence cytograms showing the temporal evolution of *Synechococcus* spp. in Lakes Geneva (a-d), Bourget (e-h), Annecy (i-l), stations 501 (m-p) and 553 (q-t) from the Reservoir Marne. (1: *Synechococcus* spp; 2: 1- μm beads). In the picture: *Synechococcus* microcolonies before (A) and after (B) sorting and culturing. Note that most populations were unicellular forms. 97
- Figure 12** PE vs. Chla fluorescence cytograms showing the seasonal evolution of the phytoplankton composition **a-d** for two clusters isolated from the station 501 of the Reservoir Marne (1: Mixed green-algae community; 2: *Pseudanabaena limnetica* (picture of a filament); 3: beads) and **e-h**- for three clusters isolated from the station 553 of the Reservoir Marne (1: *Chlorella vulgaris*; 2: Mixed green algae community; 3: Mixed green algae community; 4: beads). Pictures of the mixed green algae communities with *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acuminatus*, *Hyaloraphidium contortum*, *S. linearis* (upper left, from up left to right down) and with *Ankyra lanceolata*, *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus spinosus*, *Monoraphidium* sp. (middle, from up left to right down). 99
- Figure 13** PE vs. Chla fluorescence cytograms showing typical signatures of phytoplankton species in the 4 hydrosystems. **Lake Geneva**: a1: *Mougeotia gracillima*, a2: *Pseudanabaena catenata* and *P. limnetica*; b: *Pseudanabaena limnetica*; c: *Mougeotia gracillima*; **Lake Bourget**: d: *Planktothrix rubescens*; e: *Pseudanabaena limnetica*, f1: *Planktothrix rubescens*,

f2: mixed diatoms (*Stephanodiscus minutulus*, *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*);
g: *Pseudanabaena acicularis*, h: *Aphanizomenon flos-aquae*; **Lake Annecy**: i:
Pseudanabaena acicularis; **Reservoir Marne** (station 501): j: *Pseudanabaena limnetica*; k:
Cryptomonas sp; **Reservoir Marne** (station 553): l: *Cryptomonas* sp..... 101

Figure 14 Forward Scatter vs. Chla fluorescence cytograms showing typical signatures of phytoplankton species in the three peri-alpine lakes. Lake Geneva: a: *Mougeotia gracillima* and *Diatoma tenuis*, b: 1- *Scenedesmus* sp. and *Schroederia setigera*, 2- *Stephanodiscus minutulus*, 3- *Chlorella vulgaris*; c: *Mougeotia gracillima*; d-e: 1- *Monoraphidium contortum*, 2- *Chlorella vulgaris* ; Lake Bourget: f: 1- *Asterionella formosa*, 2- *Fragilaria crotonensis*, 3- *Chlorella vulgaris*; Lake Annecy: g: *Fragilaria crotonensis*, h: 1- *Monoraphidium komarkovae*, 2- *Asterionella formosa* and *Fragilaria crotonensis*; i: 1- *Asterionella formosa* and *Fragilaria crotonensis*, 2- *Chlorella vulgaris*; j: 1- *Fragilaria crotonensis*, 2- *Chlamydomonas* sp. 102

CHAPITRE III : RESULTATS

Figure 1 The reservoir Marne (source: Google Earth) and location of the sampling stations 131

Figure 2 The inter-structure analysis: **A** – Eigenvalues histogram based on the diagonalization of the vectorial correlation matrix. **B** – Coordinates of the 6 data sub-matrices (stations) given by the first two eigenvectors of the vectorial correlation matrix. **C** – Tree topology obtained by a Ward clustering method on 1-RV that indicates the following groups of stations ((G, (I, H, N)), (J, K)) 134

Figure 3 The compromise analysis (average station): **A** – Coordinates of the sampling dates in the first plane (axes I-II) of the compromise and histogram of eigenvalues identifying the prominence of the two first axes that define the average spatial structure. (Table III contains the correspondence between numbers and dates) **B** – Projections of the variables (species) in the first plane (axes I-II) of the compromise. **C** – Coordinates of the sampling dates in the second plane (II-III) of the compromise and histogram of eigenvalues identifying the contribution of the second and third axes in the construction of the compromise. **D** – Projections of the variables (species) in the plane defined by the axes II and III of the compromise. 138

Figure 4 Kendall τ rank correlations between species biovolume and factorial coordinates on the first three axes: 89 species were found to be significantly correlated with these axes (for $\alpha = 1\%$) 139

Figure 5 Analysis of the reproducibility of the compromise structure: A- Multiwindowed projection (by station) of rows (dates) on the first plane of the compromise. B- Multiwindowed projection (by station) of columns (species) on the first plane of the compromise. 142

Figure 6 Variations saisonnières des débits entrants et sortants (Marne et Blaise) ainsi que de la capacité totale du réservoir Marne pour les années 2006 et 2007 167

Figure 7 Evolution de la concentration des orthophosphates (PO_4^{3-}) au cours de l'année 2007 aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m) 169

Figure 8 Evolution de la concentration des nitrates (NO_3^-) et de l'ammonium (NH_4^+) au cours de l'année 2007 aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m)	170
Figure 9 Evolution de la concentration de la silice dissoute (SiO_2) au cours de l'année 2007 aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m).....	171
Figure 10 Evolution de la concentration des MES et de la turbidité au cours de l'année 2007 et aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m).....	172
Figure 11 Evolution temporelle (2006-2007) et spatiale (3 m, 6 m et 8 m) de l'abondance des trois groupes de virus (VLP) et des bactéries hétérotrophes (Hbact).....	174
Figure 12 Evolution temporelle (2006-2007) et spatiale (3 m (a), 6 m (b) et 8 m (c)) du biovolume phytoplanctonique et de la concentration de chlorophylle <i>a</i>	176
Figure 13 Représentation en ACP normée du cercle des corrélations des variables étudiées (a) et de la projection des centres d'inertie des différentes dates d'échantillonnage à une profondeur donnée (b) durant l'année 2007. (BV : Biovolume phytoplanctonique ; T° : Température ; Avr : Avril ; Jn : Juin ; Jt : Juillet ; Sept : Septembre).....	179
Figure 14 Relation entre l'EQR et la concentration en phosphore total ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (échelle log-log). La droite pleine bleue correspond à la régression linéaire. (Reproduit d'après De Bortoli et Argillier 2008, avec l'autorisation des auteurs)	197
Figure 15 Dynamiques de la concentration hivernale moyenne d'orthophosphates (PO_4^{3-}) exprimée en milligrammes par litre d'eau et de la concentration annuelle moyenne de chlorophylle <i>a</i> (Chl <i>a</i>) exprimée en microgrammes par litre d'eau dans le lac du Bourget entre 1980 et 2008.	204

LISTES DES TABLEAUX

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

Tableau I Code couleur associé à l'état écologique des lacs	14
Tableau II Code couleur associé à l'état chimique de la masse d'eau de surface	15
Tableau III Description des bases de données pour chacun des GIGs	16
Tableau IV Code couleur associé à l'état écologique de la masse d'eau de surface type masses d'eau fortement modifiées ou artificielles	19
Tableau V Abondances (cellules·ml ⁻¹) moyennes, maximales et minimales du phytoplancton de Réservoir Marne de 1997 à 2004 dans trois stations de suivis.....	32

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Tableau I Distribution des pigments photosynthétiques principaux dans les classes de phytoplancton marin et d'eau douce ainsi que les longueurs d'ondes d'absorption, d'excitation et d'émission de ces pigments.....	40
Table 2 Proportion of the spectrofluorometric chl <i>a</i> concentrations that fit into the spectrophotometric chl <i>a</i> concentrations classes established by De Bortoli & Argillier (2008) from the research institute for sustainable management of water and landscapes (CEMAGREF)	69
Table 3 Classification of the different species isolated from the four hydrosystems using FCM sorting.	93

CHAPITRE III : RESULTATS

Table I Some physical and chemical characteristics of the stations sampled in the Reservoir Marne for both years. Values are expressed as means and standard deviations over the two years 2006-2007.	130
Table II Matrix of vectorial correlation coefficients between the tables (RV), weight of each table (α_k) in the construction of the compromise, and quality index of the compromise's structure (Cos^2) for each station.	135
Table III Correspondence between the sampling dates and their number on the different figures.....	136
Tableau IV Limites de classes de qualité définies pour la concentration de phosphore total (PT) dans le réservoir Marne (De Bortoli et Argillier 2008)	197
Tableau V Concentrations de chlorophylle <i>a</i> (chl <i>a</i>) moyennes obtenues à partir de prélèvements à une profondeur de 3 mètres dans la zone euphotique pour les années 2006 et 2007 ainsi que les états écologiques associés.....	200

Tableau VI Concentrations de phosphore total (PT) moyennes obtenues à partir de prélèvements à une profondeur de 3 mètres en 2006 et 2007 ainsi que les états écologiques associés..... 200

Tableau VII : Indices planctoniques (I_{pl}) calculés à partir de prélèvements à une profondeur de 3 mètres dans la zone euphotique pour les années 2006 et 2007 et niveaux trophiques associés..... 201

ANNEXE 1

Tableau I Définitions des états écologiques « très bon », « bon » et « moyen » pour les lacs (Annexe 5, Directive 2000/60/CE, Parlement Européen 2000)..... 237

Tableau II Définitions des potentiels écologiques maximal, bon et moyen en ce qui concerne les masses d'eau fortement modifiées ou artificielles (Annexe 5, Directive 2000/60/CE, Parlement Européen 2000)..... 240

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

La documentation disponible sur la Directive Cadre sur l'Eau insiste sur la nécessité d'impliquer, d'informer et de consulter les citoyens pour ce qui a trait à la politique adoptée par l'Union Européenne (UE) en matière de législation de l'eau, les objectifs et le type de gestion pratiqué par l'UE ainsi que la démarche adoptée pour le contrôle de la qualité des plans d'eau et leur surveillance (article 14 de la Directive 2000/60/CE). Cependant, l'information n'est pas si facile à trouver et à comprendre alors qu'il est indispensable en tant que citoyen, gestionnaire de plan d'eau ou biologiste aquatique de posséder quelques notions sur cette Directive puisque nous serons tous amenés, dans un avenir proche, soit à en parler soit à en entendre parler. C'est pour cette raison que nous avons tenu à introduire cette thèse de doctorat par un chapitre général qui replace le phytoplancton dans le cadre de la DCE puisqu'il constitue l'intérêt central du travail de recherche proposé. Dans une deuxième section, nous présentons le réservoir Marne qui est considéré comme une masse d'eau artificielle d'après la DCE et nous finissons par définir précisément les objectifs de cette thèse (financée par l'Agence Nationale pour la Recherche et la Technologie dans le cadre d'un contrat CIFRE) au regard des interrogations des gestionnaires.

1. Le phytoplancton, élément de qualité biologique de la Directive Cadre sur l'Eau

1.1. Généralités sur le phytoplancton

Le phytoplancton (du grec *phyton* ou plante et *planktos* ou errant) est constitué par l'ensemble du plancton végétal, c'est-à-dire des microorganismes photosynthétiques qui sont libres, passifs et en suspension dans la colonne d'eau. Il s'agit de cellules, colonies ou filaments (i) qui ne peuvent nager et dont les mouvements dépendent de ceux de l'environnement aquatique et/ou (ii) qui sont motiles (flagellés ou ciliés) mais dont les déplacements sont restreints. La principale source d'acquisition de l'énergie s'effectue par phototrophie chez ces organismes, à partir de la lumière (photosynthèse = processus d'absorption des sels minéraux et du carbone <http://fr.wikipedia.org/wiki/Carbone> sous forme de CO₂ et de rejet d'oxygène sous l'effet de la lumière). La chlorophylle *a*, un des pigments chlorophylliens, est le pigment majoritaire impliqué dans ce processus. Pour cette raison, le phytoplancton se situe le plus souvent dans la couche superficielle éclairée des masses d'eau qu'on appelle zone (eu)photique (recevant plus de 1% de la lumière incidente). Par ailleurs,

de nombreuses cellules phytoplanctoniques (les chrysophycées par exemple) sont capables de réaliser la mixotrophie, c'est-à-dire qu'elles possèdent des capacités hétérotrophes et elles utilisent des substances organiques à la base de leur métabolisme ou sont même capables d'ingérer des bactéries (Domaizon *et al.* 2003, Zubkov et Tarran 2008).

Si les organismes phytoplanctoniques représentent seulement 1% de la biomasse des organismes photosynthétiques sur Terre, ils assurent 45 % de la production primaire (Chisholm 1995, Behrenfeld *et al.* 2001). Ils sont ainsi à la base de la chaîne trophique pélagique (Azam et Malfatti 2007) et sont donc responsables d'une part essentielle de la production primaire dans les milieux aquatiques. La structure et la dynamique de cette communauté sont sous le contrôle de différents facteurs ou processus qui interagissent simultanément entre eux :

- les facteurs ascendants (« bottom-up ») correspondent essentiellement aux ressources nutritives (apports endogènes et exogènes), capables d'influencer les capacités de croissance cellulaire;
- les facteurs descendants (« top-down ») sont essentiellement exercés l'activité de prédation des herbivores (zooplancton et poissons phytoplanctophages) ou encore par l'action lytique des virus.

1.2. Phylogénie et diversité du phytoplancton

Le phytoplancton regroupe deux types d'organismes qui diffèrent au niveau cytologique essentiellement par la présence – eucaryotes – ou non – procaryotes - d'un noyau cellulaire (ADN confiné dans une enveloppe nucléaire) (Prescott *et al.* 2003). Actuellement, la phylogénie est en pleine évolution, grâce notamment aux avancées technologiques en biologie moléculaire (Iglesias-Rodriguez *et al.* 2006 ; Not *et al.* 2007 ; Saez *et al.* 2008). A ce jour, 8 principales classes différenciées selon des critères morphologiques, cytologiques, biochimiques et reproductifs sont recensées dans les milieux aquatiques. Nous en donnons une description sommaire ci-dessous.

* Les **cyanobactéries**, organismes procaryotes, regroupent plus de 110 genres et environ 1000 espèces dulçaquicoles. La plupart des cyanobactéries sphériques appartiennent à la famille des Chroococcacées et les filamenteuses aux familles des Nostocacées et Oscillatoriacées (Bourrelly 1985a). Les cellules appartenant à cette classe se caractérisent par l'absence de noyau, de plaste et de reproduction sexuée. Les cyanobactéries (ou « algues

bleues ») se distinguent des procaryotes hétérotrophes par la présence de chlorophylle *a* et de pigments accessoires (phycocyanine, phycoérythrine, caroténoïdes) (Ganf *et al.* 1991 ; Schagerl et Donabaum 2003 ; Colyer *et al.* 2005). Certaines cyanobactéries possèdent des vacuoles gazeuses qui leur permettent de réguler leur position dans la colonne d'eau et de se maintenir à une profondeur où la température, la lumière et les éléments nutritifs sont favorables à leur développement. Un bon exemple de cette propriété physiologique est fourni avec l'espèce *Planktothrix rubescens* (Schanz *et al.* 1997 ; Bright et Walsby 1999 ; Walsby *et al.* 2004 ; Walsby 2005). D'autres cyanobactéries, également filamenteuses comme la précédente, possèdent deux types de cellules particulières : des hétérocystes et des akinètes. C'est par exemple le cas des genres *Anabaena* et *Nostoc* (Stewart 1973 ; Mur *et al.* 1999). Les hétérocystes sont des cellules à membrane épaisse, à contenu cellulaire homogène et très clair, capables de fixer l'azote atmosphérique. Ces cyanobactéries sont donc avantagées en milieu limitant en azote assimilable. Les akinètes sont des spores durables et chargées de réserves qui, une fois détachées en conditions favorables, forment un nouveau filament (Bourelly 1985a). Les cyanobactéries se divisent essentiellement par fission binaire ou division végétative, c'est à dire que la membrane cellulaire s'invagine et sépare la cellule mère en deux cellules filles isomorphiques. Généralement, cette division a lieu dans un, deux ou trois plans qui sont plus ou moins perpendiculaires les uns aux autres entre générations successives (Komarek 2003). La diversité des cyanobactéries a été moins étudiée en milieu marin que dans les milieux d'eau douce. Cette différence résulte de l'occurrence de fortes efflorescences de cyanobactéries en milieu d'eau douce et du fait que les cyanobactéries marines sont constituées de deux principaux genres unicellulaires de petite taille (*Synechococcus* et *Prochlorococcus*) plus difficilement étudiables. *Prochlorococcus*, découverte en 1988 (Chisholm *et al.* 1988), est l'espèce photosynthétique la plus abondante de la biosphère (Partensky *et al.* 1999) contribue jusqu'à 84% de la fixation du CO₂ dans certaines eaux oligotrophes (Jardillier communication personnelle).

* Les **chlorophycées** forment un groupe extrêmement vaste et morphologiquement très diversifié. Elles sont réparties en 4 classes : les Euchlorophycées, les Ulothricophycées, les Zygothricophycées et les Charophycées. Celles-ci comportent environ 500 genres, représentant plus de 15000 espèces (John 1994). Toutefois, la plupart des algues vertes planctoniques lacustres appartiennent à l'ordre des Volvocales et à celui des Chlorococcales qui font partis de la classe des Euchlorophycées (Bourelly 1985b). Les cellules des Volvocales possèdent

une paroi cellulaire glycoprotéique pourvue de 2, 4 ou 8 flagelles de même taille, 1 noyau et 2 vacuoles contractiles localisées à la base des flagelles. Les chloroplastes de la plupart des volvocales sont en forme de U et les chlorophylles *a* et *b* sont les pigments majeurs (Ettl 1983). Les Chlorococcales sont unicellulaires ou coloniales avec une membrane bien définie, parfois de formes filamenteuses (Ettl et Gärtner 1988). L'état végétatif est sous forme immobile et les flagelles sont absents au stade adulte. On distingue comme précédemment un noyau par cellule et les mêmes pigments majeurs (Bourrelly 1985b). Pour assurer leur reproduction, les Volvocales et les Chlorococcales forment des zoospores à l'intérieur de la paroi cellulaire de la cellule mère. On distingue 3 types de zoospores : celles avec membrane et 2 fouets égaux, celles sans membrane et à fouets égaux et celles sans membrane et à fouets légèrement inégaux mais de même structure (Bourrelly 1985b). Dans les formes coloniales, chaque cellule de la colonie se divise par division végétative en n cellules formant $2 \times n$ cellules filles. On retrouve également 3 types de reproduction sexuée : isogamie (2 gamètes de même taille), anisogamie (gamète male plus petit que gamète femelle) et oogamie (gamète femelle non flagellé et gamète mâle flagellé) (Nozaki 2003).

* Les **xanthophycées** regroupent plus de 100 genres et environ 600 espèces dulçaquicoles. Elles vivent à l'état unicellulaire, colonial ou de filament et sont caractérisées par une plus grande proportion de pigments caroténoïdes (β -carotène) que de chlorophylle, ce qui peut expliquer leur couleur jaune-verte (Ettl 1978). Les cellules mobiles possèdent deux flagelles de taille différente. La paroi cellulaire est souvent absente et quand elle est présente elle contient une grande quantité de pectine et peut être siliceuse chez plusieurs espèces. Les xanthophycées se divisent essentiellement par fission binaire mais peuvent également former des zoospores. La reproduction sexuée, quand elle a lieu, est le plus souvent isogame (Ott et Oldham-Ott 2003).

* Les **chrysophycées** sont des algues unicellulaires ou coloniales (rarement filamenteuses), dont certaines vivent dans une enveloppe protectrice appelée lorique. Leurs cellules possèdent un ou plusieurs plastes jaunes ou bruns à cause de la forte concentration en xanthophylles (lutéine, fucoxanthine, diadinoxanthine) et caroténoïdes (β -carotène) masquant la couleur due aux chlorophylles *a* et *c* (Wetzel *et al.* 2001). La plupart de ces cellules obtiennent leur énergie par mixotrophie, c'est à dire qu'elles sont capables d'autotrophie et d'hétérotrophie. Dans le dernier cas, elles se nourrissent en consommant de la matière

particulière comme des bactéries ou des protistes (phagotrophie) ou bien en absorbant des molécules organiques complexes (osmotrophie) (Sanders *et al.* 1990 ; Domaizon *et al.* 2003). Le nombre de flagelles est variable. La plupart des cellules sont uniflagellées mais d'autres possèdent deux flagelles généralement de même taille. Beaucoup des espèces appartenant à cette classe n'ont pas de paroi cellulaire mais sont juste entourées d'une membrane cytoplasmique. D'autres possèdent une surface cellulaire couverte de plaques ou d'écailles siliceuses ou calcaires. La multiplication se fait par fission binaire ou par zoosporulation. Les phénomènes sexuels, rarement signalés, sont de nature isogamique. En période de repos, la formation endogène de kystes siliceux, globuleux, percés d'un pore obstrué par un bouchon, est caractéristique des Chrysophycées.

* Les **diatomées** (Bacillariophycées) engloberaient plus de 100 000 espèces et on estime que près de 15 000 ont été identifiées à ce jour. C'est un des groupes les plus importants du phytoplancton même si beaucoup d'espèces sont sessiles ou associées aux substrats littoraux. Leur caractéristique principale est la présence d'une paroi cellulaire siliceuse appelée frustule (Germain 1981). Le pourtour des valves est connecté avec des bandes qui constituent la ceinture de la cellule. Ces microorganismes sont unicellulaires ou coloniaux et sont communément divisés en deux groupes : les diatomées centriques qui ont une symétrie radiale et les diatomées pennées qui ont une symétrie bilatérale. Les valves des diatomées pennées présentent des parties de cellules plus épaisses et dilatées. Chez certaines espèces, une fente, nommée raphée, traverse une partie ou la cellule entière alors que chez d'autres espèces, on observe une dépression de la paroi cellulaire appelée pseudoraphée. Quatre groupes de diatomées pennées sont différenciés sur la base de ces structures : les Araphidées, les Raphidiodées, les Monoraphidées et les Biraphidées. La reproduction végétative par division cellulaire est le mode le plus commun de multiplication (Canter-Lund et Lund 1995).

* Les **cryptophycées** sont unicellulaires, mobiles de par la présence de deux flagelles (de taille égale) et dépourvues de paroi cellulaire. En effet, l'enveloppe qui les entoure est appelée périplaste et est composé de deux couches distinctes, le périplaste interne (succession de plaques protéiques) et le périplaste externe (membrane protéique unique) qui entourent la membrane plasmique (Kugrens et Clay 2003). Les cellules sont aplaties dorso-ventralement et sont pourvues d'une invagination antérieure qui porte les deux flagelles. Les cellules

contiennent une variété de pigments dont la phycoérythrine qui leur donne une couleur rougeâtre caractéristique. La reproduction se fait par fission binaire (Starmach 1974 ; Bourelly 1985a).

* Les **dinoflagellés** regroupent environ 300 espèces et sont des algues flagellées unicellulaires dont la plupart sont mobiles. Une ceinture transversale, le cingulum, encercle la cellule et la divise en une épithèque et une hypothèque alors qu'une invagination longitudinale, le sulcus, définit la face ventrale de la cellule. Ils possèdent des plaques de cellulose sur la partie externe de la membrane et la taxonomie de ces microorganismes est basée sur le nombre et l'arrangement de ces plaques (Kofoid 1909). Ces plaques peuvent être très fines et sont parfois difficiles à voir par microscopie optique. Des pores apicaux, des extensions de plaques et des épines peuvent aussi apparaître chez certaines espèces. La chlorophylle *a* et *c₂* sont deux pigments photosynthétiques majeurs des cellules de dinoflagellés. La péridinine qui fait partie des pigments accessoires de type caroténoïdes est responsable de la couleur dorée bien que les cellules puissent apparaître jaunâtre voire marron. Bien que la reproduction sexuée se produise de temps en temps, la reproduction asexuée par la formation d'aplanospores (spores non flagellés) prédomine. En période de diapause, la formation de kystes peut s'accroître considérablement (Carty 2003).

* Les **euglènes** sont répartis en 13 genres et plus de 2000 espèces. Ils sont presque tous unicellulaires, sans paroi cellulaire, possèdent un, deux ou trois flagelles qui émanent d'une invagination de la membrane cellulaire, une vacuole contractile et un stigma (« eyespot ») orange à rouge composé de globules de caroténoïdes (Rosowski 2003). Bien que certains euglènes soient non pigmentés, phagotrophes (capable d'ingérer des particules solides) et par conséquent considérés comme des protistes animaux (ex protozoaires), la plupart sont photosynthétiques et parfois hétérotrophes. Il reste que même si la phagotrophie peut constituer le mode d'assimilation de carbone principal, aucune de ces espèces n'en dépend uniquement. Ce dernier est toujours combiné à l'absorption de composés organiques dissous. En ce qui concerne leur mode de reproduction, la division cellulaire semble être la règle pour cette classe du phytoplancton (Bourelly 1985a).

1.3. Distribution spatiale

1.3.1. Distribution horizontale

La répartition horizontale du phytoplancton de manière non homogène (« patchiness ») entraîne des différences majeures dans les assemblages en milieu marin ou d'eau douce. Cette distribution peut-être due aux variations des conditions physiques et chimiques en lien avec les systèmes de courants majeurs. La vitesse du courant est elle même dépendante de la vitesse du vent et, par conséquent, les différences dans les assemblages sur le plan horizontal peuvent perdurer tant que le vent influe. Comme, de plus, le vent fluctue en intensité et en direction, il provoque de nouveaux schémas de distribution qui se superposent aux anciens. Ainsi, aucun organisme individuel n'adopte une position permanente et chaque individu est susceptible de se faire transporter ça ou là (Padisák 2004).

Dans les petits lacs, des variations significatives dans la distribution horizontale des espèces planctoniques sont généralement observables sur de courtes périodes de temps, ces discontinuités étant souvent associées à l'interaction de la force et de la direction du vent avec la stabilité thermique de la colonne d'eau. En effet, le morcellement horizontal du phytoplancton peut se produire à de très petites échelles (de 1 à quelques mètres) mais il est très changeant et les schémas de répartition peuvent être très fréquemment modifiés ou supprimés avec le vent. La persistance temporelle de cette discontinuité est directement reliée à la dimension spatiale à l'intérieur de laquelle elle fluctue (Reynolds 1984). Ainsi, il est possible de subdiviser un habitat en plusieurs micro-habitats, formant ainsi une mosaïque de fragments qui contribuent ensemble à la formation d'une communauté phytoplanctonique pour un seul et même lac (Hutchinson 1967).

1.3.2. Distribution verticale

Les discontinuités dans la distribution spatiale du phytoplancton, celles qui persistent des heures ou des jours, voire de manière continue, sont mieux connues sur le plan vertical. La distribution du phytoplancton peut en effet varier significativement avec la profondeur, le temps et la ségrégation physique de la colonne d'eau. Les schémas de distribution peuvent devenir encore plus complexes quand les gradients de lumière ou d'éléments nutritifs s'y rajoutent (Reynolds 1984). L'intensité lumineuse diminue avec la profondeur et sa

composition spectrale change. La concentration des éléments nutritifs augmente avec la profondeur. A cela s'ajoute aussi la migration verticale du zooplancton qui peut aussi avoir une influence sur la répartition verticale du phytoplancton. Ainsi, beaucoup d'espèces « cherchent » à atteindre une position optimale dans la colonne d'eau favorisant leur développement et s'adaptent de manière à co-exister avec d'autres espèces pour former une communauté structurée. La stabilité physique des espèces dans le milieu dépend donc de la stabilité de la colonne d'eau ainsi que de la disponibilité et du taux de régénération des ressources dans les différentes strates (Walsby et Reynolds 1980 ; Padisak 2004). Les éléments nutritifs (azote, phosphore, silice) sont consommés dans la zone euphotique, si bien que leur concentration va chuter jusqu'à une concentration qui va limiter la croissance algale. Ainsi, les strates inférieures vont devenir plus riches en éléments nutritifs que les strates supérieures même si pour l'azote, par exemple, les concentrations qui permettent la croissance algale peuvent être restaurées grâce aux cyanobactéries fixatrices d'azote. Cependant, l'oxygénation de la couche inférieure de la colonne va profondément affecter la forme, la quantité et la disponibilité des nutriments. Il en résulte que la stratification thermique va amener à une séparation entre une couche de surface bien illuminée, oxygénée mais dont les concentrations en éléments nutritifs diminuent rapidement et une couche profonde moins lumineuse, plus hypoxique et riche en éléments nutritifs. Dans de telles circonstances, l'assimilation des éléments nutritifs dans les couches profondes couplée à la photosynthèse dans les couches superficielles est une stratégie qui demande aux algues de changer périodiquement leur position verticale soit grâce à leurs vacuoles gazeuses soit grâce aux mouvements de leurs flagelles. Suivant les espèces, l'amplitude maximale de migration périodique peut varier entre 2,5 et 18 m sachant que les espèces flagellées de grande taille peuvent migrer sur de plus longues distances que les espèces flagellées de plus petite taille (Sommer 1988).

1.4. Dynamique saisonnière : le modèle PEG

Les communautés phytoplanctoniques présentent des changements significatifs au cours d'une seule et même année et ces processus cycliques sont bien connus sous le nom de « succession saisonnière ». Le premier modèle de succession saisonnière planctonique en milieu dulçaquicole, appelé le modèle PEG (« Plankton Ecology Group »), a été produit suite à plusieurs années de discussions entre une trentaine d'écologistes planctoniques, et est basée

sur 24 séquences successives observées dans une série de 24 lacs (Sommer *et al.* 1986). Ce modèle se veut donc être une description des mécanismes les plus importants qui gouvernent la séquence des structures successives au travers desquelles les populations phytoplanctoniques lacustres évoluent au cours d'une année (Padisák *et al.* 1993, Scheffer *et al.* 2003). Les différentes étapes peuvent être résumées comme suit :

* (1) Vers la fin de l'hiver, la disponibilité en éléments nutritifs résultant du brassage et l'augmentation de l'intensité lumineuse favorisent la croissance du phytoplancton (essentiellement les diatomées et les cryptophytes).

* (2-4) Cette communauté est alors broutée par le zooplancton herbivore (d'abord les espèces à temps de génération court puis les espèces à croissance plus lente), qui devient abondant grâce à une forte fécondité induite par la forte biomasse d'algues comestibles. Ceci continue jusqu'à ce que le taux de filtration de la communauté zooplanctonique et sa biomasse excèdent le taux de reproduction du phytoplancton.

* (5) A cause du broutage par le zooplancton, la biomasse du phytoplancton diminue rapidement jusqu'à de très faibles concentrations. C'est ainsi qu'une phase dite des eaux claires se met en place et persiste jusqu'à ce que des espèces algales non consommables apparaissent en quantité suffisante. Les éléments nutritifs sont reminéralisés via le broutage et sont accumulés durant la phase des eaux claires.

* (6-7) Le zooplancton herbivore devient limité en nourriture et la prédation piscicole accélère le déclin des populations zooplanctoniques herbivores.

* (8) La pression de broutage étant alors réduite, une communauté phytoplanctonique estivale commence à croître. La composition du phytoplancton devient complexe du fait de l'augmentation de la richesse spécifique et de la diversité fonctionnelle alliant de petites espèces consommables et de plus grandes espèces non consommables.

* (9-13) L'appauvrissement en nutriments ralentit alors la croissance des algues consommables. La composition phytoplanctonique s'oriente alors vers des taxons qui utilisent les concentrations de phosphore élevées dans l'hypolimnion (dinoflagellés) et d'autres qui fixent l'azote atmosphérique (cyanobactéries hétérocystées) alors que les diatomées sont limitées par les faibles concentrations en silice.

* (14-16) Les grandes espèces de crustacées herbivores sont remplacées par de plus petites formes et par des rotifères qui sont moins vulnérables à la prédation par les poissons et sont moins affectés par les problèmes mécaniques de leur appareil de filtration (le colmatage notamment) en présence d'algues non consommables.

* (17) La période des successions prend fin avec les modifications environnementales d'ordre physique incluant l'augmentation de la profondeur de mélange qui va de pair avec l'enrichissement en nutriments et la diminution de la quantité d'énergie radiative reçue par les cellules.

* (18-20) De grandes espèces non consommables et des diatomées apparaissent alors, accompagnées par de petites espèces consommables. La réduction automnale de la pression de prédation par les poissons permet le développement d'une communauté zooplanctonique constituée de grandes espèces.

* (21-22) La réduction de la photopériode et de l'intensité lumineuse entraîne une baisse de la production primaire et un déséquilibre entre croissance et mortalité. Par conséquent, la biomasse du phytoplancton diminue pour atteindre son minimum hivernal, qui est suivi par un déclin de la biomasse zooplanctonique herbivore.

* (23-24) Certaines espèces de zooplancton produisent des œufs de résistance. Les cyclopoïdes sortent de leur diapause et contribuent au renforcement des populations zooplanctoniques hivernales.

Ce modèle ne semble pourtant pas applicable à tous les lacs. La déstabilisation physique du milieu est par exemple laissée pour compte et elle peut jouer un rôle très important sur la dynamique des populations (Pannard *et al.* 2007a, Pannard *et al.* 2007b). On sait aujourd'hui que l'activité de la boucle microbienne est également un processus essentiel de la régénération des éléments nutritifs (Azam *et al.* 1983, Pomeroy *et al.* 2007) mais celle-ci n'est pas prise en considération dans le modèle. L'action lytique des virus (Suttle *et al.* 1990, Suttle 2000, Brussaard 2004) ou d'autres parasites (Ibelings *et al.* 2004, Park *et al.* 2004, Figueroa *et al.* 2008) n'est pas du tout considérée dans le modèle pour expliquer la dynamique et la structure des populations phytoplanctoniques, bien que le rôle fonctionnel des parasites soit aujourd'hui largement reconnu (Gleason *et al.* 2008). Il reste que ce modèle nous donne un schéma conceptuel cohérent pour l'interprétation des successions planctoniques basé sur les ressources nutritives et la compétition (Ollrik 1994).

1.5. Stratégies écologiques « C-R-S »

Indépendamment de leur affiliation taxonomique, les espèces phytoplanctoniques peuvent être regroupées en fonction de leurs stratégies écologiques. La première distinction

développée par Mac Arthur et Wilson (1967) et appliquée au phytoplancton par Sommer (1981) sépare les espèces à sélection « r » et les espèces à sélection « K ». Les espèces à sélection « r » présentent une croissance très rapide quand les ressources nutritives ne sont pas limitantes et que le milieu est fortement perturbé alors que les espèces à sélection « K » croissent moins rapidement mais exploitent mieux les ressources rares quand le milieu est stable. Cette distinction est donc basée sur les ressources nutritives et la stabilité du milieu.

Un peu plus tard, suite aux travaux de Grime sur les plantes supérieures (1979), Reynolds (1988) décrit certaines stratégies écologiques du phytoplancton basées sur le stress et les perturbations environnementales. Il distingua ainsi trois types de stratégies : « C », « R », « S ». Les espèces à stratégie « C » (« Competitive ») tirent des bénéfices de fortes concentrations de nutriments et d'une faible pression de prédation. Elles ont un taux de croissance intrinsèque très élevé qui est favorisé par l'abondance des ressources. Ces espèces sont généralement de petites tailles, présentent un rapport surface/volume élevé et une activité métabolique importante sur une large gamme de températures. Elles restent cependant sensibles aux températures élevées et à la prédation par le zooplancton. Parmi ces algues on retrouve de petites cellules de chlorophycées des genres *Chlorella*, *Ankyra*, *Monoraphidium*, *Scenedesmus* et *Chlamydomonas*, des cryptophytes et des diatomées centriques. Les espèces à stratégie « R » (« Ruderal ») sont tolérantes aux perturbations et au déplacement dans la colonne d'eau le long du gradient de lumière. Ainsi, elles sont adaptées aux fréquentes variations physiques du milieu, aux conditions d'intensité lumineuse restreintes, aux faibles températures et aux fortes concentrations en nutriments. Ces espèces présentent un rapport surface/volume élevé, elles sont de plus grandes tailles que les espèces à stratégie « C », parfois filamenteuses et, par conséquent, résistantes au broutage par le zooplancton. Les diatomées au sein de cette catégorie incluent des espèces des genres *Aulacoseira*, *Melosira*, *Fragilaria*, *Asterionella*, *Acanthoceras* ainsi que des diatomées centriques de plus grande taille. Les chlorophycées sont essentiellement des desmidiacées (*Staurastrum*, *Closterium*). Les espèces à stratégie « S » (« Specialized » and « Stress-tolerant ») possèdent des propriétés leur permettant de résister au stress nutritif (capacité à stocker les nutriments, à migrer de la couche bien illuminée à celle riche en ressources nutritives, à utiliser les ressources organiques). Elles tolèrent donc des concentrations en éléments nutritifs assez faibles et des intensités lumineuses fortes. Par contre, elles présentent une tolérance réduite aux basses températures, aux faibles intensités lumineuses et aux perturbations physiques du milieu. Généralement, ces espèces sont de grande taille avec de faibles rapports surface/volume et de

faibles taux de croissance et de respiration. Ces espèces sont fortement représentées par les cyanobactéries coloniales (*Microcystis*, *Aphanothece*) et filamenteuses (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia*, *Cylindrospermopsis*) et également par les dinoflagellés (*Ceratium*, *Peridinium*), les chrysophytes (*Uroglena*, *Dinobryon*) et les grandes colonies de chlorophycées (*Volvox*, *Pandorina*).

Il va de soi que ces stratégies ne sont pas totalement exclusives et que certaines espèces peuvent présenter des caractéristiques intermédiaires (Olrik 1994).

1.6. Le phytoplancton comme indicateur de qualité biologique

1.6.1. Le choix du phytoplancton

Qu'il s'agisse du phytoplancton, des macrophytes, des invertébrés ou des poissons, les indicateurs biologiques (bio-indicateurs) sont basés sur le même principe. La variété des taxons présents dans un prélèvement, leur assemblage, la présence ou l'absence de groupes sensibles aux pollutions par exemple, donnent une indication sur la qualité des milieux. Ainsi, Blandin (1986) a donné au terme bio-indicateur la définition suivante : « Un indicateur biologique (ou bio-indicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui – par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques – permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées ». A cet effet, Reynolds *et al.* (2002) ont publié une description détaillée de 31 assemblages phytoplanctoniques qui peuvent être vus comme des groupes fonctionnels, c'est à dire des groupes d'espèces avec une sensibilité plus ou moins grande pour différentes combinaisons de propriétés physiques, chimiques et biologiques internes au lac (profondeur de la zone de mélange, lumière, température, P, N, Si, CO₂ et pression de prédation). Le phytoplancton, qui est donc fortement influencé par les changements environnementaux (Padisak *et al.* 2006, Salsamo *et al.* 2006, Anneville *et al.* 2008), est considéré comme étant la première communauté biologique à répondre à l'eutrophisation spécialement dans les lacs (Solheim *et al.* 2005). Ainsi, ce compartiment biologique a été proposée puis imposée par la DCE comme élément de qualité biologique pour les lacs et est identifiée aujourd'hui comme un bio-indicateur potentiel puisque répondant aux changements trophiques des masses d'eau. Trois paramètres relatifs au phytoplancton peuvent être utilisés

pour l'évaluation de l'état écologique des lacs et la définition des statuts « très bon », « bon » et « moyen ». Il s'agit de l'abondance et la composition phytoplanctonique, la biomasse phytoplanctonique (via les estimations de la concentration de chlorophylle *a* et du biovolume moyen), l'intensité et la fréquence des blooms planctoniques.

1.6.2. Classification de l'état écologique des lacs, conditions de référence et intercalibration à l'aide de l'élément de qualité biologique « Phytoplancton »

La DCE définit l'état écologique des lacs selon 5 classes de qualité : très bon état, bon état, état moyen, état médiocre et mauvais état (**Tableau I ; Annexe 1**). De façon générale, le très bon état écologique au niveau biologique fait référence à des valeurs des éléments de qualité biologique pour les masses d'eau de surface dans des conditions non perturbées, c'est à dire sans perturbation anthropique. Pour déterminer le très bon état, des conditions de références ont du être définies. Elles peuvent soit avoir une base spatiale, soit se fonder sur un modèle ou encore être dérivées d'une combinaison de ces deux méthodes. Pour les conditions de référence fondées sur des critères spatiaux, les Etats membres ont mis au point un réseau de référence pour chaque type de masse d'eau de surface. C'est ce qu'on appelle l'exercice d'intercalibration. Ce dernier assure que les limites entre les classes soient établies de manière cohérente et qu'elles soient comparables entre les Etats membres. Le réseau comporte des sites choisis dans une série de types de masses d'eau de surface présents dans chaque écorégion. Ces sites constituent un réseau d'intercalibration. Concernant les conditions de référence fondées sur des modèles, elles peuvent être établies à l'aide soit de modèles prédictifs soit de méthodes à posteriori. Les méthodes ont recours aux données historiques, paléologiques et autres données disponibles et procurent un niveau de confiance suffisant pour garantir que les conditions ainsi obtenues soient cohérentes et valables pour chaque type de masse d'eau de surface.

Suite à la classification et à la définition des états écologiques, les Etats membres ont établi des systèmes de contrôle afin d'estimer les valeurs des éléments de qualité biologique. Ces systèmes peuvent se servir d'espèces ou de groupes d'espèces particuliers, qui sont représentatifs de l'élément de qualité dans son ensemble. Puis, afin d'assurer la comparabilité des systèmes de contrôle, les résultats des systèmes utilisés par chaque Etat membre sont exprimés comme des ratios de qualité écologique (EQRs) aux fins de la classification de l'état

écologique. Le rapport est celui entre les valeurs des paramètres biologiques observées pour une masse d'eau de surface donnée et les valeurs des paramètres biologiques observées dans les conditions de référence pour cette même masse d'eau. Ce ratio est exprimé comme une valeur numérique entre 0 et 1, le très bon état écologique étant représenté par des valeurs proches de 1 et le mauvais état écologique, par des valeurs proches de 0. Chaque Etat membre a réparti les ratios de qualité écologique de son système de contrôle pour chaque catégorie de surface en 5 classes d'état écologique allant de « très bon » à « mauvais » en attribuant une valeur numérique à chacune des limites entre les classes (**Tableau I**). La valeur de la limite entre les classes « très bon » et « bon » état écologique et la valeur de la limite entre « bon » état et état « moyen » ont ainsi été établies.

Pour les catégories d'eau de surface, la classification de l'état écologique de la masse d'eau est représentée par la plus basse des valeurs des résultats des contrôles biologiques et physico-chimiques pour les éléments de qualité pertinents classés conformément à la première colonne du tableau ci-dessous. C'est ce que l'on appelle le principe du « One out, all out ». Les Etats membres ont fourni, pour chaque district hydrographique, une carte illustrant la classification de l'état écologique pour chaque masse d'eau à l'aide des couleurs indiquées dans la seconde colonne du tableau ci-dessous pour refléter l'état écologique de la masse d'eau.

Tableau I Code couleur associé à l'état écologique des lacs

Classification de l'état écologique	Code de couleur
Très bon	
Bon	
Moyen	
Médiocre	
Mauvais	

Finalement, lorsqu'une masse d'eau répond à toutes les normes de qualité environnementale, elle est enregistrée comme atteignant un bon état chimique. Si ce n'est pas le cas, la masse d'eau est enregistrée comme n'atteignant pas un bon état chimique. Pour chaque district hydrographique, les Etats membres ont fourni une carte illustrant l'état

chimique de chaque masse d'eau à l'aide des couleurs indiquées dans la seconde colonne du tableau ci-dessous (**Tableau II**) pour refléter la classification chimique de la masse d'eau :

Tableau II Code couleur associé à l'état chimique de la masse d'eau de surface

Classification de l'état chimique	Code de couleur
Bon	
Pas bon	

1.6.3. Intercalibration de l'élément de qualité biologique « phytoplancton » au sein des groupes d'intercalibration géographiques

Comme nous l'avons vu précédemment, l'intercalibration est une étape essentielle puisqu'elle permet la comparaison des résultats de suivi biologique entre tous les lacs. Elle doit aboutir à ce que le « bon état » ait le même sens pour tous les états membres et qu'il soit de même qualité partout en Europe. Elle a commencé en 2004 et s'est achevée en 2007. Les Etats membres sont divisés en cinq groupes d'intercalibration géographiques (GIG) c'est à dire des groupes d'Etats membres qui partagent des plans d'eau de même type dans différents districts hydrographiques : Alpin (ALP), Atlantique (ATL), Centre/Baltique (C/E), Méditerranéen (MED) et Nordique (NOR) sachant qu'un état membre peut faire parti de plusieurs GIGs. Ainsi, la France fait partie de 3 GIGs : ALP, C/E et MED. Le nombre de type de lacs peut varier d'un GIG à l'autre. Les principales tâches de l'intercalibration sont de définir les critères de référence et les lacs de référence, de fixer les conditions de référence et finalement de fixer les limites entre « très bon » et « bon » état et entre « bon » état et état « moyen » en établissant des ratios de qualité écologique (EQRs). Les données d'environ 1300 lacs qui regroupent par la même occasion environ 2700 années, tous lacs confondus, ont été compilées à partir des bases de données nationales dans les bases de données des GIGs (**Tableau III**). Ces bases de données contiennent des données basiques (altitude, surface, profondeur moyenne, alcalinité), des données qualitatives (concentrations en chlorophylle *a* et divers éléments nutritifs, profondeur de Secchi) et des données de pression (occupation du territoire, densité de population, impacts autres).

Tableau III Description des bases de données pour chacun des GIGs

GIGs	Lacs	Nbre d'années	Etats membres participants
ALP	86	557	Autriche, Allemagne, Italie, France, Slovénie
ATL	28	39	Irlande, Royaume-Uni
C/B	434	1143	Belgique, Danemark, Lituanie, Pays-bas, France, Royaume-Uni, Hongrie, Pologne, Estonie, Allemagne, Lettonie
MED	48	48	Chypre, France, Grèce, Italie, Portugal, Roumanie, Espagne
	210*	330*	Espagne, Portugal, Italie
NOR	500	552	Finlande, Irlande, Norvège, Suède, Royaume-Uni

* ces lacs ont fait l'objet des analyses uniquement pour la validation des limites de classes.

Toutes ces classes de qualité, leurs limites et les valeurs de référence ont été développées pour les masses d'eau naturelles ou des réservoirs assimilés à des masses d'eau naturelles, dans lesquelles l'état écologique est une déviation mesurée par rapport à une condition de référence. Ces données sont publiées dans le rapport de la Commission Européenne du 10 décembre 2008 n° C/2008/6016. Cependant, la DCE définit et doit considérer aussi les masses d'eau artificielles (celles qui sont créées par l'activité humaine) et les masses d'eau fortement modifiées (masse d'eau qui résulte d'altérations physiques anthropiques, qui potentiellement changent son caractère hydrogéomorphologique). Dans les deux cas, les Etats membres peuvent désigner une masse d'eau de surface comme artificielle ou fortement modifiée quand les changements des caractéristiques hydromorphologiques de cette masse, qui seraient nécessaires pour atteindre le bon état écologique, auraient des effets défavorables significatifs sur i) l'environnement naturel, ii) la navigation, incluant les installations portuaires, iii) les activités ayant pour objectif de stocker l'eau comme les réservoirs d'eau potable, la génération d'électricité ou l'irrigation, iv) la régulation de l'eau, la protection contre les inondations, le drainage des sols ou v) n'importe quelle autre activité de développement durable important. En se conformant aux exigences de la DCE, les gestionnaires doivent veiller à ce que les masses d'eau fortement modifiées atteignent un statut appelé « le bon potentiel écologique ». Nous reviendrons sur la définition de ce statut dans la section suivante et nous replacerons le Réservoir Marne dans ce cadre.

2. Le réservoir MARNE : une masse d'eau artificielle selon la DCE

2.1. Le « bon potentiel écologique » selon la DCE : cas des masses d'eau artificielles et des masses d'eau fortement modifiées.

2.1.1. *Peut-on définir la signification de « bon potentiel écologique » et « potentiel écologique maximum » ?*

« Une masse d'eau présente un bon potentiel écologique (BPE) quand il y a de petits changements dans les valeurs associées aux éléments de qualité biologiques comparés aux valeurs trouvées pour le potentiel écologique maximum (PEM) » (Borja 2007). Le PEM est considéré comme représentant les conditions de référence pour les masses d'eau fortement modifiées, et est censé décrire la meilleure approximation, par rapport à un écosystème aquatique naturel, qui pourrait être atteinte considérant que les caractéristiques hydromorphologiques ne peuvent pas être changées sans effet néfaste significatif. Ainsi, le PEM pour les conditions biologiques reflète aussi bien que possible, les conditions biologiques associées avec le plan d'eau naturel le plus comparable dans les conditions de référence considérant l'hydromorphologie et les conditions physico-chimiques associées. Bien que les groupes de travail implantés dans le cadre de la DCE aient tenté de donner des lignes directrices sur ces définitions, peu d'avancées sont visibles concernant la compréhension de ce qu'est le bon potentiel écologique. D'ailleurs, la DCE dans l'Annexe 5 du texte de la Directive 2000/60/CE (Parlement Européen 2000) nous présente des définitions littérales du PEM et du BPE qui restent relativement floues (**Tableau II ; Annexe 1**). En ce qui concerne le BPE, il peut être défini comme ce que l'écologie devrait être si les influences anthropiques ou les sources de stress étaient ôtées. Une fois encore, on peut se demander ce que cela signifie concrètement et pratiquement. D'autre part, cette définition suppose une connaissance des conditions avant les altérations anthropiques et donc laisse les scientifiques imaginer comment les systèmes pourraient être si l'élément source de stress ou la pression étaient enlevés.

D'après la DCE, il y a 4 méthodes pour détecter le bon état écologique qui constitue une déviation par rapport à l'état de référence et on peut se demander si ces dernières

pourraient être applicables pour détecter le bon potentiel écologique. Il s'agit des conditions de référence physiques, de connaissances antérieures du milieu, des approches prédictives (modélisation) et des analyses d'experts. En Europe, les données de référence physiques pour les masses d'eau artificielles et hautement modifiées sont difficiles voire impossible à obtenir. Les données concernant l'état des territoires avant les perturbations anthropiques sont pauvres (inexistantes pour les masses d'eau artificielles) et les modèles disponibles n'indiquent pas avec suffisamment de précisions la manière dont les territoires ont changé (cette méthode n'est pas non plus applicable pour les masses d'eau artificielles). Ces constatations laissent les analyses d'experts comme premier recours alors que ces analyses sont considérées par la DCE comme le dernier recours. C'est pour ces différentes raisons que la DCE a adopté une solution alternative pour déterminer le PEM et le BPE.

2.1.2. Comment déterminer le PEM et le GEP ?

Cette approche requiert une série d'étapes afin d'établir des valeurs appropriées pour les éléments de qualité qui vont décrire le PEM. Dans ce processus, il est important de différencier « la catégorie de masses d'eau la plus comparable » et « le type de masses d'eau de surface le plus comparable ». Les éléments de qualité biologique sont choisis à partir de la catégorie la plus comparable (estuaire, eau côtière...) tandis que les types de masses d'eau les plus comparables (qui proviennent des différents GIGs) sont utilisés pour aider à la détermination des valeurs de référence pour ces éléments de qualité dans le cas des masses d'eau fortement modifiés.

Les différentes étapes pour établir les valeurs de référence pour les masses d'eau fortement modifiées peuvent se résumer ainsi (Borja 2007) :

choisir les éléments de qualité appropriés pour la définition du PEM après avoir identifié la catégorie d'eau de surface naturelle la plus comparable ;

établir les conditions hydromorphologiques, physico-chimiques et biologiques pour atteindre le PEM, conditions qui reflètent aussi bien que possible celles associées avec le type de masse d'eau de surface le plus comparable.

Ainsi, lorsque la procédure pour établir les conditions de référence est appliquée à des masses d'eau fortement modifiées ou artificielles, les références au très bon état écologique doivent être considérées comme des références au potentiel écologique maximal défini comme les valeurs des éléments de qualité pertinents reflétant, autant que possible, celles

associées au type de masse d'eau de surface le plus comparable, vu les conditions physiques qui résultent des caractéristiques artificielles ou fortement modifiées de la masse d'eau. Notons que le Guide d'Intercalibration (Commission Européenne 2005) statue que « certains plans d'eau artificiels ou fortement modifiés pourraient être inclus dans le réseau d'intercalibration, s'ils entrent dans un des types de plans d'eau sélectionnés pour le réseau d'intercalibration. Les plans d'eau artificiels ou fortement modifiés qui ne sont comparables à aucun plan d'eau naturel, ne pourront être inclus dans le réseau d'intercalibration que s'il sont dominants sur un Etat membre ; dans ce cas seulement, ils pourront être considérés comme un type de plan d'eau à part. » Un plan d'eau artificiel ou fortement modifié sera considéré comme appartenant à un type de plan d'eau naturel si le potentiel écologique maximum du plan d'eau artificiel ou fortement modifié est comparable aux conditions de référence du type de plan d'eau naturel pour les éléments de qualité considérés dans l'exercice d'intercalibration.

Finalement, comme pour les lacs, la classification de l'état écologique des masses d'eau fortement modifiées et artificielles est représentée par la plus basse des valeurs des résultats des contrôles biologiques et physico-chimiques pour les éléments de qualité pertinents classés conformément à la première colonne du tableau ci-dessous (**Tableau IV**). Ces masses d'eau sont classifiées en 4 classes de qualité qui s'étendent du bon potentiel écologique (ou plus) au mauvais potentiel écologique. Les Etats membres ont fourni, pour chaque district hydrographique, une carte illustrant la classification du potentiel écologique pour chaque masse d'eau à l'aide des couleurs indiquées dans la deuxième colonne du tableau ci-dessous.

Tableau IV Code couleur associé à l'état écologique de la masse d'eau de surface type masses d'eau fortement modifiées ou artificielles

Classification du potentiel écologique	Code de couleur
Bon et plus	
Moyen	
Médiocre	
Mauvais	

2.2. Présentation du site d'étude : le Réservoir Marne

2.2.1. L'ouvrage et ses canaux

Le Réservoir Marne est un des 3 réservoirs de Champagne-Ardenne géré par l'Institution « Les Grands Lacs de Seine » (ou IIBRBS : Institution Interdépartementale des Barrages du Bassin de la Seine). Ce réservoir est situé à environ 200 km à l'est de Paris et est construit en dérivation des rivières Marne et Blaise (**Figure 1**). C'est un réservoir construit sur terrain argileux, peu profond (profondeur moyenne 7,2 m, profondeur maximale 19,5 m) mais très étendu (48 km²), ce qui en fait un des lacs artificiels les plus grands d'Europe occidentale et lui confère une grande capacité de stockage (350 millions de m³). Le bassin versant propre de l'ouvrage (bassin versant drainé par les canaux d'amenée et les rives du lac) est de 80 km² mais si on considère les rivières Marne et Blaise qui alimentent le réservoir, le bassin versant atteint 2940 km². Ces deux rivières ont un débit maximum en hiver et au printemps (pouvant atteindre environ 370 m³.s⁻¹) et un débit minimum en été et en automne (pouvant descendre jusqu'à 0,3 m³.s⁻¹), ce qui va de pair avec les phases de remplissage et de vidange du réservoir Marne qui ont lieu (à plus ou moins 1 mois près) entre novembre et juin et entre juillet et octobre respectivement (Aquascop 2002b).

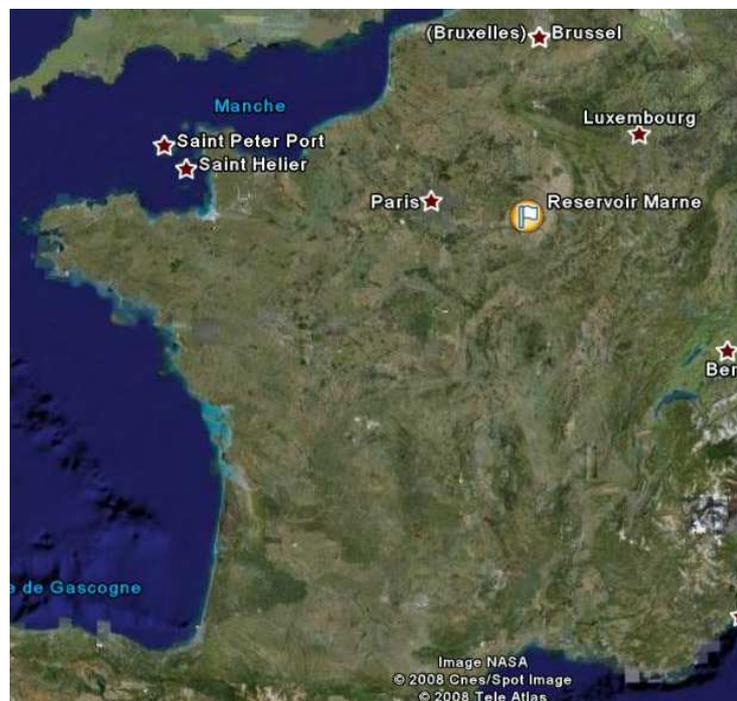


Figure 1 Carte de France localisant le Réservoir Marne (Source : Google Earth, 2008)

La construction du Réservoir Marne a été motivée par une intensification des crues de la Marne qui a provoqué des inondations dévastatrices dans la région en 1910 puis en 1924. Ainsi, un premier réservoir (0,5 km²) nommé Champaubert (nommé ci-après lac de Champaubert) a été construit entre 1932 et 1938. Puis, pour répondre à des besoins de stockage grandissants suite à l'inondation de 1955, un deuxième réservoir (47,5 km²) appelé Der (nommé ci-après lac du Der) a été mis en eau en 1974. Le Réservoir Marne est donc composé de deux « lacs » qui communiquent entre eux librement et dont le niveau est constant. Le temps de résidence de l'eau diffère selon les conditions hydrologiques et entre les deux lacs. Le lac du Der présente des temps de résidence plus courts en période humide (0,38 et 0,46 an en 1994 et 1995 respectivement) qu'en période sèche (0,53 an en 1993). Quant au lac Champaubert, il présente un temps de résidence plus court que le lac du Der (de 0,01 à 0,03 an selon les conditions hydrologiques) (Garnier *et al.* 2000). Le réservoir répond à une double mission : i) diminuer les effets des crues de la Marne et de la Blaise, ii) soutenir les débits d'étiage pour l'alimentation en eau de la région parisienne (Garnier *et al.* 1998). Ainsi, le niveau d'eau varie entre 2 et 15 mètres durant le cycle hydrologique, avec un volume maximum (309 Mm³) en été (Juillet) et un volume minimum (29 Mm³) en fin d'automne (Novembre). Afin d'amener les eaux des deux rivières au réservoir, deux canaux alimentent ce dernier, le canal d'amenée Blaise et le canal d'amenée Marne (**Figure 2**). Le canal d'amenée de la Blaise a une longueur de 5,2 km et permet de faire transiter jusqu'à 33 m³/s d'eau vers le réservoir. Le canal d'amenée Marne, quant à lui, s'étend sur 11,9 km de la prise d'eau jusqu'au déversoir d'extrémité et présente un débit maximum de 375 m³/s. Parallèlement à ces deux canaux d'amenée, le réservoir est doté de 3 ouvrages de vidange : une restitution principale vers la Marne dont le débit s'échelonne entre 0 et 50 m³/s, une restitution vers la Blaise utilisée uniquement pour une vidange d'entretien (1 à 2 m³/s) et une dans la Droye pour assurer la réalimentation du ruisseau et participer à la vidange partielle du fond de la retenue. Finalement, le lac de Champaubert comprend 3 digues de clôture : deux qui ont été rehaussées en fonction du niveau maximum du plan d'eau et une qui a été ouverte pour permettre de relier les deux lacs et assurer le transit des eaux de la Marne et de la Blaise. La cuvette principale du Réservoir Marne est, quant à elle, fermée par 8 autres digues de hauteur variable. De plus, pour promouvoir les activités touristiques, d'autres digues appelées digues de cloisonnement ont été construites, permettant ainsi de délimiter des bassins à vidange différée. L'une d'elle ferme le bassin nord-ouest et délimite un plan d'eau de 160 ha tandis que l'autre ferme le bassin sud-est et délimite un plan d'eau de 275 ha.

Globalement, le réservoir Marne présente rarement une stratification prononcée. Il existe toutefois un gradient de température de quelques degrés, de la surface au fond, d'avril à septembre. L'écart maximal entre la surface et le fond est au maximum de 10°C et ne se traduit par un déficit en oxygène important que pendant une période maximale d'un mois, en août généralement. La stratification disparaît quand le niveau de l'eau baisse et en cas de vent estival fort, la longueur importante de prise au vent du réservoir permettant une déstratification temporaire (Garnier *et al.* 1994).

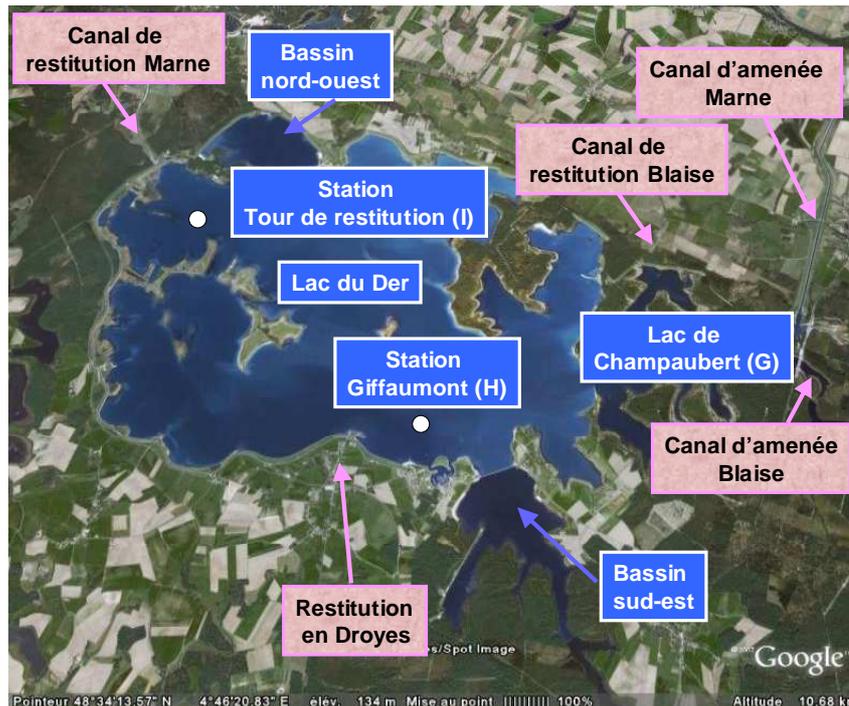


Figure 2 Carte du Réservoir Marne présentant les deux lacs (lac du Der et lac de Champaubert), les deux bassins à vidange différée (Nord-Ouest et Sud-Est), les deux canaux d'amenée (Marne et Blaise), les deux canaux de restitution (Marne et Blaise) et la restitution en Droyes (Source : Google Earth, 2008)

2.2.2. Les divers usages du Réservoir Marne

Mise à part la vocation principale du Réservoir Marne qui est de soutenir l'étiage et d'écarter les crues, l'ouvrage est inscrit d'une part parmi les zones à protéger au titre de la Convention Internationale RAMSAR (1971) et d'autre part en Zone Naturelle d'Intérêt Ecologique Floristique et Faunistique (ZNIEFF, 1983), Zone de Protection Spéciale (ZPS, 1979) et Zone de grand Intérêt pour la Conservation des Oiseaux sauvages de la Communauté Européenne (ZICO, 1989). Il est également inscrit dans le réseau Natura 2000 destiné au « maintien ou au rétablissement dans un état de conservation favorable, des habitats naturels

et/ou des populations des espèces d'intérêt communautaires » (Directive 92/43/CEE, Conseil des Communautés Européennes 1992 et Directive 79/409/CEE, Conseil des Communautés Européennes 1979). C'est un pôle majeur pour l'hivernage (premier site français pour l'oie cendrée et l'oie rieuse) et le transit migratoire (premier site français pour la grue cendrée). Notons que plus de 200 espèces migratrices transitent par le Réservoir Marne et ce dernier accueille d'ailleurs plus de la moitié du cheptel européen des grues cendrées chaque année. Notons ici que les excréments de ces oiseaux constituent sans nul doute une importante source d'éléments nutritifs, pouvant se retrouver dans les eaux du réservoir par ruissellement ou par contact direct. Par ailleurs, plus d'un million de m³ d'eau potable est produit chaque jour à partir des eaux de la Marne ce qui fait de cette rivière la deuxième réserve d'eau potable de surface de la région Ile-de-France après la Seine. Par contre, il n'y a pas d'irrigation à partir du réservoir et de ses canaux mais en aval du réservoir où des prélèvements sont effectués pour irriguer 5200 ha (Amon-Moreau, communication personnelle).

Le Réservoir Marne est un pôle d'attractions touristiques très important où sont développées des activités liées au plan d'eau (pêche) et des activités sur les rives et aux environs, liées à la nature (randonnées) et au patrimoine (observations ornithologiques). Des plages aménagées autour du réservoir (plages de la presqu'île de Champaubert et de Giffaumont dans le bassin sud-est, plage de la Cornée du Der, plages de Nuisement et de la presqu'île de Larzicourt dans le bassin nord-ouest et plage de la queue du Der) permettent des activités telles que la baignade, la voile, l'aviron, le ski nautique et la plongée.



Figure 3 Prise de vue du Réservoir Marne (Franck Mulliez, 2008)

2.2.3. Bilan biogéochimique et biologique

Les investigations menées à chaque saison en 3 stations du Réservoir Marne (Champaubert, Giffaumont, Tour de restitution) du Réservoir Marne entre 1993 et 2005 et ponctuellement en 18 stations n'ont pas révélé une hétérogénéité horizontale très marquée au niveau physique (température de surface), chimique (oxygène de surface, nitrate, ammonium, phosphates, matières en suspension, silice) et biologique (chlorophylle *a*). Des différences relativement importantes ont par contre pu être enregistrées entre les deux lacs (Champaubert et Der), les eaux du petit lac recevant les eaux des rivières enrichies en éléments nutritifs (Garnier *et al.* 2007). D'une manière générale, une diminution régulière des concentrations en nitrates dans l'eau a été mise en évidence dès le début de l'hiver. Chaque année, ces dernières variaient de 6-8 mgN·L⁻¹ à moins de 1 mgN·L⁻¹ et les auteurs précédemment cités ont proposé que cette diminution des concentrations soit principalement due au processus de dénitrification benthique plus qu'à l'utilisation de cette ressource par la biomasse phytoplanctonique. En ce qui concerne l'ammonium, sa concentration augmentait en été en période de forte minéralisation de la matière organique et ce schéma se reproduisait d'année en année. Les concentrations pouvaient être inférieures à 0,001 mgN·L⁻¹ en hiver et atteindre des valeurs proches de 0,1 mgN·L⁻¹ en été (0,4 mgN·L⁻¹ en 1997 dans le lac de Champaubert). Le réservoir présentait des concentrations de phosphates faibles, cet élément étant utilisé par le phytoplancton dès le printemps et maintenu à des concentrations limitantes (<5 µgP·L⁻¹), toujours selon les mêmes auteurs. Cependant, en ce qui concerne les concentrations de ces orthophosphates, deux zones pouvaient être distinguées: la première correspondant au lac de Champaubert qui est enrichie par les apports des rivières Marne et Blaise, la seconde qui correspond au lac du Der où les concentrations d'orthophosphates étaient beaucoup moins élevées. En ce qui concerne le phosphore total il n'a pas été mesuré depuis 1995. Il est important de dire ici que les méthodes utilisées après 1995, tirées du livre « Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater » (Lenore *et al.* 1995) et adaptées par la compagnie HACH qui fournit des équipements et du matériel pour l'analyse de l'eau, présentent des limites de détection trop élevées par rapport aux concentrations en présence dans le Réservoir Marne si bien que les résultats sont difficilement exploitables d'un point de vue écologique. Typiquement, les limites de détection pour le phosphore total, les orthophosphates, les nitrates et l'ammonium sont de 170 µgP·L⁻¹, 31 µgP·L⁻¹, 0,2 mgN·L⁻¹ et 0,17 mgN·L⁻¹ respectivement. Les concentrations de MES étaient élevées d'une part au début

de l'hiver, qui est la période où le débit des rivières qui alimentent le réservoir est très fort, et d'autre part à la fin de l'été quand la biomasse planctonique atteint son maximum. La silice dissoute incorporée par les diatomées décroissait régulièrement de 4 à 1 mgSiL⁻¹ au printemps. Puis, le stock se reconstituait partiellement en été pour diminuer à nouveau à l'automne jusqu'à des concentrations inférieures à 0,5 mgSiL⁻¹ (Garnier *et al.* 2000). En fait, toujours d'après le bilan réalisé entre 1993 et 2005 présenté par Garnier *et al.* (2007), le phytoplancton présente 2 phases de développement dans le lac du Der : une au début du printemps (février à avril : 10-15 µg chl *a*L⁻¹) dominée par les diatomées qui consomment de la silice d'où une baisse de sa concentration, et une deuxième phase en fin d'été composée d'une population mixte de chlorophycées et de diatomées qui se caractérise également par une baisse de la concentration de silice.

L'abondance phytoplanctonique semble plus élevée dans le petit lac (Champaubert) que dans le grand lac (Der) (Garnier *et al.* 2000). A titre indicatif, en 2001, on trouvait environ 110 000 individus·ml⁻¹ à Champaubert et entre 60 000 et 78 000 individus·ml⁻¹ dans le lac du Der (Aquascop 2002b, données brutes non disponibles). Ceci peut être dû, en fin de période de vidange, à la diminution du volume d'eau par rapport à la surface du réservoir, favorisant le recyclage des nutriments, l'augmentation de la température et par conséquent une accélération de la croissance algale (Garnier *et al.* 2000). Par ailleurs, durant l'été 2001, une prolifération importante de cyanobactéries du genre *Anabaena* a été observée à l'étang de la Dame, à l'extrême sud du bassin sud-est. Les tests de toxicité ont révélé une concentration de microcystines-LR (toxines hépatiques) très élevée (27 µg·L⁻¹ d'eau) rendant impossible toutes activités récréatives (Martin 2001). Rappelons que l'OMS a fixé le seuil de concentration maximale en microcystines-LR à 1 µg·L⁻¹ pour la distribution d'eau potable (Falconer *et al.* 1999). Le ru de Braucourt qui alimente l'étang de la Dame présente une forte accumulation de matières organiques. Ce dernier, qui reçoit les eaux de lagunage du hameau de Braucourt, présente une eau de mauvaise qualité (forte charge organique, teneurs excessives en azote et en phosphore). D'autre part, en septembre 2001, il y a eu un important développement de cyanobactéries filamenteuses (genre non précisé) à la station Giffaumont et à la station de la Tour de restitution. A cette époque de l'année, les conditions sont plus rigoureuses (baisse du niveau d'eau, augmentation de la température et de la concentration des nutriments) si bien que les cyanobactéries exercent leur grande compétitivité vis à vis des autres groupes et peuvent proliférer (Aquascop 2002b).

Concernant le zooplancton, l'abondance des crustacés (copépodes, cladocères) et des rotifères varie énormément d'une année sur l'autre et d'une station à l'autre (Asconit 2002). Globalement, l'étude de la dynamique saisonnière a révélé que l'on trouve des cladocères au printemps, des larves de copépodes en été et des rotifères en automne. Les pics d'abondance ont lieu aux mois de juillet et août à Champaubert et au mois de septembre à Giffaumont et à la Tour de restitution. Il semble d'ailleurs que leurs concentrations puissent dépasser celles qui sont trouvées dans les lacs eutrophes (Testard *et al.* 1993).

Les sédiments du Réservoir Marne ont une texture fine à très fine et sont principalement argilo-limoneux. Un gradient granulométrique est cependant observé d'amont en aval, le lac de Champaubert présentant une fraction sableuse importante et le lac du Der présentant une fraction plus fine et argileuse (Aquascop 2002a). Ce gradient amont-aval est également observé dans les teneurs en phosphore puisque les concentrations décroissent de 0,99 à 0,41 gP·kg⁻¹ dans les sédiments de surface et dans les teneurs en carbone dont les concentrations varient de 22 mg·kg⁻¹ en amont à 15 mg·kg⁻¹ en aval du réservoir. Cependant, les teneurs en azote ne présentent pas de différence amont-aval. Ces dernières sont relativement faibles (de l'ordre de 1,7 g·kg⁻¹ de matières sèches) et le rapport C/N d'environ 9, supérieur au rapport de Redfield (5,7) indique que la matière organique est en voie de dégradation (Garnier *et al.* 2007). Finalement, il semble que les concentrations des micropolluants organiques et minéraux soient souvent inférieures au seuil de détection, ce qui met en évidence que la contamination des sédiments du réservoir est probablement faible voire nulle (Aquascop 2002a).

2.2.4. Modélisation du fonctionnement écologique du Réservoir Marne

Le principal modèle du fonctionnement écologique du réservoir Marne s'appelle « BARMAN » (pour Barrage Marne) et il résulte du couplage d'un modèle des processus de transformation de plusieurs éléments (modèle écologique) appelé RIVE (Figure 4) et d'une représentation simplifiée de l'hydrodynamique du réservoir (modèle hydraulique de type mélangeur parfait considérant que c'est un réacteur homogène dans toutes ses dimensions). Il est décrit dans Billen *et al.* (1994), Garnier et Billen (1993) et Garnier *et al.* (1995) et a été élaboré afin de synthétiser les connaissances disponibles sur la cinétique des processus de transformation du carbone, de l'azote, du phosphore, de la silice et de leur circulation entre les principaux compartiments du réservoir, à savoir le phytoplancton, les bactéries hétérotrophes

et nitrifiantes, le zooplancton et l'interface eau-sédiment. Dans ce modèle, les variations de concentration des différentes variables de qualité sont calculées en prenant en compte les processus internes, les entrées et les sorties de matière et les variations de volume de l'ouvrage. Il rend compte des niveaux de biomasse phytoplanctonique et des teneurs en éléments nutritifs et il simule la décroissance estivale des nitrates liée à la dénitrification ainsi que les variations d'ammonium, et tout particulièrement l'augmentation d'ammonium en période de stratification (Garnier *et al.* 1999).

Concernant le peuplement algal, le couplage du modèle hydrologique au modèle « écologique » permet de calculer le taux de croissance moyen du phytoplancton, intégré sur la colonne d'eau et permet de simuler les variations saisonnières du phytoplancton. Ainsi, le modèle, conformément aux observations faites entre 1993 et 1994, prévoit un pic printanier dominé par les diatomées tandis que le peuplement estival est dominé par les chlorophycées (Garnier *et al.* 1998).

Même s'il peut reproduire les grands traits, le modèle n'inclue pas les successions planctoniques complexes trouvées dans les lacs et regroupées sous le nom de « PEG-model » (Sommer *et al.* 1986) ainsi que les assemblages d'espèces décrits par Reynolds *et al.* (2002). Il ne tient pas compte non plus de l'impact d'autres « prédateurs » comme les virus. Nous n'avons pas utilisé ce modèle dans le cadre de cette thèse mais nous tenions à le présenter puisqu'il a déjà été appliqué sur le Réservoir Marne, et que nos données obtenues en 2006 et 2007 sur les compartiments suivants : zooplancton, phytoplancton, bactéries et virus pourraient permettre de le réalimenter.

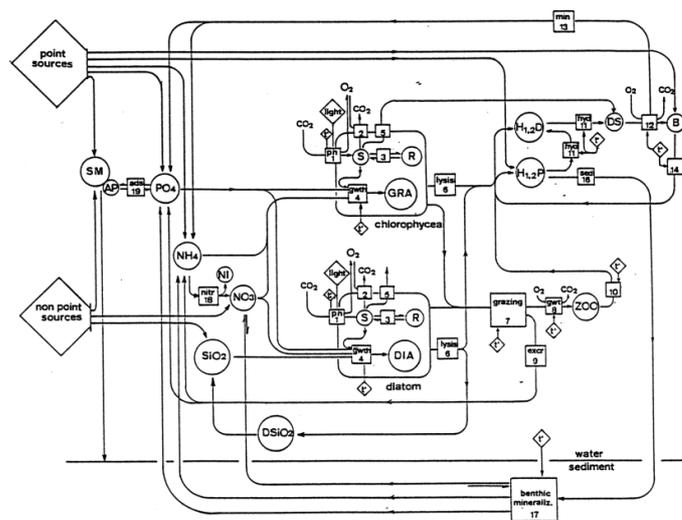


Figure 4 Schéma des processus écologiques pris en compte dans le modèle RIVE (Garnier *et al.* 1998).

2.2.5. *Classification et évaluation de l'état écologique du Réservoir Marne selon une démarche DCE*

D'après la typologie nationale des plans d'eau présentée dans le dernier rapport de l'Agence de l'eau Seine-Normandie (AESN 2008), le Réservoir Marne fait parti des masses d'eau dites artificielles et est classé dans les retenues A7b, c'est à dire les retenues à marnage de faibles intensités et fréquent, de basse altitude, de nature calcaire et profondes. Comme l'a montré le point précédent, la DCE requiert une cartographie du potentiel écologique des masses d'eau fortement modifiées en 4 classes : bon et plus, moyen, médiocre et mauvais. Dans l'attente de la définition des classes de potentiel écologique selon une démarche DCE compatible, il a été préconisé, au niveau national, de suivre une démarche fondée sur les mesures d'atténuation des impacts, tant pour l'évaluation du potentiel écologique actuel des masses d'eau artificielles que pour le choix de leurs objectifs environnementaux. Cette démarche définit les valeurs des éléments de qualité correspondant au bon potentiel écologique comme étant celles obtenues dans une situation où sont mises en œuvre toutes les mesures d'atténuation des impacts, qui ont une efficacité avérée sur le plan de la qualité et de la fonctionnalité des milieux et qui sont techniquement et socio-économiquement faisables sans remettre en cause le ou les usages à la base de la désignation comme masse d'eau artificielle. Ainsi, une classe de potentiel écologique sera déterminée pour chaque masse d'eau artificielle en prenant en considération des valeurs seuils établies sur la concentration en chlorophylle *a* et sur les éléments physico-chimiques.

Pour le Réservoir Marne, les valeurs des limites de classe pour la chlorophylle *a* ont été définies par le CEMAGREF et sont classées comme suit : TB/B 3.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, B/MO 6.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MO/ME 12.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et ME/MA 21.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (De Bortoli et Argillier 2008). Les détails de la méthode de calcul sont présentées dans le chapitre 3 (partie III). Le travail de synthèse réalisée par Garnier *et al.* (2007) pour les années 1992 à 2005 a mis en évidence des concentrations de chlorophylle *a* moyennes comprises entre 20 et 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en fin d'été et début d'automne, les niveaux de biomasse étant plus élevés dans le lac Champaubert que dans le lac du Der. Ceci suggère une qualité de l'eau médiocre à mauvaise conformément aux classes définies par le CEMAGREF selon les critères DCE. Par ailleurs, dans l'attente du développement d'une méthode d'évaluation nationale conforme aux exigences de la DCE pour l'élément qualité phytoplancton, l'indice planctonique (I_{pl}) sera utilisé et les limites de

classe des plans d'eau naturels seront utilisées après une expertise conduite selon le principe de l'écart à des conditions non ou très peu influencées par les activités humaines. L' I_{pl} tel qu'il est décrit dans le protocole de 1990 actualisé en 2003 (Barbe *et al.* 1990, Barbe *et al.* 2003) est basé à la fois sur la nature des peuplements phytoplanctoniques et sur l'abondance relative des groupes dominants. Il est connu pour sur-estimer largement la qualité du milieu et présenter fréquemment des discordances avec les autres descripteurs. Cependant, par analogie avec le principe de l'élément déclassant imposé par la DCE au niveau des éléments de qualité, on appliquera le principe de paramètre déclassant aux valeurs calculées des indices biologiques pour la station représentative du plan d'eau ou pour la moyenne des stations échantillonnées.

2.2.6. Stratégie d'échantillonnage globale pour le suivi de la qualité de l'eau du Réservoir Marne depuis sa mise en eau

L'institution « Les Grands Lacs de Seine » a entrepris un suivi de la qualité des eaux du Réservoir Marne depuis sa mise en eau en 1974. Quatre campagnes annuelles ont lieu sur le réservoir, en général pendant les mois de mars, vers la mi-mai, fin juillet et à la mi-septembre, en fonction des modalités de gestion du Réservoir. Cette fréquence d'échantillonnage est typiquement ce que préconise la DCE à *minima* une fois tous les trois ans (Circulaire DCE 2007/24, MEDDAD). Les prélèvements sont réalisés sur 7 stations réparties entre le réservoir (3), les canaux d'amenée (2), le canal de restitution Marne (1) et la Droye (1) (Aquascop 2002b) (**Figure 2**). De plus, depuis 1994, l'institution « Les Grands Lacs de Seine » réalise, une fois par mois, en 18 points référencés, au moyen d'une sonde multiparamétrique, des relevés de certains paramètres physico-chimiques : température, oxygène dissous, pH, conductivité et turbidité. Ces points d'analyse sont situés dans la cuvette à proprement parler mais également dans les trois rivières, les canaux d'amenée et de restitution. Les paramètres physico-chimiques mesurés et analysés régulièrement sont les suivants : température de l'air et de l'eau, oxygène dissous, pH, conductivité, turbidité, transparence, MES (matières en suspension), ammonium (azote ammoniacal), nitrates, orthophosphates, phosphore total (jusqu'en 1995), silice dissoute et chlorophylle *a*.

Depuis 1994, la division Environnement de l'institution « Les Grands Lacs de Seine » a ajouté des campagnes de suivi de certains paramètres biologiques (phytoplancton, zooplancton, macrophytes) sur 3 stations (501-G, 503-H et 505-I). Pour le plancton, les

campagnes sont réalisées chaque année de mars à septembre, une fois par mois de mars à mai puis tous les 15 jours entre juin et septembre. Mais les données ont été analysées par différents bureaux d'études selon les années (GREBE, Aquascop, CIA, BI-EAU) ce qui rend l'analyse des résultats des années précédentes difficile voire impossible. Notre analyse détaillée des protocoles d'échantillonnage jusqu'alors a révélé des différences importantes entre les bureaux d'études au niveau des techniques de prélèvements et de conservation (matériel et profondeur de prélèvement, présence/absence de filtration, fixation au formol/lugol) et des méthodes d'analyse des échantillons (par champs, le long d'un diamètre, semi-quantitatif, quantitatif, nombre de cellules comptées, espèces comptées prédéfinies, niveau taxonomique identifié), rendant *in fine* toute comparaison et exploitation scientifique impossibles, tant sur l'aspect qualitatif que quantitatif. Pour donner un exemple précis, entre 1997 et 2004, le nombre de taxons identifiés chaque année s'échelonnait entre 9 et 108 (**Figure 5**), et le nombre moyen de taxons par échantillon variait de 3 à 45 (**Figure 6**). Comme nous le verrons, ce travail de thèse permettra de faire des propositions concrètes en terme de stratégies d'échantillonnage du phytoplancton. Ces problèmes peuvent être également soulignés pour le zooplancton où des ajustements et des changements de protocole ont été enregistrés selon les bureaux d'études. Pour les macrophytes, les campagnes sont effectuées de mai à fin août, à proximité de la rive du réservoir, dans les anses et sites remarquables pré-déterminés (Aquascop 2002b).

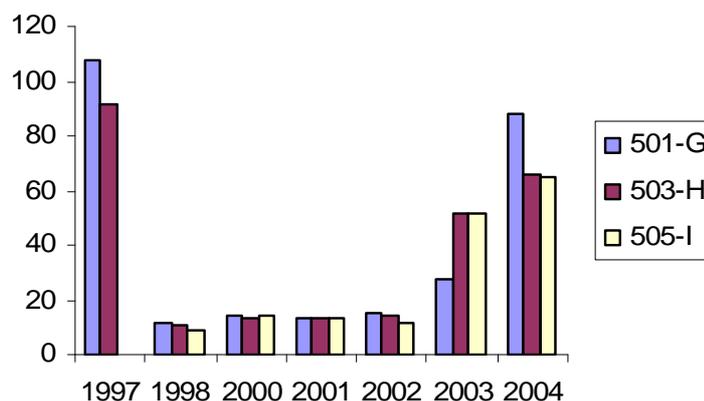


Figure 5 Nombre total de taxons identifiés par an pour chacune des stations d'échantillonnage entre 1997 et 2004

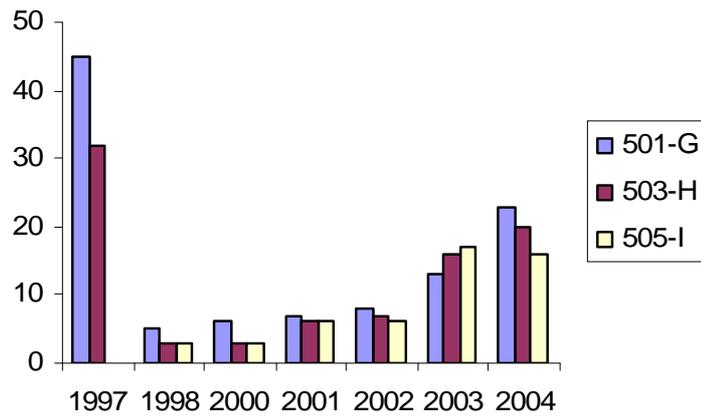


Figure 6 Nombre moyen de taxons identifiés par échantillon pour chacune des stations d'échantillonnage entre 1997 et 2004

Par ailleurs, il n'est pas rare de noter des abondances minimales nulles ou de l'ordre de quelques cellules par millilitre (**Tableau V**), ce qui pourrait correspondre au nombre de cellules minimal retrouvé dans des lacs de haute montagne (Druart et Rolland 2005) selon les années puisqu'à *minima* 35 cellules par millilitres sont retrouvées dans ces lacs.

Tableau V Abondances (cellules·ml⁻¹) moyennes, maximales et minimales du phytoplancton de Réservoir Marne de 1997 à 2004 dans trois stations de suivis

Abondance (cell·ml ⁻¹)	1997	1998	2000	2002	2003	2004
501-G						
Moyenne	1989,3	1206	1001	1643,8	2902	881
Max	6996,5	4050	1288	6235	8006	1798
Min	335,6	7	4	21	182	205
503-H						
Moyenne	381,4	10099	175	283,7	13777	333
Max	773,2	1E+05	698	738	37172	684
Min	17,5	0	0	0	129	50
505-I						
Moyenne		479	276,8	345,6	11392	375
Maximum		2006	1276	988,5	75438	881
Minimum		1	6	1,6	36	95

A titre de comparaison, le lac d'Annecy, considéré comme un lac oligotrophe présentait des abondances minimales de 1346, 809 et 205 cellules par millilitre en 2004, 2005 et 2006 respectivement ainsi que des abondances maximales de 7163, 3919 et 5654 cellules par millilitre respectivement pour les mêmes années (Gerdeaux *et al.* 2005, 2006, 2007). D'après les données disponibles de 1997 à 2004, les valeurs minimales trouvées pour le réservoir restaient en moyenne très inférieures à celles du lac d'Annecy et les valeurs maximales trouvées étaient inférieures ou relativement équivalentes selon les stations et les années. On note cependant que 3 valeurs présentaient des abondances très élevées : 114006 cellules·ml⁻¹ pour la station 503-H en 1998, 37172 cellules·ml⁻¹ pour la station 503-H en 2003 et 75438 cellules·ml⁻¹ pour la station 505-I en 2003, à cause de proliférations importantes de cyanobactéries des genres *Microcystis*, *Aphanothece* et *Oscillatoria* respectivement. Il reste cependant que toutes ces valeurs laisseraient suggérer que le Réservoir Marne présente un statut oligotrophe alors que les valeurs physico-chimiques contredisent cette hypothèse (Garnier *et al.* 2007). Sachant cela, il nous a paru important de faire un bilan détaillé de la

diversité du phytoplancton et du biovolume qu'il occupe dans le Réservoir Marne au cours de deux années de prélèvements en utilisant la même technique d'échantillonnage durant toute la période de l'étude et le même mode opératoire pour le comptage et la détermination des espèces phytoplanctoniques.

Aujourd'hui, l'importance des espèces et des assemblages d'espèces ne fait plus de doute dans l'évaluation du niveau trophique (Anneville *et al.* 2002, Reynolds *et al.* 2002, Padisák *et al.* 2006) et depuis quelques mois, un groupe de travail français s'est d'ailleurs constitué sous la tutelle du Cemagref de Bordeaux et de l'INRA de Thonon-les-Bains pour tenter de développer un indice planctonique ainsi qu'un protocole standardisé d'échantillonnage, de conservation et d'observation du phytoplancton en plan d'eau afin de répondre aux exigences de la DCE (Laplace-Tretyure *et al.* 2009). Considérant les travaux réalisés entre 1997 et 2004 sur le Réservoir Marne, puis les nôtres sur la période 2006 et 2007, il apparaît évident et critique qu'une standardisation des méthodes soit rapidement proposée en ce qui concerne à la fois l'échantillonnage et les comptages du phytoplancton.

3. Problématique, objectifs de la thèse et questions posées

Les divers assemblages d'espèces d'algues qui composent la communauté phytoplanctonique ainsi que leur dynamique de croissance sont influencés par un ensemble de paramètres environnementaux qui sont continuellement changeants et qui peuvent avoir un impact sur la réponse des organismes. Cette dernière peut s'observer à l'échelle de la seconde, de la journée, de la saison, de plusieurs mois (saison) voire de plusieurs années (décennie) (Wetzel 2001).

La réponse la plus courte s'observe au niveau biochimique c'est à dire au niveau des processus de régulation intracellulaire. Par exemple, un photon mettra entre 10^{-14} et 10^{-12} seconde pour traverser la longueur d'un récepteur phytoplanctonique, 10^{-2} seconde pour absorber l'énergie et fixer le carbone et environ 10^2 secondes pour obtenir suffisamment d'énergie et de nutriments pour entamer la production d'une nouvelle cellule (Reynolds 1990). Cette très petite échelle de temps est principalement celle qui a trait à la régulation de la photosynthèse par la lumière. La réponse au niveau physiologique s'observe pour des périodes de temps allant de 10 à 10^5 secondes. Durant ces périodes de temps qui peuvent donc s'étirer jusqu'à un cycle jour-nuit complet, les cellules phytoplanctoniques sont sujettes à des

variations de lumière qui nécessitent des ajustements physiologiques pour optimiser la fixation du carbone. Par ailleurs, elles sont susceptibles d'être transportées sur des distances de l'ordre de quelques dizaines voire centaines de mètres et par conséquent sont enclin à recevoir des quantités de lumière variables, ce qui se répercutera sur le taux de photosynthèse et la capacité de croissance de ces cellules (Reynolds 1990).

Les échelles de temps que l'on peut qualifier d'« écologiques » c'est à dire qui sont supérieures à un cycle nyctéméral, sont adéquates pour permettre et observer la réplication cellulaire. Les générations successives auront alors l'opportunité d'adapter leur physiologie aux conditions environnementales ambiantes. Ainsi, au cours de périodes de temps s'échelonnant sur plusieurs jours, des adaptations relatives à différentes conditions inhérentes au milieu à commencer par les variations de lumière pourront être observées. Les générations successives présenteront alors des capacités d'adaptations différentes afin d'optimiser au mieux l'absorption lumineuse et de surcroît la photosynthèse. Quand des périodes de temps allant de quelques semaines à plusieurs mois sont considérées (échelle de temps saisonnière ou annuelle), le lac présente des changements cycliques majeurs au niveau de sa température, de sa stabilité (stratification), de la quantité de lumière qu'il reçoit et des apports en éléments nutritifs. Par conséquent, les algues planctoniques répondent aux variations de ces signaux environnementaux et une dynamique de la communauté phytoplanctonique, qui se traduit par des successions saisonnières de différentes espèces, s'installe au cours de l'année. Sommer *et al.* (1986) ont, à ce sujet, développé un modèle de dynamique saisonnière du plancton qui permet de mettre en évidence quatre phases importantes concernant la succession des espèces au cours d'un cycle annuel.

Finalement, la variabilité interannuelle qui s'appuie sur l'analyse de la variabilité cyclique permet de trouver des schémas d'évolution des communautés phytoplanctoniques (Anneville *et al.* 2002) et de modéliser en conséquence le devenir de ces communautés en relation avec des perturbations du milieu notamment l'augmentation notable de la température à l'échelle planétaire.

Ainsi, un panel de pas de temps d'échantillonnage s'offre aux scientifiques et la stratégie d'échantillonnage du phytoplancton à adopter dépend donc de la question posée et de l'objectif de l'étude. Lorsqu'il s'agit d'un suivi annuel qui se répète d'année en année, l'échantillonnage saisonnier semble être un bon compromis (entre faisabilité et nécessité). Plusieurs études ont en effet montré que le phytoplancton présente des changements de composition et d'abondance à l'échelle de la saison (Sommer 1985, Sommer *et al.* 1986,

Reynolds 1987, Anneville *et al.* 2002, Padisák 2004), ce qui implique un pas de temps d'échantillonnage plus raisonnable pour les gestionnaires des plans d'eau qu'un pas de temps quotidien ou hebdomadaire.

Concernant les lieux de prélèvements sur une masse d'eau, il est fréquent d'observer que le critère de sélection de la station à échantillonner est celle de plus grande profondeur puisque cela permet d'obtenir des informations sur la structure physique de la colonne d'eau ainsi que sur les caractéristiques chimiques associées, loin de l'influence des tributaires et/ou de la zone côtière. Cependant, le phytoplancton est réparti et distribué quantitativement de manière hétérogène à la fois horizontalement et verticalement. En un endroit déterminé, la densité de population dépend de la composition chimique du milieu et de l'intensité de broutage. Il se constitue de cette manière des concentrations et des zones appauvries au sein d'une même masse d'eau (Dussart 1966). La répartition horizontale du phytoplancton dépend aussi de l'éclairement. Il est fréquent de constater une répartition tournante des masses planctoniques qui recherchent, pour les unes l'éclairement maximum des zones optiquement libres et pour les autres les zones d'ombres. Une étude quantitative du phytoplancton doit donc tenir compte de ces facteurs qui font intervenir l'heure et l'orientation du ou des points de prélèvements. De plus, dans le cas des réservoirs, les substances dont les algues ont besoin proviennent parfois d'affluents ou de déversoirs qui créent un gradient horizontal des conditions hydrologiques et hydrochimiques de l'amont vers l'aval. Ainsi, la multiplication des observations sera le seul moyen d'éviter des erreurs d'interprétation.

Pour le Réservoir Marne, la station qui se situe au niveau de la restitution en Marne, à l'ouest du Réservoir est celle de plus grande profondeur et fait partie des stations échantillonnées avec deux autres, une au niveau de la restitution en Droyes et l'autre dans le lac Champaubert. Cependant, devant l'absence de protocole standardisé pour l'échantillonnage du phytoplancton au niveau national et au niveau européen pour les masses d'eau artificielles, nous avons proposé à l'Institution « Les grands Lacs de Seine » d'obtenir des précisions quant à la stratégie d'échantillonnage à opérer sur le Réservoir Marne à la fois dans le temps et dans l'espace pour assurer un suivi optimal de la qualité de l'eau de ce système. Par ailleurs, face à l'explosion de nouveaux outils de détection *in situ*, nous avons également proposé à l'Institution d'acquérir un type d'instrument en particulier (un spectrofluorimètre immergeable) afin de le tester durant deux années sur le Réservoir Marne, et de valider son utilisation dans le cadre du suivi de la communauté phytoplanctonique dans cet écosystème.

Ce travail de thèse, à la fois fondamentale et finalisé, se devait de répondre à différents objectifs qui peuvent eux même se décliner sous la forme de plusieurs questions :

- Existe-t-il différents instruments d'acquisition et/ou de mesures pouvant rendre compte de la dynamique et de la diversité du phytoplancton ?
 - o Un outil unique permet-il d'appréhender de manière simple et efficace le suivi du phytoplancton par les questionnaires ?
 - o Les méthodes *in situ* peuvent-elles remplacer les méthodes classiques de laboratoire ?
 - o Quel type d'informations ces différentes méthodes fournissent-elles ?

- Quelle est la meilleure stratégie d'échantillonnage à opérer à la vue des exigences de la DCE ?
 - o Y a-t-il un nombre minimal de stations à échantillonner pour avoir une vision d'ensemble de la dynamique et de la diversité du phytoplancton ?
 - o Peut-on définir une station de référence unique, caractéristique de l'ensemble du réservoir ?
 - o Quelle méthode (d'analyse de données) peut-on utiliser pour répondre au besoin de définition d'une station de référence ?
 - o Peut-on identifier des périodes clefs dans la dynamique saisonnière du phytoplancton qui pourraient constituer des périodes d'échantillonnage caractéristiques ?
 - o Existe-t-il des variables environnementales associées à la dynamique du phytoplancton qui doivent être contrôlées régulièrement dans le cadre du suivi de la qualité de l'eau de cet écosystème ?

- Peut-on classer l'état écologique du Réservoir Marne avec l'élément de qualité biologique « Phytoplancton » ?
 - o Les trois métriques associées à cet élément (chlorophylle *a*, Indice Planctonique Lacustre, Phosphore total) et utilisées en France à l'heure actuelle donnent-elles la même information quant au statut écologique ?

- Les résultats de ces trois métriques sur une station potentielle de référence reflètent-ils bien l'état écologique de la masse d'eau dans son ensemble ou s'agit-il d'un écosystème fragmenté?

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

1. Introduction

Le phytoplancton est le compartiment à la base de la chaîne alimentaire aquatique et par conséquent une composante clé des réseaux trophiques. C'est dans cette optique que l'étude de ce compartiment (tant sur la dynamique, la diversité, la distribution et le rôle fonctionnel des espèces ou populations) est d'une importance capitale dans les recherches et les suivis écologiques des écosystèmes d'eaux douces et marins (Pearl 2000, Padisák 2004). De plus, la prolifération des populations phytoplanctoniques, sous la forme d'efflorescences (blooms) est une indication évidente de l'eutrophisation des systèmes aquatiques, ce qui suscite l'intérêt tout particulier des gestionnaires des plans d'eau (Codd *et al.* 1999, Oliver et Ganf 2000).

Le phytoplancton, tout comme la végétation terrestre ou aquatique, utilise la lumière comme principale source d'énergie. Cette dernière est stockée et utilisée comme source d'énergie chimique pour la réalisation du processus de photosynthèse qui fournit « le carburant » organique utilisé par la plupart des compartiments du réseau trophique aquatique. Le phytoplancton réalise donc la conversion de cette énergie et augmente sa biomasse organique, processus connu sous le nom de production primaire (Ley 1980). L'absorption de la lumière par le phytoplancton se fait grâce à des pigments qui captent la lumière et sont présents dans les membranes des thylacoïdes ainsi que des pigments photoprotecteurs qui sont situés dans l'enveloppe des chloroplastes (Bissett *et al.* 2001).

La chlorophylle *a* (chl *a*) est le pigment photosynthétique ubiquiste que l'on retrouve dans toutes les algues (incluant les cyanobactéries) et il est très utilisé pour estimer la biomasse phytoplanctonique totale (voir ci-dessous). Parallèlement, il existe une série de pigments dit accessoires, qui sont des marqueurs de certaines classes algales, et qui constituent donc d'excellents indicateurs de la présence de ces classes, qui peuvent ainsi être analysées et quantifiées. Ces pigments (**Tableau I**) incluent typiquement la péridinine (dinoflagellés), la chlorophylle *b* (chlorophycées), la fucoxanthine (diatomées), la zéaxanthine et les phycobiliprotéines (cyanobactéries) (Wright et Jeffrey 1987; Moline *et al.* 1997(a); Moline *et al.* 1997 (b); Moline et Prezelin 1997; Trees *et al.* 2000; Millie *et al.* 2002).

La concentration du phytoplancton, sa distribution, sa biomasse et sa composition peuvent être analysées en utilisant des méthodes conventionnelles et classiques, incluant la microscopie optique pour l'identification de ces microorganismes sur des prélèvements

intégrés ou à des profondeurs discrètes, et la spectrophotométrie pour doser la chlorophylle *a* suite à l'extraction cellulaire du pigment. D'autres méthodes de détection et de mesures comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), basée sur la séparation des pigments et la détermination de leur fluorescence, sont également très utilisées pour analyser les pigments phytoplanctoniques et quantifier l'importance relative des différents groupes (Mantoura et Llewellyn 1983; Murray *et al.* 1986; Claustre 1994; Latasa *et al.* 1996; Cullen *et al.* 1997 ; Letelier *et al.* 1997; Trees *et al.* 2000 ; Kirkpatrick *et al.* 2000 ; Havskum *et al.* 2004). La fluorométrie est également une méthode fréquemment utilisée en écologie aquatique car c'est une méthode sensible, rapide, peu coûteuse et facile à utiliser. Cette technique analytique identifie et caractérise un ou plusieurs pigments photosynthétiques. Brièvement, ces derniers sont excités par une source de lumière à différentes longueurs d'onde spécifiques et la fluorescence émise par l'échantillon est filtrée sélectivement pour déterminer un ou plusieurs pics qui correspondent à différents pigments photosynthétiques (Kemp *et al.* 1993 ; Wetzel et Likens 2000, voir Tableau 1). Depuis les deux dernières décennies, la cytométrie en flux (CMF) a été également reconnue comme une technique extrêmement puissante pour l'étude de l'écologie du phytoplancton, spécialement pour l'analyse de son évolution spatiale et/ou temporelle (Jacquet *et al.* 1998 a-b ; Vaulot et Marie 1999 ; Peperzak *et al.* 2000 ; Veldhuis et Kraay 2000 ; Li et Dickie 2001 ; Thyssen *et al.* 2008) mais aussi pour découvrir de nouvelles espèces marines majeures comme *Prochlorococcus* ou *Ostreococcus* (Chisholm *et al.* 1988, Courties *et al.* 1994). Grâce aux propriétés optiques des cellules et à leur composition pigmentaire, des populations mixtes peuvent être détectées et discriminées dans un même échantillon (Olson *et al.* 1983; Chisholm *et al.* 1988; Yentsch et Horan 1989; Olson *et al.* 1991). Dans les systèmes lacustres, l'utilisation de la cytométrie en flux pour étudier la dynamique saisonnière des populations microbiennes incluant le pico- et le nano-phytoplancton, les bactéries et les virus est relativement récente (Goddard *et al.* 2005; Personnic *et al.* sous presse). Quant à son utilisation pour étudier les populations micro-phytoplanctoniques des systèmes naturels, et plus particulièrement des environnements lacustres (Crosbie *et al.* 2003b; Tijdens *et al.* 2008; Toepel *et al.* 2004, 2005 ; Cellamare *et al.* sous presse), elle reste encore très peu usitée.

Tableau I Distribution des pigments photosynthétiques principaux dans les classes de phytoplancton marin et d'eau douce ainsi que les longueurs d'ondes d'absorption, d'excitation et d'émission de ces pigments.

Pigments	Cyanophycées	Chlorophycées	Chrysophycées	Bacillariophycées	Cryptophycées	Dinophycées	Longueurs d'ondes d'absorption	Longueurs d'ondes d'excitation	Longueurs d'ondes d'émission
Chlorophylle a	+	+	+	+	+	+	660-665; 430	430-450	668-685
Chlorophylle b	-	+	-	-	-	-	645;435;470	459-467	652-678
Chlorophylle c	-	-	+	+	+	+	630-635; 583- 586; 444-452	450-465	633-696
Fucoxanthine	-	-	-	+	-	-	450;470	508-525	678-680
Péridinine	-	-	-	-	-	+	466;535	490	675
Caroténoïdes	-	+	+	-	-	-	485	495-508	678
Phycoérythrine	+	-	-	-	+	-	498;538;565	550	560-575
Phycocyanine	+	-	-	-	+	-	614;620	630	650

(Tiré et modifié de Falkowski 1980; Gieskes et Kraay 1983; SooHoo *et al.* 1986; Phinney et Cucci 1989; Claustre 1994; Jeffrey *et al.* 1997; Grabowski *et al.* 2001; Wetzel 2001)

La fréquence des programmes d'échantillonnage qui s'intéressent à la dynamique saisonnière du phytoplancton peut ne pas être suffisante pour suivre ces changements de biomasse, particulièrement durant les périodes de « bloom » (avant, pendant et après) où la variabilité spatiale et temporelle des densités phytoplanctoniques peut être très élevée (Kutser 2004) et requiert une fréquence d'échantillonnage importante. Dans ce cadre, plusieurs méthodes peuvent être mises en avant car pouvant permettre un suivi *in-situ*, et à relativement haute fréquence, de l'abondance et de la distribution phytoplanctonique, au travers, typiquement, de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* (chl *a*), un indicateur majeur de la biomasse algale et par conséquent de la qualité de l'eau (Gallegos et Jordan 2002).

La plupart de ces outils, dont l'un des objectifs peut donc être de détecter aussi vite que possible, tout changement majeur et/ou rapide de la biomasse algale dans les écosystèmes aquatiques, ont d'abord été développés pour le suivi du phytoplancton océanique et marin. Cependant, l'importance des grandes masses d'eau douce a été mise de plus en plus en avant ces dernières années, notamment au travers de la mise en place de la Directive Cadre sur l'Eau qui encourage tous les pays européens à atteindre le bon état écologique des eaux douces avant 2015 (Parlement Européen 2000). Aujourd'hui, la gestion de la qualité des eaux intérieures préoccupe de plus en plus les gestionnaires qui se doivent de lutter contre l'eutrophisation d'origine anthropique susceptible d'affecter fortement les masses d'eau dont ils ont la charge. En effet, l'apparition potentielle de « blooms » (notamment avec les cyanobactéries toxiques) peut poser des problèmes d'ordre écologique mais surtout économique dans de nombreux lacs et réservoirs.

Fort de ces constatations, d'une demande sociétale forte mais également du besoin de nouveaux outils de détection fiable et d'utilisation facile, plusieurs détecteurs *in-situ* tels que des fluoromètres portables et immergeables ont été développés comme outil pour la gestion des lacs et des réservoirs. La méthode basée sur la mesure de la fluorescence pigmentaire est utile non seulement parce qu'elle mesure un signal qui indique la concentration phytoplanctonique potentielle mais aussi parce que les mesures peuvent être faites à une fréquence élevée et/ou en continu durant des déploiements prolongés. Elle permet également de couvrir des superficies étendues le long de transects horizontaux et/ou de profils verticaux, tout ceci sans traitement préalable des échantillons. Ces outils peuvent fonctionner à n'importe quel moment de la journée et également sous la zone euphotique, permettant si

besoin de détecter des changements nyctéméraux dans les concentrations de particules ainsi que dans la potentielle sédimentation d'agrégats phytoplanctoniques. Par conséquent, les fluoromètres *in-situ* fournissent une très bonne résolution et semblent convenir pour la description de la variabilité spatio-temporelle du phytoplancton (Cullen *et al.* 1997). Dans la plupart des cas, ces instruments ont été conçus pour fonctionner dans une large gamme de niveaux trophiques (oligotrophe à eutrophe), ce qui assure un fonctionnement possible dans tous les types d'écosystèmes à priori. Certains détecteurs ont été conçus pour la caractérisation de différents groupes à l'intérieur de la communauté phytoplanctonique à partir de leurs pigments photosynthétiques accessoires. En effet, la plupart des fluoromètres *in-situ* utilisent une longueur d'onde d'excitation dans le bleu et ils détectent l'émission de la chl *a* dans le rouge à environ 680 nm. Si une combinaison de plusieurs longueurs d'onde d'émission est mesurée, il est possible d'identifier différents groupes phytoplanctoniques sur la base des différences au niveau de leurs pigments accessoires. Finalement, ces détecteurs fournissent des données de suivi en temps réel et en continu, ce qui génère un grand nombre de données qui peuvent être visualisées immédiatement sur un ordinateur et qui sont faciles à décoder.

Parmi les différentes techniques de fluorométrie *in situ* on peut citer la « Lidar Fluorometry » (pour « Light Detecting and Ranging Fluorometry ») qui combine la détection de la chlorophylle *a* et la détection d'autres pigments accessoires rendant ainsi possible la distinction de différents taxons. Cependant, cet outil analyse la surface de l'eau et ne fournit pas d'information sur la distribution des classes algales qui se situent plus profondément dans la colonne d'eau (Nieke *et al.* 1997 ; Barbini *et al.* 2001). On peut également citer la « Flow-through Spectrofluorometry » (FLUO-IMAGER) qui analyse tous les pigments phytoplanctoniques présents étant donné que l'outil utilisé ne réalise pas de mesures à des longueurs d'onde fixes mais scanne la gamme de longueur d'onde d'excitation de 400 nm à 650 nm et la gamme de longueur d'onde d'émission de 530 nm à 730 nm. La variabilité spatiale et temporelle de la distribution du phytoplancton peut être obtenue en utilisant le spectre d'émission de fluorescence *in situ* et par des mesures répétées ou continues ; les distributions verticale et horizontale des pigments photosynthétiques peuvent être analysées (Babichenko *et al.* 2000). Finalement, la Fluoroprobe est un outil permettant la détection et la quantification de différentes classes de phytoplancton le long de la colonne d'eau (Beutler *et al.* 2002).

Ainsi, les méthodes de suivi du phytoplancton (c'est à dire d'observation, de discrimination et d'analyse) sont nombreuses en écologie aquatique. De la microscopie optique (Utermöhl 1958) à l'imagerie satellite (Allee et Johnson 1999) en passant par la cytométrie en flux ou la (spectro)fluorométrie (Collier et Campbell 2000, Beutler *et al.* 2002), il existe un grand nombre d'outils et/ou d'instruments capable de donner des informations concernant la biomasse du phytoplancton. Dans le cadre de cette thèse, quatre méthodes instrumentales ont été utilisées pour l'analyse du phytoplancton du Réservoir Marne. Elle seront décrites brièvement dans la partie 2 de ce chapitre.

L'étude de tout écosystème dans ses dimensions espace-temps conduit forcément à l'obtention d'un ensemble complexe de données qui sont par nature multivariées. Ainsi, pour une analyse détaillée d'un écosystème donné, ce dernier doit faire l'objet d'un échantillonnage spatial sur plusieurs sites, de façon répétée dans le temps, qui va aboutir à l'obtention de données tri-dimensionnelles : (1) le site, (2) la date d'échantillonnage, (3) le (ou les) descripteur(s), c'est à dire la (ou les) variable(s) mesurée(s) (biotique(s) ou abiotique(s)). Ces données spatiales et/ou temporelles conduisent à la formation de plusieurs tableaux de données. Pour explorer et analyser la structure de ces données, des méthodes dites multitableaux, ou K-tableaux, ont été spécifiquement élaborées. Parmi celles-ci, on peut citer l'Analyse Canonique Généralisée (Carroll 1968 ; Kettering 1971), STATIS (Structuration des Tableaux A Trois Indices de la Statistique) (Lavit *et al.* 1994), l'analyse factorielle multiple (AFMULT) (Escofier et Pagès 1994) ou encore l'analyse de co-intertie multiple (ACOM) (Chessel et Hanafi 1996). Bien que certaines de ces méthodes soient connues depuis relativement longtemps, leur application en écologie est encore peu répandue, et ce d'autant plus dans les systèmes dulçaquicoles de type réservoir. Dans le cadre de cette thèse, il était indispensable de passer par ce type de méthodes pour analyser notre base de données, qui comprenait 297 espèces phytoplanctoniques identifiées à 6 stations de prélèvements et à 22 dates différentes. Une de ces méthodes multitableaux, l'analyse triadique partielle (ATP) a été utilisée pour traiter nos données et nous la décrirons brièvement dans la partie 3 de ce chapitre.

2. Instrumentation utilisée pour l'analyse du phytoplancton du Réservoir Marne

2.1. La microscopie inversée

La microscopie est encore aujourd'hui la seule technique capable de donner des informations précises sur la diversité et la composition de la communauté phytoplanctonique même si des progrès récents ont été clairement réalisés dans le domaine de la taxonomie moléculaire appliquée à certaines classes algales (par exemple, voir les travaux de Neilan B.A. et Wilmotte A. pour les cyanobactéries, Daugbjerg N. et Fawley M.W. pour les chlorophycées, Laeners G et Dahlberg O.L. pour les dinoflagellés, Medlin L.K. pour les chrysophycées). En effet, nous pouvons toujours dire aujourd'hui qu'aucune technique n'a surpassé celle de « l'œil humain » et qu'une étude détaillée de la richesse des espèces phytoplanctoniques passe forcément par l'observation et l'analyse des échantillons par microscopie optique.

La microscopie utilisée est dite inversée car la source de lumière et le condensateur illuminent la chambre d'analyse (voir ci-dessous) par dessus et les objectifs, situés en dessous, permettent d'observer les spécimens à travers la très fine plaque de verre située au fond de la chambre et sur laquelle les organismes ont sédimenté. Cette technique de numération cellulaire est très efficace pour dénombrer le nanoplancton et elle permet de traiter de grandes quantités d'eau (jusqu'à 100 ml), c'est à dire de concentrer le phytoplancton même s'il est très pauvre.

Notre comptage du phytoplancton du lac Marne a été réalisé à partir d'échantillons d'eau brute. Les prélèvements ont été effectués à 3 profondeurs (3m, 6m et 8 m quand cela était possible) correspondant toujours à la zone euphotique (c'est-à-dire la strate de la colonne d'eau dans laquelle les algues reçoivent plus d'1% de la lumière nécessaire à leur activité photosynthétique). Les prélèvements ont été obtenus à l'aide une bouteille de type Van Dorn de 5 litres permettant d'obtenir les échantillons aux profondeurs discrètes mentionnées ci-dessus. Les échantillons d'eau ont été fixés immédiatement sur le bateau avec du lugol, un réactif iodo-ioduré qui assure la conservation du phytoplancton et alourdit les cellules, rendant ainsi leur sédimentation plus facile. Il colore également l'amidon des cellules ce qui rend leur identification plus aisée.

Le traitement de l'échantillon a débuté par une agitation modérée afin de remettre en suspension délicatement les algues et assurer leur répartition homogène dans le pilulier de prélèvement de 150 ml. Un sous-échantillon (10 ml, 25 ml ou 50 ml) a alors été versé dans un cylindre surmontant une chambre de sédimentation (Chambre Kolkitz) et laissé pendant 24 heures à l'abri de la lumière et de la chaleur (Hasle 1978). Ce laps de temps permet d'être sûr que les algues, même les plus légères, vont sédimenter au fond de la cuvette (Nielsen 1933). Puis, on a glissé la partie cylindrique sur le côté de la chambre pour la remplacer par une lamelle de couverture en verre. Enfin, la lame a été déposée délicatement sur le microscope inversé (microscope ZEISS Axiovert 135) pour éviter la re-suspension des organismes. Cette technique a été développée par Utermöhl en 1958.

L'identification microscopique des organismes phytoplanctoniques, faite au grossissement 40x, et au moyen d'une caméra AxioCAM (Zeiss) permettant l'acquisition de photographies pour une analyse ultérieure si besoin via l'utilisation du logiciel AxioVision release 4.4 (Zeiss), a été faite sur plusieurs critères : la taille, la présence ou l'absence de flagelles et leur nombre, l'organisation cellulaire (filaments, colonies, individus) et le type de membrane externe (cellulosique, siliceuse, peptidoglycanique...). Toutes les cellules ont été dénombrées le long d'un diamètre ou de deux diagonales jusqu'à atteindre un minimum de 400 cellules. La largeur de la bande d'observation était déterminée grâce à une lame micrométrique. Suite au comptage, nous avons également effectué un balayage de la lame afin de répertorier toutes les espèces non comptées, car rares.

Nous avons alors procéder au calcul du nombre de cellules par litre. Pour cela, nous devons tout d'abord connaître le rapport de comptage qui correspond au rapport entre la surface de la chambre (530 mm²) et la surface des bandes (11,09 mm²) :

$$\frac{\text{surface totale}}{\text{surface de bandes}} = \frac{530}{11.09} = 47.8$$

Connaissant le volume d'eau sédimenté (V), le nombre d'organismes par litre (N) est égal à :

$$N = \frac{n * 47.8 * 1000}{V}$$

où n représente le nombre de cellules comptées.

Notons que de la prise de l'échantillon jusqu'au comptage, l'eau a subi plusieurs manipulations et plusieurs sources d'erreurs potentielles existent. Il est toujours important de garder cela en mémoire, à savoir que la vision de l'écosystème est photographique et assujettit à de nombreux biais. Quelques uns peuvent être mentionnées :

Lors de la prise de l'échantillon, les organismes ne sont pas forcément répartis de manière homogène dans la colonne d'eau. De ce fait, l'erreur faite lors de la récolte de l'eau est très variable selon la répartition du phytoplancton. L'échantillonnage discret rend difficile la mesure de cette erreur.

Lors de la prise de l'échantillon, le contenu de la bouteille de prélèvement peut ne pas être complètement homogène et il se peut que certains organismes se soient agglomérés dans certaines parties du volume du container. Ayant choisi de dénombrer les unités cellulaires, qu'elles soient individualisées ou coloniales, un mauvais brassage de la bouteille, la flottaison de certaines espèces peut donc entraîner une sous estimation de certaines espèces.

Il a été décrit que les échanges thermiques entre la chambre de sédimentation et le laboratoire peuvent provoquer des courants à l'intérieur de la cuvette pendant la sédimentation. Il en résulte une distribution hétérogène des organismes au fond de la chambre et généralement, ces derniers ont tendance à se déposer en plus grand nombre à la périphérie de la cuvette (Sournia 1979)

Selon Lund *et al.* (1958), en comptant 400 cellules nous atteignons une précision de 10% donc il ne semble pas nécessaire d'en compter plus. Par ailleurs, le gain de précision obtenu en comptant 10000 cellules étant trop faible par rapport au travail qu'un tel comptage demande, il ne semble pas intéressant de l'entreprendre. Concrètement et comme nous l'avons dit plus haut, notre comptage a porté sur 450 cellules au minimum (avec une erreur de 9,43%) et 5400 cellules au maximum (avec une erreur de 2,72%).

Pour évaluer plus objectivement la quantité de matière vivante autotrophe présente dans le milieu et disponible pour les consommateurs primaires, l'estimation du volume a été préférée aux comptages globaux qui surestiment beaucoup les petites espèces au détriment des plus grosses (Hillebrand *et al.* 1999). Le biovolume a été calculé en partant des dimensions moyennes et de la forme géométrique de l'espèce considérée. Les dimensions mesurées incluait la membrane de la cellule mais excluaient la gaine mucilagineuse qui enveloppe certaines algues (enveloppe de nature polysaccharidique) (Hillebrand *et al.* 1999).

2.2. L'extraction et le dosage de la chlorophylle *a*

Le dosage de la chlorophylle *a* (chl *a*) mérite une attention particulière en raison de l'importance de ce pigment dans la photosynthèse. En effet, la chl *a* est le seul pigment capable de produire de l'énergie chimique, nécessaire à la fixation du carbone, à partir de l'énergie lumineuse. Les chlorophylles *b*, *c*, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines ne peuvent que transférer leur énergie à la chlorophylle *a*. Les caroténoïdes jouent aussi un rôle important dans le mécanisme de photo-protection des cellules. L'importance des pigments accessoires par rapport à la concentration de chl *a* varie beaucoup selon les caractéristiques de la lumière de l'habitat. Il en va de même pour la quantité de chl *a* qui est très variable d'un type d'algue à un autre et qui dépend du régime lumineux auquel il est acclimaté.

Dans l'acétone 90%, qui sert classiquement à son extraction, la chl *a* montre un maximum d'absorption à 665 nm (rouge). Ce pigment peut être convertie en phéophytine (une forme non fonctionnelle de la chl *a*), par acidification, ce qui a pour effet d'enlever le noyau Mg de la molécule. Dans les eaux naturelles, on rencontre les deux formes en proportions variables, selon l'état physiologique du phytoplancton. Puisque la phéophytine absorbe aussi à 665 nm mais de façon moins forte, la concentration de chl *a* peut être calculée à partir de la diminution d'absorbance de l'extrait après acidification. Par ailleurs, une correction approximative pour la turbidité dans l'extrait peut être apportée en soustrayant l'absorbance à 750 nm. A cette longueur d'onde, la chl *a* et la phéophytine ont une absorbance négligeable.

Plusieurs solvants organiques, méthanol et éthanol en particulier, ont été utilisés et testés pour l'extraction des pigments et comparés à l'efficacité de l'acétone (Marker *et al.* 1980 ; Nusch 1980 ; Riemann 1980 ; Sartory et Grobelaar 1984). Il en ressort que l'acétone est généralement moins efficace que le méthanol ou l'éthanol chauffé pour l'extraction de la chlorophylle *a*. Par ailleurs, le processus d'acidification dans le méthanol est extrêmement délicat et les phéopigments y sont très sensibles. Un très faible excès d'acide peut introduire des erreurs expérimentales importantes (Marker *et al.* 1980 ; Marker et Jinks 1982). Ces problèmes d'acidification sont moins sérieux avec l'éthanol (Nusch 1980), et encore moins avec l'acétone. Comme la détermination de la concentration en phéopigments peut être d'une importance majeure, car pouvant atteindre dans certains cas plus de 50% des concentrations pigmentaires totales, les produits de dégradation des pigments doivent être mesurés et c'est souvent l'acétone qui est le solvant utilisé pour l'extraction des chlorophylles et des phéopigments. Durant cette thèse, nous avons donc utilisé l'acétone 90% comme solvant

d'extraction pigmentaire. Ce travail a été effectué par le laboratoire de chimie de l'institution « Les Grands Lacs de Seine », à qui nous amenions les échantillons suite aux prélèvements.

Les échantillons d'eau ont été prélevés dans des flacons d'un litre et ont été transportés au froid et à l'obscurité jusqu'au laboratoire cité ci-dessus. La filtration a été réalisée dans les 12 heures suivant le prélèvement après homogénéisation de l'échantillon afin de jauger de la quantité appropriée pour la filtration. Cette dernière a été réalisée à travers un filtre en fibres de verre Whatman GF/F (porosité 0,7 μm) et le volume filtré a été noté pour chaque échantillon. Suite à la filtration, chaque filtre a été placé dans un bécher maintenu à l'obscurité contenant 10 à 20 ml d'acétone 90%. Le bécher a alors été placé dans un bac à ultrasons à l'obscurité (pour briser les cellules et extraire les pigments) pendant 20 min à température ambiante puis laissé au repos pendant 10 min. L'extrait pigmentaire a ensuite été filtré sur un filtre en fibres de verre (pour éliminer les débris de filtres et avoir un extrait pigmentaire exempt de particules) et transvasé dans une fiole jaugée que l'on complète au volume initial de solvant utilisé avec de l'acétone pure. La fiole a alors été conservée à l'obscurité et les mesures ont été réalisées dans les minutes suivantes. Une certaine quantité d'extrait (dépendant du volume des cuves du spectrophotomètre) a été placée dans une cuve en quartz du spectrophotomètre et les absorptions de l'échantillon à 750 nm (pour estimer la turbidité) et à 665 nm ont été mesurées. Une fois cette lecture faite, de l'acide chlorhydrique a été ajouté directement dans la cuve afin d'obtenir une concentration de la solution de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Notons que le blanc a été fait avec de l'acétone 90% à chaque fois que la longueur d'onde a été changée.

La méthode de calcul de la concentration pigmentaire utilisée est celle de Lorenzen (1967). La concentration en chlorophylle *a*, C_a , exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, dans l'échantillon d'eau analysé a été calculée selon l'équation suivante :

$$C_a = 27 * [(A_0 665 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)] * \frac{v}{L * V}$$

où :

$A_0 665$ et $A_0 750$ sont respectivement les absorbances à 665 nm et 750 nm avant acidification

$A_a 665$ et $A_a 750$ sont respectivement les absorbances à 665 nm et 750 nm après acidification

v est le volume de solvant initial (en millilitres) utilisé pour l'extraction

V est le volume d'eau filtré (en litres)

L est le parcours optique de la cuve utilisée (en centimètres)

27 est un facteur déterminé expérimentalement

La concentration en phéopigments, P_a , exprimée en $\mu\text{g.L}^{-1}$, dans l'échantillon d'eau analysé a été calculée selon l'équation suivante :

$$C_a = 27 * [1.7 * (A_{0665} - A_{0750}) - (A_{a665} - A_{a750})] * \frac{v}{L * V}$$

où A_{a665} , A_{a750} , A_{0665} , A_{0750} , v , V et L ont la même signification que précédemment et 1,7 aussi coefficient déterminé expérimentalement.

2.3. La cytométrie en flux

Les organismes phytoplanctoniques, qui peuvent être vus comme des particules en suspension dans un liquide, sont bien adaptés à l'analyse par cytométrie en flux (CMF), dès lors que les cellules, colonies ou filaments ne dépassent pas un certain diamètre (Dubelaar et Jonker 2000). Cette technique est donc particulièrement pertinente pour compter et mesurer rapidement des cellules individuelles isolées ou pour discriminer des sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de taille (Legendre et Yentch 1989, Olson *et al.* 1993).

Le principe de la cytométrie en flux peut être résumé comme suit (d'après Métézeau *et al.* 1997). Les cellules en suspension dans leur milieu liquide sont mises sous pression et injectées au centre d'un flux laminaire créé par un liquide de gaine exempt de particules. Ce liquide guide les cellules en file indienne, une par une, vers et dans une chambre d'analyse « frappée » par une source lumineuse (le plus souvent un laser de longueur d'onde fixe). Cette technologie va donc permettre l'analyse de toutes les particules et on comprend mieux pourquoi on parle de « single cell analysis ». Chaque fois qu'une cellule passe devant la source lumineuse, elle diffracte et absorbe la lumière incidente du faisceau (Jacquet 2001). La lumière diffractée peut être mesurée à différents angles. Elle est recueillie dans l'axe de la lumière incidente et le paramètre mesuré dit de « diffraction aux petits angles » (FALS pour Forward Angle Light Scatter ou FSC pour Forward Scatter Channel) c'est à dire à des angles variant entre 2 à 6° peut être mis en relation directe avec la forme, la taille, et le volume de la cellule. La lumière diffractée par la cellule est également recueillie entre 8° et 90° de l'axe de la lumière incidente et le paramètre mesuré dit de « diffraction aux grands angles » ou diffusion orthogonale (RALS pour Right Angle Light Scatter ou SSC pour Side Scatter

Channel) peut être mis en relation avec la taille, la texture cellulaire, l'indice de réfraction ou encore la granulosité cytoplasmique. Quant à la lumière absorbée puis ré-émise sous forme de fluorescence, elle est mesurée par différents détecteurs optiques après déviation grâce à des miroirs et séparation du signal lumineux grâce à différents filtres. Le FL1 enregistre la fluorescence verte (émise par le complexe marqueur-acides nucléiques utilisé pour le comptage des virus et des bactéries typiquement), le FL2 la fluorescence orange (émise par la phycoérythrine de certaines cyanobactéries et les cryptophycées) et le FL3 la fluorescence rouge (émise par la chlorophylle) (Legendre et Yentch 1989). Au final, l'acquisition des différentes mesures optiques contient des informations qui peuvent permettre d'identifier, d'énumérer et de discriminer un certain nombre de populations phytoplanctoniques. Ces mesures sont généralement visualisées sous forme d'histogrammes de dispersion biparamétrique (appelé cytogrammes) (**Figure 1a**) et/ou monoparamétrique (**Figure 1b**).

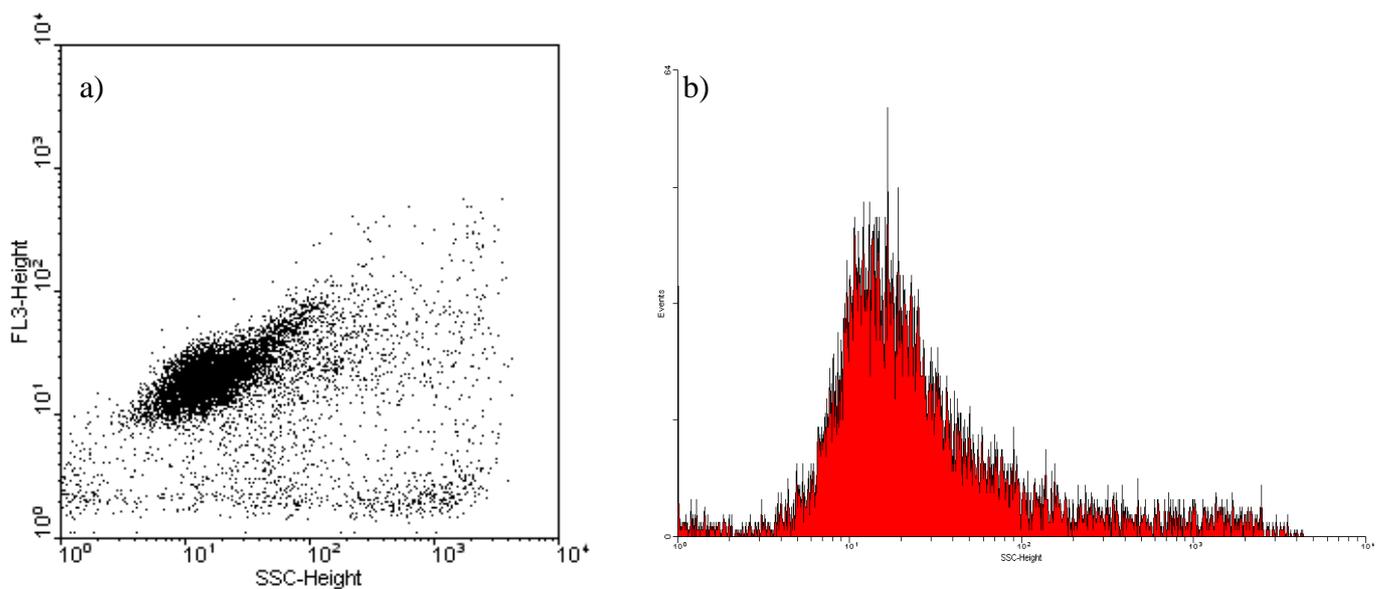


Figure 1 a) Représentation biparamétrique (cytogramme) de deux mesures optiques (FL3 versus SSC)
 – b) Représentation monoparamétrique (histogramme de distribution) d'une mesure optique (SSC).
 (Tiré de Jacquet 2004)

Certaines fonctions, comme le tri cellulaire, associées au développement de la CMF, ont ouvert de nouvelles perspectives quant à l'étude de la dynamique des populations phytoplanctoniques dans le milieu naturel (Davey et Kell 1996 ; Vives-Rego *et al.* 2000 ; Reckermann 2000). En effet, ce module interne, optionnel ou partie intégrante de certains cytomètres, permet, après l'identification d'une signature cytométrique sélectionnée, la séparation physique des cellules issues d'un assemblage mixte (**Figure 2**). La mise en culture

et l'identification microscopique des cellules phytoplanctoniques peuvent alors permettre de réaliser un suivi saisonnier à l'aide des signatures auxquelles des noms auront été attribuées.

Nous avons utilisé cette approche dans le cadre de cette thèse et les résultats obtenus sont détaillés dans l'article de Cellamare, Rolland et Jacquet intitulé : « *Flow sorting of freshwater phytoplankton* », sous presse dans *Journal of Applied Phycology*, présenté dans ce chapitre. Nous avons utilisé la capacité du cytomètre FACSCalibur à opérer le tri cellulaire pour analyser la communauté phytoplanctonique de 4 écosystèmes différents dont le Réservoir Marne. Nous avons montré que malgré les stress optique, mécanique et hydrodynamique subis par les cellules triées, la plupart des populations ciblées ont pu être isolées et mises en culture dans un milieu de culture mixte. Quarante cinq taxons phytoplanctoniques ont été isolés, incluant des chlorophycées (29 espèces), des cyanobactéries (8), des diatomées (7) et des cryptophycées (1). Environ 80 % des populations triées ont réussi à croître de façon optimale et 47% constituaient des monocultures. Cependant, certains groupes n'ont pas pu être isolés comme les cyanobactéries coloniales, les chrysophycées, les euglènes, les desmidiacées et les dinoflagellés. Par ailleurs, *Cryptomonas* sp. a présenté une grande sensibilité au tri. Nous proposons que l'analyse par cytométrie en flux du phytoplancton d'eau douce, plus spécifiquement les espèces enclines à former des efflorescences et celles qui sont facilement triables et identifiables, pourrait constituer un outil intéressant pour les gestionnaires.

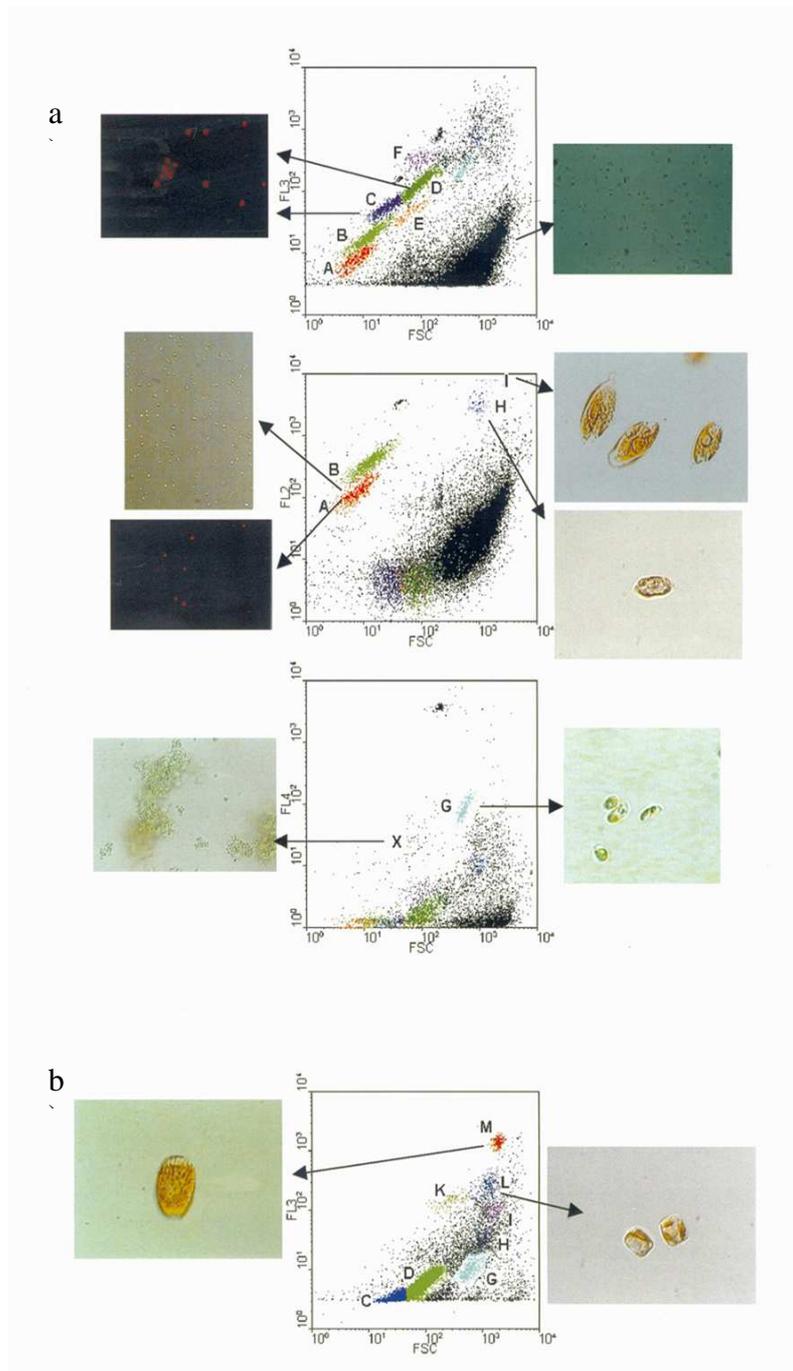


Figure 2 Histogrammes biparamétriques d'échantillons estivaux provenant de la mer Wadden (Allemagne). FL3 représente la fluorescence rouge (excitation à 488 nm et émission à 675 nm) indicatrice de la présence de chlorophylle, FL2 exprime la fluorescence orange de la phycoérythrine (excitation à 488 nm et émission à 575 nm). FL4 représente la fluorescence de la phycocyanine (excitation à 633 nm et émission à 660 nm). FSC fournit une indication sur la taille de la cellule. a) Configuration pour le pico- et nano- phytoplancton. b) Configuration pour le nano- et micro-phytoplancton. Les groupes identifiés sont les suivants : A - *Synechococcus* type I ; B - *Synechococcus* type II ; C - pico-eucaryotes type I ; D - pico-eucaryotes type II ; E - pico-eucaryotes type III ; F - *Leptocylindrus minimus* (diatomée) ; G - *Hemiselmis virescens* (cryptophycée) ; H - *Teleaulax amphioxeia* (cryptophycée) ; I - *Rhodomonas marina* (cryptophycée) ; K - *Nitzschia closterium* (diatomée) ; L - *Thalassiosira minima* (diatomée) ; M - *Fibrocapsa japonica* (raphidophycée) ; X - *Microcystis viridis* (cyanobactérie). (Tiré de Reckermann 2000)

2.4. La sonde spectrofluorométrique immergeable, Fluoroprobe™ (bbe, Moldaenke)

La sonde Fluoroprobe™ (bbe, Moldaenke) a été développée pour faciliter la détection et la quantification du phytoplancton le long de la colonne d'eau (Beutler *et al.* 2002; Gregor et Marsálek 2004). Cette sonde immergeable a été mise à la disposition des scientifiques et des gestionnaires, dès 2002, pour différencier plusieurs « groupes spectraux » de microalgues *in vivo* et *in situ* le long de profils verticaux pouvant atteindre 100 mètres. Ces profils sont réalisés en quelques minutes et sont basés sur l'intensité de fluorescence de la chl *a* à 680 nm. Le principe de mesure repose sur les capacités de fluorescence des algues phytoplanctoniques. L'émission de fluorescence fait suite à une excitation préalable par 5 diodes qui différencient les algues vertes (chlorophycées) à 450 nm, les algues brunes (diatomées, dinoflagellés, chrysophycées) à 525 nm, les algues rouges (cryptophycées et cyanobactéries riches en phycoérythrine) 570 nm et les algues bleues-vertes (cyanobactéries riches en phycocyanine) à 590 et 610 nm (Leboulanger *et al.* 2002). Cette discrimination de différents groupes phytoplanctoniques se fait donc sur la base de leurs caractéristiques pigmentaires propres. Une diode supplémentaire de longueur d'onde d'excitation 370 nm mesure la fluorescence de la matière organique dissoute appelée « substances jaunes ».

Un logiciel spécifique de la sonde est alors utilisé pour calculer la concentration de chaque groupe spectral présent, cette dernière étant exprimée en termes de concentration équivalente de chlorophylle *a* par litre d'eau (équivalents $\mu\text{g chl } a \cdot \text{L}^{-1}$) et étant en accord avec les valeurs de fluorescence enregistrées. Lors de l'acquisition des données sur le terrain, les informations apparaissent instantanément, sous forme de tableaux (**Figure 3a**) ou de graphiques (**Figure 3b**), sur l'écran de l'ordinateur rattaché en surface à la sonde (Beutler *et al.* 2002; Gregor et Maršálek 2004). Les données peuvent être sauvegardées dans la sonde ou transférées sur un ordinateur.

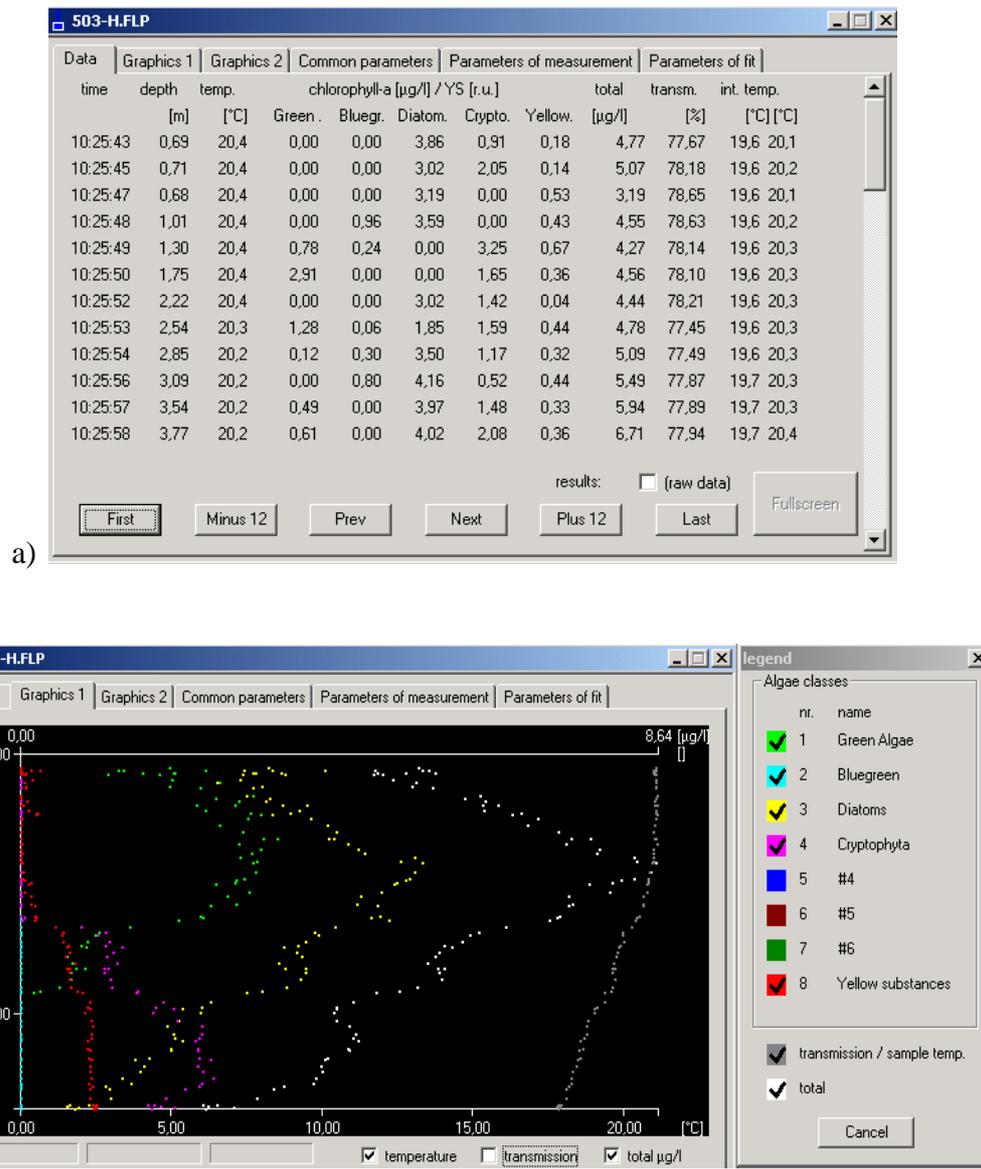


Figure 3 a) Représentation sous forme de tableaux des données acquises le long de la colonne d'eau
 b) Représentation sous forme de graphique des données acquises le long de la colonne d'eau. Ces données sont issues d'une campagne de terrain effectuée à la station Giffaumont (H) du Réservoir Marne en juin 2006 (données personnelles).

La calibration des spectres des classes individuelles est réalisée en utilisant des cultures mixtes (*Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. et *Micractinium* sp. pour les algues vertes; *Microcystis* sp., *Synechococcus* sp., *Aphanizomenon* sp. et *Anabaena* sp. pour les cyanobactéries riches en phycocyanine; *Cyclotella* sp., *Nitzschia* sp., *Synedra* sp., *Ceratium* sp., et *Peridinium* sp. pour les algues brunes; *Cryptomonas* sp. pour les algues rouges riches en phycoérythrine) (Beutler *et al.* 2002). Cependant, cet outil

peut être recalibré si nécessaire, tel que cela a été réalisé pour le suivi de la cyanobactérie *Planktothrix rubescens* dans le lac du Bourget (Leboulanger *et al.* 2002).

Nous avons utilisé cet outil dans le cadre de cette thèse. La validation de son utilisation fait le lieu d'un article, présenté dans ce chapitre, par Rolland, A. Rimet, F. et Jacquet, S. intitulé « A 2-year survey of phytoplankton in the Reservoir Marne (France): A case study validating the use of an *in situ* spectrofluorometer by comparison to algal taxonomy and chlorophyll *a* measurements » soumis à la revue *Lakes and Reservoirs : Research and Management*. Pendant presque deux années (2006-2007) nous avons suivi la structure et la distribution du phytoplancton dans le réservoir Marne en ayant recours à une combinaison de méthodes. Nous avons utilisé la sonde spectrofluorométrique bbe FluoroprobeTM, qui fournit des concentrations de chlorophylle *a* (chl *a*) associées à la présence de différentes classes algales dans la colonne d'eau. En parallèle, nous avons mesuré la chl *a* en utilisant des méthodes d'extraction classiques couplées à des analyses spectrophotométriques et nous avons calculé le biovolume de chaque taxon identifié par microscopie optique. Les concentrations de chl *a* obtenues avec la FluoroprobeTM et celles fournies par les analyses spectrophotométriques présentait une forte corrélation ($\rho=0.93$, $n=243$, $p<0.0001$). La meilleure corrélation entre ces deux méthodes a été obtenue pour des concentrations en dessous de $6,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, alors qu'aucune corrélation n'a été trouvée pour des concentrations au dessus de $21,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La relation était également hautement significative quand le biovolume phytoplanctonique total était comparé aux données de la sonde FluoroprobeTM ($\rho=0.6$, $n=243$, $p<0.0001$). La meilleure corrélation a été trouvée pour le groupe composé des diatomées, des dinoflagellés et des chrysophycées ($\rho = 0.67$, $p<0.0001$) et la moins bonne relation a été identifiée pour les cyanobactéries riche en phycocyanine ($\rho = 0.33$, $p<0.0001$), bien que toujours significative. Cette analyse basée sur une grande base de données justifie la conclusion que la FluoroprobeTM peut être considérée comme un outil fiable par les gestionnaires pour le suivi du phytoplancton pourvu qu'elle ait été correctement testée *in situ*.

3. Analyses statistiques appliquées aux données : L'Analyse Triadique Partielle (ATP)

Les méthodes d'analyses multitableaux, parmi lesquelles on trouve la famille des méthodes STATIS (L'Hermier des Plantes 1976 ; Lavit 1988 ; Lavit *et al.* 1994), permettent

l'analyse conjointe de plusieurs tableaux de données. Les bases théoriques de ces méthodes ont été développées par Escoufier (1973, 1987). Le principe général est de définir dans un premier temps la structure commune à ces tableaux, appelée « compromis », puis d'étudier la variabilité de cette structure à travers chaque tableau. Lorsque les tableaux n'ont pas le même nombre de lignes et de colonnes, ils ne sont pas directement comparables et on utilise alors la méthode STATIS proprement dite. Par contre, quand les nombres de lignes et de colonnes sont identiques, on peut calculer directement le « compromis » correspondant à une somme pondérée des tableaux et on utilise alors l'analyse triadique partielle.

L'ATP, qui est fondée sur une logique d'analyse en composantes principales, a été introduite en écologie par Thioulouse et Chessel (1987). Le protocole d'échantillonnage utilisé lors de cette thèse nous a placé dans le cas de données tridimensionnelles où plusieurs variables ont été mesurées sur les mêmes stations à plusieurs reprises. Le cube de données ainsi constitué peut être considéré comme une série spatiale de tableaux à deux entrées (dates x variables) (**Figure 4**). L'objectif étant de faire un bilan des structures temporelles et de leur stabilité.

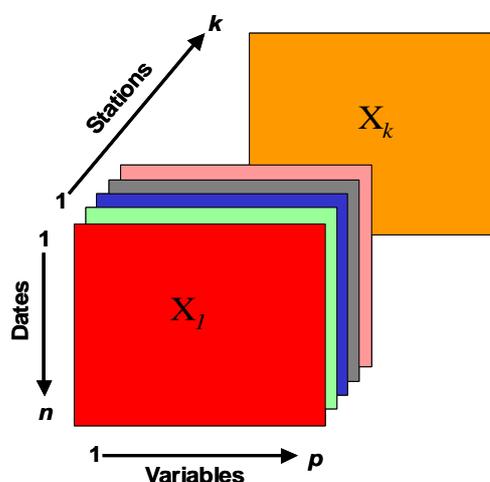


Figure 4 Cube de données X présenté sous la forme d'une série spatiale de k tableaux (n dates x p variables)

L'ATP se déroule classiquement en trois étapes décrites ci-dessous :

phase de l'inter-structure et recherche du compromis. Une matrice de corrélation vectorielle est calculée entre les tableaux et la diagonalisation de cette matrice va permettre d'identifier les similarités entre les tableaux. C'est ce qui est appelé dans la terminologie de cette analyse l'étape d'inter-structure. La diagonalisation a pour fonction essentielle d'attribuer à chaque tableau un poids. Ainsi, un nouveau tableau de synthèse combinant les

tableaux initiaux en proportion de leur poids dans la description de la structure commune dite compromis est constitué.

Analyse du compromis. L'analyse du tableau compromis s'effectue comme une analyse en composantes principales standard. Elle fournit des axes principaux et des composantes principales. Cette analyse permet d'établir une typologie commune à tous les tableaux. Le cosinus carré (Cos^2 entre le tableau k et le compromis) constitue un indicateur de la qualité de l'expression de la structure du compromis par un tableau donné.

Analyse de la reproductibilité du compromis. On peut finalement projeter sur les axes et composantes principales du compromis, les axes et composantes principales des analyses séparées de chacun des tableaux. Cette opération permet de discuter de la stabilité des tableaux autour de la moyenne (compromis), autrement dit d'analyser la reproductibilité de la structure du compromis pour chacun des tableaux.

Cette méthode a été appliquée aux données spatio-temporelles que nous avons récoltées sur la communauté phytoplanctonique. Elle fait le lieu de deux publications, l'une soumise dans les Actes du colloque « Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization » par Bertrand, F., Maumy, M., Rolland, A. et Jacquet, S. intitulée « Using multitable techniques for assessing phytoplankton structure and succession in the Reservoir Marne (Seine catchment area, France) », l'autre sous presse dans la revue *Water Research* par Rolland, A., Bertrand, F., Maumy, M. et Jacquet, S. intitulée : « Assessing Phytoplankton structure and spatio-temporal dynamics in a freshwater ecosystem using a powerful multiway statistical analysis » que l'on trouvera dans le chapitre III.

4. A 2-year survey of phytoplankton in the Marne Reservoir (France): a case study to validate the use of an in-situ spectrofluorometer by comparison to algal taxonomy and chlorophyll a measurements.

Lakes and Reservoirs: Research and Management (soumis)

Anne ROLLAND[†], Frédéric RIMET, Stéphan JACQUET

INRA, UMR 42 (CARRTEL), Station d'Hydrobiologie Lacustre, 75 avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

Corresponding author: Anne Rolland, rolland_anne@hotmail.com (+33 4 50 26 78 72) or Stéphan Jacquet, jacquet@thonon.inra.fr (+33 4 50 26 78 12)

Keywords: bbe FluoroprobeTM, chlorophyll *a*, monitoring, phytoplankton, reservoir, taxonomy

Running Head: Phytoplankton monitoring using the bbe FluoroprobeTM

Abstract

For almost 2 years (2006-2007), phytoplankton structure and distribution were monitored using a combination of methods in the Marne Reservoir (France). We used the bbe FluoroprobeTM spectrofluorometer, which provides vertical profiles for different algal classes and chlorophyll analysis, based on the *in-vivo* autofluorescence characteristics of the phytoplankton. In parallel, we measured chlorophyll *a* (chl *a*) concentrations using the classical extraction method coupled with spectrophotometric analyses, and we calculated the biovolume of all the taxa identified using inverted light microscopy. A very strong correlation ($\rho=0.93$, $n=243$, $p<0.0001$) was found between total chl *a* concentrations given by the bbe Fluoroprobe and the total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) provided by the spectrophotometric analysis. The closest correlation was obtained for concentrations below $6.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, whereas no correlation was found for those above $21.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The relationship was highly significant when total phytoplankton biovolume was compared to data from the probe ($\rho=0.6$, $n=243$, $p<0.0001$), the best correlation being found for the group composed of diatoms, dinoflagellates and chrysophyceae ($\rho = 0.67$, $p<0.0001$), while the worst relationship was for the blue-green cyanobacteria ($\rho = 0.33$, $p<0.0001$), although it was still highly significant. Our analysis, based on a large data set, justifies the conclusion that the FluoroprobeTM can be considered as a reliable tool for use by fresh water managers to monitor phytoplankton at any relevant time and space scales, provided that the device has been properly checked *in situ*.

Introduction

Since the second half of the 20th century, many water bodies have suffered from eutrophication, which promotes microalgal (phytoplankton) proliferation and is caused by increasing nutrient pollution (especially with phosphorus), leading to severe deterioration of water quality (Sommer 1983, Reynolds 1984, Tilman *et al.* 1986). The aim of the European Water Framework Directive (WFD) (European Parliament 2000) is to reduce eutrophication, which is of particular concern for water management and treatment, in order to reach what has been called the “good ecological status” by the year 2015. This concept of “good ecological status” is defined as restoring “the state of an ecosystem to a close approximation of its condition prior to disturbance where ecological damage is repaired. Both the structure and the functions of the ecosystem are recreated” (Higgs 1997). Ecological quality is based on the status of the biological (phytoplankton, macroalgae, macrophytes, benthos and fishes), hydromorphological and physico-chemical quality parameters.

The phytoplankton biomass constitutes a bio-monitoring index of major importance for the ecological survey and understanding of hydrosystems, and it has been a required part of the estimation of water quality for many decades (CIPEL 1984; Brettum 1989; Dokulil *et al.* 2005; Wolfram *et al.* 2007). In addition, chlorophyll *a* measurements have also been shown to provide a good estimate of phytoplankton biomass (Smayda 1978; Harris 1986; Wetzel et Likens 2000). However, recent studies have shown that there are some problems with using the direct estimation of chlorophyll *a* (chl *a*) to deduce phytoplankton biomass, because spatial and temporal variations can occur (Felip et Catalan 2000), and the ratio of chl *a* to cell carbon depends on external and internal factors, such as phytoplanktonic taxonomy composition, cell physiological conditions, temperature, nutrient concentrations and light intensity. Phytoplankton biomass, via the estimation of chl *a* concentration, has also been used to obtain an indication of the trophic status of the water system (Vollenweider et Kerekes 1982). The WFD therefore decided to include both the chl *a* concentration and the phytoplankton biovolume as two of the estimators used to define the ecological state of a lake (European Commission 2008), even though it was recently suggested that the proportions of the different algal classes should also be considered to give an indication of the trophic status of the ecosystem (Reynolds *et al.* 2002) and furthermore, that taxon specificity must be assessed to provide a precise estimate of the trophic status of a lake (Anneville *et al.* 2002).

Different techniques, materials and methods have become available for surveying phytoplankton development, from species identification and counts using microscopy (Utermöhl 1958) to satellite images at a larger spatial scale (Allee & Johnson 1999). It is noteworthy, however, that phytoplankton identification and microscopy counts are known to be very time-consuming and labor intensive. This is one of the reasons why conventional taxonomy-based surveys have generally been limited in scale and duration. However, satellite images are not suitable for surveying restricted areas, and provide only partial information (i.e. for the water near the surface). As a compromise, many *in-situ* sensors providing immediate information have been developed to facilitate monitoring for water managers; these include fluorometers (Desiderio *et al.* 1997), and devices such as flow cytometers that can be deployed on moored systems (Thyssen *et al.* 2008). Beutler *et al.* (2002) designed a multi-wavelength probe, the bbe FluoroprobeTM (bbe-Moldaenke, Kiel, Germany), which is a submersible spectrofluorometer that provides, down to 100 m depth, automatic algae class and chlorophyll analysis, based on the *in-vivo* autofluorescence characteristics of pigment-containing micro-organisms, such as cyanobacteria and eukaryotic microalgae. Such a device gives *in fine* a measurement of chl *a* fluorescence, which is a reliable and commonly-used proxy for total phytoplankton biomass. The main advantages of the bbe FluoroProbe is that it copes with the constraints associated with water monitoring, such as immediacy of response, low maintenance costs, specificity, sensitivity, ease of handling, and rapidity of interpretation. Various algal groups can be identified by detecting diagnostic marker pigments, known as accessory pigments. These marker pigments include peridinin (a marker for dinoflagellates), Chlorophyll *b* (an indicator of green algae), fucoxanthin (a diatom marker) and zeaxanthin, as well as phycobiliproteins (indicators of cyanobacteria) (Wright & Jeffrey 1987; Moline *et al.* 1997a, 1997b; Moline & Prezelin 1997; Trees *et al.* 2000; Millie *et al.* 2002).

To the best of our knowledge, only one study has so far attempted to confirm the quality of the whole dataset provided by this device over time and space (Gregor *et al.* 2005). Gregor and Marsalek (2004) had suggested earlier that the device could be recommended as a sensitive tool for water managers, but only for total chl *a* measurements. Both the studies mentioned above were performed on a relatively small number of samples. Leboulanger *et al.* (2002) successfully configured the bbe Fluoroprobe to detect and quantify a red cyanobacterium *Planktothrix rubescens* bloom on Lake Bourget (France), and the device is still used in the context of surveying the water quality of this large and deep peri-alpine lake (Jacquet *et al.* 2008). Finally, Pinel-alloul *et al.* (unpublished data) described the formation

and summer maintenance of deep chlorophyll maxima in Canadian oligotrophic lakes with different watershed land uses. Clearly, data are missing about the *in-situ* application and accuracy of such a device with regard to all the microalgal groups that it can detect and over lengthy periods of time (i.e. for several successive seasons). The aim of the study reported here was therefore to compare and validate over a 2-year period the data obtained with the bbe FluoroprobeTM with i) the total chl *a* concentrations provided by classical spectrophotometric measurements following pigment extraction, ii) the total phytoplankton biovolume obtained after cell counts, and as estimated by the different formulae proposed by Hillebrand *et al.* (1999), and finally iii) the biovolume of the different phytoplankton classes identified after microscopic analyses.

Materials and methods

Site description

The Marne Reservoir is one of the largest reservoirs in Western Europe (48 km²). It is situated in the Champagne region, 200 km east of the Paris Basin (France). It is subdivided into two shallow artificial “lakes”: the smaller lake (Champaubert Lake, 0.5 km², mean depth 3.5-4.5 m), which was completed in 1938, receives water from the Marne and Blaise rivers, whereas water is released from the larger basin (Der Lake, 47.5 km², mean depth 7-9 m). This large reservoir was completed in 1974 to prevent flooding of Paris city during winter and early spring, and to enhance low flows in summer. The water level varies between 2 and 15 m over the hydrological cycle, with maximum water volume occurring in summer (July) and minimum water volume in late autumn/fall (November). Depending on summer weather conditions (wind, temperature) and management strategies, the water column may be stratified for a few weeks in summer, and the water residence time varies between approximately 3 and 12 months. The reservoir is classed as a mesotrophic water body, with annual mean concentrations of total phosphorus of about 15 µg L⁻¹, ranging from 8 µg L⁻¹ in winter to 32 µg L⁻¹ in summer (Rolland *et al.*, unpublished).

Sampling strategy

The samples used for this study were collected every two to three weeks between March and September in 2006 and 2007. Six different stations in the Reservoir were investigated during each campaign. The FluoroprobeTM was lowered down the water column

in order to visualize the distribution of the microalgal biomass as a whole, and those of the different pigment classes that are related to phytoplankton classes (see details below). Simultaneously, water samples were collected at discrete depths (3, 6 and 8 m) using a Van Dorn sampling bottle. The water collected in the bottle was homogenized, and samples were separated for chl *a* extraction and quantification and for species determination. For the latter, 100 ml were immediately fixed with Lugol's solution onboard the ship. All samples were kept in the dark between 4 and 6°C until arrival in the laboratory for immediate processing.

Fluorescent-based method

Since 2002, a multi-wavelength submersible probe (FluoroProbe™, bbe-Moldaenke) has been made available to scientists and water managers (Beutler *et al.* 2002) that can differentiate between “spectral groups” of microalgae both *in vivo* and *in situ*, and provide vertical profiles (down to 100 m) within a few seconds, on the basis of the relative fluorescence intensity of Chl *a* at 680 nm. This fluorescence emission follows sequential light excitation by 6 Light Emitting Diodes (LEDs), which segregate the green group (chlorophyceae and desmidiates noted CD) at 450 nm, the brown group (diatoms, dinoflagellates and chrysophyceae noted DDC) at 525 nm, the red group (cryptophytes and red cyanobacteria noted CRC) at 570 nm, and the blue-green group (blue-green cyanobacteria noted BGC) at 590 and 610 nm respectively. The UV LED (370 nm), which has been added to the latest generation of devices, is used to measure the fluorescence of dissolved organic matter (DOM), which is referred to as “yellow substances”. Measurements were performed every 0.5 second from the surface down to 50 cm above the sediment of each of the stations in the reservoir sampled. This generated approximately between 10 and 15 data for every meter of the water column. The values given by the Fluoroprobe™ were integrated, and averaged from 2.2 to 3 m, 5.2 to 6 m and 7.2 to 8 m in order to make the data comparable with those from the Van Dorn sampling bottle that is 80 cm length. Note here that we also compared the results using a single depth (i.e. 3, 6 or 8 m), and did not find any significant difference between the two approaches. The excitation spectrum obtained was then compared to normal standard curves stored in the probe. Specific software (Fluoroprobe 1.9, bbe Moldaenke) was then used to calculate the relative amount of each phytoplankton spectral group present, expressed in terms of the equivalent amount of chl *a* per liter of water (equiv. $\mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$), and which reflects the recorded fluorescence values. The data were transferred

to a PC connected to the probe, which displayed the results immediately as tables and graphs (Beutler *et al.* 2002; Leboulanger *et al.* 2002; Gregor & Maršálek 2004; Jacquet *et al.* 2005).

Chlorophyll a extraction and concentration measurements

The samples were first filtered throughout a 200- μm mesh filter in order to remove large organisms (i.e. metazooplankton). Next, the chlorophyll was collected on a GF/F (nominal porosity: 0.7 μm) glass filter, the volume filtered varied from 0.5 to 1 liter depending on the chl *a* concentrations provided by the FluoroprobeTM. Each filter was placed for 5 minutes in 12 ml of 90% acetone that had previously been heated to 78-80°C for pigment extraction. The filters were kept in the dark at 4°C for a period of 24 h to maximize the extraction. Then, they were ground for 30 seconds to facilitate cell degradation. The extract was then filtered through a 45 μm filter to eliminate the cellular constituents, and to collect only the solvent containing the pigments. Chl *a* extracts were then measured by spectrophotometry, in a four centimeter-long cuvette at 750 and 665 nm before and after acidifying the sample with hydrochloric acid (0.1 ml of HCl 0.1N). According to Lorenzen (1967), the latter process corrects for interference due to the presence of phaeophytin (i.e. a chlorophyll decomposition product that absorbs at the same wavelength). Moreover, as mentioned above, a reading was also carried out at 750 nm to eliminate the absorbance due to turbidity. These values were subtracted to those obtained at 665 nm. Calculations were made according to Lorenzen (1967). The AFNOR standard (1999) is available for a complete and detailed description.

Phytoplankton analysis

Phytoplankton identification and counts were performed with an inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) following the Utermöhl procedure (Utermöhl 1958; AFNOR 2006). Algal species were observed at high magnification (x640) along both diameters of the sedimentation chamber, and counted until at least 400 cells had been identified. Species abundance was calculated taking into consideration the surface area of the 2 diameters counted, the surface of the sedimentation chamber, and the volume of water sedimented. The biovolume was then estimated using the various formulae proposed by Hillebrand *et al.* (1999).

Data analysis and statistics

As the distributions of the data were not normal even after logarithmic transformations, non-parametric Spearman rank correlations were used to identify the relationships between i) the total chl *a* provided by the bbe FluoroprobeTM and the usual spectrophotometric measurements, ii) the total chl *a* given by the bbe Fluoroprobe and the total phytoplankton biovolume obtained by microscopy, iii) the pigment class chl *a* equivalents obtained by the bbe FluoroprobeTM and phytoplankton class biovolumes. All the analyses were carried out using the statistical software Sigma Stat (Stat32). In order to assess more globally the correlations between the data given by the fluoroprobe and the results given by the Utermöhl technique, a Canonical Correspondence Analysis (CCA) was computed using the PC-Ord software (McCune & Mefford 2006). The biovolumes of the different algal groups (DDC, BGC, CD, CRC) obtained with the Utermöhl technique were used as a secondary matrix to explain the chlorophyll *a* results of the 4 algal groups obtained with the Fluoroprobe (main matrix).

Results

Comparison of the bbe Fluoroprobe and the spectrophotometric analyses for measuring total chl a concentrations

The dataset was obtained from the measurements made over the two sampling years (23 sampling dates) at 6 stations and 3 different depths (3, 6 and 8 m), when the water was deep enough to permit sampling. This yielded a total of 243 chl *a* concentration measurements for this period, ranging from 0.5 to 38.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the bbe FluoroprobeTM and from 0.1 to 40.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the spectrophotometric analyses. As shown by Figure 5, the relationship between the chl *a* concentrations given by the bbe FluoroprobeTM and the spectrophotometry was very strong ($\rho=0.93$, $p<0.0001$). Moreover, while analyzing such a relationship from the different depths considered separately, we also obtained highly significant correlations between the chl *a* concentrations obtained by both methods (3 m: $\rho=0.94$, $p<0.0001$, $n=135$; 6 m: $\rho=0.93$, $p<0.0001$, $n=68$; 8 m: $\rho=0.79$, $p<0.0001$, $n=40$).

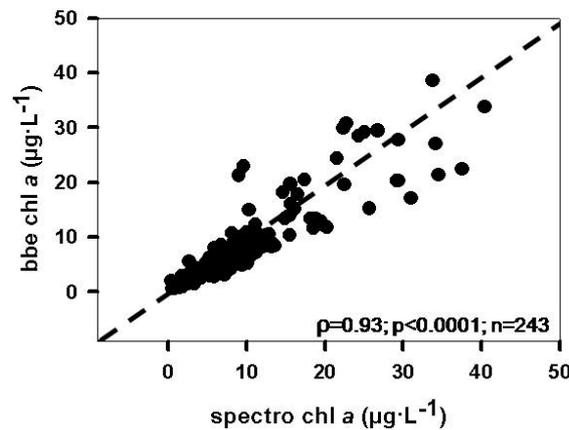


Figure 5 Relationship between total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the bbe FluoroprobeTM and total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) provided by the spectrophotometric analyses. The dashed line corresponds to the 1:1 relationship.

In order to assess the ecological potential of the Marne Reservoir in the context of the application of the Water Framework Directive, the research institute for sustainable management of water and landscapes (i.e. the CEMAGREF) established a range of water quality classes based on chl *a* concentrations (De Bortoli & Argillier 2008). The authors defined 5 different quality classes: very good quality for chl *a* concentrations that are below or equal to $3.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, good, moderate and passable qualities for chl *a* concentrations comprised between 3.9 and $6.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 6.9 and $12.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 12.2 and $21.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively, and bad quality for chl *a* concentrations that are above $21.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Data from spectrophotometric analyses were separated into these classes, and the associated fluorometric chl *a* concentrations were plotted to test whether the bbe FluoroprobeTM was able to detect the different chl *a* concentrations accurately. As a result, we tested the relationship between each chl *a* concentration class established from spectrophotometric analysis and the chl *a* concentrations obtained by fluorometry (Figure 6). The first class, which involved 61 observations, was significantly correlated with the fluorometric chl *a* concentrations ($\rho=0.66$, $p<0.0001$) (Figure 6-a). Likewise, the best correlation we found was between the second class of chl *a* concentrations given by the spectrophotometric analyses and the associated bbe FluoroprobeTM measurements ($\rho=0.71$, $p<0.0001$, $n=60$) (Figure 6-b). For the data included in the third class ($n=84$), the Spearman correlation coefficient, linking chl *a* concentrations given by spectrophotometric analyses and those from the bbe FluoroprobeTM, decreased slightly although remaining highly significant ($\rho=0.54$, $p<0.0001$) (Figure 6-c). The fourth class, involving chl *a* concentrations between 12.2 and $21.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=22$), still exhibited a strong relationship with the associated fluorometric measurements ($\rho=0.50$, $p=0.02$) (Figure 6-d).

Finally, the worst relationship was found for the highest concentrations. For concentrations above $21.6 \mu\text{gL}^{-1}$ ($n=16$), the correlation with the results given by the FluoroprobeTM was weak, and the Spearman coefficient was nearly zero ($\rho=0.009$, $p=0.97$) (Figure 6-e). Although n was relatively little in the latter case, the relationships linking chl *a* concentrations from both methods was still valid. However, this does not tell us whether the range of concentration was the same for both methods. Therefore, from the data obtained by spectrophotometric analyses and used to determine the CEMAGREF water quality classes, we calculated the proportion of the Fluoroprobe chl *a* concentrations that could fit into these classes (Table 1). Globally, if we look at each range of concentrations, all the values appear to be correlated; bbe-based fluorometry tends to suggest lower chl *a* concentrations than spectrophotometry, and we observed that on average the spectrophotometric data were indeed about 1.2 fold higher than the bbe data (data not shown).

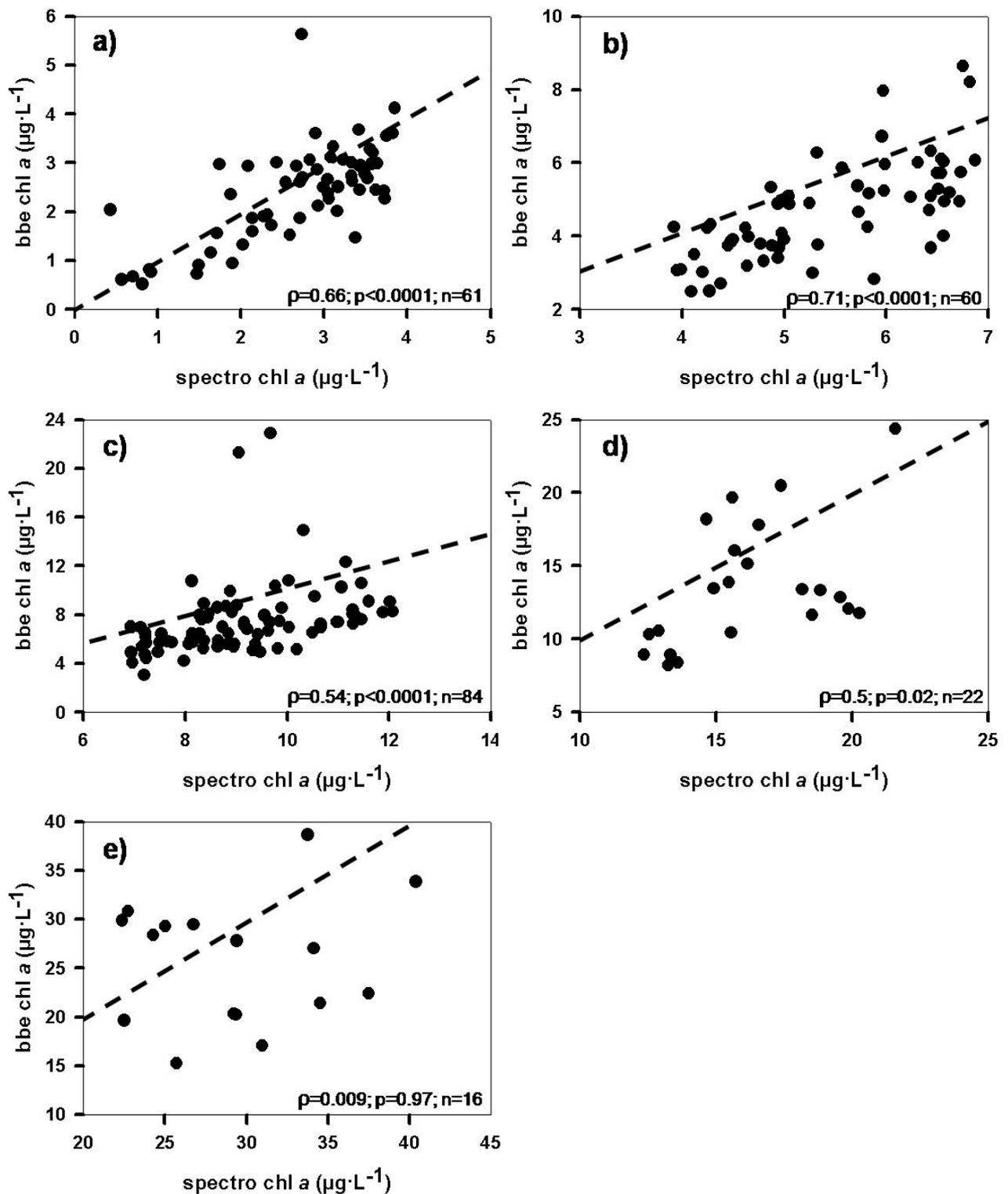


Figure 6 Relationships between total chl a concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe and total chl a concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) provided by the spectrophotometric analyses subdivided into the 5 classes of concentrations (as proposed by the CEMAGREF in the context of the WFD) i.e. a) $<4.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; b) $[4.6-8] \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; c) $[8-12.2] \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; d) $[12.2-21.6] \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; e) $\geq 21.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The dashed line corresponds to the 1:1 relationship.

Table 2 Proportion of the spectrofluorometric chl *a* concentrations that fit into the spectrophotometric chl *a* concentrations classes established by De Bortoli & Argillier (2008) from the research institute for sustainable management of water and landscapes (CEMAGREF)

Chl <i>a</i> concentrations classes established by the CEMAGREF [†] in the context of the WFD	Proportion of chl <i>a</i> concentrations obtained with the Fluoroprobe TM found in the CEMAGREF [†] classes				
	< 3.9	[3.9 – 6.9[[6.9 - 12.2[[12.2 - 21.6[≥ 21.6
< 3.9	0.97	0.03	0	0	0
[3.9 – 6.9[0.33	0.62	0.05	0	0
[6.9 - 12.2[0	0.44	0.51	0.05	0
[12.2 - 21.6[0	0	0.45	0.5	0.05
≥ 21.6	0	0	0	0.38	0.62

[†] Research Institute for Sustainable Management of Water and Landscapes

Comparison between chl a concentrations given by the bbe FluoroprobeTM and phytoplankton biovolume

As chl *a* concentration is used as an estimation of phytoplankton biomass, the total chl *a* concentrations given by the FluoroprobeTM and the total biovolume estimates obtained after microscopic counting were plotted and compared. For the whole dataset (Figure 7), the correlation between the two variables was highly significant ($\rho = 0.6$, $p < 0.0001$, $n = 243$). We noticed here that the correlation between the chl *a* concentrations and the total biovolume estimates was lower, although significant, for the spectrophotometric analyses.

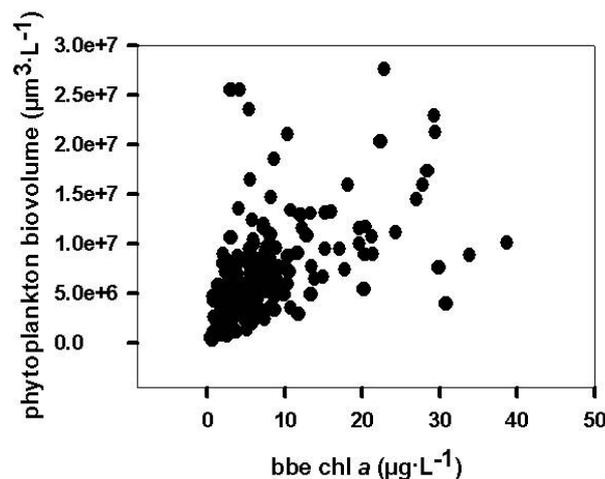


Figure 7 Relationship between total phytoplankton biovolume ($\mu\text{m}^3\text{L}^{-1}$) and total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe.

The strength of the correlation between chl *a* and biovolume varied depending on the algal class considered. The best correlation was found between the equivalent amount of chl *a*

for the Browns and the biovolume of the Diatoms, Dinoflagellates and Chrysophyceae ($\rho=0.67$, $p<0.0001$, $n=242$) (Figure 8-a). The correlation between the amount of chl *a* for the “Reds” and the biovolume of the Cryptophyceae and red cyanobacteria was also strong ($\rho=0.55$, $p<0.0001$, $n=242$) (Figure 8-b). Despite the highly significant relationship between the amount of chl *a* for the “Greens” and the biovolume of the Chlorophyceae ($p<0.0001$), the Spearman correlation coefficient was lower ($\rho=0.46$) (Figure 8-c) as was the correlation coefficient that linked the amount of chl *a* of the “Blue-greens” and the biovolume of the Cyanobacteria ($\rho=0.33$, $p<0.0001$) (Figure 8-d).

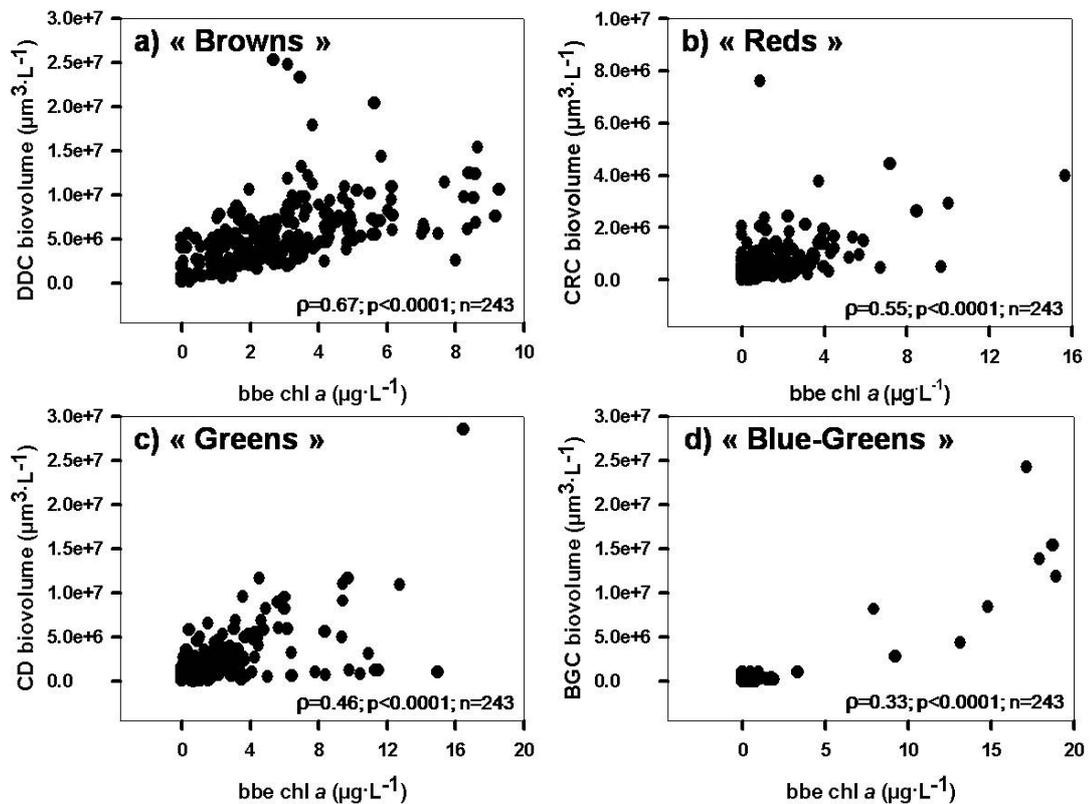


Figure 8 Relationships between total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe for each pigment class and total biovolume ($\mu\text{m}^3\cdot\text{L}^{-1}$) for each phytoplankton class i.e. a) the “Browns” associated with the Diatoms, Dinoflagellates and Chrysophyceae (noted DDC) ; b) the “Reds” associated with the Cryptophyceae and the Red Cyanobacteria (noted CRC); c) the “Greens” associated with the Chlorophyceae and Desmidiates (noted CD); d) the “Blue-greens” associated with the Blue-Green Cyanobacteria (noted BGC).

Figure 9 shows the results of the CCA revealing that the overall explained variance on the two first axes was 56.3%. The Utermöhl technique and the Fluoroprobe™ were correlated since the biovolumes measured with the Utermöhl technique and the chl *a* measured with the Fluoroprobe™ are in the same parts of the graph for the Browns/DDC, for the Blue greens/BGC and for the Reds/CRC. The only algal class which did not show a good correlation between the two techniques was the “Greens”. As the length of the vectors refers to the strength of the correlations between the two techniques, we could also observe that the best correlations were obtained for the “Blue greens” and the “Browns” while comparing the two techniques.

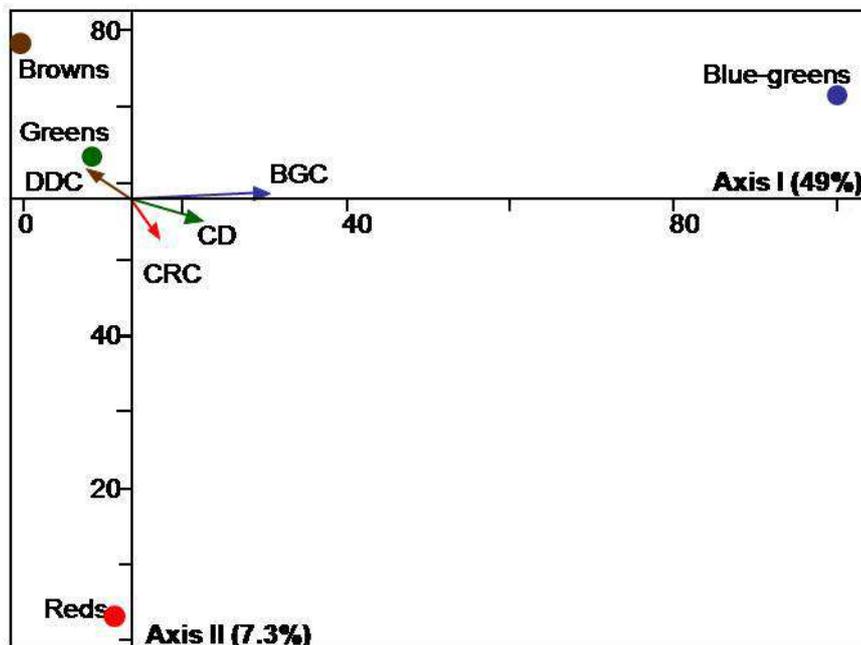


Figure 9 Canonical correspondence analysis computed on 243 measures of total chl *a* concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the Fluoroprobe for each pigment class in relation with the total biovolume ($\mu\text{m}^3\cdot\text{L}^{-1}$) for each phytoplankton class obtained with the Utermöhl technique. The percentage of variance explained is 56.3% in the 2 first axes. The following abbreviations are used in this graph. For the Utermöhl technique: “DDC” corresponds to the sum of biovolumes of the Diatoms, Dinoflagellates and Chrysophyceae, “CRC” to the Cryptophyceae and the Red Cyanobacteria, “CD” to the Chlorophyceae and Desmidiates, and “BGC” to the Blue-Green Cyanobacteria. For the Fluoroprobe™ results: ‘Browns’ corresponds to the chl *a* concentrations of Diatoms, Dinoflagellates and Chrysophyceae, ‘Reds’ to the Cryptophyceae and the Red Cyanobacteria, ‘Greens’ to the Chlorophyceae and the Desmidiates, ‘Blue-greens’ to the Blue-Green Cyanobacteria.

Discussion

The aim of our study was to check the accuracy of the Fluoroprobe™ bbe spectrofluorometer using a large dataset obtained throughout a succession of different seasons in a large reservoir. This was done by the parallel use of a spectrophotometric method to quantify the total chl *a* concentration and light microscopy to assess phytoplankton diversity and biovolume. The only previous studies that could be compared with the one presented here were done by Gregor and Marsalek (2004) and Gregor *et al.* (2005), but these authors used considerably fewer data and taxonomic resolution than we did.

Difference between spectrophotometric analyses and spectrofluorometric measurements

The correlation between the chl *a* concentrations obtained by spectrophotometric analyses and those provided by spectrofluorometric measures was strong and highly significant. This was also observed by Gregor and Marsalek (2004), who showed that there was an excellent correlation between the total chl *a* measured by the bbe, and the chl *a* determined by spectrophotometry after pigment extraction ($r=0.97$, $p<0.05$, $n=18$). Similarly, Gregor *et al.* (2005) obtained much the same relationship ($r=0.95$, $p<0.01$, $n=96$). However, it remains true that spectrofluorometric values were lower than spectrophotometric ones (Pinckney *et al.* 1994). This was probably due to the fact that the bbe Fluoroprobe™ is calibrated on the basis of HPLC analysis, and this technique usually provides lower chl *a* concentrations than spectrophotometric methods, especially if ethanol is used for the extraction process, probably due to the presence of other chlorophyll-like pigments that interfere with the spectrophotometric measurements (Meyns *et al.* 1994; Gregor *et al.* 2005). In contrast, it has also been shown that the presence of certain accessory pigments, such as pheophytin, can interfere with the fluorometric measurements and consequently lead to the underestimation of chl *a* concentrations by producing lower values than spectrophotometric analyses (Pinto *et al.* 2001). Another explanation for the difference recorded between the results provided by the two methods lies in what we are measuring. Typically, spectrophotometry measures the total chl *a* concentration, whereas spectrofluometry estimates chl *a* for specific algal classes, and consequently does not provide an accurate estimation of all the phytoplankton present in the water column. In addition, fluorometry measures fluorescence, which means that the chl *a* concentration is estimated from physiologically active cells, whereas spectrophotometry is a measure of absorbance, that does not take into account the physiological status of the cells

that may be active, senescent and/or lysed. The physiological status of cells can indeed affect their pigment content and fluorescence (Meeks 1974; Vörös & Padisák 1991). Thus, the two methods do not measure exactly the same thing. Furthermore, the accuracy of *in-vivo* fluorometric determination is limited by the quantum efficiency (quanta emitted to quanta absorbed), aside from the species composition and the physiological conditions of the phytoplankton. Consequently, spectrophotometry can be expected to produce higher chl *a* concentrations than spectrofluorometry. It remains true that, when one is trying to evaluate the chlorophyll *a* present in living cells, it is more convenient to measure the fluorescence of the water containing the phytoplanktonic cells (Pinto *et al.* 2001).

Differences between depths (3, 6 and 8 m)

As presented in the results, the relationships between chl *a* concentrations obtained with the bbe FluoroprobeTM and those provided by spectrophotometric analyses were considerable, and highly significant at 3 and 6 m, whereas the correlation was weaker at 8 m although still highly significant. This can seem surprising, because fluorescence is known to be slightly inhibited in subsurface layers due to “quenching”, which is a decrease in fluorescence caused by high irradiance on surface waters (Long *et al.* 1994; Falkowski & Raven 1997). We did not observe this phenomenon in the top surface water, which has previously been identified as a potential important drawback by Leboulanger *et al.* (2002), since it could decrease the fluorescence yield of a given population (e.g. *Planktothrix rubescens*) by up to 40%. However, we assume that, as the light transmission was significantly lower at depth than on the surface, this could explain the weaker relationship found for deeper layers because of suspended particles, for instance. In fact, the Marne Reservoir is a wind-exposed shallow water system with a long fetch that consequently lead to water mixing and sediment particles are likely to be suspended at the bottom of the water column. This phenomenon may induce an increase in water turbidity deeper in the water column, and affect the scatter of the excitation light from diodes, as well as the fluorescence response from the phytoplanktonic cells. Using the percentage of transmission of the water provided by the bbe with the 710 nm LED opposite to the detector, we observed that the percentage of transmission could fall from 90% at the surface, to less than 75% near the sediments. Whether such a reduction in transmission could influence the intensity of light from the diodes and fluorescence response of the cells was difficult to assess, but this was clearly not impossible. Interestingly, Beutler *et al.* (2002) reported that even when

transmission was reduced by 50%, the chl *a* detected decreased by only 5%, but we can postulate also that as their test was done only with a green alga (*Chlorella vulgaris*) in culture, other species, especially in the field, could behave differently.

The Fluoroprobe™ efficiency depending on the concentration range considered

The best correlations between the two methods was found for total chl *a* concentrations ranging from 3.9 to 6.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and for chl *a* concentrations below 3.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, which indicates that the Fluoroprobe™ is likely to be more suitable for detecting the lower levels of chl *a* in the Marne Reservoir. In fact, on the contrary, we found that there was no link between the two methods for concentrations above 21.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. In the case of high phytoplankton biomass, and especially if colonial species were present, the underestimation of the chl *a* level has already been reported (Gregor & Maršálek 2004). Optical density, caused by high amounts of phytoplankton, could thus constitute a strong limiting factor for using this method. Light emitted by the instrument, or by phytoplankton, can be shaded, scattered or re-absorbed, and these can all lead to a biased estimate of the quantity of phytoplankton present (Gregor *et al.* 2005). Another possible reason for the lack of relationship found at high concentrations of chl *a* could result from the fact that values for chlorophyll *a* given by the Fluoroprobe can be affected by the fluorescence of various chemical compounds also present in the water. At lower concentrations of chl *a* particularly, there is no interference between these substances and phytoplankton cells, whereas in the presence of high concentrations of phytoplankton associated with high concentrations of these chemicals, the latter can be falsely attributed to fluorescence of non phytoplanktonic origin (Gregor & Maršálek 2004). Note also that the number of measurements was considerably higher below 6.9 than above 21.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Whether this aspect could have an influence on the results was not tested but we cannot completely exclude this hypothesis.

*The strength of the relationship between biovolume estimates and chlorophyll *a* concentrations provided by the bbe Fluoroprobe™*

We found significant relationships between total phytoplankton biovolume estimates and chl *a* concentrations given by the Fluoroprobe™, for both the whole dataset and for the spectral groups taken separately. However, the trends also differed considerably in the different algal groups. Moreover, the CCA analysis highlighted a good correlation between the two matrices for the “Browns” and the “DDC”, the “Reds” and the “CRC”, the “Blue-

Greens” and the “BGC” but an opposite correlation between the two matrices for the “Greens” and the “CD”.

On the one hand, it is important to remember that, for all the samples analyzed, an average biovolume was used whatever the sampling date, the station or the depth. However, biovolume can change depending on the season and the depth, just as the chl *a* content of the phytoplanktonic cells can change spatially and temporally (Harris 1986; Tadonl  k   *et al.* 1998). Moreover, chl *a* content can depend on the taxonomic composition. In fact, the difference in the taxonomic composition of phytoplankton can account for most of the variability in the chlorophyll-biovolume relationship which depends on the life form of the predominant group and their average cell size (Felip & Catalan 2000). Consequently, it is generally difficult to look for a clear correlation between biovolume and chl *a* concentrations (Labaugh 1995) (determined by the standard method or by the bbe FluororobeTM), since these parameters are not strictly related, and because the variance in cell size and chl *a* content is high not only within divisions, but often within a given genus during different seasons (Desortova 1981; Gregor *et al.* 2005). Finally, the weak relationship between total phytoplankton biovolume and chl *a* concentrations can depend on internal cellular factors, such as their physiological status (a large biovolume, but low photosynthetic activity) as well as external factors such as temperature and light conditions (Sooahoo *et al.* 1986; Felip & Catalan 2000; Staehr *et al.* 2002), as well as nutrient availability (Pannard *et al.* 2007; Twiss & McLeod 2008). To illustrate this latter point, Beutler *et al.* (2002) reported that when the culture reached nutrient limitation, it was observed that the fluorescence intensity was 50% higher (due to changes in the pigment composition of the peripheral antenna).

On the other hand, when the spectral groups associated with phytoplankton classes were taken into consideration, the relationships highlighted a close correlation between the amount of chl *a* in the “Browns” and the biovolume of diatoms, dinoflagellates and chrysophytes which is also observed on the CCA analysis between the “Browns” and the DDC. The species that belong to these classes consist mainly of high-biovolume cells that are potentially detected with accuracy by the FluoroprobeTM. Thus, it might be possible that their detection may interfere with the detection of other minority communities present. The relationship linking the amount of chl *a* for the “Reds” and the biovolume of cryptophytes and red cyanobacteria was not so strong, although still significant. Red cyanobacteria were not abundant in our samples, but cryptophytes were. These are flagellated algae that are strongly distortable, and whose biovolume can therefore be misestimated when a fixative such as lugol

is added to the samples. Moreover, these algae present a wide range of cell sizes and a shape plasticity depending on the season. Reynolds (1984) reported a cell volume for *Cryptomonas ovata* between 1950 and 3750 μm^3 . This suggests that the mean biovolume that we calculated and applied for each sample may not have strictly corresponded to the species biovolume of this group throughout both sampling periods. Furthermore, the weak correlation between the amount of chl *a* for the “Greens” and the biovolume of chlorophytes and desmidiates which is confirmed by the opposite correlation on the CCA can be partly explained by the fact that they aggregate in larger colonies that do not allow the excitation light to penetrate the cells inside the colony. Moreover, Felip and Catalan (2000) proposed that there might be a time lag between the change in biovolume and the cell chlorophyll *a* content. This could explain the weak relationship found for this group. Finally, the worst relationship involved the amount of chl *a* for the “Blue-Greens” and the biovolume of blue-green cyanobacteria. This can be explained by the small proportion of cyanobacteria in our samples, which generated a lot of low values. In fact, as only 8 chl *a* concentrations were above 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and were associated with biovolumes above $2.5 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3 \cdot \text{L}^{-1}$, it would have been difficult to demonstrate a strong relationship. This can partly explained the reason of the contradictory result provided by the CCA for the “Blue-greens” and the “BGC” that tends to highlight a good relationship between the two matrices for these two groups. In fact, the CCA compares the two matrices and is less sensitive to a high number of null values. Moreover, it should be mentioned that the phycocyanin content per cell in cyanobacteria sometimes varies (Rodriguez *et al.* 1991; Foy 1993; Takano *et al.* 1995). Thus, the estimation of an average biovolume for colonies and filaments can lead to some mistakes that are reflected in the relationship linking the biovolume and the chl *a* content.

Taken together, our results support the proposal that the *in-situ* method can be used as a source of quantitative data, while microscopic analyses should be considered as a source of information about dominant species, and a way to check the approximately measured ratio of algal groups. For the Marne Reservoir, we can thus recommend the bbe FluoroprobeTM as an efficient tool for water quality analysis, bathing water surveillance, and bloom detection. For cyanobacterial assessment, however microscopic observations should be made, and it is possible that other systems, such as the bbe AlgaeTorch, Moldaenke, that provides the total chl *a* concentration and the relative proportion of blue-green cyanobacteria specifically, could be a better tool to envisage.

Conclusion and prospects

The different relationships obtained for chl *a* concentrations were fairly good, and these results encouraged us to use the whole dataset provided by the bbe FluoroProbeTM from Marne Reservoir to study the spatial and temporal variability of the phytoplankton dynamics in detail, as illustrated for the “Browns” in Figure 10, and that will be the aim of a forthcoming study (Rolland *et al.* unpublished). We have to keep in mind, however, that the results obtained for each class and compared to biovolume estimates remained somewhat problematic, especially for the blue-green cyanobacteria, a group of major interest in the context of water quality surveys. It remains that, on the basis of our results, we can conclude that the FluoroprobeTM is a very efficient technology for monitoring phytoplankton in reservoirs, especially for water managers and researchers who require fast and accurate methods. This sensor can serve as a good screening tool for phytoplankton quantification, as well as for preliminary taxonomic identification, and it could be particularly advantageous for the routine monitoring of water quality, where detailed microscopic analyses are not necessary. The methods used here are still complementary rather than mutually exclusive, and can be used to provide reliable data to interpret and to propose device validation with respect to the ecosystem studied. As fast and effective diagnosis will be increasingly required in the years to come for water managers, the bbe FluoroprobeTM and related devices will be of great interest, provided the user keeps a critical view on the results and has checked for data accuracy. There are numerous possible applications: monitoring drinking water for blue or red cyanobacteria, control testing bathing water for harmful algal blooms, limnological research, supervision of aquaculture systems, early warning systems, since it can also be used to provide continuous measurements along the water column, preventing the risk of missing something (typically the concentration of a population in a thin layer) and/or rapid changes in some localities (precise discrete depth or recruitment from the sediments).

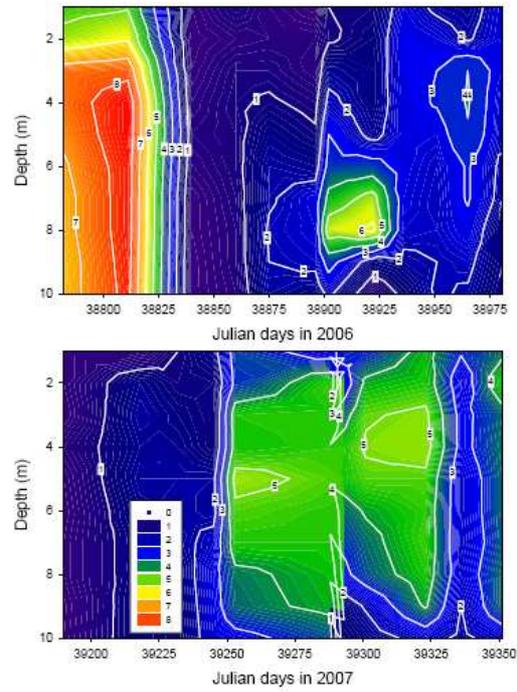


Figure 10 Spatio-temporal dynamics of the “Browns” obtained with the bbe FluoroprobeTM over the two sampling years (2006-2007), at the station H, between the surface and 10 m.

Acknowledgments

This work was supported by the IIBRBS (Institut Interdépartemental des Barrages du Bassin de la Seine), a CIFRE contract granted to AR from ANRT (Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie), the Seine-Normandie Water Agency. Jean-Claude Druart, Gérard Beaudoin and Yannik Guillemin are acknowledged for their help in the sampling of the Reservoir Marne. The bbe Fluoroprobe was purchased by the “Environment” Division of IIBRBS. English was checked by a native English speaker.

References

- AFNOR. (1999) Water Quality. Determination of Chlorophyll a and of a phaeopigments index. Molecular Absorption Spectrometric Method. NF T90-117. 12pp.
- AFNOR. (2006) Water Quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique). NF EN 15204. 42pp.
- Allee, R. J. and Johnson, J. E. (1999) Use of satellite imagery to estimate surface chlorophyll a and Secchi disc depth of Full Shoals Reservoir, Arkansas, USA. *Int. J. Remote Sens.* 20, 1057-1072.
- Anneville, O., Ginot, V., Druart, J. C. and Angeli, N. (2002) Long term study (1974-1998) of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva: a multiple table approach. *J. Plankton Res.* 24, 993-1007.
- Beutler, M., Wilshire, K. H., Meyer, B. et al. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynth. Res.* 72, 39-53.
- Brettum, P. (1989) *Algen als Indikatoren für die Gewässerqualität in norwegischen Binnenseen*. Norsk Institutt for Vannforskning, NIVA. n° 2344: 1-111.

CIPEL. (1984) Le Léman: Synthèse des travaux de la Commission internationale pour la protection des eaux du Léman contre la pollution 1957-1982. Presses de l'imprimerie de l'ère nouvelle, Lausanne.

De Bortoli, J. and Argillier, C. (2008) Définition des conditions de référence et des limites des classes d'état sur la base d'une approche pressions/impacts - Plans d'eau - Paramètre Chlorophylle-a – Rapport CEMAGREF, 51 p.

Desiderio, R. A., Moore, C., Lantz C. and Cowles T. J. (1997) Multiple excitation fluorometer for in situ oceanographic applications. *Appl. Opt.* 36, 1289-1296.

Desortová, B. (1981) Relationship between chlorophyll a concentration and phytoplankton biomass in several reservoirs in Czechoslovakia. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* 66, 153-169.

Dokulil, M. T., Teubner, K. and Greisberger, S. (2005) Typenspezifische Referenzbedingungen für die integrierende Bewertung des ökologischen Zustandes stehender Gewässer Österreichs gemäß der EU-Wasserrahmenrichtlinie. Modul 1 : Die Bewertung der Phytoplankton struktur nach dem Brettum-Index. Projektstudie Phase 3, Abschlussbericht. In: *Auftrag des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft. Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien.*

European Commission. (2008) Commission Decision of 30 October 2008 establishing, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, the values of the Member State monitoring system classifications as a result of the intercalibration exercise. *OJEC.* 332, 20-44.

European Parliament. (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a Framework for Community action in the field of water policy. *OJEC.* 327, 1-72.

Falkowski, P. G. and Raven, J. A. (1997) *Aquatic Photosynthesis.* Blackwell Sciences, Oxford.

Felip, M. and Catalan, J. (2000) The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake : decoupling in their spatial and temporal maxima. *J. Plankton Res.* 22, 91-105.

Foy, R. H. (1993) The phycocyanin to chlorophyll a ratio and other cell components as indicators of nutrient limitation in 2 planktonic cyanobacteria subjected to low-light exposures. *J. Plankton Res.* 15, 1263-1276.

Gregor, J., Geriš, R., Maršálek, B., Hetesá, J. and Marvan, P. 2005. *In situ* quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia.* 548, 141-151.

Gregor, J. and Maršálek, B. (2004) Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a : a comparative study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* methods. *Water Res.* 38, 517-522.

Harris, G. P. (1986) *Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation*, 1st edition. Chapman & Hall, London.

Higgs, E. S. (1997) What is Good Ecological Restoration ? *Conserv. Biol.* 11, 338-348.

Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kieschtel, D., Zohary, T., Pollinger, U. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403-424.

Jacquet, S., Briand, J. F., Leboulanger, C. et al. (2005). The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae.* 4, 651-672.

Jacquet, S., Paolini, G., Lazzarotto, J. et al. (2008) *Suivi de la qualité des eaux du lac du Bourget pour l'année 2007*. CISALB report.

Labough, J. W. (1995) Relation of algal biovolume to chlorophyll-a in selected lakes and wetlands in the North Central United States. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 416-424.

Leboulanger C., Dorigo U., Jacquet S., Le Berre B., Paolini G., Humbert J. F. (2002) Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol.* 30, 83-89.

Long, S. P., Humphries, S. and Falkowski, P. G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 45, 633-662.

Lorenzen, C. J. (1967) Determination of chlorophyll and pheopigments by spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12, 343-346.

McCune, B. and Mefford, J. (2006) *PC-ORD: Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 5.18. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon.

Meeks, J. C. 1974. Chlorophylls. In: *Algal Physiology and Biochemistry* (ed W. D. P. Stewart) pp. 161-175. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Meyns, S., Illi, R. and Ribí, B. (1994) Comparison of chlorophyll-*a* analysis by HPLC and spectrophotometry: Where do the differences come from? *Arch. Hydrobiol.* 132, 129-139.

Millie, D. F., Fahnenstiel, G. L., Carrick, H. J., Lohrenz, S. E. and Schofield O. M. E. (2002) Phytoplankton pigments in coastal Lake Michigan: distributions during the spring isothermal period and relation with episodic sediment resuspension. *J. Phycol.* 38, 639-648.

Moline, M. A., Prezelin, B. B. and Schofield, O. (1997a) Palmer LTER: Stable interannual successional patterns of phytoplankton communities in the coastal waters off Palmer Station. *Antarct. J. U. S.* 32, 151-153.

Moline, M. A., Prezelin, B. B., Schofield, O. and Smith, R. C. (1997b) Temporal dynamics of coastal Antarctic phytoplankton: Environmental driving forces and impact of a 1991-1992 summer diatom bloom on the nutrient regimes. In: *Antarctic communities*. (eds B. Battaglia, J. Valencia & D. W. H. Walton) pp. 67-72. Cambridge University Press, Cambridge.

- Moline, M. A. and Prezelin, B. B. (1997) High-resolution time-series data for in situ carbon fixation at a Palmer LTER site and its implications for modeling primary production in the Southern Ocean. *Polar Biol.* 17, 39-53.
- Pannard, A., Bormans, M., Lefebvre, S., Claquin, P. and Lagadeuc, Y. (2007) Phytoplankton size distribution and community structure: influence of nutrient input and sedimentary loss. *J. Plankton Res.* 29, 583-598.
- Pinckney, J., Papa, R. and Zingmark, R. (1994) Comparison of High-Performance Liquid-Chromatographic, Spectrophotometric and Fluorometric Methods for Determining Chlorophyll *a* Concentrations in Estuarine Sediments. *J. Microbiol. Methods.* 19, 59-66.
- Pinto, A. M. F., Von Sperling, E. and Moreira, R. M. (2001) Chlorophyll-*a* determination via continuous measurement of plankton fluorescence: Methodology development. *Water Res.* 35, 3977-3981.
- Reynolds, C. S. (1984) *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L. and Melo, S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* 24, 417-428.
- Rodriguez, H., Rivas, J., Guerrero, M. G. and Losada, M. (1991) Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanoabacteria. *J. Biotechnol.* 20, 263-270.
- Sommer, U. (1983) Nutrient competition between phytoplankton species in multispecies chemostat experiments. *Arch. Hybrobiol.* 96, 399-416.
- Sooahoo, J. B., Kiefer, D. A., Collins, D. J. and McDermid, I. S. (1986) *In vivo* fluorescence excitation and absorption spectra of marine phytoplankton. *J. Plankton Res.* 8, 197-214.
- Smayda, T. J. 1978. From phytoplankters to biomass. In: *Phytoplankton Manual* (ed A. Sournia) pp. 273-279. Unesco, Paris.

Staehr, P. A., Henriksen, P. and Markager, S. (2002) Photoacclimation of four marine phytoplankton species to irradiance and nutrient availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238, 47-59.

Tadonlélé, R. D., Jugnia, L. B., Sime-Ngando, T., Zebaze, S. and Nola, M. (1998) Short-term vertical distribution of phytoplankton populations in a shallow tropical lake (Lake Municipal, Yaounde, Cameroon). *Arch. Hydrobiol.* 143, 469-485.

Takano, H., Arai, T., Hirano, M. and Matsunaga, T. (1995) Effects of intensity and quality of light on phycocyanin production by a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp NKBG-042902. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1014-1018.

Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N. and Denis, M. (2008) Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged cytometer. *J. Plankton Res.* 30, 1027-1040.

Tilman, D., Kiesling, R., Sterner, R., Kilham, S. and Johnson, F. A. (1986) Green, blue-green and diatom algae : taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.* 106, 473-485.

Trees, C. C., Clark, D. K., Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E. and Mueller, J. L. (2000) Accessory pigments versus chlorophyll a concentrations within the euphotic zone : A ubiquitous relationship. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1130-1143.

Twiss, M. and McLeod, I. (2008) Phytoplankton community assessment in eight Lake Ontario tributaries made using fluorimetric methods. *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 11, 422-431.

Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mit. Int. Ver. Limnol.* 9, 1-38.

Vollenweider, R. A. and Kerekes, J. (1982) Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. OECD, Paris.

Vörös, L. and Padisák, J. (1991) Phytoplankton biomass and chlorophyll *a* in some shallow lakes in central Europe. *Hydrobiologia*. 215, 111-119.

Wetzel, R. G. and Likens, G. E. (2000) *Limnological Analyses*. 3rd edition. Springer, London.

Wolfram, G., Dokulil, M. T., Pall, K. et al. (2007) Intercalibration Exercise, Technical Report + Annexes, Alpine GIG (Lakes). Vienna – Ispra.

Wright, S. W. and Jeffrey, S. W. (1987) Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analyzed by HPLC and HPTLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 38, 259-266.

5. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton

Journal of Applied Phycology (sous presse)

Maria CELLAMARE^{1,2}, Anne ROLLAND¹, Stéphan JACQUET^{1*}

¹. INRA, UMR CARRETEL, Station d'Hydrobiologie Lacustre, 75 Avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

². Cemagref, UR REBX, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas Cedex, France

*Corresponding author: jacquet@thonon.inra.fr, +33 4 50 26 78 12

Keywords: flow cytometry, sorting, phytoplankton, freshwaters, culture, monitoring

Running title: Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton

Abstract

We used the flow sorting capacities of a benchtop FACSCalibur flow cytometer to analyze the phytoplankton community of four different aquatic ecosystems. We show that despite the high optical, mechanistic and hydrodynamic stress for the cells while sorted, most of the targeted populations could be isolated and grew in mixed culture media subsequent to sorting. Forty-five phytoplankton taxa were isolated, including green algae (29 species), cyanobacteria (8), diatoms (7) and cryptomonads (1). The isolation success average was high since 80% of the total sorted populations grew successfully and 47% constituted monocultures. It is noteworthy, however, that some groups could not be isolated, as for example colonial cyanobacteria, chrysophytes, euglenophytes, desmides or dinoflagellates, and some species such as *Cryptomonas* sp. were very sensitive to the sorting process. It is proposed that flow cytometric analysis of freshwater phytoplankton, especially species prone to bloom, easy to sort and identify, might be a relevant tool for water managers and could be considered as an early bio-monitoring warning system.

Introduction

During the last two decades, flow cytometry (FCM) has been recognized as a powerful tool for the study of phytoplankton ecology, especially for spatial and seasonal trends (Peperzak *et al.* 2000). Due to the light scattering and the multi-color fluorescence emission (due to the chlorophylls and the phycobilins) of the cells, mixed populations in a sample can be detected and discriminated (Chisholm *et al.* 1988; Olson *et al.* 1985; Olson *et al.* 1991; Yentsch and Horan 1989). FCM is especially suited for the study of tiny organisms such as the picophytoplankton (Crosbie *et al.* 2003a; Ivanikova *et al.* 2007; Sarmiento *et al.* 2006, 2008) which is difficult to observe and count by other techniques (typically microscopy) because of their very small size (<5 μm) (Vaulot *et al.* 1989). This technology was first used in marine ecosystems in the mid-1980's (Olson *et al.* 1985) to quantify picocyanobacteria and the smallest eukaryotic algae which had been largely ignored in previous studies (Chisholm *et al.* 1988; Courties *et al.* 1994; Weisse 1993). It also allowed the discovery of the most abundant oceanic photosynthetic organism, i.e. *Prochlorococcus* (Chisholm *et al.* 1988). Several marine picophytoplankters such as *Prochlorococcus* (Chisholm *et al.* 1988; Dandonneau *et al.* 2006; Jacquet *et al.* 2001; Marie *et al.* 1997; Partensky *et al.* 1999), *Peridinium* *Synechococcus* (Jacquet *et al.* 1998; Li and Dickie 2001; Partensky *et al.* 1996; Vaulot and Marie 1999) or again the smallest eukaryotic phytoplankter, *Ostreococcus* (Courties *et al.* 1994) have been identified and studied extensively using FCM. In freshwater ecosystems, however, it took a longer time before FCM was used to study population dynamics of autotrophic picoplankton (Crosbie *et al.* 2003b) or the whole microbial community including phytoplankton, bacteria and viruses (e.g. Goddard *et al.* 2005; Personnic *et al.* submitted). Regarding the larger phytoplankton, FCM has not really been used to study populations in natural systems, especially in freshwater environments (Crosbie *et al.* 2003b; Tjeldens *et al.* 2008; Toepel *et al.* 2004, 2005).

In order to obtain reliable information on ecophysiological features of phytoplankton species, it is necessary to isolate them physically from their natural environment and culture them separately (Reckermann 2000). In that goal, a variety of methods has been applied such as the isolation by pipetting (Hoshaw and Rosowski 1973), the isolation on Petri dish (Koch 1881) or again the serial dilution technique (Thronsen 1995). With the development of FCM and associated functions such as sorting, a new alternative and attractive isolation method has emerged more recently compared to previous methods cited above. In fact, the sorting

module, which allows a physical separation of the cells from a mixed assemblage, has become a regular option for many instruments. However, our feeling is that it has been only poorly used, especially to study natural phytoplanktonic population dynamics in freshwaters. As pointed out by Reckermann (2000) while reviewing flow sorting in aquatic ecology, possible applications are numerous. Briefly, Sensen *et al.* (1993) sorted different flagellated algae (such as *Cyanophora paradoxa*, *Haematococcus lacustris*, *Scherffelia dubia*) using FCM to obtain thereafter clonal cultures. Li (1994) could measure primary productivity of different groups after sorting. Dubelaar and Jonker (2000) showed that isolations using FCM sorting could be used to test fluorescent probes and molecular techniques for the analysis of phytoplankton. Pel *et al.* (2004a) reported the link of flow cytometric cell sorting and compound-specific ^{13}C -analysis to determine population-specific isotopic signatures and growth rates in cyanobacteria-dominated African lakes. More recently, this method has been proposed to be of special interest for isolating potentially toxigenic cyanobacteria, such as *Planktothrix rubescens*, with the goal to analyze toxins production under different environmental conditions (Jacquet unpublished; Oberhaus *et al.* 2007). Finally, FCM sorting might be useful to isolate some new species in a lake for instance, previously identified by microscopy, when no more information is available and molecular biology assays are required (Vives-Rego *et al.* 2000).

It is noteworthy however that flow sorting may also display important drawbacks. Typically, it is likely that such a technology may not be allowed to isolate all species identified by traditional microscopical analysis. Cells might be affected or destroyed by fluid acceleration, electrical or mechanistic shock as well as by optical stress. We should also keep in mind that size limitation is likely in many flow cytometers with upper limits of typically 30 to 150 μm (Dubelaar and Jonker 2000). Thus, particles that exceed this size would not be sorted and isolated. In addition, considering that small cells are more abundant than larger ones, it is often easier to isolate the former than the latter (Veldhuis and Kraay 2000). FCM is not suited for rare events. At last, numerous species form chains (in particular diatoms or cyanobacteria) or produce colonies and this can lead to some mistakes during the sorting step if they are not separated with the acceleration of the fluid and counted as single entities.

In the present study, we show that it is of great interest to know what kind of organisms is hidden behind the dot plots shown on the screen of the flow cytometer computer. For different freshwater ecosystems, we tested a flow cytometric method in order to sort and

culture the major algal taxa. In parallel, microscopic observations were carried out to identify the species isolated from the different clusters. Potential applications are discussed.

Materials and methods

Study sites and sampling strategy

Samples were taken from three natural peri-alpine lakes (Geneva, Bourget, and Annecy) located at the border of the French Alps and one artificial reservoir (Marne, also referred to as Lac du Der) located in the Champagne region, 200 km east of Paris. The three peri-alpine lakes have different trophic status. Briefly, Lake Geneva passed between 1960 and 1980 from an oligotrophic to an eutrophic status. Programs engaged in the early 1970's for water quality restoration became fruitful from the mid 80's (Anneville *et al.* 2002) and this lake is now considered as mesotrophic, according to OECD criteria (OECD 1982). Lake Bourget has experienced water eutrophication between 1950 and 1980. Water quality restoration programs began at the end of the 1970's and early 80's, which has led to an important reduction of the phosphorus concentration for the last 20 years (from 120 to ~20 $\mu\text{g l}^{-1}$). However, a bloom of the filamentous and toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* has been constantly detected since 1996 during summers and autumns (Briand *et al.* 2005; Jacquet *et al.* 2005). Lake Annecy has been protected from the wastewater discharge by a peripheral sewer collecting secondary network since 1961. Nutrient concentrations in this lake are particularly low so that it is often referred as the "cleanest" lake of France (Masson *et al.* 2001; Nicoud and Manalt 2001). Each peri-alpine lake was sampled at a single station which corresponds to the reference station for the water quality survey of these ecosystems. In the Reservoir Marne two stations were explored since, at that time, no reference station had been identified. The first one (553) is a closed nautical basin submitted to nutrient pollution from a little river and consequently prone to phytoplankton blooms that can represent a potential problem for ecosystem functioning and public health. The second station (501) receives water from two feeding channels derived from two rivers and this area presents high phytoplankton and phosphorus concentrations. Reservoir Marne is also a mesotrophic ecosystem when considered as a whole but the two stations analyzed are eutrophic.

This study was conducted between February and June 2005 in Lakes Geneva, Bourget and Annecy and between May and September 2006 in Reservoir Marne. Samples were

obtained using a Van Dorn bottle at different discrete depths between 0 and 20 m, i.e. from surface down to the bottom layer of the euphotic zone. All samples were brought back to the laboratory within only a few hours under cool and dark conditions and processed immediately.

Flow cytometry analysis and cell-sorting

A FACSCalibur (Becton Dickinson) Flow cytometer equipped with an air-cooled argon laser (15 mW power, 488 nm excitation), a red-emitting diode (635 nm excitation) and four filters for fluorescence emission was used. Following the method of Marie *et al.* (2000), previously diluted 1 μm -diameter yellow-green fluorescent beads (Molecular Probes Inc.) (2 μl of stock solution in 2 ml of milliQ water) were added to 2 ml bulk samples for later signal normalization. Forward Scatter (FSC) indicative of the cell size and shape, Side Scatter (SSC) indicative of cell granularity, size and refractive index, green fluorescence from phycobilin (515–545 nm, FL1), orange fluorescence from phycoerythrin (PE) (564–606 nm, FL2) and red fluorescence from chlorophyll *a* (Chla) (>650 nm, FL3) were recorded for each cell. Analyses were run during 3 minutes for the smallest forms (picocyanobacteria) and for up to 8 minutes for the largest forms (filamentous cyanobacteria and eukaryotes) at the highest single flow rate of 95-100 $\mu\text{l min}^{-1}$ of our machine and by changing the flow cytometer set up for each size class to detect the whole community. For small cells, parameter settings were as follow: FSC (E01), SSC (400), FL1 (500), FL2 (500), FL3 (500) whereas for large cells, settings were: FSC (E00), SSC (300), FL1 (350), FL2 (300), FL3 (300). Abundance of each population was calculated according to the formulae: $N = (n \cdot 1000) / q \cdot t$, where q is the flow rate ($\mu\text{l min}^{-1}$), t is the duration (min) of the acquisition, n is the number of events counted by the flow cytometer and N is the number of cells per milliliter. Data were collected in listmode files and analyzed using CYTOWIN (Vaulot 1989). Subsequently, the cytometer sorting function was used to separate and characterize the different populations detected.

The FCM sorting function allowed us to separate physically homogeneous populations from the heterogeneous mixture of cells, based upon the specific light scattering and fluorescent characteristics of each cell. In this way, every cluster was regarded as an individual phytoplankton population and the “exclusion mode” of the FCM sorting function was used. This means that the sort occurred only when a target cell was identified – there was no nontarget cells in the sort envelope – leading to the highest purity made possible by the device of the sorted population. Then, every cluster was isolated and cultured. For this

purpose, the sheath fluid generally used (i.e. milliQ water, FACSFloTM or filtered natural water) was replaced by a mixture of 9 different culture media, in equal proportion, available in the laboratory (referred to as MWC, L-C, BB, BG-11, ASM1, DV, JAWORSKI, Z+Si+Vitamin, Z) in order to promote non-limiting growth conditions for any sorted species. Consequently, each sorted population was incubated in the same mixture of culture medium.

Culture conditions

Each population of interest observed in both set up previously established was sorted in a 50-ml falcon tube and transferred to a 250 ml Nunclon bottle. Bottles were placed in a culture chamber with white (DiaLux) light intensities of 50-55 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in a light:dark rhythm of 16:8 h at a constant temperature of 18°C. To maintain alive the populations isolated, the culture medium was regularly changed, and once they were developed (generally three weeks later), the samples were observed using a light inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) for taxonomic identification. In addition, epifluorescence microscopy (Leitz-Wetzlar, Dialux 20), equipped with a filter set for blue light excitation, was used for picocyanobacterial observation.

Results

Isolation success

A total of 175 isolations was carried out in the 4 hydrosystems using the FCM sorting module. In the peri-alpine lakes, 130 samples were sorted, 36 came from Lake Geneva, 49 from Lake Bourget and 45 from Lake Annecy. In the Reservoir Marne, 45 samples were sorted, 23 issued from the station 553 and 22 from the station 501. The higher isolation success average (monospecific cultures, see Table 2) was obtained in the samples from Lake Annecy (58%), followed by those from Lakes Bourget (54%) and Geneva (45%), and those from the station 553 (37%) and 501 in the Reservoir Marne (26%).

Table 3 Classification of the different species isolated from the four hydrosystems using FCM sorting.

Main pigment			systematic groupe	species	Hydrosystems				
Chlorophyll	Phycocyanin	Phycoerythrin			Reservoir Marne	Lake Geneva	Lake Bourget	Lake Annecy	
+	-	-	Bacillariophyte	Asterionella Formosa Hassal		X	X	X	
				Diatoma tenuis Agardh		X	X		
				Fragilaria crotonensis ^b Kitton				X	X
				Navicula sp. Bory de St. Vincent 1822	X				
				Nitzschia sp. Hassal 1845	X				
				Stephanodiscus minutulus ^b (Kützing) Cleve and Möller		X	X		
+	+ ^a	- ^a	Cyanobacteria	Anabaena solitaria Klebahn	X				
				Aphanizomenon flos-aquae ^b Ralfs			X		
				Planktothrix agardhii ^b (Gomont)	X				
				Anagnostidis and Komárek					
				Planktothrix rubescens ^b (DeCandolle ex Gomont)			X		
				Anagnostidis and Komárek					
				Pseudanabaena acicularis ^b (Nygaard)				X	X
				Anagnostidis and Komárek					
				Pseudanabaena catenata Lauterborn			X		
				Pseudanabaena galeata ^b Böcher	X				
Pseudanabaena limnetica ^b (Lemmermann) Komárek	X	X	X	X	X				
Synechococcus sp. ^b Nägeli 1849	X	X	X	X	X				

+	-	+	Cryptophyte	<i>Cryptomonas</i> sp. ^b Ehrenberg 1838	X			
+	-	-	Chlorophyte	<i>Ankyra</i> sp. Fott 1957	X			
				<i>Chlamydomonas</i> sp. Ehrenberg 1833	X			X
				<i>Chlorella vulgaris</i> ^b Beijerinck	X	X	X	X
				<i>Choricystis minor</i> ^b (Skuja) Fott	X	X	X	
				<i>Coelastrum</i> <i>microporum</i> Nägeli	X			
				<i>Crucigenia</i> sp. Morren 1830			X	
				<i>Crucigeniella</i> <i>rectangularis</i> ^b (Nägeli) Komárek	X			
				<i>Didymocystis</i> <i>bicellularis</i> (Chodat) Komárek	X			
				<i>Hyaloraphidium</i> <i>contortum</i> Pascher and Koršikov	X			
				<i>Monoraphidium</i> <i>arcuatum</i> (Koršikov) Hindak	X			
				<i>Monoraphidium</i> <i>circinale</i> Nygaard	X			
				<i>Monoraphidium</i> <i>contortum</i> ^b (Thuret) Komárkova.- Legnerová			X	
				<i>Monoraphidium</i> <i>convolutum</i> (Corda) Komárkova.- Legnerová	X			
				<i>Monoraphidium</i> <i>dybowskii</i> (Woloszynska) Hindak and Komárkova.- Legnerová	X			
				<i>Monoraphidium</i> <i>griffithii</i> (Berkeley) Komárkova.- Legnerová	X			

				Monoraphidium kormakovae ^b Nygaard				X
				<i>Monoraphidium</i> <i>minutum</i> (Nägeli) Komárkova.- Legnerová	X			
				<i>Monoraphidium</i> <i>tortile</i> (W. and G.S. West) Komárkova.- Legnerová	X			
				Mougeotia gracillima ^b (Hassal) Wittrock			X	
				<i>Mougeotia</i> sp. ^b Agardh 1824	X			
				Scenedesmus acutus Meyen	X			
				Scenedesmus bicaudatus Deducenko	X			

^a except for *Planktothrix rubescens*, *Pseudanabaena catenata*, *P. limnetica*, *P. acicularis* and *Synechococcus* sp. which cells contain more phycoerythrin than phycocyanin

^b Species isolated and maintained as a monoculture

The major algal groups

The major algal taxa isolated and then identified by microscopy in the four hydrosystems as well as the different pigmentation fluorescence used to classify them from FCM parameters are listed in Table 1. Forty-five phytoplankton species have been isolated from the four systems. Most of them corresponded to chlorophytes (29 taxa), then 9 taxa were classified in the cyanobacterial group, 6 belonged to the bacillariophytes (i.e. diatoms) and finally the cryptophytes were represented by the single genus *Cryptomonas* sp. It can be noted that no chrysophytes nor euglenophytes as well as desmides or dinoflagellates were obtained in the different isolations while they were present in microscopic counts (data not shown).

Seasonal Dynamics of Synechococcus spp.

Picocyanobacteria were always observed at all stations. As this community can be very diverse genetically (Crosbie *et al.* 2003c), this group should be called *Synechococcus* spp. and thereafter in the manuscript we only refer to them as *Synechococcus*. Unique signatures of *Synechococcus* were observed in each of the 5 stations. In Lakes Geneva (Figure 11a-d) and Bourget (Figure 11e-h), it was highly abundant in June ($47 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹ and $8 \cdot 10^3$ cells.m⁻¹, respectively). Among the three alpine lakes, the higher abundances over the period of this study were found in Lake Annecy (Figure 11i-l) where densities reached $37 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹. Very interestingly and by contrast to the other lakes investigated, signatures of *Synechococcus* in this lake were elongated. In the stations 501 (Figure 11m-p) and 553 (11q-t) of the Reservoir Marne, *Synechococcus* signatures were smaller (more compact) in May, August and September and corresponded to small abundances whereas they were thicker in July and were related to a higher abundance during this period, reaching densities up to $60 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹.

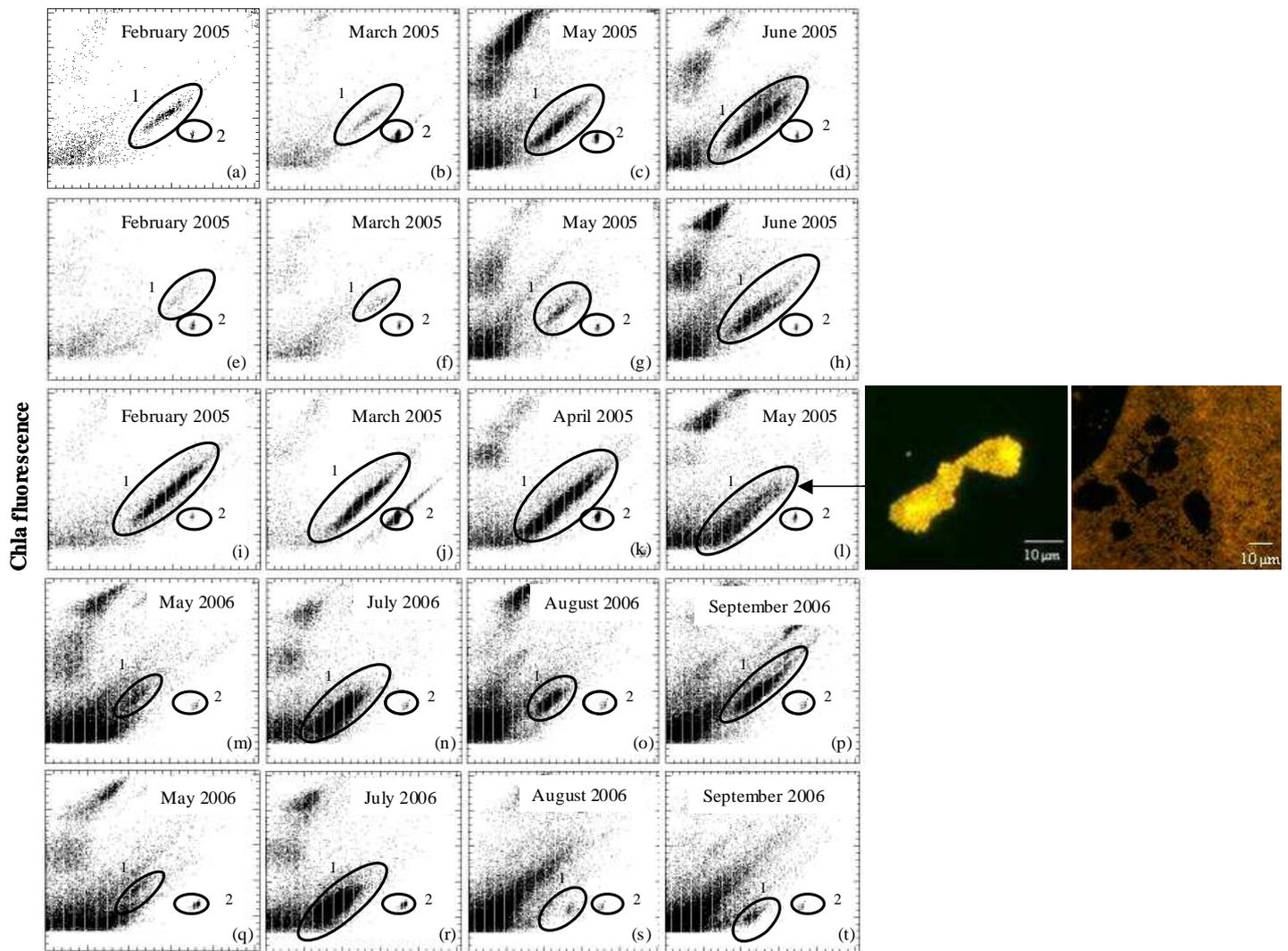


Figure 11 PE vs. Chla fluorescence cytograms showing the temporal evolution of *Synechococcus* spp. in Lakes Geneva (a-d), Bourget (e-h), Annecy (i-l), stations 501 (m-p) and 553 (q-t) from the Reservoir Marne. (1: *Synechococcus* spp; 2: 1- μ m beads). In the picture: *Synechococcus* microcolonies before (A) and after (B) sorting and culturing. Note that most populations were unicellular forms.

Seasonal dynamics of other phytoplankton populations or groups

The seasonal distribution of other species was observed even though lots of populations isolated were mixed. Thus, information can be highlighted about some clusters that did not contain exactly the same species from one date to another but had the same fluorescence pattern because they belonged to the same taxonomic class. As an example, for station 501 (Figure 12a-d), the first cluster of interest (a mixed green algal community) presented an elevated chla fluorescence, an information about potential high chlorophyll *a* content, and a low or absence of PE fluorescence, result of a lack of such a pigment in those

algae. The cluster had more or less the same signature (related to beads fluorescence) along the sampling season but the microscopic determination clearly revealed some differences in its composition. In fact, while in May and July this cluster was mainly composed of *Chlorella vulgaris*, *Hyaloraphidium contortum* and several species of *Monoraphidium* spp., there was a new mixed community in August composed essentially of species from the genus *Scenedesmus*. Finally, several *Monoraphidium* species found in May and July returned in September. The abundance of this cluster decreased between May and July (3 to $2 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹), then there was a high increase in August ($22 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹) and finally it turned lower again in September ($4 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹). A second cluster we could discriminate was the cyanobacterium *Pseudanabaena limnetica*. The position of the cluster 2 underlined high Chla and PE fluorescence, probably as an indication of elevated pigment cell concentrations. This second cluster presented the same shape along the sampling season but particles seemed to form more or less dense clouds of dots, revealing the variation in abundance of this species. We observed that the number of cells decreased between May and July (from 0.5 to $0.4 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹), then there was a strong increase in the abundance of this species ($2 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹ in August) and finally a slight decrease in September ($0.9 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹).

The station 553 displayed more or less the same patterns than previously described for station 501 (Figure 12e-h) but populations were less distinct. For instance, the species *Chlorella vulgaris* (cluster 1) was clearly identified as an abundant cluster in May and July (3.9 and $3.5 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹) but the population decreased in August and September (0.07 and $0.04 \cdot 10^4$ cells.ml⁻¹). The second cluster was identified as a mixed green algal community that changed along the sampling season. It was first composed of *Ankyra lanceolata* and several species of *Monoraphidium* spp. ($3 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹). In July, *Ankyra lanceolata* disappeared to favor the growth of green flagellates ($4 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹) and, as for the station 501, August was characterized by the appearance of several *Scenedesmus* species ($2 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹). Additionally, the phytoplanktonic community was essentially composed of little flagellates, *Chlamydomonas*-like, and *Scenedesmus* species ($3 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹) in September. At last, the third cluster was mainly composed of large cells in May ($0.6 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹) as well as in September ($0.3 \cdot 10^3$ cells.ml⁻¹). These populations were supposed to be composed of phycoerythrin-rich species but after isolation and 3 weeks culturing, we identified green-algae species under the microscope. Unfortunately, we failed sorting and culturing this population in July and August.

The specific composition in a cluster seemed to be more or less the same along the season for a single station but clusters having the same fluorescence in cytograms from different stations were not characterized by the same species. This was typically the case for the second cluster of the station 501 (filamentous cyanobacteria) and the third cluster of the station 553 (mixed green algae population).

‘Long-term’ monitoring was not always possible because some specific clusters isolated were present at a particular time but not at the others. This was particularly true for *Cryptomonas* sp., a phycoerythrin-rich species for which abundance reached $0.8 \cdot 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, that was only isolated in September in the station 501 because it was not present before.

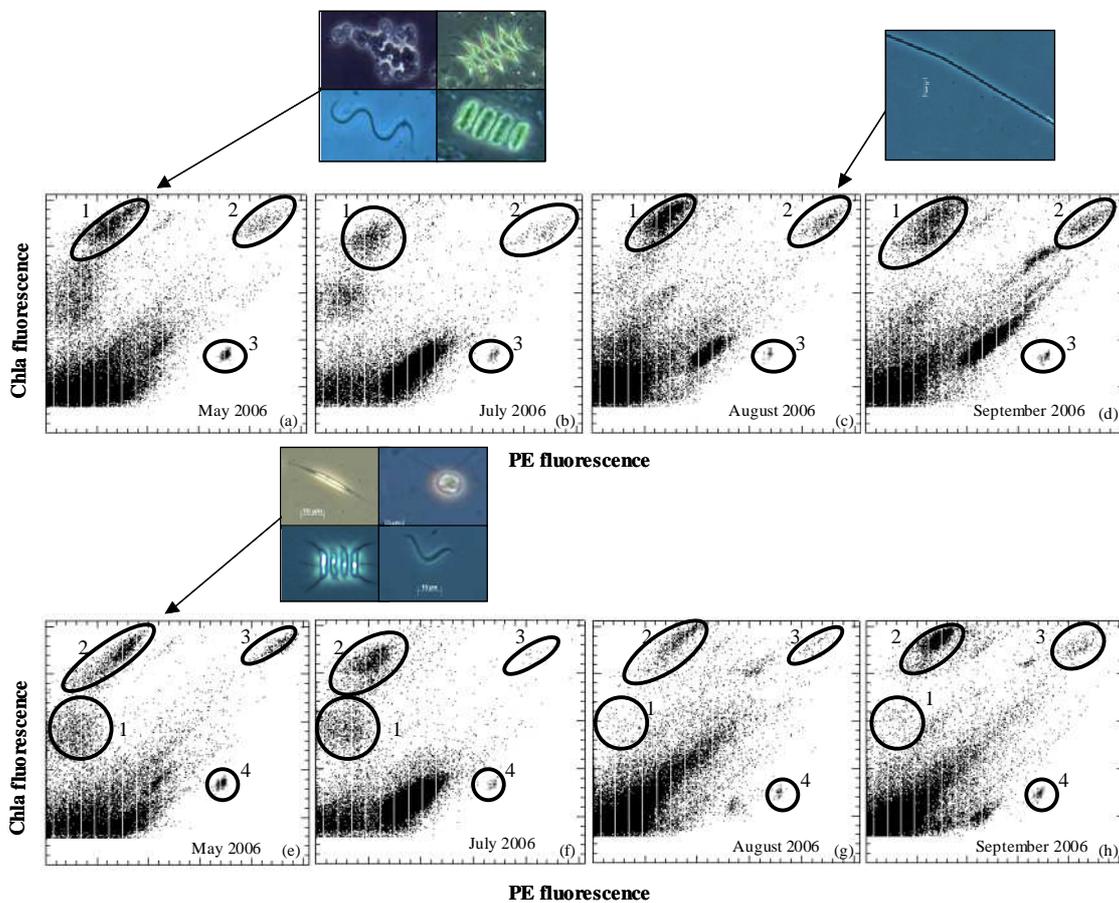


Figure 12 PE vs. Chla fluorescence cytograms showing the seasonal evolution of the phytoplankton composition **a-d** for two clusters isolated from the station 501 of the Reservoir Marne (1: Mixed green-algae community; 2: *Pseudanabaena limnetica* (picture of a filament); 3: beads) and **e-h** for three clusters isolated from the station 553 of the Reservoir Marne (1: *Chlorella vulgaris*; 2: Mixed green algae community; 3: Mixed green algae community; 4: beads). Pictures of the mixed green algae communities with *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acuminatus*, *Hyaloraphidium contortum*, *S. linearis* (upper left, from up left to right down) and with *Ankyra lanceolata*, *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus spinosus*, *Monoraphidium* sp. (middle, from up left to right down).

Specific determination of phytoplankton

Different clusters observed in the cytograms Chla vs. PE fluorescence were clearly identified as characteristics for some species such as the filamentous phycoerythrin-rich cyanobacteria *Pseudanabaena limnetica* and *P. catenata* or the chlorophyte *Mougeotia gracillima* in Lake Geneva (Figure 13). In Lake Bourget, we could identify clusters of the phycoerythrin-rich *Planktothrix rubescens*, *Pseudanabaena acicularis* and *P. limnetica* (Jacquet *et al.* 2005; Ivanikova 2006), the phycocyanin-rich cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae* (Benedetti *et al.* 2004) and some diatoms. Note that the presence of the cluster represented by the *Aphanizomenon flos-aquae* in the zone of phycoerythrin-rich algae was more difficult to explain but this was observed at several occasions. All these species were also the dominant taxa (in terms of density) in the natural samples observed in the microscope (data not shown).

In the Reservoir Marne the clusters of the phycoerythrin-rich *P. limnetica* and the cryptophyte *Cryptomonas* sp. were also identified. The FCM signatures of the selected species were clearer at station 501 than at station 553 what confirmed the nutrient-enriched character of the station 501. Moreover, these two species were abundant in the microscopic observations during September and probably facilitated the isolation.

Finally, looking at the cultures 3 weeks after the isolation, *Cryptomonas* sp. seemed to be healthy and motile favoring the subculturing into the specific Jaworski's medium for Cryptophytes (Jaworski *et al.* 1981) and the survival of this species.

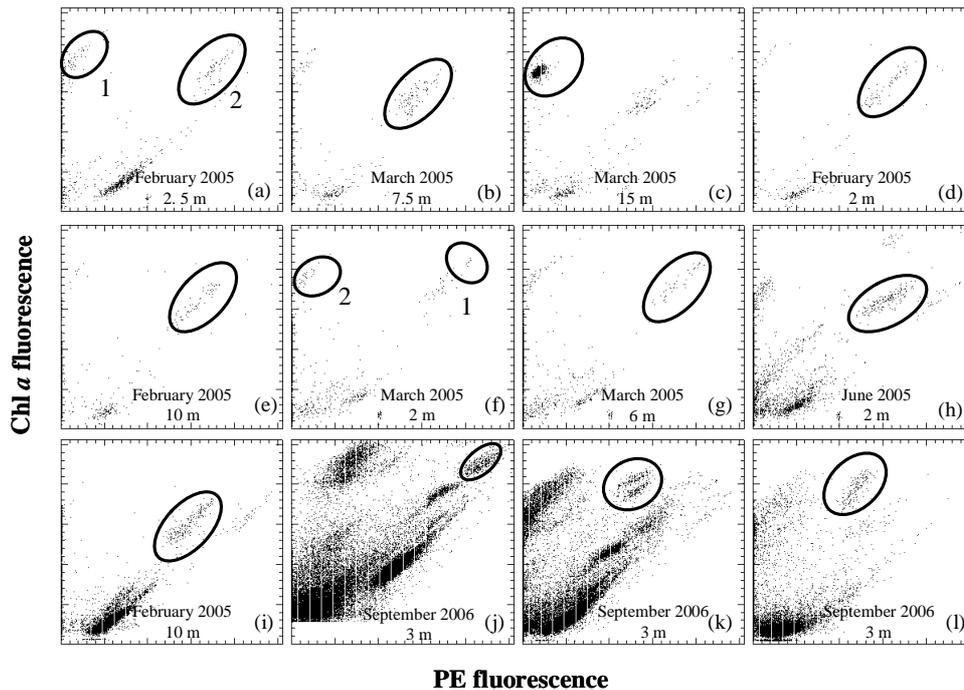


Figure 13 PE vs. Chla fluorescence cytograms showing typical signatures of phytoplankton species in the 4 hydrosystems. **Lake Geneva:** a1: *Mougeotia gracillima*, a2: *Pseudanabaena catenata* and *P. limnetica*; b: *Pseudanabaena limnetica*; c: *Mougeotia gracillima*; **Lake Bourget:** d: *Planktothrix rubescens*; e: *Pseudanabaena limnetica*, f1: *Planktothrix rubescens*, f2: mixed diatoms (*Stephanodiscus minutulus*, *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*); g: *Pseudanabaena acicularis*, h: *Aphanizomenon flos-aquae*; **Lake Annecy:** i: *Pseudanabaena acicularis*; **Reservoir Marne** (station 501): j: *Pseudanabaena limnetica*; k: *Cryptomonas* sp; **Reservoir Marne** (station 553): l: *Cryptomonas* sp.

The Figure 13 shows that several species of filamentous cyanobacteria, both PE- and PC-rich, were easily identified in the Chla vs PE fluorescence plot, and to a lower extent some chlorophytes and diatoms. Obviously, several signatures of these two last groups were best identified to the species level in the Forward Scatter vs. Chla fluorescence cytogram (Figure 14). Small species such as *Chlorella vulgaris* presented a low FSC scatter and Chla fluorescence, corresponding to probable low cell size and chlorophyll *a* cell content, respectively. In contrast, larger species such as *Mougeotia gracillima* and *Fragilaria crotonensis* showed high FSC scatter and high Chla fluorescence. In this cytogram were also identified some species belonging to different classes but with similar size and shape as is the case of *Diatoma tenuis* and *M. gracillima* which can measure between 40 to 70 μm in length and have a parallelepiped shape. In the same figure, we could also observe that some diatoms such as *F. crotonensis* and *Asterionella formosa* are in the same cluster. This result is not surprising because both elongated diatoms are found in the same size range (60-105 μm in

length) and they also have the same pigmentation. In the Figure 4 several aspects are highlighted: elongated diatoms are placed in the upper part of the cytogram. Then, the signatures of the small chlorophytes *Monoraphidium contortum* and *C. vulgaris* have a specific shape and localization in the lower part of the cytogram, and this for several sampling dates, which would allow the study of the seasonal evolution of these species in the future.

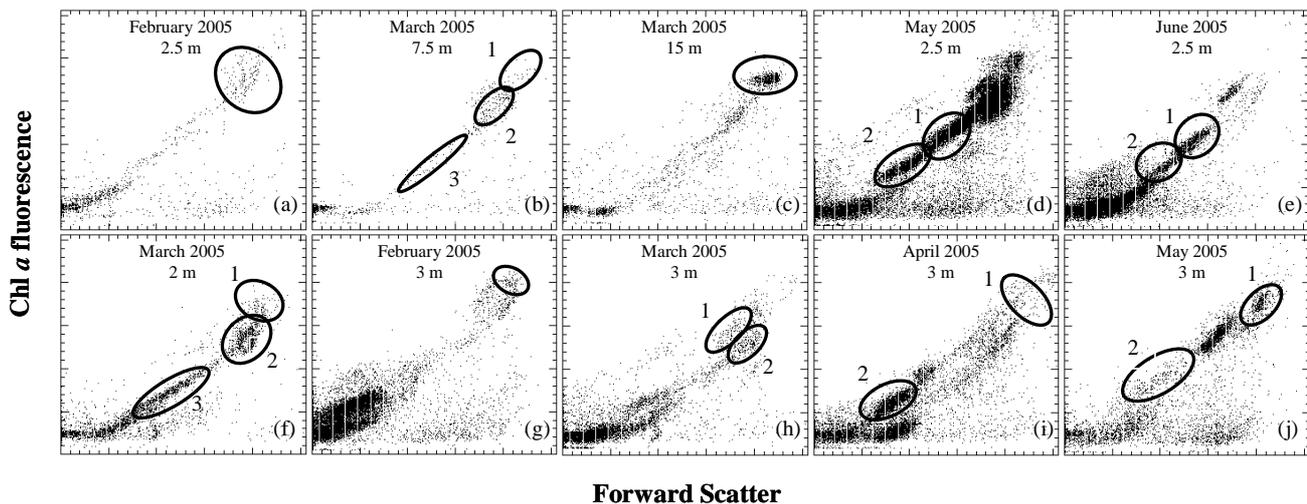


Figure 14 Forward Scatter vs. Chl a fluorescence cytograms showing typical signatures of phytoplankton species in the three peri-alpine lakes. Lake Geneva: a: *Mougeotia gracillima* and *Diatoma tenuis*, b: 1- *Scenedesmus* sp. and *Schroederia setigera*, 2- *Stephanodiscus minutulus*, 3- *Chlorella vulgaris*; c: *Mougeotia gracillima*; d-e: 1- *Monoraphidium contortum*, 2- *Chlorella vulgaris* ; Lake Bourget: f: 1- *Asterionella formosa*, 2- *Fragilaria crotonensis*, 3- *Chlorella vulgaris*; Lake Annecy: g: *Fragilaria crotonensis*, h: 1- *Monoraphidium komarkovae*, 2- *Asterionella formosa* and *Fragilaria crotonensis*; i: 1- *Asterionella formosa* and *Fragilaria crotonensis*, 2- *Chlorella vulgaris*; j: 1- *Fragilaria crotonensis*, 2- *Chlamydomonas* sp.

Discussion

Flow cytometry and sorting have proved to be a powerful technique with many potential applications in aquatic sciences (Collier and Campbell 1999; Jochem 2000; Reckermann 2000; Yentsch *et al.* 1983). However, they have been mainly applied in the context of the marine field research whereas limnetic ecosystems have comparatively received less attention. Crosbie (2002) reported from a search in the *Current Contents* from 1993 to 2002 (by using a battery of keywords such as flow cytometry, picocyanobacteria, picoplankton, picoeukaryotes, ocean, sea, marine, lake, river, freshwater, limnology, reservoirs, limnetic or inland waters) 151 references for “oceanography” and only 16 for “limnology”. Such a ratio between “marine” and “freshwater” was even higher in 2008 while

making a rapid search on ISI Web of Science from 1992 to nowadays, and using keywords such as flow cytometry OR flow cytomet* OR flow sorting AND freshwater OR marine (not shown). Here, we report one of the rare studies where FCM sorting was applied to a variety of freshwater ecosystems and can be proposed as a powerful monitoring tool.

Success of isolations

The success average of the phytoplankton isolations in the 4 hydrosystems was very dissimilar, being higher in the peri-alpine lakes, particularly in the oligotrophic Lake Annecy and less successful in the two eutrophic stations of the Reservoir Marne. At first sight, this result could be closely related with the trophic status of the systems, where more species coming from oligo- to mesotrophic waters could be isolated and grown on artificial media while species from rich systems were not. Was our culture medium not enough rich to maintain the species isolated from the Reservoir Marne? We assume that this was probably not the case regarding the medium recipes. Another explanation was that a higher number of isolations were carried out in the peri-alpine lakes, and as a consequence, it was possible that we simply obtained a higher success average. However, in our study, 80% of the total sorted cultures grew successfully and 47% were monocultures. In addition, the cultures grew after only 3 weeks following the isolation.

Among possible reasons for the high success average obtained after population sorting, the good quality of the culture medium was a good explanation. In fact, such a mixture was very efficient to guaranty the growth of all isolated phytoplanktonic groups within the first 3 weeks without any visible nutrient-limited condition. It is noteworthy however that, after this period, a lot of cultures started to lyse. As an example, the diatom *Fragilaria crotonensis* formed chains after 3 weeks and by using the same mixture of nutritive media in the following days, the culture decayed progressively. The only way of maintaining the population was to change gradually the mixture by a more specific culture medium as this is generally done for classical algal culturing (Grobbelaar 2004).

*Seasonal evolution of *Synechococcus* spp.*

The cluster of PE-rich *Synechococcus* was clearly identified in the 4 hydrosystems. This picocyanobacterial group is characterized by a specific Chla vs. PE fluorescence FCM signature commonly found in most aquatic ecosystems, making its spatio-temporal monitoring possible (Crosbie *et al.* 2003b; Jacquet *et al.* 1998; Li and Dickie 2001; Partensky

et al. 1996; Vaulot and Marie 1999). The presence of picocyanobacteria was important in the four ecosystems, being a persistent and abundant component of the oligotrophic Lake Annecy throughout the study, while in the 2 other peri-alpine lakes, this community was better represented in late spring-early summer when the thermal stratification/clear-water phase took place (Anneville and Leboulanger 2001; Jacquet *et al.* 2005). In the Reservoir Marne, the picocyanobacteria had its maximum abundance with thermal stratification between the end of June and the end of July. In agreement with the literature, picocyanobacteria are present in lakes of different trophic but they are likely to be the dominant group all year long in oligotrophic systems whereas they took advantage of the low nutrient concentrations found in surface waters in spring and summer in mesotrophic lakes (Callieri 2008; Weisse 1993). Several authors have suggested that small phytoplankton cells do best in resource-poor habitats. This phenomenon has been linked to the greater surface area to volume ratio of small organisms promoting efficient uptake of nutrients, which gives them a competitive advantage over larger organism when nutrients are scarce (Drakare *et al.* 2003; Raven 1998). Thus, this community may be of particular interest to monitor the trophic status evolution of freshwater ecosystems and FCM is clearly the best tool to obtain precise counts and non-time consuming short-term dynamics of this “canary in the coal mine” (Schallenberg and Burns 2001; Weisse and Mindl 2002).

Following the same idea, FCM signatures of *Synechococcus* in Lake Annecy were characterized by a long “tail” which had been reported in other lakes as a consequence of high proportions of colonial forms of these picocyanobacteria (Collier 2000). The presence of these colonial forms or aggregates was confirmed by epifluorescence microscopy (Figure 1A, B) and this was attributed to oligotrophic conditions or nutrient depletion during the maximal thermal stratification in summer as a strategy for more efficient nutrient recycling (Passoni and Callieri 2000; Schallenberg and Burns 2001; Stockner and Shortreed 1991). Stockner (1991) also suggested that this strategy could be an anti-predator mechanism. Our data suggest that the high concentration of picocyanobacteria aggregates observed in Lake Annecy is a consequence of the low nutrient concentrations of this lake. Once sorted, such colonies were generally disrupted so that it is likely that studying the proportion of colonial *vs.* single cells of this community will still require epifluorescence microscopy or more powerful FCM.

Seasonal evolution of other phytoplankton groups

Identification of the seasonal evolution and succession of the different phytoplankton groups identified in the Reservoir Marne was not easy since most of the reservoir is empty from October to February and consequently sampling cannot be performed along the year. Although sorting experiments were thus conducted only from late spring to early autumn, a lot of information can be drawn from the results obtained from the phytoplankton composition and abundance inside the different clusters. The first cluster identified in the station 501 and the second cluster isolated in the station 553 (Figure 3) contained species that changed from one month to another. These species belonged to the chlorophytes that mainly contain chlorophyll *a* and *b* pigments and lack other accessory pigments which explains their position the FL3 (Chl *a* fluorescence) axis (Nozaki 2003; Wetzel 2001). *Monoraphidium* spp. were observed in May, July and September in the station 501 as well as in May in the station 553. For both stations, several species of *Scenedesmus* spp. were found in August and also in September for the station 553. In addition, *Ankyra lanceolata* was isolated in May in the second cluster of the station 553 (Figure 3) and a filamentous cyanobacterium, *Pseudanabaena limnetica*, was isolated from the station 501. This last species is optically defined as a pale blue-green algae whose phycocyanin (Ivanikova 2006; Komárek and Anagnostidis 2005) is responsible for an olive blue-green color. Moreover, the species *Cryptomonas* sp. has an elevated PE fluorescence and has been isolated in September from the station 501. Finally, in the station 553, the third cluster was composed of large cells that exhibited a high FL2 fluorescence associated with phycoerythrin. Unfortunately, after 3 weeks of culturing, green algae were largely present in the flasks. Thus, it is possible that we isolated cells with a large quantity of phycoerythrin but the culture was probably “contaminated” with green algae that rapidly out-competed these phycoerythrin-rich species as it is explained for *Chlorella* (see below). It is also possible that the mixed medium was not strongly adapted to the phycoerythrin-rich species and allowed green algae to take advantage of these conditions.

One more aspect that can be highlighted is the difficulty to foresee specific monitoring if the species change along time within a same cluster despite a regular fluorescence pattern. In fact, communities referred to as the “mixed green algae” were, on one hand, composed of different species and, on the other hand, the diversity changes among seasons. On the contrary, clusters containing *Chlorella vulgaris* or *Pseudanabaena limnetica* could be prone

to an annual monitoring as these species maintained from one date to another and informations about the abundance of these species could be obtained.

Specific identification of algae

Even if several authors pointed out the limitations of the flow cytometry to discriminate phytoplankton species (Collier 2000; Dubelaar and Jonker 2000), the isolation of the most abundant species from the 4 systems studied (excepted for the chrysophytes and colonial cyanobacteria) was possible using the flow cytometry sorting option. Since the clusters of several taxa were here well discriminated (*Synechococcus* sp., *Pseudanabaena limnetica*, *Chlorella vulgaris*, *Monoraphidium contortum*, *Mougeotia gracillima*, *Planktothrix rubescens*, etc.), numerous studies could be carried out in the future using this simple methodology. One of the largest interests is the study of the seasonal trends of the main phytoplankton species as have been showed by several authors before (Hofstraat *et al.* 1994; Rutten *et al.* 2005) without the time-consuming microscopic analysis. However, we should keep in mind that the diversity of algae found in the field is larger than that possibly isolated using FCM sorting. In any case, if the analysis of major functional groups of phytoplankton needs to be routinely done, this methodology offers obviously higher frequency analysis in both time and space (Dubelaar and Jonker 2000). Another advantage of the sorting method is the possibility to isolate specific clusters (species) from an algal mixture in order to study their physiological, ecological or genetic features (Jochem 2000), and in the case of potentially toxic species (i. e. *Planktothrix rubescens*), to detect quickly their presence and take preventive measures.

Early warning

The accurate identification of harmful algal clusters using FCM represents an important tool for detecting the low-level occurrence of toxic species, giving early warning of the probability of bloom development (Dubelaar and Jonker 2000). As an example described by Rutten *et al.* (2005), routine analyses using FCM allowed them to identify a bloom of the harmful species *Phaeocystis* spp. in Dutch coastal waters. As a result of improved monitoring, the sluice gate was closed to prevent the inflow of this haptophyte in a contiguous lake. In our study, several clusters of potentially toxic filamentous cyanobacteria were clearly identified, as is the case of the phycoerythrin-rich *Planktothrix rubescens* and in a lower extent the phycocyanin-rich *Aphanizomenon flos-aquae* in Lake Bourget. The first one can produce

hepatotoxins and forms blooms in this lake since 1996, at least during summer and autumn periods (Jacquet *et al.* 2005) and the second one is a potential producer of the neurotoxin anatoxin-a (Rapala *et al.* 1993). In this way, potentially toxic species can be quickly detected and enumerated by flow cytometric routine analysis to determine if their concentrations represent a public health risk. This could be applied to *P. rubescens* dynamics in Lake Bourget (Jacquet unpublished). Furthermore, flow cytometer sorting allows the effective isolation of the harmful algae and their culture with high success average to carry out physiological or molecular studies, which provide rapid and sensitive diagnoses for the presence of toxic and toxigenic cyanobacteria (Ouellette and Wilhelm 2003).

Limitations for the isolation of specific groups

We were not able to cultivate colonial cyanobacteria such as *Aphanocapsa* or chrysophytes such as *Dinobryon*, which were however frequently observed by microscopy whatever the lake considered. In the case of the colonial cyanobacteria, shear forces from the flow cytometer may have caused the breaking of cells' aggregates (Rutten *et al.* 2005) making difficult its development after sorting. In addition, Pel *et al.* (2004b) mentioned that colonial phytoplankton does not well support cell sorting. In the case of the delicate siliceous-wall of *Dinobryon*, several hypotheses could be proposed. Chrysophytes are characterized and dominated by yellow-brown xanthophyll and carotenoid pigments that hide the green colour of chlorophyll *a* (Wetzel 2001). Thus, it is likely that the FASCalibur was not calibrated to easily detect such kind of pigments in contrast to phycobilin, phycoerythrin, chlorophyll *a* and phycocyanin if using the optional fourth fluorescence. In addition, the FACSCalibur flow cytometer is not suited to sort particles whose size exceeds 130 μm . *Dinobryon* and *Aphanocapsa* colonies can reach 130 μm and 300 μm , respectively, so that it may have been possible that the diameter of the flow sorting tube was not large enough to allow particle absorption and selection. Cryptophytes also were very difficult to isolate in the peri-alpine lakes while this group at time could be relatively abundant. Isolation was possible from samples of the Reservoir Marne. Actually, deformation of cells membranes is frequently observed in cryptophyte cells after preservation with Lugol's fixative (Rutten *et al.* 2005). Probably membranes of cryptophytes are also very sensitive to the sorting process, more especially to the mechanical stream capture. This could result in a high loss of cells viability after sorting and may be was the reason why we did not succeed in the isolation of this group in some occasions. Such an hypothesis was checked before (in the sample) and after selection

and sorting of PE-rich cells by using direct cell observation under the microscope. We observed indeed some cells of *Cryptomonas* very damaged. We also think that this membrane integrity loss could be linked to nutrient concentration and osmotic stress, since replacing the media by filtered lake water may conduct to a better cell recovery (Rimet, personal communication). In the future, this aspect should probably deserve more attention. Indeed, an isolation technique that could be more appropriate for cryptophytes is the application of serial dilutions (Landry and Hassett 1982), consisting in adding a certain volume of an enriched sample to a lesser one until isolation of a single cell be done. The streak plating, which is another classical microalgal isolation technique, is probably more suitable for small species (<10 µm, typically nano- rather than microalgae) or algae that grow well on a substrate (Stein 1973).

Finally, we can point out that the FACSCalibur is not really designed to make precise cell sorting. In fact, this flow cytometer presents an optional sorting module but it is not a sorter as a whole. Consequently, the inability to track and monitor some of the dominant populations in the water system is more than a significant limitation. It is likely that using an advanced cell sorting function might be useful and more appropriate, although we obtained a large success. To cite an example, the FACSVantage (Becton-Dickinson) or related device would probably provide a better cell sorting frequency because of increased speed, accuracy, reliability and allowing sorting cells larger than previously mentioned with the FACSCalibur. Moreover, up to 16 cell populations can be identified using gates of various sizes and shapes, grouped in logical combinations and overlaps with no performance loss of sort or analysis rates (Mollet *et al.* 2008).

Sample contamination

Some of the samples were contaminated by “contaminant” species such as *Chlorella vulgaris* or *Choricystis minor*. While analysing the different cultures after a few days using FCM and/or microscopy, some cultures were indeed observed to be made of one dominant species (the one we selected) and some cells of *Chlorella*. Rapidly, such samples were only made of the non-desired chlorophyte. This replacement phenomenon has already been observed during an experiment dealing with competition for light between some phytoplankton species (Huisman *et al.* 1999). They found that in a steady-state monoculture of *Scenedesmus* inoculated by a small number of *Chlorella*, the latter was able to invade. Conversely, *Scenedesmus* was not able to invade a steady-state culture of *Chlorella*.

Moreover, in an experiment where four species were inoculated together, *Chlorella* became the final dominant species after a few days. This confirms that *Chlorella* has a critical advantage on other phytoplankton species in culture. Even more, it can out-compete cyanobacteria under low light conditions. The dominance of chlorophytes on cyanobacteria has also been identified in other culture conditions. For example, it has been shown that *Prochlorothrix* competitively displaced *Planktothrix* under both a constant and a pulse phosphorus supply (Ducobu *et al.* 1999). Moreover, another invasion experiment between two species from a same taxonomic class have highlighted that *Fragilaria crotonensis* could invade *Tabellaria fenestrata* cultures, but that *Tabellaria* could not invade *Fragilaria* cultures under phosphate-limited conditions (Tilman and Sterner 1984). Thus, depending on environmental conditions, some species can take advantage and dominate the medium. What could explain the dominance of *Chlorella* or *Choricystis* in our cultures was clearly the non limiting nutrient conditions offered to this small size group. It has been demonstrated indeed that for a single-celled organism, the surface is a critical interface between the organism/cell and its environment. Exchange of materials often occurs through the process of diffusion, in which dissolved molecules or other particles move from areas of higher concentration to areas of lower concentration (although some exchange is mediated by cellular mechanisms). This type of exchange is a passive process and, as a result, imposes constraints upon the size of a single-celled organism. Materials must be able to reach all parts of a cell quickly, and when volume is too large relative to surface area, diffusion cannot occur at sufficiently high rates to ensure this (Schmidt-Nielson 1984). With this in mind, it is likely that *Chlorella* took advantage of its high surface to volume ratio and dominates species whose ratio is lower (Drakare *et al.* 2003). At last, light was also likely to favour a green alga such as *Chlorella* since it was not limiting both in terms of quality and quantity.

Conclusion

As for medical sciences where FCM monitoring represents a valuable survey analytical tool or more recently in phytoplankton marine ecology when deployed on moored systems (e.g. Thyssen *et al.* 2008), we showed here that FCM could be applied to limnetic survey after simple species identification using the sorting function. In fact, this technique could be applied in some specific cases, for example the monitoring of a blooming species, the study of the physiological state of some species or the impact of a chemical contaminants

(pesticides, metals) on species growth rate. The high time-consuming microscopical determination and counting of phytoplankton limit sampling frequencies below an acceptable level for the monitoring of dynamic ecosystems such as lakes or reservoirs. Although having a limited discrimination power, we showed that simple (and relatively low cost) benchtop FCM may allow the analysis of large numbers of samples and, after taxonomic identification of selected sorted cells by microscopy, can constitute a basic tool for (further) key species bio-monitorings. For this purpose, flow cytometers should be limited to research laboratories and water managers could be trained for the use of such a technology. As pointed out by Jochem (2000), we strongly believe that “flow cytometry is still in its infancy”, especially as regards to phytoplanktonic survey in freshwater ecosystems.

Acknowledgments

We are grateful to Pascal Perney, Jean-Christophe Hustache, Pascal Chifflet (INRA Thonon) and Gérard Paolini (CISALB, Aix-les-Bains), who realised the sampling of the three alpine lakes during the period of this study. Gérard Beaudoin and Yannik Guillemain (IIBRBS) are acknowledged for their help in the sampling of the Reservoir Marne. We want to thank Eliane Menthon for the preparation of the culture media and Jean Claude Druart (INRA, Thonon) for his support in the taxonomic phytoplankton identification.

References

Anneville, O., Ginot, V., Druart, J.C., Angeli, N. (2002). Long-term study (1974–1998) of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva: a multi-table approach. *Journal of Plankton Research*, 24(10), 993-1008.

Anneville, O., Leboulanger, C. (2001). Long-terms changes in the vertical distribution of phytoplankton biomass and primary production in Lake Geneva: a response to the oligotrophication. *Atti Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia*, 14, 25-35.

- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., Canestrari, F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences*, 75(19), 2353-2362.
- Briand, J.-F., Jacquet, S., Flinois, C., Avois-Jacquet, C., Maissonette, C. Leberre, B., Humbert, J.-F. (2005). Variations in the microcystins production of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) assessed by a four years *in situ* survey of Lac du Bourget (France) and by laboratory experiments. *Microbial Ecology*, 50(3), 418-428.
- Callieri, C. (2008). Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater reviews*, 1(1), 1-28.
- Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke R., Waterbury, J.B. (1988). A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334(6180), 340-343.
- Collier, J.L. (2000). Flow Cytometry and the Single Cell in Phycology. *Journal of Phycology*, 36(4), 628-644.
- Collier, J.L., Campbell, L., (1999). Flow cytometry in molecular aquatic ecology. *Hydrobiologia*, 401(1), 34-54.
- Courties, C., Vaquer, A., Trousselier, M., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Neveux, J., Machado, C., Claustre, H. (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature*, 370(6487), 255.
- Crosbie, N.D. (2002). Flow cytometric mapping and isolation of freshwater autotrophic picoplankton. Conference at the ASCMAP (Analysis of single cells in the marine phytoplankton) workshop, Alfred Wegener Institute for polar and marine research, April 2002.
- Crosbie, N.D., Pockl, M. Weisse, T. (2003a). Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2): 361-370.

Crosbie, N.D., Teubner, K., Weisse, T. (2003b). Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 33(1), 53-66.

Crosbie, N.D., Pöckl, M., Weisse, T. (2003c). Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5716-5721.

Dandonneau, Y., Montel, Y., Blanchot, J., Giraudeau, J., Neveux, J. (2006). Temporal variability in phytoplankton pigments, picoplankton and coccolithophores along a transect through the North Atlantic and tropical southwestern Pacific. *Deep-Sea Research*, 53(4), 689-712.

Drakare, S., Blomqvist, P., Bergström, A.-K., Jansson, M. (2003). Relationships between picophytoplankton and environmental variables in lakes along a gradient of water colour and nutrient content. *Freshwater Biology*, 48(4), 729-740.

Dubelaar, G.B.J., Jonker, R.R. (2000). Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Scientia Marina*, 64(2), 135-156.

Ducobu, H., Huisman, J., Jonker, R.R. Mur, L.R. (1999). Competition between a prochlorophyte and a cyanobacterium under various phosphorus regimes: comparison with the Droop Model. *Journal of Phycology*, 34(3), 467-476.

Goddard, V.J., Baker A.C., Davy, J.E., Adams, D.G., De Ville, M.M., Thackeray, S.J., Maberly, S.C., Wilson, W.H. (2005). Temporal distribution of viruses, bacteria and phytoplankton throughout the water column in a freshwater hypereutrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*, 39(3), 211-223.

Grobbelaar, J.U. (2004). Algal nutrition: mineral nutrition. In Richmond A (Ed.), *Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology* (pp. 97-115), Blackwell Publishing.

Hofstraat, J.W., van Zeijl, W.J.M., de Vreeze, M.E.J., Peeters, J.C.H., Peperzak, L., Colijn, F., Rademaker, T.W.M. (1994). Phytoplankton monitoring by flow cytometry: Application of flow sorting to identify phytoplankton cells in natural communities. *Journal of Plankton Research*, 16(9), 1197-1224.

Hoshaw, R.W., Rosowski, J.R. (1973). Methods for microscopic algae. In J.R. Stein (Ed.), *Handbook of phycological methods* (pp. 53-68), London: Cambridge University Press.

Huisman, J., Jonker, R.R., Zonneveld, C., Weissing, F.J. (1999). Competition for light between phytoplankton species: experimental tests of mechanistic theory. *Ecology*, 80(1), 211-222.

Ivanikova, N.V. (2006). Lake Superior phototrophic picoplankton: Nitrate assimilation measured with a cyanobacterial nitrate responsive bioreporter and genetic diversity of the natural community. PhD dissertation, Graduate College of Bowling Green State University, p. 24.

Ivanikova, N.V., Popels, L.C., McKay, R.M.L. and Bullerjahn, G.S. (2007). Lake superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 4055-4065.

Jacquet, S., Briand, J.F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J.C., Anneville, O., Humbert, J.-F. (2005). The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae*, 4(4), 651-672.

Jacquet, S., Lennon, J.-F., Marie, D., Vaultot, D. (1998). Picoplankton population dynamics in coastal waters of the N. W. Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 43(8), 1916-1931.

Jacquet, S., Partensky, F., Marie, D., Casotti, R., Vaultot, D. (2001). Cell Cycle Regulation by Light in *Prochlorococcus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 782-790.

Jaworski, G.M. H., Talling, J.F., Heaney, S.I. (1981). The influence of carbon dioxide depletion on growth and sinking rate of two planktonic diatoms in culture. *British Phycological Journal*, 16, 395-410.

Jochem, F.J., 2000. Probing the physiological state of phytoplankton at the single cell level. *Scientia Marina*, 64(2), 183-195.

Koch, R. (1881). Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. *Mitthe Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 1(1), 1-48.

Komárek, J., Anagnostidis, K. (2005). *Cyanoprokaryota. 2nd part: Oscillatoriales*. München: Elsevier.

Landry, M.R., Hasset, R.P. (1982). Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Marine Biology*, 67(3), 283-288.

Li, W.K.W. (1994). Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: Measurements from flow cytometric sorting. *Limnology and Oceanography*, 39(1), 169-175.

Li, W.K.W., Dickie, P.M. (2001). Monitoring Phytoplankton, Bacterioplankton and Virioplankton in a Coastal Inlet (Bedford Basin) by Flow Cytometry. *Cytometry*, 44(3), 236-246.

Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D. (1997). Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid dye SYBR-Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 186-193.

Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F. & Vaultot, D. (2000). Flow cytometry analysis of marine picoplankton, In R. A. Diamond, S. DeMaggio (Eds.), *In living color: protocols in flow cytometry and cell sorting* (pp. 421–454). Springer Lab Manual.

Masson, S., Angeli, N., Guillard, J., Pinel-Alloul, B. (2001). Diel vertical and horizontal distribution of crustacean zooplankton and young of the year fish in a sub-alpine lake: an approach based on high frequency sampling. *Journal of Plankton Research*, 23(10), 1041-1060.

Mollet, M., Godoy-Silva, R., Berdugo, C., Chalmers, J.J. (2008). Computer simulations of the energy dissipation rate in a fluorescence-activated cell sorter: Implications to cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(2), 260-272.

Nicoud, G., Manalt, F. (2001). The lacustrine depression at Annecy (France), geological setting and quaternary evolution. *Journal of Paleolimnology*, 25(2), 137-147.

Nozaki, H. (2003). Flagellated Green Algae. In J.D. Wehr and R.G. Sheath (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (pp. 225-252). Paris: Academic Press.

Oberhaus, L., Briand, J.F., Leboulanger, C., Jacquet, S., Humbert, J.F. (2007). Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *Journal of Phycology*, 43(6), 1191-1199.

OECD. (1982). *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control*. Paris: Organization for Economic Co-Operation and Development (In French).

Olson, R.J., Vaultot, D., Chisholm, S.W. (1985). Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Research, A* 32(10), 1273-1280.

Olson, R.J., Zettler, E.R. Chisholm S.W. & Dusenberry, J.A. (1991). Advances in oceanography through flow cytometry. In S. Demers (Ed.), *Particle analysis in oceanography* (pp. 351–399). Berlin: Springer-Verlag.

Ouellette, A.J.A., Wilhelm, S.W. (2003). Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(7), 359-366.

Partensky, F., Blanchot, J., Lantoiné, F., Neveux, J., Marie, D. (1996). Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I*, 43(8), 1191-1213.

Partensky, F., Hess, W.R., Vaultot, D. (1999). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 106-127.

Passoni, S., Callieri, C. (2000). Picocyanobacteria single forms, aggregates and microcolonies: survival strategy or species succession? *Verhandlungen - Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 27, 1879-1883.

Pel, R., Floris, V., Gons, H.J., Hoogveld, H.L. (2004a). Linking flow cytometric cell sorting and compound-specific C-13-analysis to determine population-specific isotopic signatures and growth rates in cyanobacteria-dominated lake plankton. *Journal of Phycology*, 40(5), 857-866.

Pel, R., Floris, V., Hoogveld, H.L. (2004b). Analysis of planktonic community structure and trophic interactions using refined isotopic signatures determined by combining fluorescence-activated cell sorting and isotope-ratio mass spectrometry. *Freshwater Biology*, 49(5): 546-562.

Peperzak, L., Vrieling, E.G., Sandee, B., Rutten, T. (2000). Immuno flow cytometry in marine phytoplankton research. *Scientia Marina*, 64(2), 165-181.

Rapala J., Sivonen K., Luukkainen R., Niemela, S. (1993). Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains laboratory study. *Journal of Applied Phycology*, 5, 581-591.

Raven, J.A. (1998). The twelfth Tansley lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional Ecology*, 12(4), 503-513.

Reckermann, M. (2000). Flow sorting in aquatic ecology. *Scientia Marina*, 64(2), 235-246.

Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T. (2005). Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? *Cytometry, A* 64(1), 16-26.

Sarmiento, H., Isumbisho, M. and Descy, J.P. (2006). Phytoplankton ecology of Lake Kivu (eastern Africa). *Journal of Plankton Research*, 28(9): 815-829.

Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbisho, M., Stenuite, S., Gasol, J.M. and Descy, J.P. (2008). Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biology*, 53(4): 756-771.

Schallenberg, M., Burns, C. (2001). Test of autotrophic picoplankton as early indicators of nutrient in an ultra-oligotrophic lake. *Freshwater Biology*, 46(1), 27-37.

Schmidt-Nielson, K. (1984). *Scaling: Why is Animal Size so Important?* Cambridge University Press, New York, 256 pp.

Sensen, C. W., Heimann, K., Melkonian, M. (1993). The production of clonal and axenic cultures of microalgae using fluorescence activated cell sorting (FACS). *European Journal of Phycology*, 28(2), 93-97.

Stein, J.R. (1973). *Handbook of phycological methods and growth measurements*. New York: Cambridge University Press.

Stockner, J.G. (1991). Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: the view from the summit. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 76(4), 483-492.

Stockner J.G., Shortreed, K.S. (1991). Autotrophic picoplankton: Community composition, Abundance and distribution across a gradient of oligotrophic British Columbia and Yuon Territory lakes. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 76(4), 581-601.

Throndsen, J. (1995). Estimating cell numbers. In G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella (Eds.), *Manual on harmful marine algae* (pp 63-80). Paris: UNESCO.

Thyssen, M., Tarran, G. A., Zubkov, M.Z., Holland, R.J. Gregori, G., Burkill, P.H., Denis, M. (2008). The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *Journal of Plankton Research*, 30, 333-343.

Tijdens, M., van de Waal, D.V., Slovackova, H., Hoogveld, H.L., Gons, H.J. (2008). Estimates of bacterial and phytoplankton mortality caused by viral lysis and microzooplankton grazing in a eutrophic lake. *Freshwater Biology*, 53(6), 1126-1141.

Tilman, D., Sterner, R.W. (1984). Invasions of equilibria: tests of resource competition using two species of algae. *Oecologia*, 61(2), 197-200.

Toepel, J., Langner, U. and Wilhelm, C. (2005). Combination of flow cytometry and single cell absorption spectroscopy to study the phytoplankton structure and to calculate the chl a specific absorption coefficients at the taxon level. *Journal of Phycology*, 41(6): 1099-1109.

Toepel, J., Wilhelm, C., Meister, A., Becker, A., Martinez-Ballesta, M. del C. (2004). Cytometry of freshwater phytoplankton. *Methods in Cell Biology*, 75: 375-407.

Vaulot, D. (1989). CytoPC: processing software for flow cytometric data. *Signal Noise*, 2, 8.

Vaulot, D., Courties, C., Partensky, F. (1989). A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry*, 10(5), 629-635.

Vaulot, D., Marie, D. (1999). Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research*, 104(C2), 3297-3310.

Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W. (2000). Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina*, 64(2), 121-134.

Vives-Rego, J., Lebaron, P., Nebe-von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 429-448.

Weisse, T. (1993). Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In J. G. Jones (Ed.), *Advances in microbial ecology* (327-370), New York: Plenum Press.

Weisse, T., Mindl, B. (2002). Picocyanobacteria – sensitive bioindicators of contaminant stress in an alpine lake (Traunsse, Austria). *Water Air Soil Pollution*, 2, 191-210.

Wetzel, R.G. (2001). *Limnology: Lake and River Management*. London: Academic Press.

Yentsch, C.M., Horan, P.K. (1989). Cytometry in the aquatic sciences. *Cytometry*, 10(5), 497-499.

Yentsch, C.M., Horan, P.K., Muirhead, K., Dortch, Q., Haugen, E.M., Legendre, L., Murphy, L. S., Phinney, D., Pomponi, S.A., Spinrad, R.W., Wood, A.M., Yentsch, C.S., Zaharenc, B.J. (1983). Flow cytometry and sorting: a powerful technique with potential applications in aquatic sciences. *Limnology and Oceanography*, 28(6), 1275-1280.

CHAPITRE III

RESULTATS

1. Introduction

Comme nous l'avons vu en introduction générale (Chapitre I), les communautés phytoplanctoniques sont constituées d'assemblages d'espèces présentant des caractéristiques morphologiques (taille, forme...) et physiologiques (mode de nutrition, de reproduction...) différentes, et dont l'organisation est une composante essentielle à la compréhension d'un écosystème. Au cours d'un cycle saisonnier, la composition phytoplanctonique suit des tendances générales, comme décrites par exemple dans le modèle PEG (Sommer *et al.* 1986), qui changent en réponse aux changements dans les conditions environnementales (température, lumière, nutriments) (Reynolds 1997 ; Grover et Chrzanowski 2005) et aux différentes interactions biologiques (brouillage, parasitisme, lyse virale) (Griffin et Rippingale 2001 ; Brussaard 2004 ; Gleason *et al.* 2008). Lorsque l'on s'intéresse aux plans d'eau de type réservoir, une variable susceptible d'être importante concerne les variations saisonnières dans l'hydrologie. Cette dernière est en effet susceptible de jouer un rôle majeur sur la stabilité de la colonne d'eau, ce qui peut avoir un impact important sur la composition de la communauté phytoplanctonique (Fietz *et al.* 2005, Staehr et Sand-Jensen 2006). Le vent est également un facteur environnemental pouvant modifier de manière significative la structure physique du réservoir et constituer par la même un forçage pour le contrôle de la dynamique du phytoplancton (Pannard *et al.* 2007). La vitesse et la direction du vent qui induisent des mouvements de la masse d'eau ainsi que le courant qui est généré par l'arrivée de l'eau dans les canaux d'amenée peuvent également être responsables de la répartition hétérogène horizontale du phytoplancton (Moreno-Ostos *et al.* 2008).

Dans le cas du Réservoir Marne, les conditions physiques sont fortement fluctuantes, l'hydrologie du réservoir change de façon importante au cours de l'année en fonction des phases de remplissage et de vidange, mais aussi en fonction des stations du réservoir. En effet, l'alimentation du réservoir est concentrée dans le lac Champaubert qui a une petite surface (0.5 km²) et une faible profondeur moyenne (4 m), alors que la vidange du réservoir est localisée dans le lac du Der qui a une surface beaucoup plus grande (47.5 km²) et une profondeur moyenne plus importante (8 m), là où se situent les canaux de restitution. Le temps de résidence des eaux semble pouvoir varier entre 1 et 12 mois suivant les stations. Notons également que les deux bassins récréatifs sont isolés du reste du réservoir par des digues et ne suivent pas le régime hydrologique du Réservoir Marne. On peut donc s'attendre

à ce que ce réservoir présente une grande hétérogénéité en terme de composition phytoplanctonique et de dynamique et que les différentes successions mises en évidence par le modèle PEG ne s'adapte que difficilement à cet écosystème. Par ailleurs, au sein d'un écosystème potentiellement hétérogène, il peut être difficile de trouver une station d'échantillonnage de référence qui pourrait refléter au mieux l'écosystème dans son ensemble. A ce sujet, Moreno-Ostos *et al.* (2008) ont précisé récemment que le caractère fragmenté de la structure spatiale du phytoplancton dans un réservoir sous-tend que les procédures de suivi conventionnelles, qui consistent à échantillonner une station généralement localisée au centre du lac ou à proximité de la profondeur maximale, ne sont pas adéquates pour une description pertinente de la biomasse, de la composition et de la dynamique du phytoplancton dans un réservoir. Ainsi, un nombre important de stations d'échantillonnage devrait être adopté, toute contrainte logistique ou humaine étant ici mise de côté et non prise en compte.

Dans ce troisième chapitre plusieurs résultats sont présentés et répondent à certains des objectifs principaux de ce travail de thèse déclinés à la fin de l'introduction générale.

Tout d'abord, nous révélons l'hétérogénéité spatiale de la diversité, la biomasse et la dynamique saisonnière des assemblages d'espèces phytoplanctoniques aux différentes stations examinées. Cet indicateur de l'hétérogénéité du milieu nous a alors permis d'identifier les stations qui semblent refléter le mieux la dynamique du phytoplancton de l'écosystème dans son ensemble, mais également de souligner que certaines stations, typiquement les bassins nautiques, ont leur propres caractéristiques pouvant nécessiter un suivi régulier spécifique, surtout dans la mesure où il s'agit de pôles d'activités récréatives. Ces résultats ont fait l'objet d'un article, sous presse la revue *Water Research*, et présenté ci-après. Cet article réalisé par Rolland, A., Bertrand, F., Maumy, M. et Jacquet, S. intitulé « Assessing Phytoplankton structure and spatio-temporal dynamics in a freshwater ecosystem using a powerful multiway statistical analysis » nous a permis de répondre aux questions suivantes :

Y a-t-il un nombre minimal de stations à échantillonner pour avoir une vision d'ensemble de la dynamique et de la diversité du phytoplancton ?

Peut-on définir une station de référence unique, caractéristique de l'ensemble du réservoir ?

Quelle méthode (d'analyse de données) peut-on utiliser pour répondre au besoin de définition d'une station de référence ?

Peut-on identifier des périodes clefs dans la dynamique saisonnière du phytoplancton qui pourraient constituer des périodes d'échantillonnage caractéristiques ?

Le résumé en français de l'article est précisé. La dynamique et la diversité du phytoplancton sont difficiles à analyser, particulièrement lorsque (i) l'échelle de l'analyse se situe au niveau de l'espèce, (ii) la diversité de la communauté phytoplanctonique est élevée, (iii) l'étude couvre plusieurs saisons et (iv) l'échantillonnage est réalisé sur plusieurs stations de l'écosystème étudié. Pour pallier à cette complexité, des méthodes statistiques ont été développées pour traiter ce genre de « design » expérimental afin de considérer chaque espèce identifiée dans des études spatio-temporelles détaillées. L'analyse triadique partielle, une méthode issue de la famille STATIS, a été appliquée à un jeu de données qui comprenait 6 stations d'un grand réservoir français (le Réservoir Marne), échantillonné 22 fois au cours de deux années (2006-2007) entre mars et septembre. Trois périodes clés en accord avec celles mises en évidence par le modèle PEG (c'est à dire début de printemps, fin printemps et début d'été, fin d'été et début d'automne) ont été déterminées sans ambiguïté, avec certaines espèces associées à chacune d'elles. Par ailleurs, une station de référence potentielle, représentative du plan d'eau dans son ensemble, a été identifiée parmi celles étudiées, ce qui constitue une information très pertinente pour les gestionnaires du plan d'eau. Il reste que trois autres stations devraient être suivies de façon régulière, dans la mesure où leur communauté phytoplanctonique respective possède des caractéristiques spécifiques en termes de dynamique et de diversité.

Dans une deuxième partie de ce chapitre, nous avons focalisé notre intérêt sur la station de référence potentielle proposée pour le réservoir Marne et avons tenté d'identifier les facteurs environnementaux d'ordre physique, chimique et/ou biologique susceptibles d'influencer la biomasse et la dynamique de la communauté phytoplanctonique. Cette étude fait l'objet d'un article en préparation intitulé « Variables environnementales associées à la dynamique du phytoplancton du réservoir Marne à la station de référence : étude exploratoire » qui sera présenté en français dans ce manuscrit. Il nous a permis de répondre à la question suivante :

Existe-t-il des variables environnementales associées à la dynamique phytoplancton qui doivent être contrôlées régulièrement dans le cadre du suivi de la qualité de l'eau de cet écosystème ?

En résumé, les variations saisonnières dans la structure phytoplanctonique des lacs naturels de climat tempéré suivent généralement un schéma assez bien connu tel que décrit dans le modèle PEG par Sommer *et al.* (1986). Cependant, pour les réservoirs, les conditions hydrologiques peuvent largement influencer cette dynamique saisonnière. Durant l'année 2007, nous avons mesuré un certain nombre de variables environnementales d'ordre physique, chimique et biologique et nous avons identifié celles qui étaient associées à la dynamique du phytoplancton à la station de référence. Nos résultats montrent que les variables qui étaient associées à la dynamique de la communauté phytoplanctonique étaient différentes selon les périodes de l'année 2007. Au début du printemps, les concentrations de nitrates élevées et les forts débits entrants étaient associés au début de la croissance du phytoplancton. Au printemps et au début de l'été, l'augmentation du biovolume phytoplanctonique était associée à la diminution de la silice dissoute, utilisée par les chrysophycées. En plein été, on observait les biovolumes phytoplanctoniques maximaux, en lien avec les fortes températures. Cette même période révélait également des corrélations significatives entre les fortes concentrations en chl *a*, bactéries hétérotrophes et certains virus aux profondeurs de 6 et 8 m. Finalement, la fin de l'été et le début de l'automne étaient caractérisés par un débit sortant important dans le canal Marne et des concentrations d'orthophosphates élevées, probablement dues à une intensification de la dégradation de la matière organique.

Finalement, pour répondre aux exigences de la DCE, nous avons tenté de classifier l'état écologique des stations échantillonnées et du réservoir dans son ensemble en se basant sur les limites de classes proposées par le CEMAGREF (De Bortoli et Argillier 2008) pour le phosphore total, la concentration de chlorophylle *a* moyenne estivale, l'indice planctonique lacustre (Barbe *et al.* 2003). Ces derniers résultats, qui font l'objet d'une note en troisième partie de ce chapitre intitulée « Classification de l'état écologique du Réservoir Marne via trois métriques : Chlorophylle *a*, Indice planctonique lacustre et Phosphore total » nous ont permis de répondre aux questions suivantes :

Les trois métriques associées à cet élément (chlorophylle *a*, Indice Planctonique Lacustre, Phosphore total) et utilisées en France à l'heure actuelle donnent-elles la même information quant au statut écologique?

Les résultats de ces trois métriques sur une station potentielle de référence reflètent-ils bien l'état écologique de la masse d'eau dans son ensemble ou s'agit-il d'un écosystème fragmenté?

En résumé, Le phytoplancton est un des éléments de qualité biologique à évaluer dans le cadre de la DCE. Les travaux récents de De Bortoli et Argillier (2008) ont permis de construire les limites de classes d'état écologique pour la métrique chlorophylle *a* et phosphore total pour l'ensemble des plans d'eau du territoire national et l'indice planctonique lacustre (Barbe *et al.* 2003) est utilisé pour définir le niveau trophique des plans d'eau en fonction de l'abondance relative de certaines classes algales. Ainsi, nous avons appliqué les trois métriques aux données recueillies sur quatre des six stations échantillonnées sur le réservoir Marne pendant deux années (2006-2007). Les résultats montrent que les eaux de la station H, assimilée à la station de référence, présentent un état écologique bon à moyen avec un niveau trophique mésotrophe, tout comme la station J (bassin nord-ouest). Par contre, les stations G (lac Champaubert) et K (bassin sud-est) présentent des eaux eutrophes et un état écologique médiocre.

2. Assessing Phytoplankton Structure and Spatio-temporal Dynamics in a Freshwater Ecosystem Using a Powerful Multiway Statistical Analysis

Water Research (sous presse)

Anne ROLLAND^{1*}, Frédéric BERTRAND², Myriam MAUMY² and Stéphan JACQUET¹

¹ INRA, UMR 42 (CARRTEL), Station d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

² IRMA, UMR 7501, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg cedex, France

*Corresponding author: Anne Rolland, rolland@thonon.inra.fr

Keywords: Phytoplankton, Dynamics, Diversity, Partial Triadic Analysis, Sampling strategy, Management

Running Head: Freshwater phytoplankton analysis using multiway statistics

Abstract

Phytoplankton dynamics and diversity are particularly difficult to analyze, especially when (i) the scale of the analysis is situated at the species level, (ii) such a diversity is high, (iii) the study covers several seasons, and (iv) sampling has been performed at many stations of the ecosystem. Fortunately, some powerful statistical methods have been developed with which each species identified can be considered in detailed spatio-temporal analyses. The Partial Triadic Analysis, a method issued from the STATIS family, was applied on a dataset corresponding to 6 stations of the largest French reservoir (Reservoir Marne) sampled 22 times over two years (2006-2007) between March and September. Three key sampling periods that were consistent with those exhibited with the Plankton Ecology Group model (i.e. early spring, late spring-early summer, late summer-early autumn) were unambiguously recognized, with some specific species associated with each of them. Furthermore, a potential reference sampling station was identified among all stations investigated, an information very relevant to both scientists and water managers. It remains that 3 other stations could also be monitored, regularly or from time to time, because of specific phytoplankton characteristics.

Introduction

One of the European Water Framework Directive (WFD) aims is to resist against eutrophication, which is of particular concern for water management and treatment, in order to reach and maintain a “good ecological state” by year 2015 (Borja & Elliott 2007). Recognition of the ecological state (i.e. water quality and functioning) of a lake depends upon evolving bio-indicative criteria related to the presence of species drawn from several categories of organisms. One of them, phytoplankton, is of major importance for the ecological monitoring and understanding of hydrosystems and constitute a potential bio-indicator of both water quality and changes in response to local or more global influences such as nutrient or micro-toxic pollution, temperature or UV increase and species invasion (Wetzel 2001; Kalff 2002). Presently, the main technique to estimate the phytoplankton biomass is based on cell chlorophyll *a* concentration. In order to measure this parameter, a set of *in situ* sensors have been developed by scientists and water body managers, including immergeable fluorimeters (e.g. Beutler *et al.* 2002) or flow cytometers-like machines (e.g. Thyssen *et al.* 2008). However, like satellite-borne biosensors (another category of potential detectors of phytoplankton biomass), those devices are unable to give precise information on species composition and if the interest of the study lies on characterizing phytoplankton dynamics, it is often necessary to combine those methods with classical light microscopy. In fact, this latter technique remains the only one capable of yielding sufficiently precise information about species diversity and composition. In other words, nothing has replaced human-eye observation and expertise so far, and the indices proposed to diagnose the ecological status of water bodies within the European WFD are based indeed on lists of species requiring microscopic identification (Kaiblinger 2008).

It is noteworthy, however, that phytoplankton identification and counts by microscopy are very time-consuming and labor intensive. This is one of the reasons why classical surveys based on taxonomy are generally reduced both in time and space. It remains that the decision to reduce sampling effort should be the consequence of preliminary intensive data acquisition and treatment that would have allowed the identification of key temporal periods and key spatial places in a single ecosystem. Such information might help to guide future sampling strategies, particularly in selecting precisely when and where the samples should be taken. The introduction of the Plankton Ecology Group model (PEG-model) in 1986 proposed 24 sequential statements which describe step by step the seasonal events which occur in the

phytoplankton and zooplankton of an “idealized standard lake” (Sommer *et al.* 1986). The statements concerning phytoplankton can be summarized in four key temporal periods related to the succession of the phytoplankton species. First, towards the end of winter, Cryptophyceae and small centric diatoms develop in response to nutrient availability and increased light. Secondly, the crop of small algae is grazed upon herbivorous zooplanktonic species. As a consequence, phytoplankton biomass decreases rapidly to very low levels to reach a ‘clear-water’ equilibrium phase in spring. Then, herbivorous zooplanktonic species become food-limited and fish predation accelerates the decline of herbivorous planktonic populations. Under these conditions, phytoplankton summer crops start to build up. Succession during summer is highly pronounced. At first, the edible Cryptophyceae and the inedible green algae become predominant. Competition for phosphate leads to a replacement of green algae by large diatoms. Silica-depletion leads to a replacement of the large diatoms by large Dinophyceae and/or Cyanobacteria. Nitrogen depletion favors a shift to nitrogen-fixing species of filamentous blue-green algae. Thirdly, after a minor reduction of algal biomass in response to changes in physical factors, an algal community develops which is adapted to being mixed. Large unicellular or filamentous algal forms appear. Among them diatoms become increasingly important with the progress of autumn. To finish, a reduction of light energy input results in a low or negative net primary production and an imbalance with algal losses which causes a decline of algal biomass to the winter minimum. Said that, it remains obvious that the taxonomic composition of the phytoplankton community may be highly variable among lakes and/or reservoirs (Reynolds 1999). Concerning key spatial places, it is often recommended to sample the deepest station of a lake but this might not be adapted to very large lakes/reservoirs that can present a highly spatial heterogeneity in their horizontal phytoplankton distribution (Reynolds 1984).

Another problem with detailed species-specific data lies on their analysis. Hopefully, the last decades have seen the development of some useful multiway statistical tools that reflect, with considerable precision, the multilinear structures in higher-order datasets (Acar & Yener 2009). Among these multiway analyses, the three-way data analysis called STATIS (Abdi & Valentin 2007), introduced by L’Hermier des Plantes (1976) and Robert & Escoufier (1976) then developed by Lavit (Lavit 1988; Lavit *et al.* 1994), have been used in many research fields such as sensory evaluation (Qannari *et al.* 1995; Schlich 1996), molecular imaging (Coquet *et al.* 1996), brain imaging (Kherif *et al.* 2003), chemometrics (Stanimirova *et al.* 2004), marketing (Perez Aparicio *et al.* 2007) and food science (Martin *et al.* 2000;

Meyners *et al.* 2000; Meyners 2002; Chaya *et al.* 2004; Perez-Hugalde *et al.* 2004; Perrin *et al.* 2008). The related approach is known as “procrustes matching by congruence coefficients” in the English speaking community (Korth & Tucker 1976). In aquatic ecology, the STATIS method has been especially applied to coastal marine ecology (Gaertner *et al.* 1998; Licandro & Ibanez 2000; Lekve *et al.* 2002; Gailhard *et al.* 2003; Muiño *et al.* 2003; Simier *et al.* 2004; Lobry *et al.* 2006). In limnology, this method was rarely used but two applied studies are fundamental. The first one by Centofanti *et al.* (1989) revealed a spatial scheme of a reservoir distinguishing five sectors as a function of several physico-chemical variables. The second study, performed by Anneville *et al.* (2002), helped to identify three homogeneous periods over 25 years (i.e. 1974-1985, 1986-1991 and 1992-1998) in the temporal evolution of the summer phytoplankton community in Lake Geneva. With our dataset, the use of STATIS was not possible as we had a balanced experimental design (i.e. the data matrices had the same number of lines and columns). Consequently, we used the Partial Triadic Analysis (PTA), a method derived from the “STATIS family”. This approach was originally described by Jaffrenou (1978), and then introduced to ecology by Thioulouse & Chessel (1987) (see also Kroonenberg (1989) and Thioulouse *et al.* (2004) for a detailed description). The PTA has been used in several ecological studies (Blanc *et al.* 1998; Blanc & Beaudou 1998; Gaertner 2000; Rossi 2003; Jiménez *et al.* 2006; Ernoult *et al.* 2006; Carassou & Ponton 2007; Pavoine *et al.* 2007) but, to the best of our knowledge, it has never been applied to freshwater phytoplankton ecology.

With this study of phytoplankton ecology of Reservoir Marne, the largest in Western Europe, two main objectives have been pointed out. First of all, using the PTA, we were able to identify the key seasonal periods exhibiting the dynamics of phytoplankton diversity in comparison to those highlighted by the PEG-model. Secondly, we could determine the stations that represent the best the phytoplankton dynamics in the Reservoir Marne. Consequently, we are able to provide some advices to water managers concerning the sampling effort and strategy to operate.

Material and Methods

Site description and data set

The data set issues from the monitoring of the Reservoir Marne (48°34'55''N 04°45'23''E) located in the Champagne region, 200 km east of Paris, France (See Table I for additional information). This large reservoir (48 km²) was constructed in 1974 to control

flooding in winter and early spring and to enhance low flows in summer. The water level varies between 2 and 15 m through the hydrological cycle, with a maximum water volume (309 Mm³) in summer (July) and a minimum (29Mm³) in late autumn (November). Depending on summer climate conditions (wind, temperature) and management strategies, the water column may be stratified for a few weeks. Over the two years survey of the reservoir, 22 field campaigns were performed, 11 samplings in 2006 and 11 samplings in 2007 between March and September at 6 stations (Figure 1). Stations K and J correspond to two basins devoted to recreational activities (e.g. sailing, bathing, windsurfing, fishing) and they are separated from the reservoir by a breakwater. Station G receives water from two input channels, stations I and H are close to the output channels and finally station N is approximately in the middle of the reservoir (Figure 1). This sampling strategy was defined in order to obtain the best picture of the structure of the phytoplanktonic organisms compatible with practicalities of sampling and analysis.

Table I Some physical and chemical characteristics of the stations sampled in the Reservoir Marne for both years. Values are expressed as means and standard deviations over the two years 2006-2007.

	J	K	G	N	I	H
Mean Z* (m)	8.6±0.7	8.3±0.3	6.7±1.5	8.5±1.9	11.5±1.7	12.9±1.7
Max Z* (m)	10.8	8.9	8.4	11.1	13.8	14.8
Mean pH	8.0±0.2	8.0±0.2	8.0±0.3	8.0±0.3	8.0±0.3	8.0±0.3
Mean Temp.* (°C)	18.2±4.3	18.5±4.3	18.4±4.2	17.7±4.7	17.4±4.5	17.3±4.3
Mean Transp.* (m)	2.8±1.4	1.9±1.1	2±1.1	2.4±1.4	2.6±1.3	3±1.5
Mean photic zone thickness (m)	7.0±3.5	4.8±2.8	5±2.7	6.1±3.6	6.5±3.1	7.4±3.7
WRT* (months)	03-déc	03-déc	01-déc	01-déc	01-déc	01-déc
Mean TP* (µg.L ⁻¹)	15.3±4.8	38.0±14.2	40.2±24.4	18.8±6.9	18.7±7.7	22.3±8.6
Mean TN* (µg.L ⁻¹)	736.8±585.4	1003.0±746	1801.7±1077.2	1981.2±940	2086.1±984	2009.2±920.2
Mean Chl a (µg.L ⁻¹)	4.7±2	11.0±8.6	15.8±10.7	6.7±4.0	6.5±3.5	7.1±3.8

* Z: Depth; Temp: Temperature; Transp: Transparency; WRT: Water Residence Time;

TP: Total Phosphorus; TN: Total Nitrogen

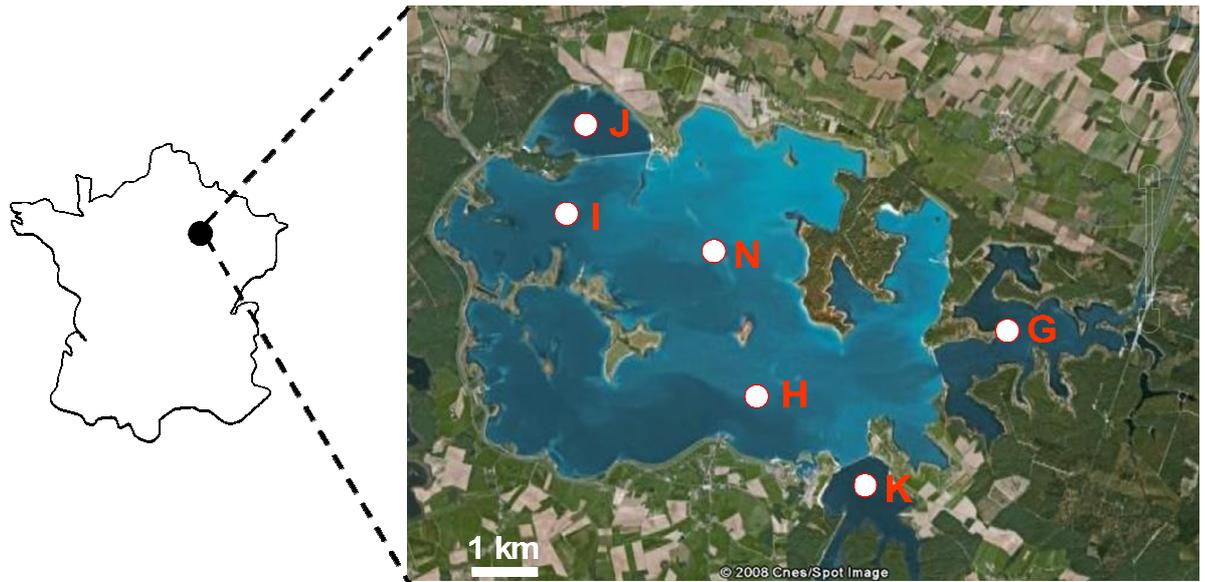


Figure 1 The reservoir Marne (source: Google Earth) and location of the sampling stations

Phytoplankton sampling and analysis

Phytoplankton samples were collected at a depth of 3 m beneath the surface, using a 5-L Van Dorn bottle, and were immediately preserved in Lugol's Iodine solution for phytoplankton counting with an inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) following the Utermöhl procedure (Utermöhl 1958). Algal species were identified and counted at high magnification (x640) along 2 diameters of the sedimentation chamber. Then, the whole slide was scanned at lower magnification (x200) to determine rare species. Abundance was calculated considering the surface area of the 2 diameters counted, the surface of the sedimentation chamber and the volume of water sedimented. Then, the biovolume, that corresponds to the space occupied by a cell or a group of cells in the water column, was estimated considering the different geometric formulae proposed by Hillebrand *et al.* (1999) depending on the form of the cells.

Data preparation

During this analysis, 142 species out of the 297 identified during the 2-year survey, for a total of 138 samples, were taken into consideration. Each of them represented more than 0.01% of the total abundance and more than 0.01% of the total biovolume. These criteria were chosen because most of the other species occurred rarely, some being observed on as few as one or two occasions during the entire study period. Thus, we considered that these very rare species were not really characteristics of the environment and could be omitted from the

statistical analysis. Moreover, from a water management perspective, we know that only well-represented species are important and that these can be viewed as potential indicators of phytoplankton dynamics, water quality and ecosystem functioning.

In fine, these data were assembled inside a matrix comprising 142 columns and 132 rows, in which each column corresponded to a variable (species biovolume) and each sample occupied a row. This matrix was then subdivided into 6 sub-matrices, each corresponding to one station. In order to compare the annual variations of the species biovolumes between the sub-matrices, the data of each one were centered. All the analyses were run using the package ADE-4 (Chessel *et al.* 2004; Dray *et al.* 2007) with R Software (R Development Core Team 2007).

The Partial Triadic Analysis

The PTA is based on the logic of the Principal Component Analysis (PCA). It is designed to study simultaneously several sub-matrices of quantitative data and to detect within the structure any pattern common to these different sub-matrices.

The first step of the analysis is called the inter-structure analysis. It consists in the comparison of the structure of the 6 different sub-matrices (stations) and the identification of the stations sharing a similar annual structure. The calculation of the RV-coefficient matrix between stations allows the comparison of the stations and the representation of the proximity between stations. The function of this step is to attribute a weight to each station sub-matrix (α_k coefficients). The second step is called the construction of the compromise and its analysis involves the building of a mean matrix of maximum inertia (referred to as the compromise matrix). It is derived from the initial sub-matrices in proportion to their weight. A dimensionless value, the Cos^2 , constitutes an indicator of how much the compromise expresses the information contained in each sub-matrix (we talk about the Cos^2 between a sub-matrix and the compromise). Then, the matrix representing the vectorial correlations between the different stations sub-matrices (RV coefficients) provides an indication of the strength of the links among the different sub-matrices from the various stations (Robert & Escoufier 1976). In the compromise matrix, a greater importance is thus given to stations which have a similar structure. This leads to the establishment of a common temporal typology shared by those stations; in other words, the compromise will express the spatially stable part of the annual structure. Finally, the last step is called the intra-structure or

reproducibility of the compromise. The 6 subsets are projected separately onto the compromise to highlight which station fits best to the compromise.

Thus, the results of the partial triadic analysis is made of three successive steps, which, in our case, successfully revealed (1) the proximity between stations, (2) the pattern of phytoplankton dynamics through the two sampling years, and (3) the stability and reproducibility of this pattern for each station.

Results

Analysis of the inter-structure (between-stations analysis)

Figure 2-A illustrates the detection of the similarities between the stations concerning the structure of the phytoplankton community. The representation of the first eigenvalues and eigenvectors shows the similarity between the stations based on their annual phytoplankton successions. The first eigenvalue issued from the inter-structure analysis was isolated from the others and was found to explain 40% of the total inertia. The representation of the eigenvectors on the Euclidean space (Figure 2-B) shows that the 6 components (stations) of the first eigenvector had high values on the first axis. Such a distribution on this axis, which explains most of the total inertia, indicated a strong common spatial structure. On the second axis, the inter-structure analysis emphasized a segregation of groups of stations. It indicated differences in the annual phytoplankton structures between stations. Two groups can be seen on the second axis (Figure 2-B): a group that includes the stations K and J (the two basins) and another one that gathers the stations G, H, I and N (the four stations within the Reservoir Marne). The second eigenvector explained only a minor part of the total inertia (15%). However, such a distribution in the Euclidean space suggested the existence of two main alternatives in the annual pattern identified.

Then, the matrix presenting the vectorial correlations (RV) between the stations sub-matrices (Table II) showed that the strongest correlation ($RV = 0.46$) was observed between the stations H and N whereas the stations G and J pointed out the weakest one ($RV = 0.14$). Moreover, considering the results of the Ward clustering method (Figure 2-C), stations were classified and it confirmed that the stations G, H, I, and N seemed to be linked whereas the other ones (K and J) could be considered as different based on the composition of their phytoplankton community.

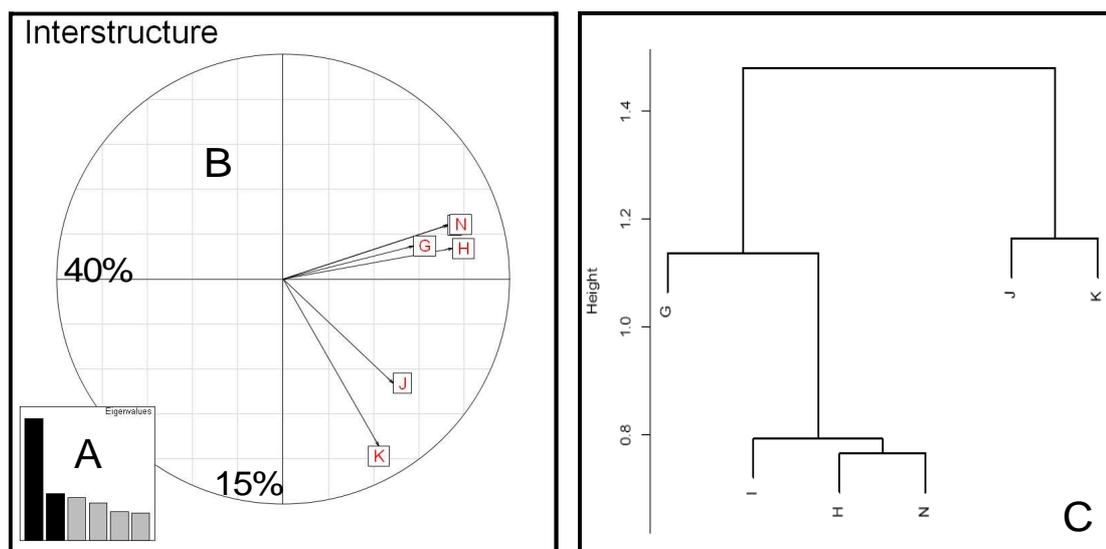


Figure 2 The inter-structure analysis: **A** – Eigenvalues histogram based on the diagonalization of the vectorial correlation matrix. **B** – Coordinates of the 6 data sub-matrices (stations) given by the first two eigenvectors of the vectorial correlation matrix. **C** – Tree topology obtained by a Ward clustering method on 1-RV that indicates the following groups of stations ((G, (I, H, N)), (J, K))

Another piece of information derived from the analysis of the inter-structure is the contribution of each sub-matrix in the construction of the compromise defined as α_k coefficients (Table II). They represent the weight of each sub-matrix in the definition of the compromise. It seems that the sub-matrices H, I and N contributed a larger part in the definition of the compromise suggesting that the other stations had more particular structures leading to a weaker weight. Moreover, looking at some chemical characteristics of the reservoir (mean total phosphorus (TP), total nitrogen (TN) and chlorophyll *a* (chl *a*) concentrations), it can be confirmed that the three former stations are mutually more similar, as compared to the three latter ones (Table I). The last interesting piece of information derived from the initial tables in proportion to their weight is the Cos^2 (Table II). It constitutes an indicator of how much the compromise expresses the information contained in each table. The station H was the one that fits best with the compromise ($\text{Cos}^2 = 0.75$), followed by stations N and I ($\text{Cos}^2 = 0.74$ and 0.73 respectively) whereas the compromise represented with less accuracy the annual phytoplankton dynamics at stations G, J and K ($\text{Cos}^2 = 0.58$, 0.48 and 0.42 respectively).

Table II Matrix of vectorial correlation coefficients between the tables (RV), weight of each table (α_k) in the construction of the compromise, and quality index of the compromise's structure (Cos^2) for each station.

Tables		RV				Weight (α_k)	Cos^2
H	1					0.49	0.75
N	0.46	1				0.48	0.74
I	0.45	0.44	1			0.47	0.73
G	0.29	0.31	0.3	1		0.37	0.58
J	0.25	0.23	0.23	0.14	1	0.32	0.48
K	0.21	0.17	0.17	0.18	0.18	1	0.42

Analysis of the compromise

The first three axes only accounted for 48% of the total inertia with 26% for axis I, 12% for axis II and 10% for axis III. However, given the great number of variables (i.e. 142) they provided a good summary of the temporal species organization over the 6 stations for the two sampling years. The projection of the samples (dates) on the Euclidean planes I-II (Figure 3-A) and II-III (Figure 3-C) provides a graphical representation of the compromise, whose interpretation requires consideration of the correspondences with the species. In fact, the species contributing the most to the annual phytoplankton structure are shown in Figure 3-B and 3-D. To facilitate Figure 3 reading, each sampling date has been associated with a number (see Table III for correspondence). Moreover, the Kendall τ rank correlations (Kendall 1976) between the species and the Euclidean coordinates (Figure 4) allowed the selection of the 89 species that are most responsible for the observed annual distribution. As these 89 species accounted for the major part of the phytoplankton biovolume (73.6% of the average phytoplankton biovolume per sample), their changes were considered to be representative of those of the whole phytoplankton community.

Table III Correspondence between the sampling dates and their number on the different figures

Samples' number	Dates	Samples' number	Dates
1	06/03/2006	12	18/04/2007
2	04/04/2006	13	16/05/2007
3	03/05/2006	14	30/05/2007
4	07/06/2006	15	12/06/2007
5	28/06/2006	16	20/06/2007
6	04/07/2006	17	03/07/2007
7	24/07/2006	18	25/07/2007
8	07/08/2006	19	07/08/2007
9	22/08/2006	20	29/08/2007
10	05/09/2006	21	11/09/2007
11	19/09/2006	22	26/09/2007

The first axis of the analysis was defined by two distinct assemblages (Figure 3-B and Figure 4) essentially composed of microphytoplankton and to a lesser extent of nanophytoplankton. The first assemblage could be divided into two groups (positive part of the first axis). Half of the major taxa belonged to the Chlorophytes and they were mainly represented by non motile species. They were found in the colonial form (for example *Scenedesmus* spp., *Crucigenia tetrapedia*, *Pediastrum* spp., *Coelastrum* spp., *Crucigeniella rectangularis*, *Tetrastrum triangulare*) as well as in the individual form (for example *Tetraedron minimum*, *Golenkinia radiata*, *Dydimocystis bicellularis*, *Lagerheimia ciliata*, *Monoraphidium minutum*). Some Cryptophytes (*Cryptomonas* sp, *Rhodomonas minuta*, *Rhodomonas minuta* var *nanoplantica*) were also part of this group. Moreover, some individual Euglenoids (*Trachelomonas* spp., *Phacus* spp., *Euglena* sp.), Desmidiates (*Closterium aciculare*, *C. acutum* var *variable*, *Staurastrum* sp.) considered as “R” strategists (Ruderal species i.e. they need high resources but low energy) and Cyanobacteria (*Aphanizomenon* spp., *Chroococcus limneticus*, *Planktothrix agardhii*, *Woronichinia naegeliana* to name the most important ones) often viewed as specialized species (“S” strategists or Stress-tolerant i.e. they are adapted to low resources water systems) (Grime 1979; Reynolds 1988; Padisak 2004) constitute another cluster within this first assemblage. The second assemblage located in the negative part of the first axis was composed of larger species in the colonial form (*Dinobryon sertularia*, *Fragilaria crotonensis*) or in the individual form (*Gymnodinium helveticum*, *Cryptomonas rostratiformis*, *Cyclotella*

bodanica). These were all observed to be relatively more common in spring and early summer. Then, the projection of the sampling dates on the compromise (Figure 3-A) showed that the two clusters of the first assemblage characterized the end of summer (August) and the beginning of autumn (September) for both years (8, 9, 10, 11 in 2006 and 19, 20, 21, 22 in 2007). In contrast, in the negative part of the first axis, the sampling dates were related to the first half of the year including spring and early summer (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 2006 and 12, 13, 14, 15, 16, 17 in 2007). Thus, Axis I defined a spring - early summer assemblage and a late summer - early autumn assemblage.

The second axis was defined by two distinct assemblages (Figure 4). One assemblage was dominated by colonial Chrysophytes (*Dinobryon* spp.), the individual flagellate Chlorophyte *Phacotus lendneri*, some Desmidiates from the genus *Cosmarium* and a Dinoflagellate called *Peridinium aciculiferum* whereas the second one was essentially composed of large individual Diatoms (*Gyrosigma acuminatum*, *Nitzschia acicularis*), little Chlorophytes species (undetermined small Chlorophytes, *Monoraphidium kormakovae*) and some others. Thus, the axis II appeared to reflect a gradual change from a winter-spring assemblage to a summer one with gradual shifts from the dominance of larger forms towards small colonial or unicellular species characteristics of warmer seasons. In addition, the distribution of the sampling dates on the compromise reflected a transition from March-May 2006 (1, 2, 3) to June-July 2006 (4, 5, 6, 7) and to a lesser extent from April-May 2007 (12, 13, 14) to June-July 2007 (15, 16, 17, 18). In fact, Axis II showed with precision the changes that occurred during the first half of the year 2006 rather than 2007 and it made the differentiation between species characteristics of winter-spring and early summer within the phytoplanktonic community of the Reservoir Marne.

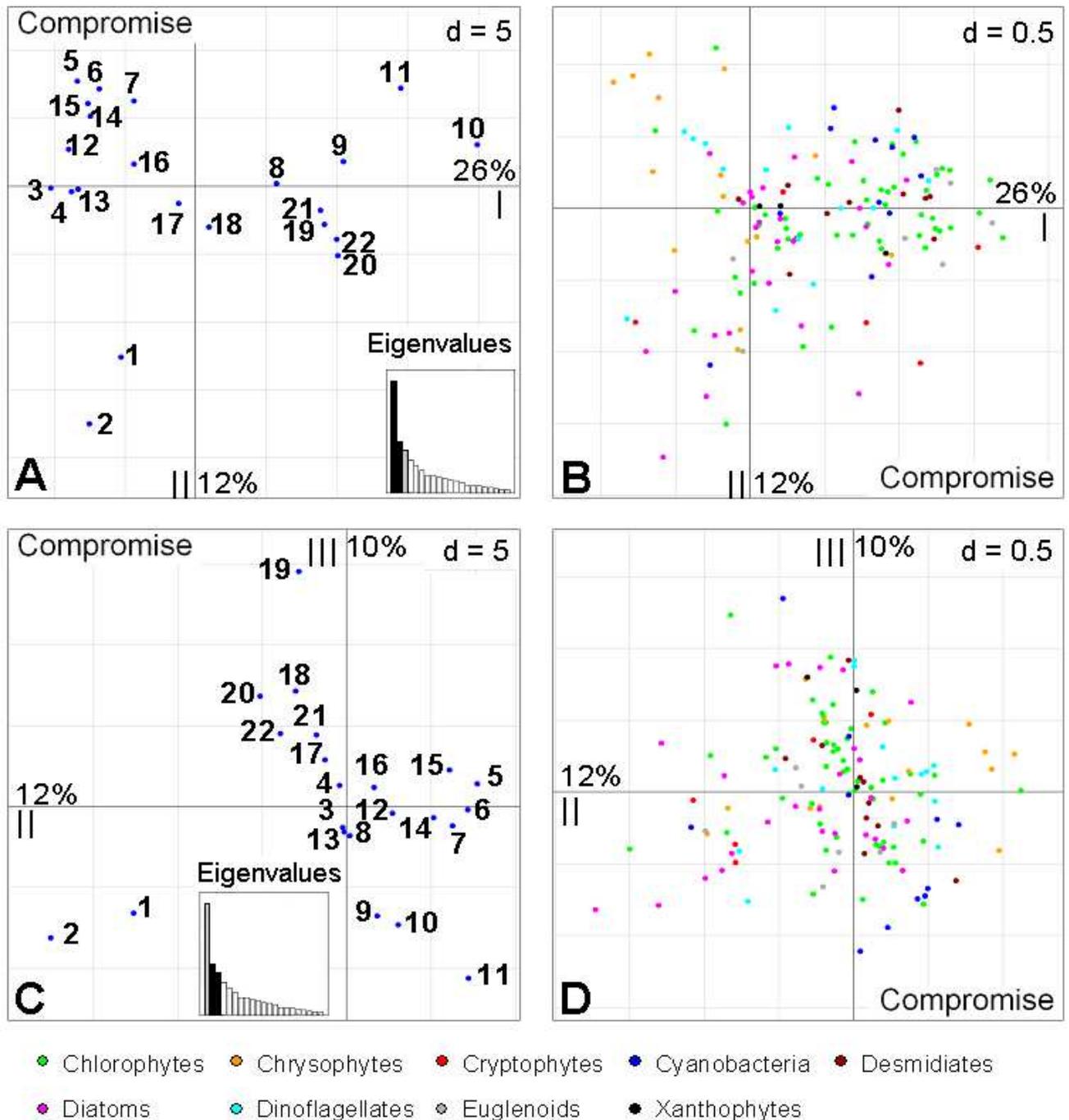


Figure 3 The compromise analysis (average station): **A** – Coordinates of the sampling dates in the first plane (axes I-II) of the compromise and histogram of eigenvalues identifying the prominence of the two first axes that define the average spatial structure. (Table III contains the correspondence between numbers and dates) **B** – Projections of the variables (species) in the first plane (axes I-II) of the compromise. **C** – Coordinates of the sampling dates in the second plane (II-III) of the compromise and histogram of eigenvalues identifying the contribution of the second and third axes in the construction of the compromise. **D** – Projections of the variables (species) in the plane defined by the axes II and III of the compromise.

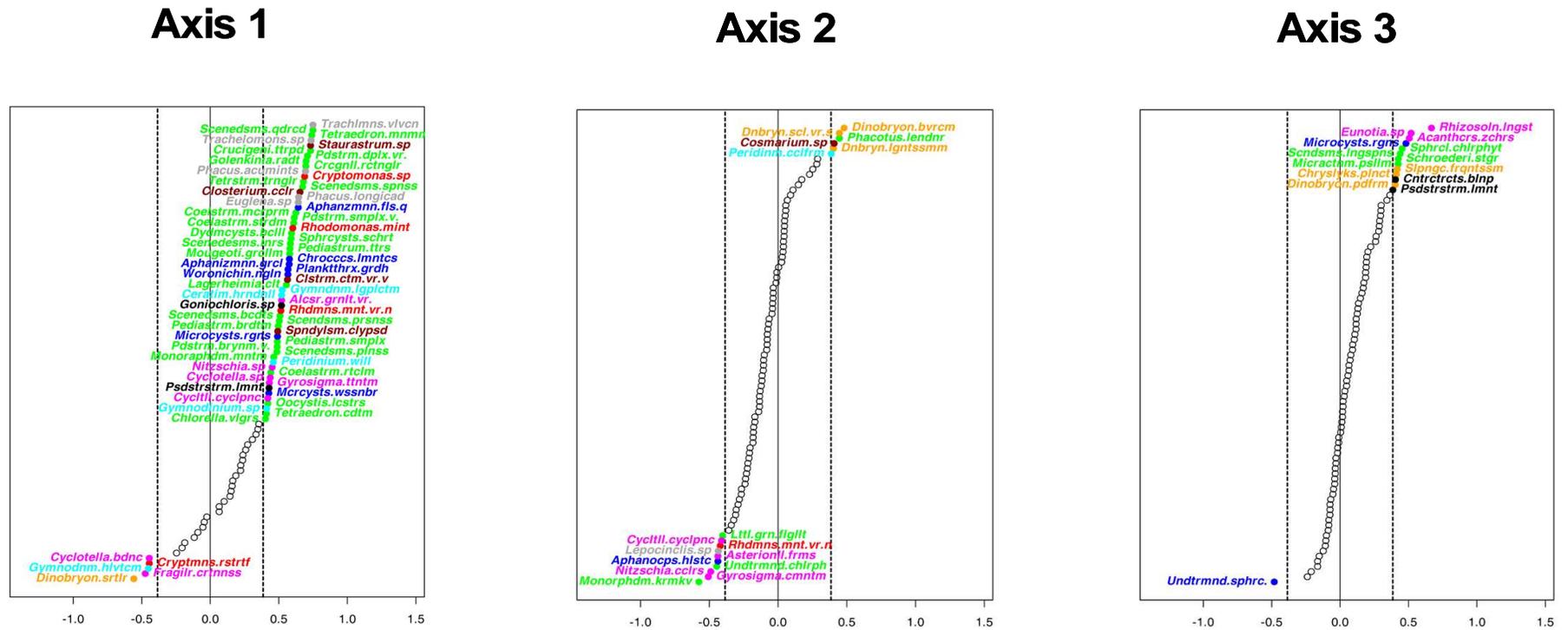


Figure 4 Kendall τ rank correlations between species biovolume and factorial coordinates on the first three axes: 89 species were found to be significantly correlated with these axes (for $\alpha = 1\%$)

Then, the third axis is also defined by an assemblage composed of some undetermined spherical cyanobacteria that were at the opposite of another group characterized by a mixed assemblage with some well-identified large Diatoms (*Rhizosolenia longiseta*, *Eunotia sp* and *Acanthoceras zachariasii*), a colonial Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*), small unicellular (undetermined Chlorophytes and *Schroederia setigera*) and colonial (*Scenedesmus longispinus* and *Micractinium pusillum*) Chlorophytes as well as some small unicellular Chrysophytes (*Salpingoeca frequentissima* and *Chrysolykos planctonicus*) (Figure 3). The distribution of the sampling dates (Figure 3-C) showed that axis III mainly reflected the differences of the late summer-early autumn phytoplankton assemblages between the two sampling years. In fact, late August and September 2006 (9, 10, 11) were opposed to late July and August 2007 (18, 19, 20). The correspondence with the species (Figure 3-D) showed that the 2006 assemblage was characterized by several Cyanobacteria in the unicellular form (undetermined spherical Cyanobacteria), in the colonial form (*Woronichinia naegeliana*) and in the filamentous form (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudanabaena limnetica*) as well as a filamentous Chlorophyte, *Mougeotia gracillima* and a unicellular one *Treubaria triappendiculata*. On the contrary, the 2007 assemblage was defined by the presence of large Diatoms, a potentially toxic colonial Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) and some other algae cited above (small unicellular chlorophytes and chrysophytes as well as colonial chlorophytes).

To summarize, following the analysis of the three axes, it seems that three temporal periods can be highlighted considering the distribution of the dates and the arrangement of the species on the first two axes. The first one corresponds to early spring, the second one is related to late spring and early summer and the third one refers to late summer and early autumn.

Analysis of the intra-structure (reproducibility of the compromise)

The reproducibility of the compromise for the stations can be represented for species (Figure 5-B) and for dates (Figure 5-A). It allows the discussion about the spatial evolution of species-dates links (internal typology for each sub-matrix). To do that, the lines (Figure 5-A) and the columns (Figure 5-B), from the separated analyses of each sub-matrix, have been projected on the first plane of the compromise. These projections confirm that the analysis is centered on the station sub-matrices H, N and I because the general pattern for the distribution of the points for the dates and for the species is in accordance with the pattern pointed out by

the compromise. This observation implies that there were only a few differences between seasonal changes in the composition of the phytoplankton community between these three stations and the compromise. Moreover, this confirms the information given by the elevated values of the α_k and the Cos^2 . On the contrary, the general pattern observed for stations K, J and G concerning the distributions of the dates and the species differed from the distribution obtained with the compromise. In fact, they had their own structure compared to the other three stations. The projection of the sampling dates on the axes of the compromise for each of these three stations revealed a distribution that was different from the compromise's one, indicating that the phytoplankton community had its own seasonal dynamics in the stations K, J and G. Finally, the species distribution as a whole differed from the distribution of the species on the compromise indicating that species diversity was not the same in these three stations.

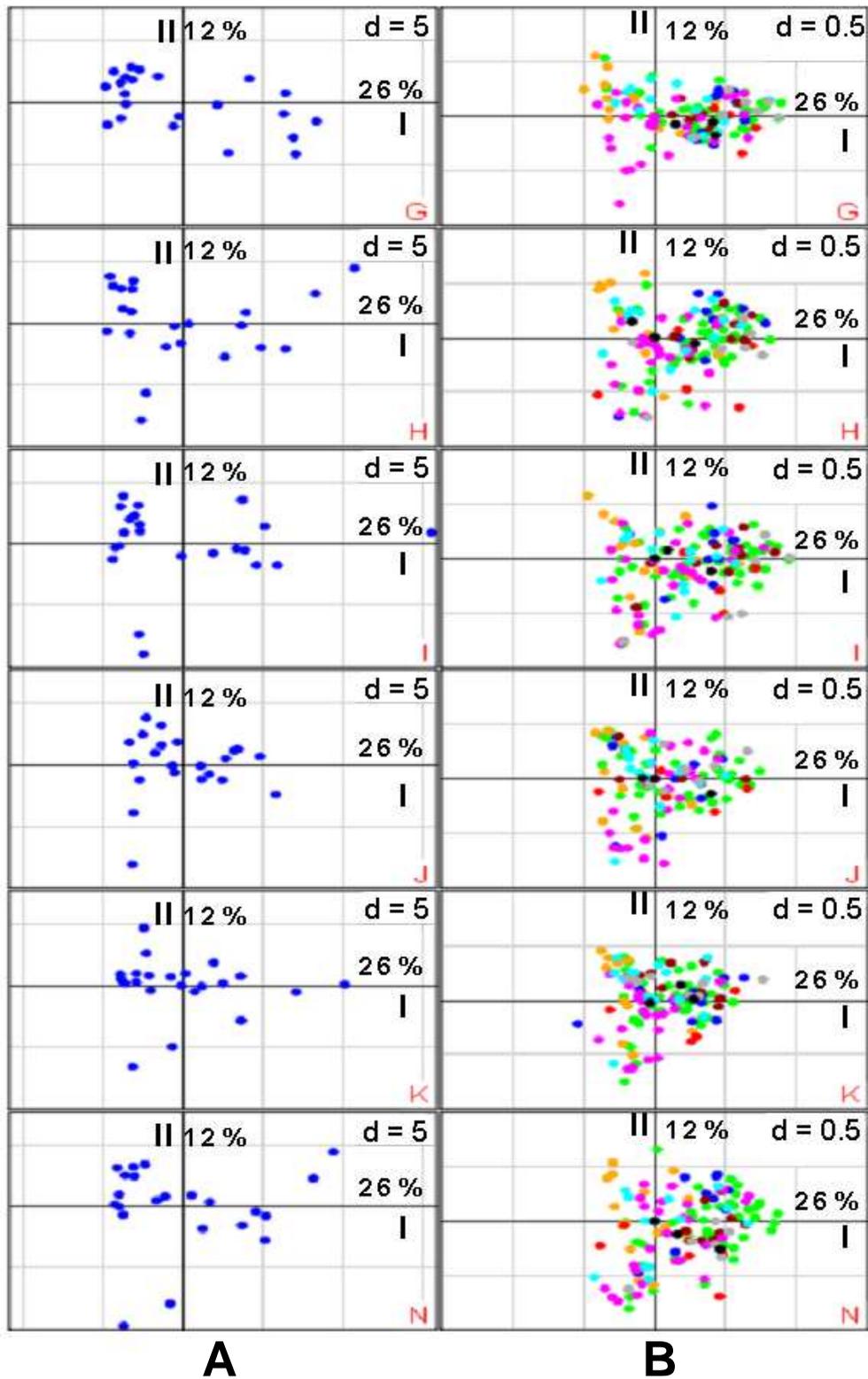


Figure 5 Analysis of the reproducibility of the compromise structure: A- Multiwindowed projection (by station) of rows (dates) on the first plane of the compromise. B- Multiwindowed projection (by station) of columns (species) on the first plane of the compromise.

Discussion

According to the PEG-model (Sommer *et al.* 1986), some basic trends of planktonic succession in lakes are well-known. This can be related to a variety of different factors such as the trophic status, the hydrological regime, the relative importance of the heterotrophic compartment to name only a few. The overriding differences between lakes and reservoirs relate mainly to hydrography and to the hydraulic exchanges (Reynolds 1999). For example, the Reservoir Marne is prone to important level fluctuations along the year, and the water residence time is short (between 1 and 12 months depending on the sampling station). Consequently, stratification in this reservoir is absent or very weak and this is likely to have an impact on phytoplankton composition in selecting for species that are more or less tolerant to mixing.

Seasonal dynamics of the phytoplankton community

The early spring assemblage was judged exclusively by the species represented in 2006, because no sampling was carried out in March 2007. The species present in April 2007 were dominated by species of spring and early summer, according to the vectorial coordinates on the second axis. In March and April 2006, *Gyrosigma acuminatum* and *Nitzschia acicularis* were the two main Diatoms. The PEG-model generalizes that small centric Diatoms often develop in early spring (Sommer *et al.* 1986) but some authors have observed that large pennate diatoms can make a significant contribution to the biovolume of the phytoplankton community during this period in rivers (Leland *et al.* 2001; Ha *et al.* 2002), ponds (Rojo *et al.* 2000) or estuaries (Roy *et al.* 1996). In fact, these species, often considered as “R” strategists, have low nutrients requirements (Grime 1979; Reynolds 1988; Padisak 2004). Moreover, they can live in strong-flowing waters that come from the rivers that feed the reservoir and consequently rely on physical perturbations to remain in suspension. The physical mixing in the upper lit layers is essential to the continued suspension of non-motile species with no other means of offsetting a constant tendency to sink. In addition, the coexistence of large diatoms and small chlorococcales has been observed in the eutrophic temperate lake Vechten (Holland) (Gulati & Parma 1982) and two shallow lakes with a weak stratification, Lake Tjeukemeer (Holland) (Gulati & Parma 1982) and Lake Heimdalsv (Norway) (Larsson *et al.* 1978). This could confirm the importance of small undetermined Chlorophytes during this period, i.e. cosmopolitan species growing fast.

An assemblage of several species (*Dinobryon sertularia*, *Fragilaria crotonensis*, *Cyclotella bodanica*, *Gymnodinium helveticum* and *Cryptomonas rostratiformis*) characterized the 2006 and 2007 spring and early summer periods (negative part of the first axis and positive part of the second axis). *Cryptomonas* spp are considered to be fast-growing and opportunistic species and they are known to be part of the key species that establish and infest the water systems in spring (Sommer 1985a). These small species are generally considered as “C” strategists (competitive species, i.e. they need high resources and energy) with high intrinsic growth rates and high metabolic activity (Grime 1979; Reynolds 1988; Padisak 2004). They also benefit from high concentrations of nutrients and low grazing pressure. In addition, Diatoms such as *Fragilaria crotonensis* can be associated with the beginning of the summer period in shallow temperate lakes with a mesotrophic status (Yang *et al.* 1996). According to Vollenweider & Kerekes (1982), the trophic status of the Reservoir Marne can thus be considered as mesotrophic for most of its capacity (stations H, I, N, J) whereas the stations K and G seem more eutrophic (Table I). Thus, it is not surprising to find this Diatom in the reservoir during this period of the sampling season. In addition, the dependence upon physical mixing is strongly apparent, requiring a continuous or semi-continuous mixed layer of 2-3 m in thickness. Diatoms can also be associated with Desmidiates (Townsend & Luong-Van 1998; Watanabe *et al.* 2000; Negro *et al.* 2003). *Gymnodinium helveticum* has never been identified with *Fragilaria crotonensis* and *Cyclotella bodanica* but it has been shown that Desmidiates can be more or less abundant than Diatoms in this kind of associations (Reynolds *et al.* 2002). Moreover, *G. helveticum* seems to present its maximum development in spring, during the decline of the Diatom bloom whereas in summer, the species is almost completely absent from the epilimnion and occupies the meta- and hypolimnion (Wille & Hofmann 1991). Then, we can see that *Dinobryon sertularia* was a summer species. This species is often found in nutrient-rich water systems and the position of this species in the spring-early summer period can be viewed as a transition through a mature summer assemblage essentially composed of Chrysophytes (Barbiero & McNair 1996; Clegg *et al.* 2003). In fact, *Dinobryon* spp. (*Dinobryon bavaricum*, *D. sociale* var *stipitatum*, *D. elegantissimum*), often defined as “S” strategists, appeared as typical summer members of the plankton community (positive part of the second axis). These species are obligate CO₂ users, their sensitivity to enrichment and relative absence in high-alkalinity waters is down to difficulties of carbon acquisition (Reynolds *et al.* 2002; Padisak 2004). On the contrary, species like *Cosmarium* sp. tend to be present in more eutrophic

waters (Spijkerman & Coesel 1996; Stamenkovic & Cvijan 2008). Surprisingly, the dinoflagellate *Peridinium aciculiferum* seemed to be one of the species characterizing the positive part of the second axis that represented the early summer 2006. This species is known to be present in winter plankton for a short time (February-March) and it can be a dominant species in March. A possible explanation for this incoherence can rely on a mistake in the identification. In fact, some *Peridinium aciculiferum* morphotypes could be confused with some *Peridinium umbonatum* morphotypes (Popovsky & Pfiester 1990). The size range of the former can fit into the size range of the latter. Moreover, as plates are not always visible on samples preserved in Lugol's Iodine solution and spines can be located at the same place in both species, it might be possible that we identified *Peridinium aciculiferum* instead of *Peridinium umbonatum*. Like *Peridinium willei*, this species is actually considered as a cosmopolitan species living in water systems from oligotrophic to mesotrophic status and whose abundances can be high in all seasons (Popovsky & Pfiester 1990; Lewis & Dodge 2002). Concerning *Phacotus lendneri*, high abundances have been found in summer in Lake Geneva (Anneville *et al.* 2002) leading to bloom formation in some cases (Bluszcz *et al.* 2008). In addition, this species is widely distributed all year long, growing in waters whose temperature fluctuates from 15 to 25°C and whose trophic status varies from oligo- to hypertrophic water systems (Schlegel *et al.* 1998). Given the high mean temperatures found in the Reservoir Marne as well as the mean TP concentrations (Table I), the results obtained in our study are consistent with what has been found in previous studies.

Finally, the phytoplankton dynamics during late summer and early autumn showed that different species with various ecological strategies share the same habitat (positive part of the first axis) and are the main contributors to the phytoplankton biovolume. This is in agreement with the PEG-model that describes the seasonal succession of algae and insists on the development of a rich summer algal growth typical for nutrient-rich water systems (Sommer *et al.* 1986). In fact, colonial Chlorophytes and Cryptophytes often form the dominants in the summer phytoplankton. These large algal species have a slower growth rate than small ones that have short generation time. Nevertheless, they present an exponential increase within a few days (Sommer *et al.* 1986). Most of these species are characteristics of shallow, enriched lakes (Reynolds *et al.* 2002) and are found in summer in Lake Geneva (Anneville *et al.* 2002). Then, in late summer and early autumn, several classes of algae can be represented in the phytoplankton community. First of all, Cyanobacteria are the typical phytoplankton dominants of all lakes with rich summer algal growth. Species identified in the

Reservoir Marne were both filamentous (*Planktothrix agardhii*, *Aphanizomenon spp*) and colonial (*Woronichinia naegeliana*). These specialized species are often of large size with low surface to volume ratios. In addition, they are stress-tolerant species with special adaptations such as the ability to utilize organic resources or to store nutrients (Reynolds *et al.* 2002). Their main selective advantage is their high resistance to grazing because of their size, their high resistance to sedimentation due to their motility or buoyancy and their ability to migrate vertically (Mur *et al.* 1999). Sometimes, they can be accompanied by Dinoflagellates but this was not observed in the Reservoir Marne. Later on in the early autumn period, Desmidiates appear. The three species identified (*Closterium aciculare*, *Closterium acutum var variabile* and *Staurastrum* sp) are generally found in nutrient-rich water systems and their growth is known to be favored when the water column is mixed instead of being stratified. Then, despite the lack of information on Euglenoids in the PEG model, it is well known that these cosmopolitan species occur in shallow, nutrient-rich systems when mixing process increases due to changes in wind velocity during summer and early autumn (Samuels & Mason 1997; Celik & Ongun 2006). As the Reservoir Marne is a highly exposed water mass, this results in nutrient replenishment available for the Euglenoids' growth. To finish, we can mention, as it was done in Reynolds *et al.* (2002), that some water systems can support algal flora which have not been well characterized. Several functional groups can be mixed as it is the case for the positive part of the first axis. As an example, we can find, in shallow and enriched systems, species of groups D (Diatoms), J (*Scenedesmus*, *Pediastrum*, *Coelastrum*), X1 (*Chlorella*, *Ankyra*, *Monoraphidium*, *Golenkinia*, *Treubaria*), Y (*Cryptomonas*) and W (Euglenoids, Chrysophytes, Desmidiates) all together (See Reynolds *et al.* 2002 for more details).

*Differences between the two sampling years for the late summer-early autumn period:
the importance of the third axis of the compromise*

As presented in the results, the third axis clearly separated the 2006 late summer-early autumn period from the 2007 one. In 2006, undetermined spherical Cyanobacteria contributed to a great part of the biovolume. These Cyanobacteria are assumed to be isolated cells of *Microcystis aeruginosa* because of their size, their shape and their pigmentation. Generally, these algae are found in the colonial form but as samples are preserved in Lugol's Iodine solution, it might be possible that they were broken. This alga is one of the most widely reported, and typically forms blooms that may persist throughout the summer in enriched

lakes (Mur *et al.* 1999). The other algae that characterized this period were also Cyanobacteria, in the colonial (*Woronichinia naegeliana*) or filamentous form (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudanabaena limnetica*). *W. naegeliana* can also contribute to a great part of the cyanobacterial biovolume during the end of summer in mesotrophic lakes but is rarely a major component of blooms (Reynolds *et al.* 2002). The autumnal assemblage also included filamentous Cyanobacteria and a filamentous Chlorophyte, *Mougeotia gracillima*, whose morphological and functional properties make them close to K-selected species (i.e. they grow slowly but can better exploit scarce resources). The heterocysteous Cyanobacteria *A. flos-aquae*, a dinitrogen-fixing species (tolerant to low nitrogen concentrations in the water) is often found in eutrophic systems and can form dense blooms in temperate zones. This is a characteristic species of the autumnal period in Lake Geneva (Anneville *et al.* 2002). *P. agardhii* and *P. limnetica* are two photoadapting solitary filamentous Cyanobacteria from the so-called functional group “S1” (Reynolds *et al.* 2002). They are commonly found among enriched, exposed and generally shallow lakes at most latitudes, where they can aspire to monocultural populations persisting throughout the year. Another distinctive Chlorophyte, *Treubaria triappendiculata*, part of the group “J” (mainly non gelatinous, non-motile Chlorococcales) (Reynolds *et al.* 2002) have the characteristics to be prominent in shallow, highly enriched systems and completed the list of the different species that characterize the 2006 late summer-early autumn assemblage. As we can see, all these species are found in nutrient-replete water systems and this is in agreement with the mesotrophic status of the Reservoir Marne whose annual mean TP concentrations are between 15 and 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ depending on the stations.

Then, the 2007 species that are at the opposite of the 2006 species belong to several classes. The large Diatoms (*Rhizosolenia longiseta*, *Eunotia sp* and *Acanthoceras zachariasii* as well as *Asterionella formosa*) generally started to develop in early summer, in parallel with the development of the early-summer species. Since they are better adapted for autumnal conditions (deepening of the mixed layer, decreasing vertical temperature gradient and light intensity), they become dominant in late summer and autumn. Diatoms become increasingly important as autumn progresses and the community shifts to the winter species. In addition, elevated silicate concentrations can contribute to Diatoms growth (Sommer 1985b). In fact, during mixing process at the end of summer and the beginning of autumn, Diatoms can become dominant because dissolved silicate is replenished from deeper water. Some authors also suggest that the Diatoms growing at the end of summer are those who required important

nutrient concentrations (Miyajima *et al.* 1994; Benson-Evans *et al.* 1999; Heo & Kim 2004). However, some others pointed out that the mixed water system in autumn decreases competition for nutrients and leads to a shift to algae with progressively lower light requirements (Sommer *et al.* 1986; Reynolds 1987; Reynolds 1999). The autumnal species replacements can thus be understood as a sequence of species with increasingly lower light requirements. Therefore, direct physiological effects of temperature and sedimentation should play less of a role than traditionally assumed. Among Chlorophytes, small unicellular (undetermined Chlorophytes and *Schroederia setigera*) and colonial (*Scenedesmus longispinus* and *Micractinium pusillum*) species have been identified to be characteristic of the 2007 late summer period. They are non flagellate and non motile species, thus favored by water column mixing. Moreover, these colonial species possess spines that can be considered as a way to resist against predation.

The colonial Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* could be characteristic of the 7th August 2007. It is well-known that today's populations are not the product of today's conditions and the responses always lag by days (cells) to weeks (populations). In the present study, the weeks preceding the beginning of August presented some specific features related to meteorological conditions. In fact, previous weeks were hot and well-insolated but they were also the windiest. Consequently, the water column was not stratified during this period even though this species generally develops in stratified water layers. Thus, it might be possible that the windy conditions associated with the shallow depth suspended the *Microcystis* colonies that were detectable and presented an elevated biovolume during this period.

Part of the explanation for the differences between the two years can rely on meteorological conditions. Summer 2006 was hot and shinny whereas summer 2007 was cool and windy. In September 2006, the phytoplankton community was still a late summer community whereas in 2007, the phytoplankton composition turned to an autumn community much more rapidly. The 7th August 2007 could be the turning date to autumn because *Microcystis aeruginosa* is often considered as an early autumn blooming species. Then, the following dates are more associated with a late autumn community composed of large Diatoms, small opportunistic Chlorophytes and Chrysophytes rather than a late summer one. Moreover, the bad meteorological conditions and the strong wind exposure could also explain that Cyanobacteria were not characteristic of the 2007 sampling year whereas in 2006, conditions were quiet, with low turbulence due to calm winds and high irradiance that favored

their growth. All these results highlight also that 2 years is a minimal duration for ecosystem water quality survey.

Stations K, J, G versus the others and identification of a reference station

One of the great interests of the statistical method used here relied on the possibility to identify the stations that represented with the most accuracy the situation described by the compromise and consequently to point up a potential reference station after having extensively sampled the water system. We assume that this is of particular relevance for water managers to define an adequate sampling strategy and plan accurate management policy. As presented in the results, the stations H, N and I were good candidates as reference stations for the whole reservoir whereas the stations K, J and G were more atypical with their own seasonal trends in phytoplankton composition. Somehow, this agrees with the fact that K and J are located in two closed basins that are not directly connected to the main reservoir. The station J could be viewed as a mesotrophic station whereas the station K could be an eutrophic station, with elevated annual mean TP and chl *a* concentrations agreed with. In fact, the latter receives polluted water from a small stream whose trophic status is hypereutrophic and causes the development of invasive algae. The station G is also a nutrient-rich station, with an elevated annual mean TP concentration, that receives water from two feeding channels. Historically, the basin including the station G was the Reservoir Marne in itself, inaugurated in 1938. Then, in 1974, it was enlarged to allow the storage of larger volumes of water. This station, in turn, could be regarded as the feeding station of the reservoir because it communicates with the stations H, N and I that are part of the extended reservoir. Those stations, as they are quite identical to the seasonal trends and the phytoplankton distribution on the compromise could be considered as reference stations. Strictly regarding the values of the Cos^2 , the station H can be proposed as the reference station to chose for water quality survey of this short-time water residence ecosystem. Nevertheless, this does not mean that the other stations are not important or interesting for an ecological perspective. Typically, as the stations K and J are the places for recreational activities, they should be taken into account in the sampling strategy and be at the center of the water managers' interests, especially regarding the cyanobacterial risk in summer. The station G, as it is the receptacle of water from the channels and consequently the rivers Marne and Blaise, could also be an important station to sample and monitor, for the same reason than above.

Conclusion

The PTA revealed three key sampling periods with associated key species, the first one corresponding to early spring, the second one to spring-early summer and the last one to late summer-early autumn which is in agreement with the PEG-model. Moreover, four stations could be chosen for the survey of the reservoir water quality, the station H as the reference and stations K, J and G for their own specificity. This is particularly important to define the best sampling strategy protocol for water managers in the context of the European WFD. With this objective in mind, the PTA appears as a very relevant tool to determine a valid strategy to operate. Most of the water masses possess huge phytoplankton datasets and this kind of statistical technique should constitute an interesting tool for the choice of a representative management strategy. It will be particularly useful for managers who now, more than ever, require decision support to determine adequate policy, i.e. priorities and actions to carry out.

Acknowledgments

This work was funded by the Institution Interdépartementale des Barrages-Réservoirs du Bassin de la Seine (IIBRBS), the National Agency for Research and Rechnology (ANRT), the Seine-Normandie Water Agency. Jean-Claude Druart, Gérard Beaudoin and Yannik Guillemin are acknowledged for their help in the sampling of the Reservoir Marne. We are indebted to D^f Colin S. Reynolds for helping us to improve the final version of this manuscript. We are also grateful to D^f Orlane Anneville for her critical reading of a former version of the manuscript.

References

Abdi, H. and Valentin, D. (2007) The STATIS Method. In: Salkind, N. Ed. Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks (CA): Sage. pp 1-17.

Acar, E. and Yener, B. (2009) Unsupervised Multiway Data Analysis: A Literature Survey. IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering. 21(1): 6-20.

Anneville, O., Ginot, V., Druart, J.-C. and Angeli, N. (2002) Long-term study (1974-1998) of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva : a multi-table approach. Journal of Plankton Research. 24(10): 993-1007.

Barbiero, R.P. and McNair, C.M. (1996) The dynamics of vertical chlorophyll distribution in an oligomesotrophic lake. Journal of Plankton Research. 18(2): 225-237.

Benson-Evans, K., Antoine, R. and Antoine, S. (1999) Studies of the water quality and algae in Llangorse Lake. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. 9(5): 425-439.

Blanc, L. and Beaudou, D. (1998) Temporal stability of spatial structures of fish community in Languedoc-Roussillon and Provence-Alpes-Côte d'Azur regions. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture. 348(1): 23-45. (In French)

Blanc, L., Chessel, D. and Dolédec, S. (1998) Study of the temporal stability of spatial structures by analysing series of totally paired faunistic tables. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture. 348(1): 1-21. (In French)

Bluszcz, P., Kirilova, E., Lotter, A. F., Ohlendorf, C. and Zolitschka, B. (2008) Global radiation and onset of stratification as forcing factors of seasonal carbonate and organic matter flux dynamics in a hypertrophic hardwater lake (Sacrower See, northeastern Germany). Aquatic Geochemistry. 14(1): 73-98.

Beutler, M., Wiltshire, K.H., Meyer, B., Moldaenke, C., Luring, C., Meyerhofer, M., Hansen, U.P. and Dau, H. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthesis Research*. 72(1): 39-53.

Borja, A. and Elliott, M. (2007) What does “good ecological potential” mean, within the European Water Framework Directive? *Marine Pollution Bulletin*. 54: 1559-1564.

Carassou, L. and Ponton, D. (2007) Spatio-temporal structure of pelagic larval and juvenile fish assemblages in coastal areas of New Caledonia, southwest Pacific. *Marine Biology*. 150(4): 697-711.

Celik, K. and Ongun, T. (2006) Seasonal dynamics of phytoplankton assemblages across nutrient gradients in shallow hypertrophic Lake Manyas, Turkey. *Lake and Reservoir Management*. 22(3): 250-260.

Centofanti, M., Chessel, D. and Doledec, S. (1989) Stability of a spatial structure and compromise in a multiway matrices statistical analysis: application to physical and chemical properties in a reservoir lake. *Journal of Water Science*. 2: 71-93. (In French)

Chaya, C., Perez-Hugalde, C., Judez, L., Wee, C.S. and Guinard, J.X. (2004) Use of the STATIS method to analyze time-intensity profiling data. *Food Quality and Preference*. 15(1): 3-12.

Chessel, D., Dufour, A.-B. and Thioulouse, J. (2004) The ade4 package I: One-table methods. *R News*. 4: 5–10.

Clegg, M.R., Maberly, S.C. and Jones, R.I. (2003) Behavioural responses of freshwater phytoplanktonic flagellates to a temperature gradient. *European Journal of Phycology*. 38(3): 195-203.

Coquet, R., Troxler, L. and Wipff, G. (1996) The STATIS method: Characterization of conformational states of flexible molecules from molecular dynamics simulation in solution. *Journal of Molecular Graphics*. 14: 206-212.

Dray S., Dufour, A.-B. and Chessel, D. (2007) The ade4 package II: Two-table and K-table methods. *R News* 7: 47–52.

Ernault, A., Freire-Diaz, S., Langlois, E. and Alard, D. (2006) Are similar landscapes the result of similar histories? *Landscape Ecology*. 21: 631-639.

Gaertner, J.-C., Chessel, D. and Bertrand J. (1998) Stability of spatial structures of demersal assemblages: a multitable approach. *Aquatic Living Resources*. 11(2): 75-85.

Gaertner, J.-C. (2000) Seasonal organization patterns of demersal assemblages in the Gulf of Lions (north-western Mediterranean Sea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 80(5): 777-783.

Gailhard, I., Durbec, J.-P., Beliaeff, B. and Sabatier, R. (2003) Phytoplankton Ecology along French coasts : inter-site comparison. *Comptes Rendus Biologies*. 326(9): 853-863. (In French)

Grime, J.P. (1979) *Plant Strategies and Vegetation Processes*. Wiley, New York. 222 pp.

Gulati, R.D. & Parma, S. (eds.) (1982) *Studies on Lake Vechten and Tjeukemeer, The Netherlands; 25th anniversary of the Limnological Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences*. *Developments in Hydrobiology* 11: 383 pp, Dr W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands.

Ha, K., Jang, M.H. and Joo, G.J. (2002) Spatial and temporal dynamics of phytoplankton communities along a regulated river system, the Nakdong River, Korea. *Hydrobiologia*. 470(1-3): 235-245.

Heo, W.M. and Kim, B. (2004) The effect of artificial destratification on phytoplankton in a reservoir. *Hydrobiologia*. 524(1): 229-239.

Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kieschtel, D., Zohary, T., Pollinger, U. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*. 35: 403-424.

Jaffrenou, P. A. (1978) On the analysis of families of vectorial variables. Algebraic bases and application to the statistical description. PhD Thesis, Claude Bernard University, Lyon I, 97 pages. (In French)

Jiménez, J.J., Decaens, T. and Rossi, J.P. (2006) Stability of the spatio-temporal distribution and niche overlap in neotropical earthworm assemblages. *Acta Oecologica – International Journal of Ecology*. 30: 299-311.

Kaiblinger, C. (2008) Water quality assessment in lakes with special focus on phytoplankton indices used within the EU Water Framework Directive (WFD). SHL report n° 277/08. 47pp.

Kalff, J. (2002) *Limnology : Inland water ecosystems*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 592 pp.

Kendall, M.G. (1976) *Rank Correlation Methods*. 4th Ed. Griffin.

Kherif, F., Poline, J.P., Mériaux, S., Benali, H., Flandrin, G. and Brett, M. (2003) Group analysis in functional neuroimaging: selecting subjects using similarity measures. *NeuroImage*. 20: 2197-2208.

Korth, B. and Tucker, L.R. (1976) Procrustes matching by congruence coefficients. *Psychometrika*. 41: 531-535.

Kroonenberg, P.M. (1989) The analysis of multiple tables in factorial ecology. III. Three-mode principal component analysis: “analyse triadique complete.” *Acta Oecologica, Oecologia Generalis*. 10: 245-256.

Larsson, P., Brittain, J. E., Lien, L. and Lillehammer, A. (1978) The lake ecosystem of Øvre Heimdalsvatn. *Holarctic Ecology*. 5: 253-272.

Lavit, C. (1988) Joint Analysis of Quantitative Tables. Masson, Paris. (In French)

Lavit, C., Escoufier, Y., Sabatier, R. and Traissac, P. (1994) The ACT (STATIS method). *Computational Statistics and Data Analysis*. 18(1): 97-119.

Lekve, K., Stenseth, N.Chr., Gjørseter and Dolédec, S. (2002) Species richness and environmental conditions of fish along the Norwegian Skagerrak coast. *ICES Journal of Marine Science*. 59(4): 757-769.

Leland, H.V., Brown, L.R. and Mueller, D.K. (2001) Distribution of algae in the San Joaquin River, California, in relation to nutrient supply, salinity and other environmental factors. *Freshwater Biology*. 46(9): 1139-1167.

Lewis, J.L. and Dodge, J.D. (2002) Phylum Pyrrophyta (Dinoflagellates). In: John, D.M., Whitton, B.A. and Brook, A.J. Eds. *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 186-207.

L'Hermier des plantes, H. (1976) Structure of tables with three indices. Theory and application of a joint analysis method. PhD dissertation, University of Sciences and techniques from Languedoc, Montpellier II. (In French)

Licandro, P. and Ibanez, F. (2000) Changes of zooplankton communities in the Gulf of Tigullio (Ligurian Sea, Western Mediterranean) from 1985 to 1995. Influence of hydroclimatic factors. *Journal of Plankton Research*. 22(12): 2225-2253.

Lobry, J., Lepage, M. and Rochard, E. (2006) From seasonal patterns to a reference situation in a estuarine environment: Example of the small fish and shrimp fauna of the Gironde estuary (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 70(1-2): 239-250.

Martin, N., Molimard, P., Spinnler, H.E. and Schlich, P. (2000) Comparison of odour sensory profiles performed by two independent trained panels following the same descriptive analysis procedures. *Food Quality and Preference*. 11(6): 487-495.

Meyners, M. (2002) Methods to analyse sensory profiling data – a comparison. *Food Quality and Preference*. 14(5-6): 507-514.

Meyners, M., Kunert, J. and Qannari, E. (2000) Comparing generalized procrustes analysis and statis. *Food Quality and Preference*. 11(1-2): 77-83.

Miyajima, T., Nakanishi, M., Nakano, S. and Tezuka, Y. (1994) An autumnal bloom of the diatom *Melosira granulata* in a shallow eutrophic lake – Physical and chemical constraints on its population dynamics. *Archiv für Hydrobiologie*. 130(2): 143-162.

Muiño, R., Carrera, P., Petitgas, P., Beare, D.J., Georgakarakos, S., Haralambous, J., Iglesias, M., Liorzou, B., Massé, J. and Reid, D.G. (2003) Consistency in the correlation of school parameters across years and stocks. *ICES Journal of Marine Science*. 60(1): 164-175.

Mur, L.R., Skulberg, O.M. and Utkilen, H. (1999) Cyanobacteria in the environment. In: Chorus, I. and Bartram, J. Eds. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London. pp. 15-40.

Negro, A.I., De Hoyos, C. and Aldasoro, J.J. (2003) Diatoms and desmid relationship with the environment in mountain lakes and mires of NW Spain. *Hydrobiologia*. 505(1-3): 1-13.

Padisak, J. (2004) Phytoplankton. In: O’Sullivan, P.E. and Reynold, C.S Eds. *The Lakes Handobook* (Vol. 1). Blackwell Publishing. pp 251-308.

Pavoine, S., Blondel, J., Baguette, M. and Chessel, D. (2007) A new technique for ordering asymmetrical three-dimensional data sets in ecology. *Ecology*. 88(2): 512-523.

Perez Aparicio, J., Toledano, M. and Lafuente, R. (2007) Descriptive sensory analysis in different classes of arrange juice by a robust free-choice profile method. *Analytica Chimica Acta*. 595(1-2): 238-247.

Perez-Hugalde, C., Judez, L., Litago, J., Yuste, J. and Fuentes-Pila, J. (2004) Statistical procedure for clonal preselection of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo in the Duero Valley, Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*. 55(4): 335-345.

Perrin, L., Symoneaux, R., Maitre, I., Asselin, C., Jourjon, F. and Pages, J. (2008) Comparison of three sensory Napping (R) procedure: Case of methods for use with the ten wines from Loire valley. *Food Quality and Preference*. 19(1): 1-11.

Popovsky, J. and Pfiester, L.A. (1990) *Dynophyceae (Dinoflagellida). Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Qannari, E.M., Wakeling, I. and MacFie, H.J.H. (1995) A hierarchy of models for analyzing sensory data. *Food and Quality Preference*. 6(4): 309-314.

R Development Core Team. (2007) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Reynolds, C.S. (1984) *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, London.

Reynolds, C.S. (1987) The response of phytoplankton communities to changing lake environments. *Aquatic Sciences – Research across boundaries*. 49(2): 220-236.

Reynolds, C.S. (1988) Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. In: Sandgren, C.D. Ed. *Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 388-433.

Reynolds, C.S. (1999) Phytoplankton Assemblages in Reservoirs. In: Tundisi, J. G. and Straskraba, M. Eds. *Theoretical Reservoir and its Applications*. pp: 439-456.

Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-flores, L. and Melo, S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of plankton Research*. 24(5): 417-428.

Robert, P. and Escoufier, Y. (1976) A unifying tool for linear multivariate statistical methods: the RV coefficient. *Applied Statistics*. 25(3): 257-265.

Rojo, C., Ortega-Mayagoitia, E., Rodrigo, M.A. and Alvarez-Cobelas, M. (2000) Phytoplankton structure and dynamics in a semiarid wetland, the National Park “Las Tablas de Daimiel” (Spain). *Archiv für Hydrobiologie*. 148(3): 397-419.

Rossi, J.-P. (2003) The spatio-temporal pattern of a tropical earthworm species assemblage and its relationship with soil structure. *Pedobiologia*. 47(5-6): 497-503.

Roy, S., Chanut, J.P., Gosselin, M. and SimeNgando, T. (1996) Characterization of phytoplankton communities in the lower St Lawrence estuary using HPLC-detected pigments and cell microscopy. *Marine Ecology Progress Series*. 142(1-3): 55-73.

Samuels, A.J. and Mason, C.F. (1997) Ecology of eutrophic water bodies in a coastal grazing marsh. *Hydrobiologia*. 346: 203-214.

Schlegel, I., Koschel, R. and Krienitz, L. (1998) *Phacotus lenticularis* (Chlorophyta) population dynamics in both nature and culture. *International Association of Theoretical and Applied Limnology Proceedings*. 27(2): 700-703.

Schlich, P. (1996) Defining and validating assessor compromises about product distances and attribute correlations. In: Naes, T. and Risvik, E. Eds. *Multivariate analysis of data sensory sciences*. Elsevier, New York. pp. 229-306.

Simier, M., Blanc, L., Aliaume, C., Diouf, P.S. and Albaret, J.J. (2004) Spatial and temporal structure of fish assemblages in an “inverse estuary”, the Sine Saloum system (Senegal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 59(1): 69-86.

Sommer, U. (1985a) Differential migration of cryptophyceae in Lake Constance. *Marine Sciences*. 17(suppl): 166-175.

Sommer, U. (1985b) Seasonal succession of phytoplankton in Lake Constance. *Bioscience*. 35(6): 351-357.

Sommer, U., Gliwicz, Z.M., Lampert, W. and Duncan, A. (1986) The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie*. 106(4): 433-471.

Spijkerman, E. and Coesel, P.F.M. (1996) Competition for phosphorus among planktonic desmid species in continuous-flow culture. *Journal of Phycology*. 32(6): 939-948.

Stamenkovic, M. and Cvijan, M. (2008) Desmid flora (Chlorophyta, Zygnematophyceae) of the Danube in the province of Vojvodina (Northern Serbia). *Archives of Biological Sciences*. 60(2): 181-199.

Stanimirova, I., Walczak, B., Massart, D.L., Simeonov, V., Saby, C.A. and Di Crescenzo, E. (2004) STATIS, a three-way method for data analysis. Application to environmental data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 73(2): 219-233.

Thioulouse, J. and Chessel, D. (1987) Multi-table analyses in factorial ecology. From state typology to functional typology with the triadic analysis. *Acta Oecologica*. 8(4): 463-480. (In French)

Thioulouse, J., Simier, M. and Chessel, D. (2004) Simultaneous analysis of a sequence of paired ecological tables. *Ecology*. 85(1): 272-283.

Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N. and Denis, M. (2008) Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged cytometer. *Journal of Plankton Research*. 30(9): 1027-1040.

Townsend, S.A. and Luong-Van, J.T. (1998) Phytoplankton biomass and composition in Manton River Reservoir, a mesotrophic impoundment in the Australian wet/dry tropics. *International Review of Hydrobiology*. 83(SI): 113-120.

Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*. 9: 1-38.

Vollenweider, R.A. and Kerekes, J. (1982) Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. OECD Cooperative Programme on monitoring of inland waters (Eutrophication control), Environment Directorate, OECD, Paris, 154 pp.

Watanabe, M.M., Mayama, S., Hiroki, M. and Nozaki, H. (2000) Biomass, species composition and diversity of epipelagic algae in mire pools. *Hydrobiologia*. 421: 91-102.

Wetzel, R.G. (2001) *Limnology: Lake and river ecosystems*. 3rd edition. Academic Press, London. 1006 pp.

Wille, E. and Hofmann, L. (1991) Population dynamics of the dinoflagellate *Gymnodinium helveticum* Penard in the reservoir of Esch-sur-Sûre (G.-D. of Luxembourg). *Belgian Journal of Botany*. 124(2): 109-114.

Yang, J.R., Pick, F.R. and Hamilton P.B. (1996) Changes in the planktonic diatom flora of a large mountain lake in response to fertilization. *Journal of Phycology*. 32(2): 232-243.

3. Variables environnementales associées à la dynamique phytoplancton du réservoir Marne à la station de référence : étude exploratoire

Article en préparation

Anne ROLLAND^{1*}, Stéphan JACQUET¹

¹ INRA, UMR 42 (CARTELE), Station d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

Résumé

Les variations saisonnières dans la structure phytoplanctonique des lacs naturels de climat tempéré suivent généralement un schéma assez bien connu tel que décrit dans le modèle PEG par Sommer *et al.* (1986). Cependant, pour les réservoirs, les conditions hydrologiques peuvent largement influencer cette dynamique saisonnière. Durant l'année 2007, nous avons mesuré un certain nombre de variables environnementales d'ordre physique, chimique et biologique et nous avons identifié celles qui étaient associées à la dynamique du réservoir Marne et du phytoplancton à la station de référence. Nos résultats montrent que les variables qui étaient associées à la dynamique du système et de la communauté phytoplanctonique étaient différentes selon les périodes de l'année 2007. Au début du printemps, les concentrations de nitrates élevées et les forts débits entrants étaient associés au début de la croissance du phytoplancton. Au printemps et au début de l'été, l'augmentation du biovolume phytoplanctonique était associée à la diminution de la silice dissoute, utilisée par les chrysophycées. En plein été, on observait les biovolumes phytoplanctoniques maximaux, en lien avec les fortes températures. Cette même période révélait également des corrélations significatives entre les fortes concentrations en chl *a*, bactéries hétérotrophes et certains virus aux profondeurs de 6 et 8 m. Finalement, la fin de l'été et le début de l'automne étaient caractérisés par un débit sortant important dans le canal Marne et des concentrations d'orthophosphates importantes, probablement du à une intensification de la dégradation de la matière organique.

Introduction

Les communautés phytoplanctoniques présentent des changements significatifs durant l'année, en terme de biomasse et de composition. Ces changements que l'on appelle également « successions saisonnières » reflètent les modifications intra-annuelles des conditions environnementales. Les variations saisonnières dans la structure phytoplanctonique des lacs naturels de climat tempéré suivent généralement un schéma assez bien connu tel que décrit dans le modèle PEG (Sommer *et al.* 1986) (voir introduction générale). Les variations saisonnières du phytoplancton dans ces lacs sont fortement associées au cycle annuel de la température, à la stratification thermique, à la lumière (en quantité et qualité), aux concentrations des nutriments, au broutage et au parasitisme. Les variations dans les conditions hydrologiques sont également importantes et peuvent largement influencer la dynamique saisonnière (Fabbro et Duivenvoorden 2000) et interannuelle (Zohary *et al.* 1996 ; Hambright et Zohary 2000 ; Kruk *et al.* 2002 ; Roelke *et al.* 2004) du phytoplancton pour les réservoirs et les lacs peu profonds. En effet, dans les réservoirs peu profonds, la dynamique irrégulière des flux entrants et sortants est connue pour altérer de façon prononcée les conditions environnementales pour les communautés biotiques. Il en va de même pour les fluctuations dans la direction et la force du vent qui peuvent déstabiliser la colonne d'eau et par voie de conséquence influencer la distribution horizontale et/ou verticale du phyto- et du zooplancton (Straskraba 2005).

D'après Kimmel *et al.* (1990), un réservoir peut être vu comme un lac très dynamique dans lequel une portion significative de son volume posséderait des caractéristiques et des fonctions biologiques d'une rivière. Souvent, la portion riveraine des réservoirs fonctionne de la même manière que des rivières larges et turbides dans lesquelles la turbulence, l'instabilité des sédiments, la grande turbidité, la réduction de la lumière disponible diminuent la photosynthèse malgré une grande disponibilité des éléments nutritifs. Dans la portion lacustre (pélagique) des réservoirs, la succession des communautés phytoplanctoniques peut être assez similaire à celle trouvée dans les lacs naturels. Cependant, la fréquence des perturbations est plus élevée dans les réservoirs que dans les lacs, avec des changements rapides et irréguliers dans le niveau, la turbidité et le brassage de la colonne d'eau. Par conséquent, il est fréquent que la périodicité et la succession du phytoplancton soient perturbées par l'absence de stratification et par les charges de matières entrantes dans le réservoir qui augmentent la turbidité de l'eau. Par ailleurs, lors de conditions très venteuses, la colonne d'eau d'un

réservoir peu profond étant brassée, les sédiments sont mis en suspension du fond vers la surface. Ces derniers prennent ainsi part aux échanges physiques de matières, qui incluent le phytoplancton et les détritiques. Cette re-suspension des microorganismes et des particules réduit la pénétration de la lumière pendant un laps de temps suffisant pour freiner la reproduction du phytoplancton, ce qui entraîne des oscillations de biomasse dans le réservoir (Gons *et al.* 1992 ; Wetzel 2001).

Les variations des débits entrants et sortants influencent non seulement la turbidité mais également la disponibilité en nutriments qui peut parfois masquer l'importance d'autres facteurs de régulation de la communauté phytoplanctonique dans les réservoirs notamment la lumière qui est un facteur de contrôle important de la productivité de ces milieux et qui peut devenir limitant lors de forts apports en matière organique dissoute. Un des derniers facteurs importants dans le contrôle de la dynamique du phytoplancton est le temps de résidence de l'eau (Straskraba 2005). Les algues vertes et les diatomées planctoniques sont souvent dominantes en été durant les périodes de faibles temps de résidence tandis que les cyanobactéries ont besoin de milieux plus stables, au temps de résidence plus long (Padisak 2004). Ainsi, les communautés phytoplanctoniques des réservoirs sont souvent perturbées ce qui tend à augmenter la diversité de la communauté avec le développement d'espèces à stratégie-r qui ont une croissance très rapide et sont constamment renouvelées (Reynolds 1999).

Comme nous l'avons vu dans l'article précédent, nous avons identifié la station H comme la station de référence potentielle du réservoir, c'est à dire celle qui représenterait le mieux le réservoir Marne dans son ensemble. Nous présentons donc, pour cette station, certaines des variables environnementales d'ordre physique, chimique et biologique que nous avons mesurées au cours des deux années d'échantillonnage (2006-2007) et tentons d'identifier celles qui étaient associées à la dynamique du réservoir Marne et du phytoplancton en particulier.

Matériel et Méthodes

Site d'étude

Le réservoir Marne est composé de deux lacs. Le lac Champaubert (surface : 0,5 km², profondeur moyenne : 4 m) reçoit les eaux des rivières Marne et Blaise via deux canaux d'amenée tandis que le lac du Der (surface : 47,5 km², profondeur moyenne : 8 m) abrite les canaux de restitution dont le principal est le canal de restitution en Marne qui est situé à l'extrême ouest du réservoir. Le temps de résidence des eaux varie entre les deux bassins. Il est en moyenne de 5-6 mois dans le lac du Der et de moins d'1 mois pour le lac Champaubert. La station H de référence est la station la plus profonde (profondeur maximale : environ 15 m) et elle est située au sud du lac du Der (voir introduction générale pour plus de détails).

Stratégie d'échantillonnage

Les échantillons d'eau ont été prélevés avec une bouteille de Van Dorn durant 2 années, entre mars et septembre 2006 et entre avril et septembre 2007. En mars et avril, les échantillons ont été collectés une seule fois alors que les mois suivants, ils ont été prélevés 2 fois. Par ailleurs, en mars, avril, mai et septembre, un prélèvement à 3 m a été réalisé alors qu'en juin, juillet et août, trois profondeurs ont été échantillonnées à 3, 6 et 8 m. Ces échantillons ont servi au dosage de certains éléments nutritifs, au comptage du phytoplancton et à la détermination des abondances bactérienne et virale. Des prélèvements ont également été réalisés au moyen d'une boîte de 30 litres de notre fabrication, basée sur le modèle de Schindler-Palatas, pour apprécier aux différentes profondeurs l'abondance et la structure de la communauté zooplanctonique. Au moment du rendu de ce rapport, ces données n'étaient pas encore disponibles.

Paramètres mesurés

La température, l'oxygène dissous, le pH ont été mesurés tous les mètres le long de la colonne d'eau avec une sonde multiparamétrique (U-22, Horiba) et la turbidité a été mesurée à des profondeurs discrètes grâce à un turbidimètre (Turb 355 IR/T, WTW). La transparence a été déterminée à l'aide d'un disque de Secchi. Parallèlement, l'intensité lumineuse (radiations photosynthétiquement actives « PAR ») a été mesurée tous les 50 cm avec une sonde LI-COR immergeable (LI-192SA, Biosciences) relié à un enregistreur de données (LI-1400,

Biosciences). La profondeur de la zone euphotique (Z_{eu}) était considérée comme étant la profondeur à laquelle on retrouvait 1% de l'intensité lumineuse de surface.

Les analyses de phosphore total (PT), d'orthophosphates (PO_4^{3-}), d'azote total (NT), de nitrates (NO_3^-), d'ammonium (NH_4^+) et de silice (SiO_2) ont été réalisées au laboratoire de chimie de l'INRA de Thonon-les-Bains en suivant des méthodes standards dont les procédures analytiques, les limites de détection et la précision des analyses sont décrites dans le recueil des normes françaises (AFNOR 1997).

La chlorophylle *a* a été déterminée par spectrophotométrie (Lorenzen 1967, AFNOR 1999) après filtration sur des filtres en fibre de verre de type GF/F (porosité 0,7 μm) et extraction dans l'acétone (voir chapitre II). Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire de chimie de l'Institution « Les Grands lacs de Seine ». Les matières en suspensions (MES) ont également été mesurées par l'Institution en suivant la méthode de filtration sur filtre en fibres de verre de l'AFNOR (NF EN 872) décrite dans le recueil des normes françaises (AFNOR 1997).

Les abondances bactériennes (bactéries hétérotrophes) et virales ont été déterminées en utilisant un cytomètre en flux de type FACSCalibur (Becton Dickinson) équipé d'un laser fournissant 15 mW à 488 nm. Les échantillons destinés au comptage des virus ont été fixés au glutaraldéhyde (concentration finale 0,5%, grade I, Merck) pendant 30 min à l'obscurité, puis dilués dans du tampon TE filtré sur 0,02 μm (0.1 mM Tris-HCL and 1 mM EDTA, pH 8) et enfin incubés avec du SYBR Green I (à une concentration finale de 5×10^{-5} par rapport à la solution mère ; Molecular Probes) pendant 5 minutes à température ambiante puis pendant 10 minutes à 75°C et enfin à nouveau pendant 5 minutes à la température de la pièce avant analyse (d'après Brussaard 2004 et modifié par Jacquet dans Personnic *et al.* 2009). Les comptages de bactéries hétérotrophes ont été réalisés sur des échantillons qui ont également été fixés au glutaraldéhyde (concentration finale 0,5%) pendant 30 minutes mais les échantillons ont été dilués dans des échantillons d'eau du réservoir filtrés sur 0,02 μm , puis incubés avec du SYBR Green I (dilution 10^{-4} de la solution stock commerciale) pendant 15 minutes. Les fichiers obtenus ont été transférés et analysés en utilisant le logiciel CYTOWIN (Vaulot 1989).

Finalement, les déterminations phytoplanctoniques ont été réalisées sur des échantillons préservés avec du lugol (Thronsen 1978). Les cellules algales ont été comptées sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 135 avec les méthodes préconisées par Lund *et al.* (1958) et actuellement en cours de normalisation au niveau national (Laplace-Treyture *et al.*

2008). Les comptages, incluant les formes coloniales et filamenteuses, ont été réalisés en énumérant les cellules. Les biovolumes totaux ont été calculés à partir des abondances totales et les biovolumes spécifiques ont été déterminés à partir de formes géométriques simples présentées dans Hillebrand *et al.* (1999). La classification taxonomique a été rendue possible grâce à une vaste littérature présente à la Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre de Thonon-les-Bains.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées dans cette étude ont été de plusieurs types. Tout d'abord, une analyse de variance (ANOVA) à 1 facteur (profondeur) nous a permis de tester s'il y avait une différence significative entre les profondeurs échantillonnées pour chacune des variables d'intérêt afin de voir s'il était possible de combiner toutes nos données pour la station H. Par la suite, nous avons réalisé une analyse en composantes principales afin d'identifier les variables qui étaient liées entre elles et/ou au biovolume phytoplanctonique ou qui évoluait de la même manière ou de façon contraire. Finalement, afin de valider les liens entre ces variables, nous avons réalisé des corrélations deux à deux afin de mettre en évidence la force des relations.

Résultats

Hydrologie du Réservoir Marne

Les conditions hydrologiques ont varié au cours des deux périodes d'échantillonnage. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 6, la rivière Marne est la principale source d'alimentation du réservoir puisque les débits entrants dans le réservoir ont atteint $96 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ alors que ceux provenant de la rivière Blaise étaient au maximum de $12,6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. De façon générale, les débits entrants dans le réservoir Marne ont été plus élevés en 2006 qu'en 2007, suggérant que 2007 a été une année plus sèche. Parallèlement, les débits sortants en 2006 ont été beaucoup moins élevés qu'en 2007 (débits sortants maximaux dans la rivière Marne de $35 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ et $38 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en 2006 et 2007 respectivement). Par conséquent, la capacité totale du réservoir a été significativement plus faible en 2007 (292 Mm^3) qu'en 2006 (345 Mm^3). D'autre part, les forts débits entrants ont été observés en hiver et au printemps alors que les forts débits sortants ont été enregistrés en été et en automne.

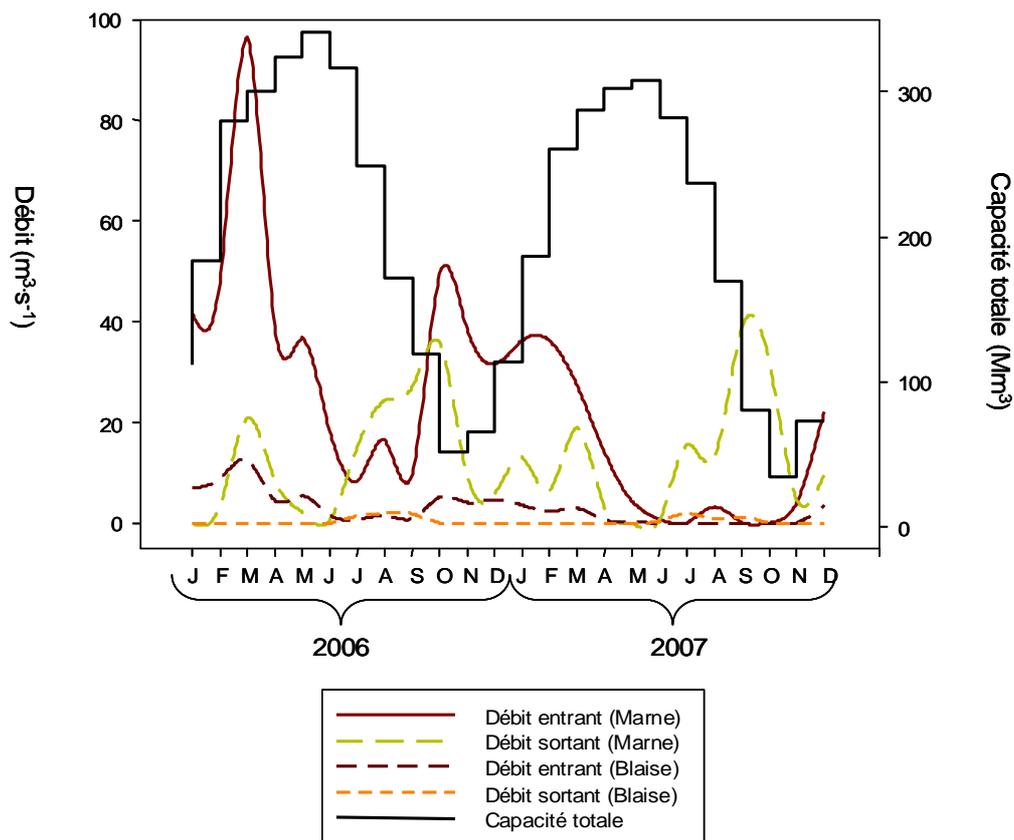


Figure 6 Variations saisonnières des débits entrants et sortants (Marne et Blaise) ainsi que de la capacité totale du réservoir Marne pour les années 2006 et 2007

Caractérisation de la colonne d'eau

Durant l'année 2006, nous avons pu observer une stratification de la colonne d'eau de fin juin à début août, les températures passant de 24°C en moyenne à la surface à environ 16°C à 50 cm au dessus des sédiments. Par contre, durant l'année 2007, les épisodes de stratification de la colonne d'eau ont été beaucoup plus sporadiques et moins prononcés. Au début du mois de juin, la température de la colonne d'eau était de 23°C en surface et de 16,5°C au dessus des sédiments tandis qu'à la fin du mois d'août, la température de surface était de 20°C et celle du fond de 16°C.

Les plus faibles transparences (1,5 et 1,9 m en moyenne en 2006 et 2007) ont été enregistrées durant les mois d'août et de septembre alors que les plus fortes transparences ont été mesurées au début du printemps en avril (7 m en moyenne) pour les deux années. Ainsi, il n'était pas rare que toute la hauteur de la colonne d'eau soit équivalente à la zone euphotique, le niveau du réservoir baissant lorsque les transparences les plus faibles étaient retrouvées. Par contre, les profils de lumière ont révélé de façon générale une grande instabilité des valeurs pour une même profondeur, l'instrument de mesure (LICOR) étant très sensible au moindre

changement de luminosité à l'extérieur (nuages, surface de l'eau agitée). De façon globale, nous avons constaté que la profondeur de la zone euphotique, calculée à l'aide des valeurs obtenues avec la sonde LI-COR, oscillait entre 8 et 13 m ce qui correspondait effectivement à la hauteur de la colonne d'eau, de la surface à 1-1,5 m au dessus des sédiments selon le niveau du réservoir au moment des mesures. Par ailleurs, les valeurs de profondeurs de la zone euphotique calculées avec les données de la sonde LI-COR corroboraient avec celles obtenues avec le disque de Secchi (2,5 x profondeur de Secchi).

Le pH moyen observé dans les 3 premiers mètres de la colonne d'eau présentait un caractère légèrement basique (8,2 en moyenne pour les deux années). Etant donné la faible stratification de la colonne d'eau, peu de différences ont été identifiées entre la surface et le fond. On constatait cependant une augmentation du pH à la fin des mois de juin 2006 et 2007 (9,9 en 2006 et 9,6 en 2007 à 1 m de profondeur) et une diminution du pH le long de la colonne d'eau, ce dernier atteignant 7,5 en juin 2006 et 7,7 en juin 2007 à 50 cm au dessus du fond du réservoir.

Les concentrations d'oxygène dissous variaient de 8 à 8,5 mg.L⁻¹ en moyenne pour les deux années. Comme pour le pH, peu de différences ont été mises en évidence entre la surface et le fond du réservoir excepté en été où on pouvait observer des différences de plus de deux mg.L⁻¹. Par exemple, à la fin des mois de juin 2006 et 2007, des concentrations variant de 7,5 à 5,3 mg.L⁻¹ et de 8,4 à 6,3 mg.L⁻¹ respectivement le long de la colonne d'eau ont été mesurées. Il en va était même pour les mois d'août 2006 et 2007 où des concentrations variant de 8,8 à 6,2 mg.L⁻¹ entre la surface et le fond de la colonne d'eau ont été observées au cours des deux années.

Variations annuelles des variables chimiques

Seules les données analysées par l'INRA pour l'année 2007 ont pu être considérées ; celles analysées en 2006 par le laboratoire de Chimie de l'IIBRBS étant inexploitable.

La concentration moyenne des orthophosphates mesurée à 3 m variait entre 1 et 16 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ au cours de l'année 2007 (Figure 7). La concentration minimale a été mesurée au début du mois de juin alors que la concentration maximale l'a été au début du mois de septembre. Durant la période estivale, les concentrations en orthophosphates ne variaient pas en fonction de la profondeur puisque les 3 courbes (3 m, 6 m, 8 m) étaient quasiment superposées. De plus, le test ANOVA nous a confirmé qu'il n'y avait pas de différence significative entre les profondeurs ($p = 0,638$).

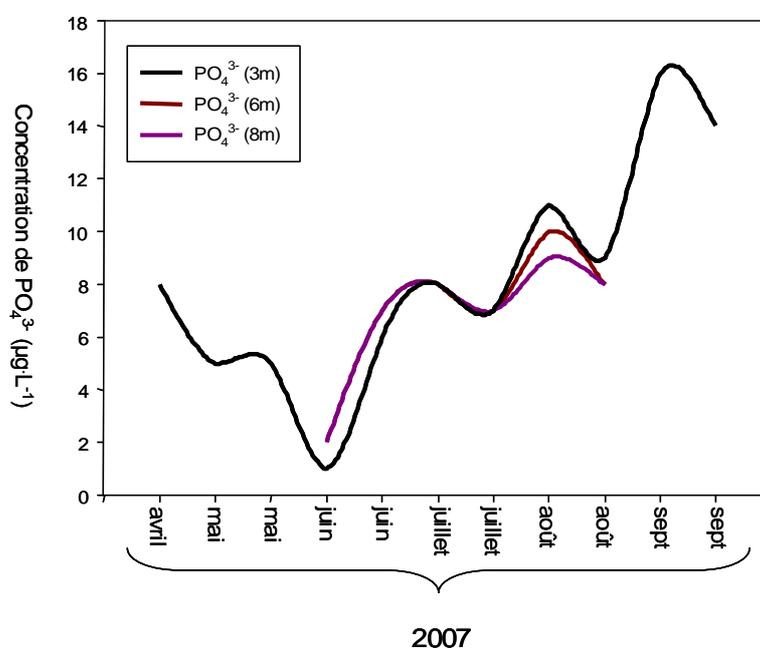


Figure 7 Evolution de la concentration des orthophosphates (PO_4^{3-}) au cours de l'année 2007 aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m)

Les dynamiques des nitrates (NO_3^-) et de l'ammonium (NH_4^+) étaient différentes au cours de l'année 2007 (Figure 8). Tandis que les concentrations de nitrates n'ont cessé de diminuer tout au long de la période d'échantillonnage (de 3,41 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en avril à 0,49 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en septembre à une profondeur de 3 m), les concentrations d'ammonium ont révélé une évolution temporelle un peu plus chaotique. En effet, ces dernières diminuaient entre avril et juin (de 32 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) puis étaient caractérisées par une légère augmentation en juillet pour atteindre un maximum en août où des concentrations de 61 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ont été mesurées. Finalement, les concentrations ont ensuite diminué jusqu'à la fin de la période

d'échantillonnage (fin septembre). Par ailleurs, la dynamique des nitrates était la même entre les trois profondeurs échantillonnées pour la période estivale ($p = 0,885$) alors qu'elle était différente à la surface (3 m) et plus profondément dans la colonne d'eau (6 m et 8 m) pour l'ammonium. Cependant, l'ANOVA à critère de classification pratiquée sur les données estivales n'a pas révélé, là encore, de différence significative entre les profondeurs ($p = 0,93$).

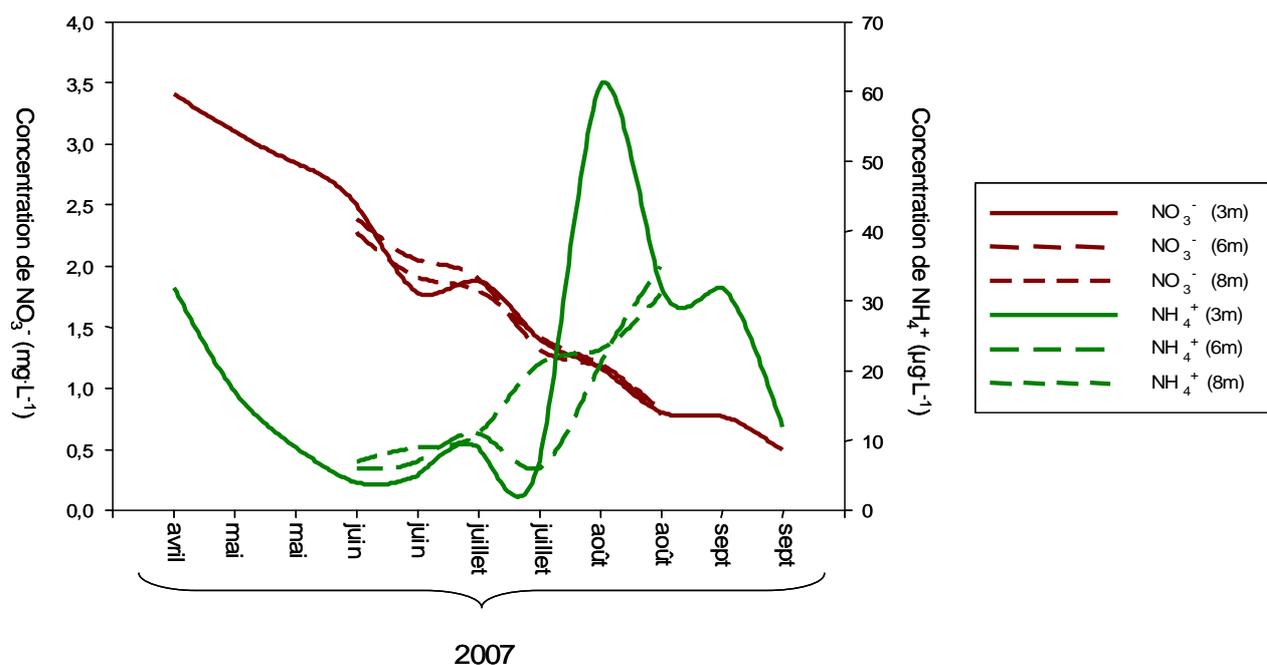


Figure 8 Evolution de la concentration des nitrates (NO₃⁻) et de l'ammonium (NH₄⁺) au cours de l'année 2007 aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m)

La dynamique de la silice au cours de la période d'échantillonnage présentait plusieurs phases (Figure 9). Tout d'abord, une diminution des concentrations entre avril et juin (de 2,5 mg·L⁻¹ à 1,5 mg·L⁻¹) était observée, puis une augmentation entre début juin et fin juillet (de 1,5 à 2,47 mg·L⁻¹). Le mois d'août était caractérisé par une chute brutale de la concentration de silice (de 2,47 à 0,22 mg·L⁻¹), les concentrations restant relativement basses durant le mois de septembre (0,47 et 0,8 mg·L⁻¹ pour les deux derniers prélèvements).

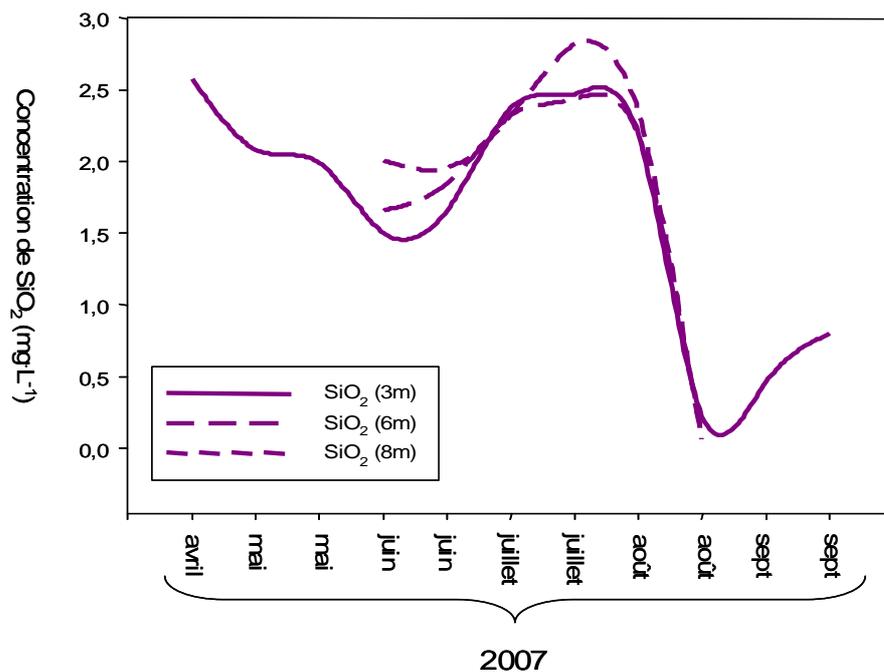


Figure 9 Evolution de la concentration de la silice dissoute (SiO₂) au cours de l'année 2007 aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m)

Les dosages de matières en suspension (MES) et les mesures de turbidité ont suivi la même dynamique au cours de l'année (Figure 10). Globalement, on observait une augmentation des concentrations de ces deux paramètres (de 1 à 11 NTU [Nephelometric Turbidity Unit]) pour la turbidité et de 3,6 à 9,2 mg·L⁻¹ pour les MES) au cours de la période d'échantillonnage, allant de concert avec la diminution du volume d'eau dans le réservoir et l'augmentation des débits sortants au niveau de la restitution en Marne. Comme pour les paramètres chimiques précédemment cités, les différences entre les profondeurs n'étaient pas significatives durant la période estivale ($p = 0,98$ et $p = 0,94$ respectivement pour les MES et la turbidité).

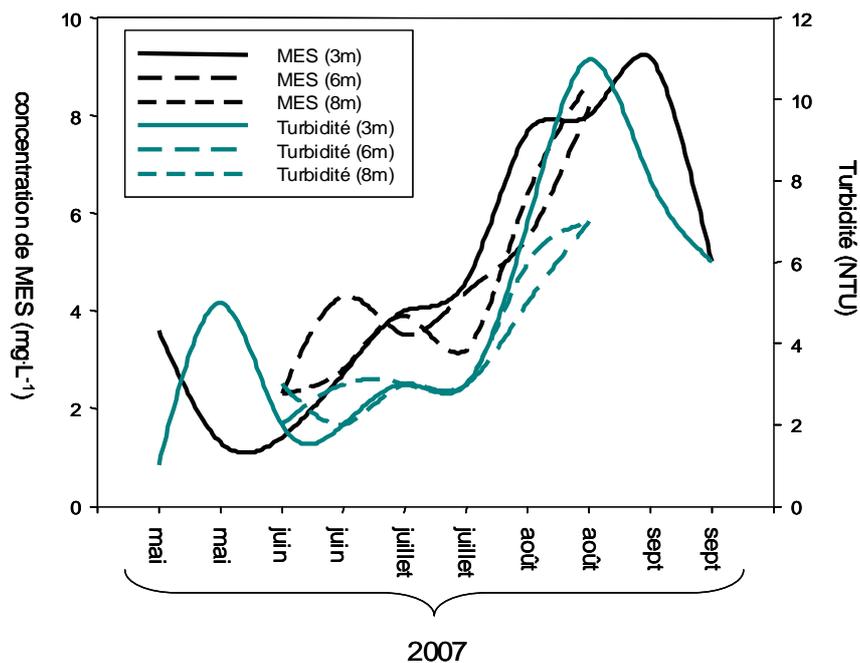


Figure 10 Evolution de la concentration des MES et de la turbidité au cours de l'année 2007 et aux trois profondeurs échantillonnées (3 m, 6 m et 8 m)

Variations annuelles des abondances bactériennes et virales

La cytométrie en flux a permis de discriminer jusqu'à 3 groupes de virus, caractérisés par des fluorescences différentes du complexe ADN-colorant (Personnic 2007). Les valeurs minimales de virus totaux ont été mesurées en juin ($5,1 \cdot 10^6$ et $7,2 \cdot 10^6$ part.ml⁻¹) tandis que les valeurs maximales ont été observées en septembre ($5,4 \cdot 10^7$ et $6,4 \cdot 10^7$ part.ml⁻¹). L'allure des courbes de l'évolution de l'abondance pour les deux groupes viraux principaux, VLP1 et VLP2, était relativement similaire en 2006 et début 2007. On observait de fortes concentrations au printemps et au début de l'automne et des concentrations plus faibles en été pour l'année 2006 (Figure 11). Par contre, l'année 2007 a été caractérisée par de relatives faibles concentrations printanières, puis une augmentation durant la période estivale. La dynamique des VLP3 était beaucoup plus fluctuante. En 2006, les concentrations au sortir de l'hiver étaient élevées (environ $1 \cdot 10^6$ part.ml⁻¹). Puis elles chutaient au début du printemps pour augmenter à nouveau durant le mois de juin ($5,5 \cdot 10^6$ part.ml⁻¹). Au cœur de l'été les abondances diminuaient et ces dernières redevenaient relativement élevées durant la fin de la saison d'échantillonnage. En 2007, les oscillations dans le schéma de dynamique des VLP3 ont été importantes. On distinguait les plus faibles abondances au début du mois de mai ($1,02 \cdot 10^5$ part.ml⁻¹) et les plus fortes abondances à la fin du mois de septembre ($1,3 \cdot 10^6$ part.ml⁻¹). Par ailleurs, les variations d'abondances entre les profondeurs échantillonnées ont

été faibles et non significatives ($p = 0,77$ pour les VLP1 ; $p = 0,78$ pour les VLP2 ; $p = 0,76$ pour les VLP3).

En ce qui concerne les bactéries hétérotrophes (Figure 11), leur abondance était en moyenne plus élevée en 2006 qu'en 2007. Les concentrations maximales ont été mesurées à la fin du mois de mai ($4,1 \cdot 10^6$ cellules·ml⁻¹) et au début du mois de septembre 2006 ($3,7 \cdot 10^6$ cellules·ml⁻¹) alors que pour l'année 2007, les concentrations maximales de bactéries hétérotrophes ont été observées à la fin du mois de juillet et au début du mois de septembre ($2,5 \cdot 10^6$ cellules·ml⁻¹ pour ces deux dates). Les concentrations minimales, quant à elles, se retrouvaient au début du mois de juillet 2006 ($0,9 \cdot 10^6$ cellules·ml⁻¹) et au début du mois de juin 2007 ($0,65 \cdot 10^6$ cellules·ml⁻¹). Aucune différence significative dans les abondances bactériennes n'a été trouvée entre les trois profondeurs échantillonnées ($p = 0,21$).

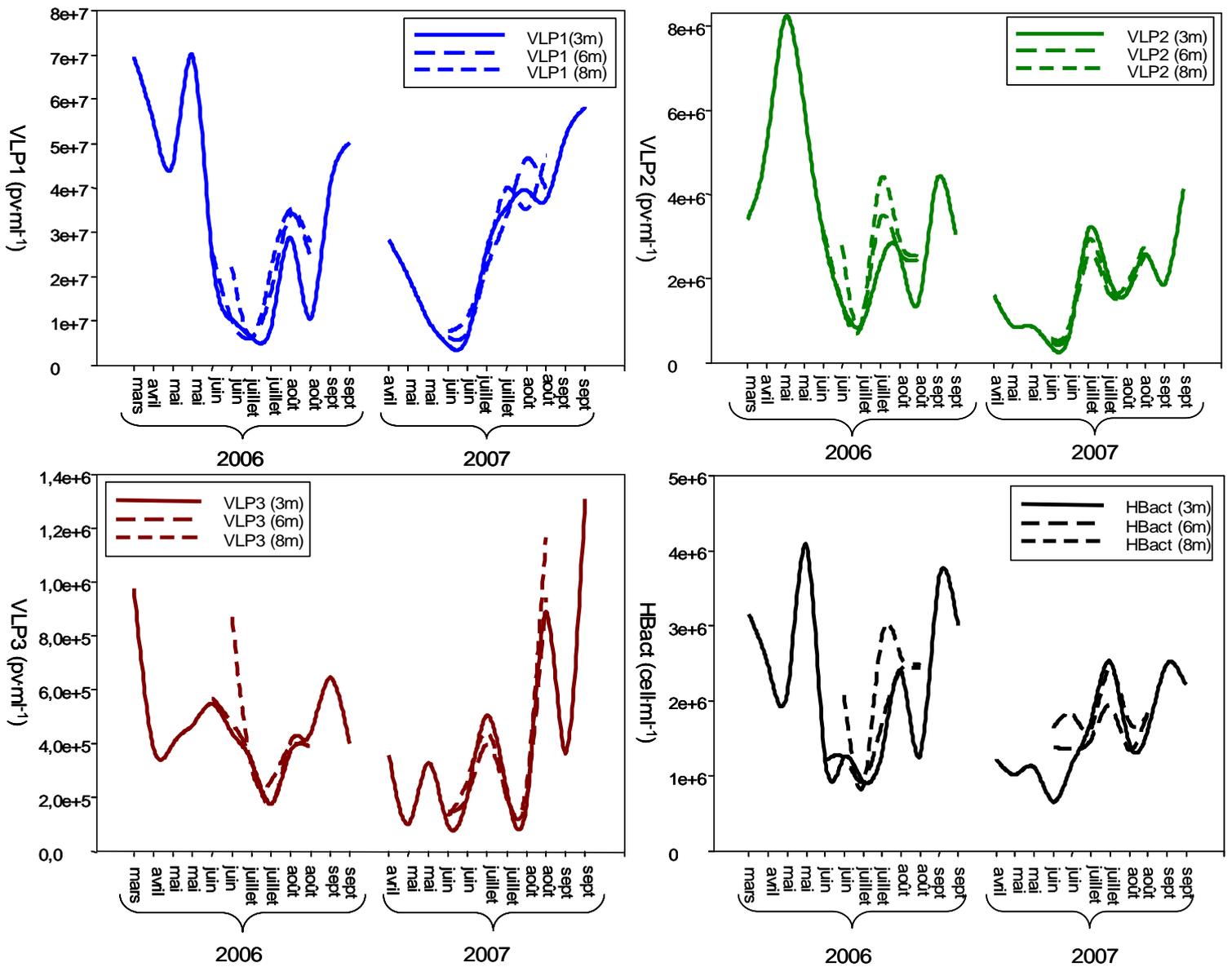


Figure 11 Evolution temporelle (2006-2007) et spatiale (3 m, 6 m et 8 m) de l'abondance des trois groupes de virus (VLP) et des bactéries hétérotrophes (Hbact)

Variations annuelles des concentrations de chlorophylle a et du biovolume phytoplanktonique

Les résultats concernant la chlorophylle *a* et le biovolume phytoplanktonique sont présentés pour la profondeur de 3 m et durant l'été pour les profondeurs de 6 et 8 m bien que comme pour les autres variables, le test ANOVA à un critère de classification n'ait pas révélé de différence significative entre les trois profondeurs ($p = 0,65$ pour la chlorophylle *a* et $p = 0,22$ pour le biovolume phytoplanktonique total). D'après la Figure 12a, les concentrations de chlorophylle *a* à 3 m au cours des deux périodes d'échantillonnage ont révélé une dynamique qui suivait la variation de biovolume au cours du temps. On constate cependant un pic de chlorophylle *a* ($16,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) qui a été mesuré au début du mois de mai 2006 et qui n'était pas associé à un biovolume phytoplanktonique élevé. L'année 2007 a également été caractérisée par un pic de chlorophylle *a* ($13,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) mais en fin de période d'échantillonnage (fin septembre) avec un biovolume phytoplanktonique plus faible qu'à certaines périodes où les biovolumes étaient du même ordre de grandeur mais les concentrations de chlorophylle *a* plus faibles (début juillet et fin août 2007). Concernant les profondeurs de 6 et 8 m, on observait un pic dans le biovolume phytoplanktonique très important ($2,9\cdot 10^8 \mu\text{m}^3\cdot\text{L}^{-1}$ à 6 m et $3,8\cdot 10^8 \mu\text{m}^3\cdot\text{L}^{-1}$ à 8 m) à la fin du mois de juillet 2007 essentiellement composé de chlorophycées.

Concernant la dynamique des espèces, le printemps 2006 a été caractérisé par les diatomées (Figure 12a). Puis, les chrysophycées constituaient une grande part du biovolume entre juin et fin juillet pour laisser la place aux chlorophycées en août et septembre. L'année 2007 a été caractérisée par une arrivée plus rapide des chrysophycées dans le milieu puisqu'elles constituaient une grande part du biovolume dès le mois de mai 2007. Finalement, l'été et l'automne 2007 ont été caractérisés par les chlorophycées mais les desmidiacées, les diatomées et les dinoflagellés constituaient également une grande part du biovolume phytoplanktonique total à ces périodes. De façon générale, les cyanobactéries n'ont jamais présenté un biovolume important durant les deux années d'échantillonnage, comparativement aux biovolumes des autres classes phytoplanktoniques.

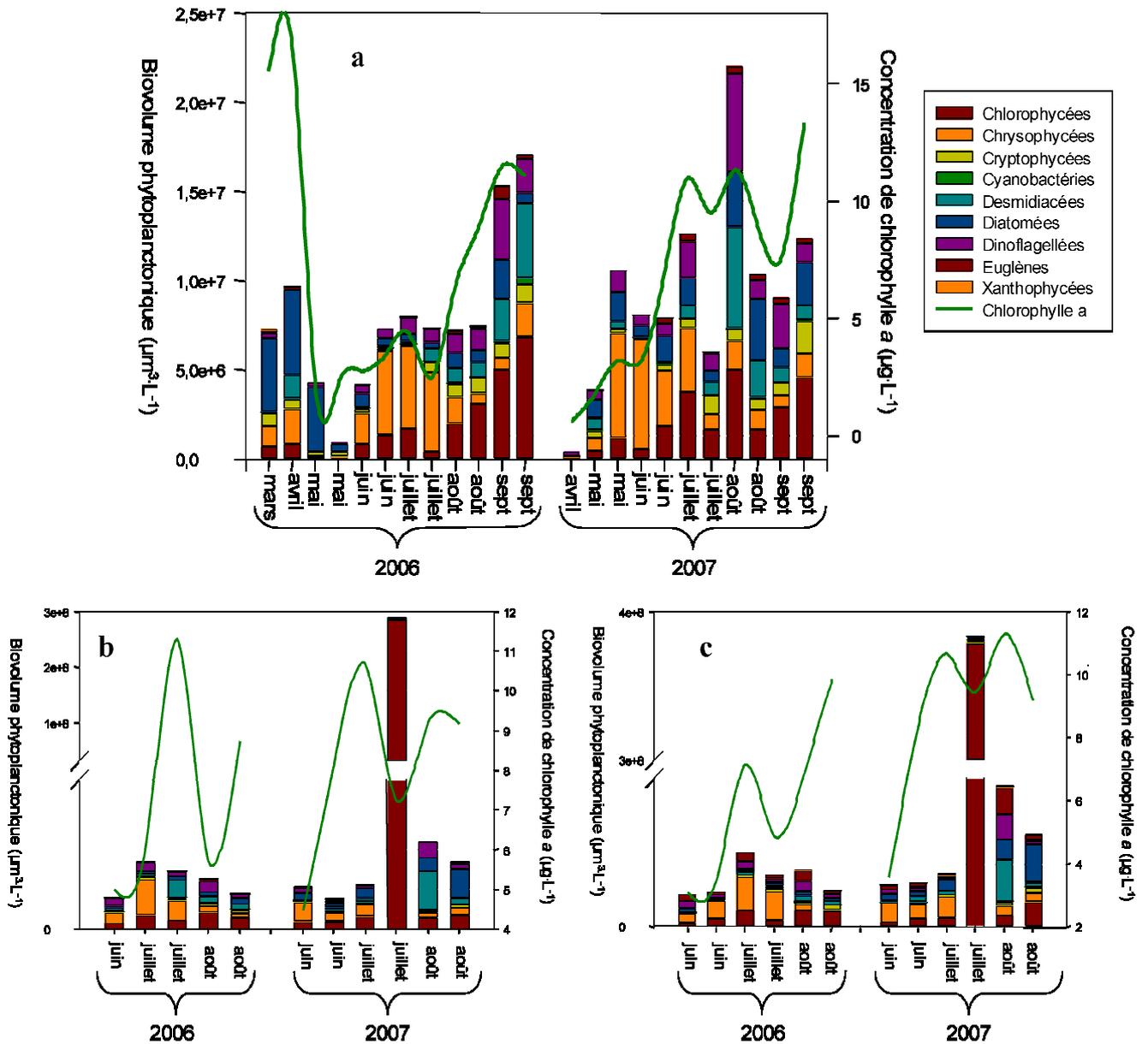


Figure 12 Evolution temporelle (2006-2007) et spatiale (3 m (a), 6 m (b) et 8 m (c)) du biovolume phytoplanktonique et de la concentration de chlorophylle *a*

Identification des variables liées à la dynamique du biovolume phytoplanctonique du réservoir Marne

Suite à l'analyse des différentes variables environnementales mesurées, nous avons mis en évidence qu'il n'y avait pas de différence significative entre les profondeurs. Ainsi, nous avons rassemblé toutes ces données afin de tenter de visualiser d'éventuelles corrélations entre les variables du milieu (abiotique et biotique), le biovolume phytoplanctonique total et la chlorophylle *a*. Les résultats ne sont présentés que pour l'année 2007. La Figure 13a représente la projection des variables environnementales, du biovolume phytoplanctonique et de la chlorophylle *a* sur le cercle des corrélations tandis que la Figure 8b représente la projection des individus (dates d'échantillonnages) sur le premier plan factoriel, issue d'une analyse en composantes principales (ACP) normée. Les résultats de cette analyse montrent que 54% de l'inertie totale sont représentés par les deux premiers axes factoriels (F1 = 38% et F2 = 16%). Cette projection montre que certaines variables environnementales semblent être fortement corrélées entre elles et également avec le biovolume phytoplanctonique et la chlorophylle *a*.

Nous pouvons tout d'abord constater que le premier axe factoriel (F1) est fortement défini par les variables Débit Marne sortant et NO_3^- qui s'opposent. Ainsi, les mois d'août et de septembre (Figure 13b) sont associés à de forts débits sortants du réservoir dans le canal de restitution Marne alors qu'au contraire les mois de mai et juin (Figure 13b) sont caractérisés par de fortes concentrations de NO_3^- . De plus, les projections des variables de débits entrants sur l'axe 1 mettent en évidence une opposition entre les débits entrants et sortants ce qui va de pair avec le cycle hydrologique du réservoir (Figure 6). Nous pouvons également voir que la variable PO_4^{3-} est fortement opposée à la variable NO_3^- sur l'axe 1, ce qui revient à dire que de faibles concentrations de NO_3^- sont associées à de fortes concentrations de PO_4^{3-} et vice-versa. Le coefficient de corrélation inverse qui lie ces deux variables est d'ailleurs hautement significatif ($R = -0,65$; $p = 0,0008$). Si nous revenons sur les Figures 7 et 8, nous pouvons constater que ces deux éléments nutritifs présentent une dynamique inverse avec les concentrations maximales de PO_4^{3-} retrouvées en août et septembre et les concentrations maximales de NO_3^- retrouvées en avril, mai et juin. Quant au mois de juillet, il constitue un mois de transition dans la dynamique de ces deux éléments nutritifs ce qui peut être également observé par le changement marqué dans le rapport $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ qui passe de 620 en mai à 200 en juillet pour finir à 35 en septembre. L'axe 2, quant à lui, est défini par la température et le biovolume phytoplanctonique et les projections des dates dans le plan

factoriel révèlent que le mois de juillet est celui où sont retrouvés les températures les plus élevées et les biovolumes les plus importants. Comme nous avons pu le remarquer précédemment sur la figure 12, une augmentation explosive du biovolume phytoplanctonique est observée en juillet à 6 m et 8 m de profondeur et à l'inverse, les projections des dates sur l'axe 2 montrent que les biovolumes les plus faibles sont retrouvés en avril et en mai, ce qui est confirmé par la figure 12. Par ailleurs, la projection des variables sur le cercle des corrélations semble montrer que le biovolume phytoplanctonique est associé à la température. Cependant, ces variables prises deux à deux ne présentent aucune corrélation significative ($R = 0,11$; $p = 0,61$) de façon globale.

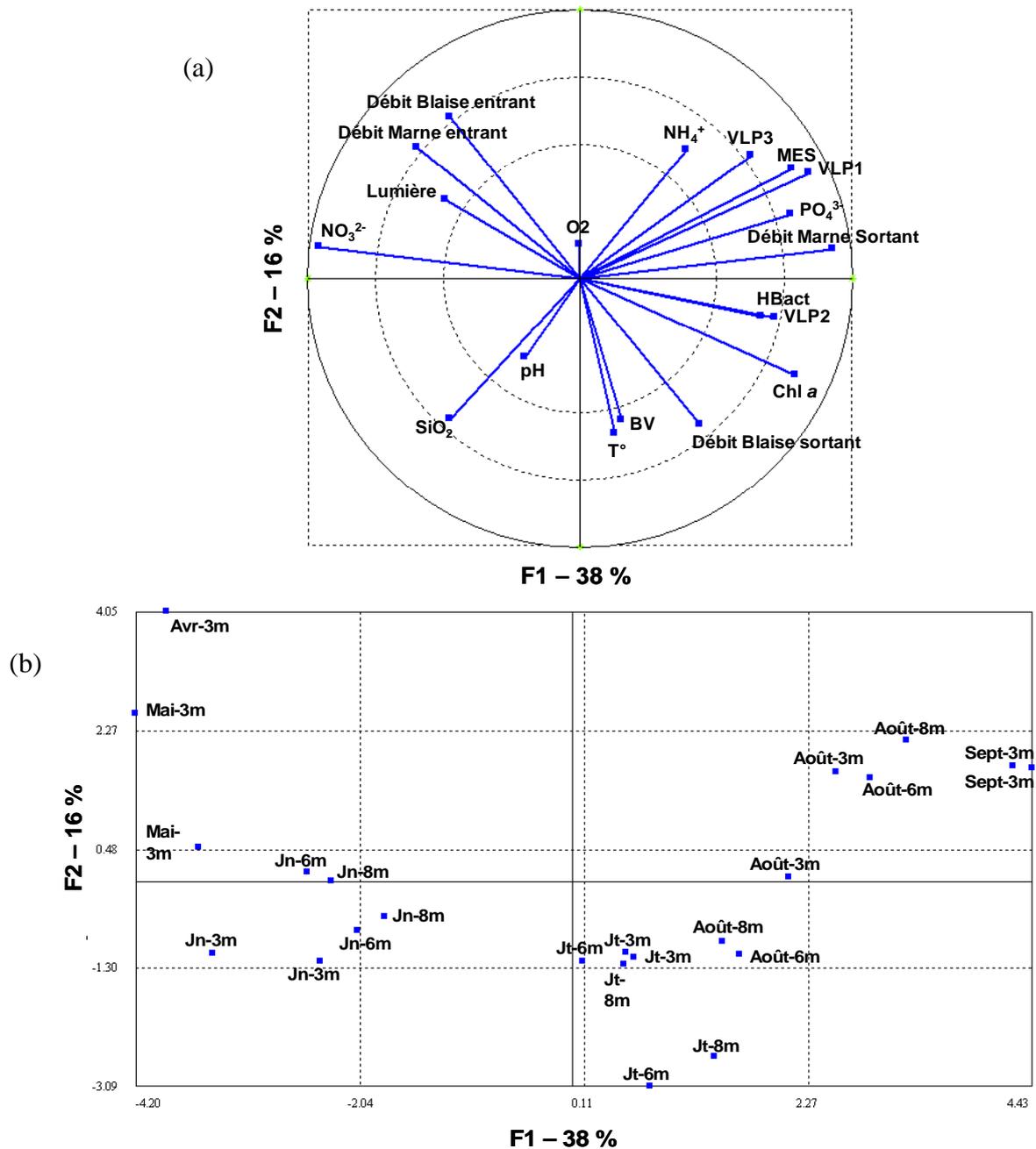


Figure 13 Représentation en ACP normée du cercle des corrélations des variables étudiées (a) et de la projection des centres d’inertie des différentes dates d’échantillonnage à une profondeur donnée (b) durant l’année 2007. (BV : Biovolume phytoplanctonique ; T° : Température ; Avr : Avril ; Jn : Juin ; Jt : Juillet ; Sept : Septembre)

La concentration en chlorophylle *a* semble être corrélée positivement à l’abondance des VLP2 et des bactéries hétérotrophes durant le mois de juillet à 3 m, le début du mois d’août à 6 m et la fin du mois d’août à 8 m. Or, en visualisant chaque courbe séparément, nous pouvons constater un pic d’abondance virale et de concentration de chlorophylle *a* au

même moment au mois de juillet. D'autre part, ces relations sont confirmées par les coefficients de corrélation trouvés pour ces trois variables prises deux à deux. Les relations entre la concentration de chlorophylle *a* et les VLP2 ou les bactéries hétérotrophes sont hautement significatives ($R = 0,62$; $p = 0,001$ pour chl *a*/VLP2 – $R = 0,46$; $p = 0,028$ pour chl *a*/Hbact). Les VLP2 et les bactéries hétérotrophes sont également hautement corrélés ($R = 0,67$; $p = 0,0005$). Par ailleurs, la concentration de chlorophylle *a* semble être négativement corrélée aux deux variables de débits entrants ainsi qu'à la concentration de nitrates. Si on considère notre période d'échantillonnage d'avril à septembre, on constate que les débits entrants les plus forts ont été observés en avril, mai et début juin spécialement pour la rivière Marne. Par contre, les forts débits sortants ont été mesurés à la fin du mois d'août et en septembre. Ainsi, en regardant la courbe de chlorophylle *a* et l'hydrodynamique du réservoir, on peut voir que les faibles concentrations de chlorophylle *a* sont associées aux débits entrants les plus forts ainsi qu'aux concentrations de NO_3^- les plus élevées. Par ailleurs, la chlorophylle *a*, testée avec les trois autres variables (relations deux à deux), présentent des corrélations hautement significatives ($R = -0,59$; $p = 0,003$ pour Chl*a*/Débit entrant Marne ; $R = -0,61$; $p = 0,002$ pour Chl*a*/Débit entrant Blaise; $R = -0,79$; $p < 0,0001$ pour Chl*a*/ NO_3^-). Finalement, les concentrations de chl*a* et le biovolume phytoplanctonique ne semblent pas associés sur le cercle des corrélations. Par ailleurs, la relation entre ces deux variables nous donne un coefficient de corrélation non-significatif ($R = 0,1$; $p = 0,64$).

Discussion

La projection sur le plan factoriel des dates d'échantillonnages pour l'année 2007 montre des regroupements organisés au regard des variables physico-chimiques et biologiques incluses dans l'analyse en composantes principales. Les variables qui caractérisent le mois d'avril et le début du mois de mai sont clairement les variables de débits entrants. Ces derniers sont assez élevés à cette période et correspondent à la phase de remplissage du réservoir. Par ailleurs, cette période est également caractérisée par de forts apports en nitrates. Etant donné que la partie amont du bassin versant du réservoir Marne est soumise à une importante activité agricole, de grandes quantités d'azote sont amenées jusque dans le réservoir (Garnier *et al.* 2000). Comme l'ont remarqué ces auteurs, au cours d'une étude réalisée entre 1993 et 1995, la rétention des nitrates dans le réservoir Marne était comprise

entre 700 et 1500 tonnes d'azote (N) par an, soit 40% des apports. Les nitrates constituent une forme d'azote potentiellement assimilable pour le phytoplancton et/ou les bactéries et il est relativement fréquent dans la plupart des eaux tempérées de trouver de fortes concentrations en hiver et de faibles concentrations en été puisque le taux d'assimilation par les microorganismes est supérieur aux apports externes durant la période estivale (Reynolds 1984). Cependant, d'après certaines études, il semble que la dénitrification plus que l'utilisation par la biomasse phytoplanctonique soit à l'origine des pertes d'azote dans ce système (Sanchez 1997 ; Garnier *et al.* 1999). Au cours de cette période qui correspondait au sortir de l'hiver et au début du printemps, plusieurs classes algales sont présentes, notamment les diatomées qui sont les premières formes colonisatrices et les desmidiacées qui peuvent être associées aux diatomées durant cette période (Watanabe *et al.* 2000; Reynolds *et al.* 2002; Negro *et al.* 2003). L'eau alimentant le réservoir provient des rivières Marne et Blaise et comme les diatomées constituent une classe majoritaire des milieux lotiques (Villeneuve 2008), il n'est pas surprenant de les retrouver à cette période dans cet écosystème. Par ailleurs, elles peuvent vivre dans des eaux très perturbées et elles sont favorisées par les perturbations hydrologiques du milieu qui leur permettent de rester en suspension. Ainsi, ces espèces non mobiles n'ont pas d'autres moyens de contrer leur tendance à sédimenter afin de réaliser la photosynthèse et d'obtenir des nutriments.

La fin du mois de mai et le mois de juin sont caractérisés par l'apparition des chrysophycées qui, très rapidement, constituent une grande part du biovolume phytoplanctonique. Ces espèces sont typiques de la période estivale et sont également associées à une grande biodisponibilité de la silice dissoute à cette période (Clegg *et al.* 2003). Les chrysophycées peuvent présenter des écailles ou loger dans une logette (appelée lorica) composée de silice ou de carbonate de calcium. Ainsi, la silice dissoute participe à l'élaboration de ces composantes pour certaines espèces, notamment les *Dinobryon* spp très présents à cette période de l'année (Lott et Siver 2005 ; Kristiansen 2008).

La fin du mois de juillet et le début du mois d'août sont caractérisés par les biovolumes les plus importants. A la fin du mois de juillet, les chlorophycées se développent aux profondeurs de 6 et 8 m tandis qu'au mois d'août on observe une communauté phytoplanctonique mixte essentiellement composée de chlorophycées, desmidiacées, diatomées et dinoflagellés aux trois profondeurs. Durant cette période, les valeurs de

température et de biovolume sont les plus élevées et la température pourrait ainsi favoriser la croissance du phytoplancton. Cette relation qui lie la température et le taux de croissance maximal du phytoplancton a été mise en évidence à plusieurs reprises (Reynolds, 1984 ; Seip et Reynolds 1995, Padisak 2004). Il faut noter, toutefois, que cette relation est valable dans le cas bien précis de la période de temps considérée et non pour l'ensemble de la période d'échantillonnage puisque nous n'avons pas trouvé de relation significative pour l'ensemble du jeu de données.

Au début du mois d'août, aux profondeurs de 6 et 8 m, des concentrations relativement élevées de chlorophylle *a* ont été mesurées. Ces concentrations de chl *a* étaient associées à des abondances élevées de bactéries hétérotrophes et du groupe de virus, nommé VLP2, ces virus et les bactéries étant eux mêmes fortement liés. Les abondances bactérienne et virale sont souvent très importantes en été dans les lacs mésotrophes (Lymer *et al.* 2008 ; Personnic *et al.* 2009). Par ailleurs, la relation entre bactéries hétérotrophes et virus a déjà été observée dans les milieux productifs et riches en éléments nutritifs (Gasol et Duarte 2000 ; Clasen *et al.* 2008) ainsi que dans des milieux mésotrophes (Personnic *et al.* 2009). Cependant, dans ces milieux, cette relation mettait en scène les virus de type VLP1 et non les VLP2 comme c'est le cas dans notre étude puisque ces derniers semblent plutôt être des cyanophages ou des virus de micro-algues (Payet et Suttle 2008). De façon générale, les VLP1 sont plus nombreux dans le milieu (10 à 100 fois plus) que les VLP2. Puisque la rencontre entre un virus et une bactérie se fait de manière passive, par des mouvements aléatoires, la probabilité qu'un VLP1 rencontre une bactérie est beaucoup plus forte que pour un VLP2. L'abondance plus que la fonction elle-même des VLP1 pourrait alors expliquer la forte relation qui existe entre les VLP1 et les bactéries mais n'exclue pas le fait que les VLP2 puissent potentiellement être des bactériophages. D'autre part, la relation entre les concentrations de chlorophylle *a* et les abondances de VLP2 a été observée dans les lacs péri-alpins de statut mésotrophe (Personnic *et al.* 2009). Cette association était principalement due à la présence de picocyanobactéries et/ou de petits eucaryotes alors que dans notre étude, elle était due à la présence de desmidiacées, de diatomées, de dinoflagellés et d'euglènes. Finalement, la relation entre les concentrations de chlorophylle *a* et l'abondance bactérienne peut être expliquée par le fait que les bactéries hétérotrophes consomment et dégradent la matière organique dissoute qui provient essentiellement des producteurs primaires, c'est à dire les organismes phytoplanctoniques eucaryotes et les cyanobactéries (Azam *et al.* 1994 ; Pinhassi *et al.* 1999).

D'après les résultats de l'analyse en composantes principales, la concentration de la chlorophylle *a* et le biovolume phytoplanctonique ne semblent pas être deux variables qui évoluent de la même manière. Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre 2 (article 2), nous avons utilisé un biovolume moyen pour chaque espèce quelque soit l'échantillon considéré. Cependant, le biovolume peut se modifier selon la saison et la profondeur à laquelle se situe l'espèce, tout comme la concentration de chlorophylle *a* des cellules phytoplanctoniques peut changer dans le temps et dans l'espace (Harris 1986; Tadonlélé *et al.* 1998). De plus, les différences dans la composition taxonomique du phytoplancton peuvent être responsables de la plus grande part de la variabilité observée dans la relation chlorophylle-biovolume qui dépend du stade de développement des espèces majoritaires et de la taille des cellules (Felip et Catalan 2000). Par conséquent, il est généralement difficile de trouver une relation claire entre les concentrations de chlorophylle *a* et le biovolume phytoplanctonique (Labaugh 1995) puisque ces variables ne sont pas directement reliées et que la variation de taille des cellules et de contenu en chlorophylle *a* est élevé non seulement entre les classes phytoplanctoniques mais souvent aussi au sein d'un même genre ou d'une même espèce au cours de plusieurs saisons (Desortova 1981; Gregor *et al.* 2005). Finalement, le manque de relation entre ces deux variables peut dépendre, de facteurs internes à la cellule tels que son statut physiologique (un biovolume important mais une faible activité photosynthétique) et aussi de facteurs externes tels que les conditions de lumière et de température (Soohoo *et al.* 1986; Felip et Catalan 2000; Staehr *et al.* 2002), la disponibilité en nutriments (Pannard *et al.* 2007; Twiss et McLeod 2008)

La fin du mois d'août et le mois de septembre sont caractérisés par un débit sortant important à la station de restitution qui fournit au canal, l'eau qui est amenée à la rivière Marne. Cette période correspond à la phase de vidange du réservoir et la capacité de ce dernier est fortement réduite. Cette diminution du niveau de l'eau va de pair avec des fortes concentrations de matières en suspension (dont dépend également la turbidité du milieu qui présente de fortes valeurs à cette période) car l'eau est plus facilement sujette à un brassage de la colonne, ce qui, par conséquent, peut remettre en suspension des particules sédimentées et intensifier le recyclage des éléments nutritifs. Quant à la communauté phytoplanctonique composée majoritairement de chlorophycées, de desmidiacées, de diatomées et de dinoflagellés, elle présente des biovolumes relativement élevés tout comme la chlorophylle *a*

dont la concentration reste importante. Si la capacité du réservoir baisse et que ce dernier conserve son « pool » algal, il est possible de retrouver des biovolumes et des concentrations de chlorophylle *a* élevés. Ces biovolumes algaux élevés participent aussi aux fortes concentrations de matières en suspension retrouvées à la fin de l'été et au début de l'automne (Garnier *et al.* 2000). Par ailleurs, cette période est celle où les concentrations d'orthophosphates sont maximales. Or, les orthophosphates dissous sont une source majoritaire de phosphore assimilable dans l'eau par le phytoplancton et contribuent à la croissance de ces microorganismes. Ainsi, nous aurions du observer une dynamique inverse, comme cela a été décrit par exemple par Anneville et Leboulanger (2001). La consommation des orthophosphates peut être décelée entre avril et juin. Puis une augmentation de la concentration est observée. L'hypothèse de relargage du phosphore provenant des sédiments ne semble pas plausible puisque les concentrations d'oxygène au fond du réservoir ne sont jamais inférieures à 5,3 mg·L⁻¹. De plus, d'après une étude menée entre 1993 et 1995, il semble que les flux de phosphates à l'interface eau-sédiment soient à peine perceptibles (Sanchez 1997). Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution du volume du réservoir va concentrer tout le pool de matière organique, qui va ainsi être fortement dégradé par les bactéries, provoquant un flux d'orthophosphates dans la colonne d'eau. De plus, les fortes abondances de virus enregistrées au cours de cette période laissent supposer une forte activité lytique. Cette dernière engendrerait une production importante de débris cellulaires (matière organique dissoute et particulaire, notamment des éléments inorganiques), hautement biodégradables par des bactéries présentes dans l'écosystème (Middelboe *et al.* 1996).

L'ammonium présente des concentrations élevées à la fin de l'été et au début de l'automne. Cette augmentation pourrait correspondre à une forte minéralisation (dégradation) de la matière organique par des bactéries aérobies (Garnier *et al.* 1998). Cependant, un pic d'ammonium est observé au mois d'août, ce qui fort probablement pourrait être mis en relation avec une augmentation de l'abondance du zooplancton qui rejette de l'ammonium via ses excréments. Malheureusement, nous ne disposons pas encore des données zooplanctoniques et nous ne pouvons qu'émettre cette hypothèse, mais les échantillons étant disponibles, nous serons rapidement en mesure de confirmer ou infirmer cette hypothèse. Notons ici que cette forte relation entre la concentration d'ammonium dans le milieu et

l'abondance de zooplancton a déjà été mise en évidence, par exemple dans des lacs mésotrophe et oligotrophe durant l'été (Perga et Gerdeaux 2006).

De façon assez surprenante de prime abord, les cyanobactéries n'ont jamais représenté une part importante du biovolume phytoplanctonique à la station de référence. Ces espèces se développent généralement en fin d'été et au début de l'automne dans les milieux tempérés (Chorus et Bartram 1999). Elles sont capables de stocker le phosphore dans leur cytoplasme et présentent également une capacité à croître sous de faibles intensités lumineuses associées à de grandes turbidités. Etant donné que la fin de la période d'échantillonnage est caractérisée par des concentrations d'orthophosphates élevées et de fortes concentrations de matières en suspension qui peuvent diminuer l'intensité lumineuse arrivant dans la colonne d'eau, on aurait pu s'attendre à obtenir une proportion de cyanobactéries plus importante. D'après Garnier *et al.* (2000), l'hydrologie du réservoir n'est pas un facteur dominant dans le contrôle du développement des organismes phytoplanctoniques, le temps de résidence des eaux étant beaucoup plus élevé que le temps de génération des algues. Il reste toutefois que l'hydrologie, ici à prendre dans le sens de courantologie, est un facteur déterminant pouvant expliquer l'absence de développement des cyanobactéries. Il est d'ailleurs intéressant de noter ici que le bateau devait être souvent maintenue sur une bouée de surface ancrée de manière permanente sur le réservoir lors des prélèvements à cette station afin de ne pas dériver de la zone d'échantillonnage. Le vent, indépendant de l'écosystème en lui même, peut être un facteur clé dans la prolifération des cyanobactéries. A cette période où la capacité du réservoir diminue et par conséquent la profondeur de la station de référence est plus faible, la colonne d'eau a tendance à être brassée. Ces microorganismes étant sensibles à la stabilité de la colonne d'eau et proliférant généralement lorsque la surface de l'eau est calme, il est possible que les conditions météorologiques n'aient pas favorisé le développement de ces microorganismes. Par ailleurs, l'existence de fortes concentrations de virus susceptibles de lyser les cyanobactéries pouvait freiner le développement de cette classe algale (Jardillier *et al.* 2005 ; Tijdens *et al.* 2008). Dans ces conditions, il semble que le lac du Der, dans sa partie pélagique ait une probabilité assez faible d'être fortement assujetti à une efflorescence cyanobactérienne. Corroborant nos hypothèses, lorsqu'une efflorescence cyanobactérienne a été rapportée dans cet écosystème, c'était dans l'étang de la dame, situé dans la partie sud du réservoir, caractérisée par des eaux stagnantes de faible profondeur et assujetties à une forte pollution par les nutriments (Martin 2001).

Conclusion

L'objectif de cette partie était de donner un premier aperçu des variables importantes qui structurent la dynamique du phytoplancton du Réservoir Marne. Les variables qui étaient associées à la dynamique du système et de la communauté phytoplanctonique étaient différentes selon les périodes de l'année 2007. Au début du printemps les concentrations de nitrates élevées et les forts débits entrants étaient associés au début de la croissance du phytoplancton. Au printemps et au début de l'été, l'augmentation du biovolume phytoplanctonique était associée à la diminution de la silice dissoute, utilisée par les chrysophycées. En plein été, on retrouvait les biovolumes phytoplanctoniques maximaux associés aux fortes températures estivales. De plus, cette même période associait les concentrations de chl *a* aux abondances élevées de bactéries hétérotrophes et de VLP2. Finalement, la fin de l'été et le début de l'automne étaient caractérisés par un débit sortant important dans le canal Marne et des concentrations d'orthophosphates importantes résultant de la concentration de la matière organique due à la diminution du volume du réservoir et de l'intensification de sa dégradation. De toute évidence, plusieurs autres analyses auraient pu être mises en place pour avoir une meilleure idée du fonctionnement du réservoir Marne, notamment des mesures d'activités photosynthétiques (production primaire) et bactériennes. Par ailleurs, pour avoir une estimation précise du rôle de la lyse virale et du broutage par le zooplancton sur la régulation de la croissance de la communauté phytoplanctonique et bactérienne, nous avons réalisé des expériences de dilution chaque mois pendant 48h tels qu'imaginés par Evans *et al.* (2003). Cette technique ayant consisté à incuber, dans des sacs à dialyse, des échantillons d'eau après dilution avec de l'eau ultrafiltrée ou simplement filtrée à travers 0,45 μm à différents niveaux (20%, 40%, 70%), pour réduire l'abondance des prédateurs et/ou parasites viraux du phytoplancton et des bactéries, devrait permettre de mesurer l'impact du zooplancton et des virus sur les taux de croissance bactérien et phytoplanctonique. Les résultats permettront d'approcher deux facteurs clés qui sont la croissance et la mortalité de ces compartiments, et donc un aspect fonctionnel important dans l'écologie du réservoir Marne.

Références

AFNOR. 1997. Qualité de l'eau (Tome 2). Méthodes d'analyse 1 : Analyse organoleptique, mesures physico-chimiques, paramètres globaux, composés organiques (2^{ème} édition). AFNOR, Paris.

AFNOR. 1999. Water Quality. Determination of Chlorophyll a and of a phaeopigments index. Molecular Absorption Spectrometric Method. NF T90-117. 12p.

Anneville, O. et Leboulanger, C. 2001. Long-term changes in the vertical distribution of phytoplankton biomass and primary production in lake Geneva : a response to the oligotrophication. *Atti Associazione Italiana Oceanologia Limnologia*. 14 : 25-35.

Azam, F., Smith, D.C., Steward, G.F. et Hagstrom, A. 1994. Bacteria – Organic matter Coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology*. 28: 167-179.

Brussaard, C.P.D. 2004. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 : 1506-1513.

Chorus, I. et Bartram, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London.

Clasen, J.L., Brigden, S.M., Payet, J.P. et Suttle, C.A. 2008. Evidence that viral abundance across oceans and lakes is driven by different biological factors. 53: 1090-1100.

Clegg, M.R., Maberly, S.C. et Jones, R.I. 2003. Behavioural responses of freshwater phytoplanktonic flagellates to a temperature gradient. *European Journal of Phycology*. 38: 195-203.

Desortová, B. 1981. Relationship between chlorophyll a concentration and phytoplankton biomass in several reservoirs in Czechoslovakia. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*. 66: 153-169.

Evans, C., Archer, S.D., Jacquet, S. et Wilson, W.H. 2003. Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population. *Aquatic Microbial Ecology*. 30 : 207-219.

Fabbro, L.D. et Duivenvoorden, L.J. 2000. A two-part model linking multidimensional environmental gradients and seasonal succession of phytoplankton assemblages. *Hydrobiologia* 438 :13-24.

Felip, M. et Catalan, J. 2000. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake : decoupling in their spatial and temporal maxima. *Journal of Plankton Research*. 22: 91-105.

Garnier, J., Billen, G. et Levassor, A. 1998. Réservoirs : Fonctionnement et impacts écologiques (Chapitre 6). Dans Meybeck, M., De Marsily, G. et Fustec, E. (eds). *La Seine en son bassin : Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé*. Elsevier, Paris. pp. 263-300.

Garnier J., Leporcq B. Sanchez N. et Philippon X. (1999)- Biogeochemical budgets in three large reservoirs of the Seine basin (Marne, Seine & Aube reservoirs). *Biogeochemistry*, 47: 119-146.

Garnier, J., Billen, G., Sanchez, N. et Leporcq, B. 2000. Ecological functioning of the Marne reservoir (Upper Seine basin, France). *Regulated Rivers : Research and Management*. 16 : 51-71.

Gasol, J.M. et Duarte, C.M. 2000. Comparative analyses in aquatic microbial ecology: how far do they go? *FEMS Microbiology Ecology*. 31: 99-106.

Gons, H.J., Burger-Wiersma, T., Otten, J.H. et Rijkboer, M. 1992. Coupling of phytoplankton and detritus in a shallow eutrophic lake (Lake Loosdrecht, The Netherlands). *Hydrobiologia*. 233: 51-9.

Gregor, J., Geriš, R., Maršálek, B., Hetesá, J. et Marvan, P. 2005. *In situ* quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia*. 548: 141-151.

Hambright, K.D. et Zohary, T. 2000. Phytoplankton species diversity control through competitive exclusion and physical disturbances. *Limnology and Oceanography*. 45 : 110-122.

Harris, G.P. 1986. *Phytoplankton Ecology: Structure, function and fluctuation*. Chapman and Hall, London.

Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kieschtel, D., Zohary, T. et Pollinger, U. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*. 35: 403-424.

Jardillier, L., Bettarel, Y., Richardot, M., Bardot, C., Amblard, C., Sime-Ngando, T. et Debroas, D. 2005. Effects of viruses and predators on prokaryotic community composition. *Microbial Ecology*. 50 : 557-569.

Kimmel, B., Lind, O. et Paulson, L. 1990. Reservoir Primary Production. *Dans : Reservoirs Ecosystems*. Thornton, K. (ed.). John Wiley and Sons, New York. pp : 133-193.

Kristiansen, J. 2008. Dispersal and biogeography of silica-scaled chrysophytes. *Biodiversity and Conservation*. 17 : 419-426.

Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G. et Reynolds, C.S. 2002. Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of Plankton Research*. 24 : 901-912.

Labough, J.W. 1995. Relation of algal biovolume to chlorophyll-a in selected lakes and wetlands in the North Central United States. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52 : 416-424.

Laplace-Treytore, C., Barbe, J., Dutartre, A., Druart, J.C., Rimet, F. et Anneville, O. 2009. Protocole standardisé d'échantillonnage, de conservation et d'observation du phytoplancton en plan d'eau. Version 3.3. 37 pp.

Lorenzen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments : spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*. 12 : 343-346.

Lott, A.M. et Siver, P.A. 2005. An inventory of scaled chrysophytes from North Carolina, USA, and their relationships to environmental variables. *Nova Hedwigia*. 128(suppl.) : 211-229.

Lund, J.W.G., Kilpling, C. et Le Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*. 11 : 143-170.

Lymer, D., Brendan Logue, J., Brussaard, C.P.D., Baudoux, A.C., Vrede, K. et Lindström, E.S. 2008. Temporal variation in freshwater viral and bacterial community composition. *Freshwater Biology*. 53 : 1163-1175.

Martin, C. 2001. Suivi écologique des lacs-réservoirs de Champagne: Expertise de l'étang de la Dame. Centre d'Ingénierie Aquatique, Nemours.

Middelboe, M., Jorgensen, N.O.G. et Kroer, N. 1996. Effects of Viruses on Nutrient Turnover and Growth Efficiency of Noninfected Marine Bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1991-1997.

Negro, A.I., De Hoyos, C. and Aldasoro, J.J. 2003. Diatoms and desmid relationship with the environment in mountain lakes and mires of NW Spain. *Hydrobiologia*. 505: 1-13.

Padisák, J. 2004. Phytoplankton. (Chapitre 10). *Dans* : The Lakes Handbook (volume 1). O'Sullivan, P.E. et Reynolds, C.S. (eds). Blackwell Publishing, Oxford. pp 251-308.

- Pannard, A., Bormans, M. et Lagadeuc, Y. 2007. Short-term variability in physical forcing in temperate reservoirs : effects on phytoplankton dynamics and sedimentary fluxes. *Freshwater Biology*. 52 : 12-27.
- Payet, J.P. et Suttle, C.A. 2008. Physical and biological correlates of virus dynamics in the southern Beaufort Sea and Amundsen Gulf. *Journal of Marine Systems*. 74 : 933-945.
- Perga, M. et Gerdeaux, D. 2006. Seasonal variability in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the zooplankton taxa in two alpine lakes. *Acta Oecologica*. 30 : 69-77.
- Personnic, S. 2007. Dynamique des communautés microbiennes et impact de la lyse virale sur les bactéries auto- et hétérotrophes en milieu lacustre. Thèse de doctorat de l'Université de Savoie, 358 p.
- Personnic, S., I. Domaizon, U. Dorigo, L. Berdjeb et S. Jacquet. 2009. Seasonal and spatial variability of virio, bacterio- and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. *Hydrobiologia (sous presse)*.
- Pinhassi, J., Azam, F., Hemphala, J., Long, R.A., Martinez, J., Zweifel, U.L. et Hagstrom, A. 1999. Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology*. 17 : 13-26.
- Reynolds, C.S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reynolds, C.S. 1999. Phytoplankton Assemblages in Reservoirs. *Dans: Theoretical Reservoir Ecology and its applications*. Tundisi, J.G. and Straškraba, M. (eds). International Institute of Ecology, Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers. pp: 439-456.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-flores, L. et Melo, S. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 24 : 417-428.

Roelke, D., Buyukates, Y., Williams, M et Jean, J. 2004. Interannual variability in the seasonal plankton succession of a shallow, warm-water lake. *Hydrobiologia*. 513 : 205-218.

Sanchez, N. 1997. Le processus de dénitrification dans les sédiments du barrage-réservoir de la Marne. Etude de sa cinétique et modélisation. Thèse de Doctorat en Sciences de l'Eau. Université Pierre et Marie Curie, Paris 6. 151 pp.

Seip, K.L. et Reynolds, C.S. 1995. Phytoplankton functional attributes along trophic gradient and season. *Limnology and Oceanography*. 40 : 589-597.

Sommer, U., Gliwicz, M., Lampert, W. et Duncan, A. 1986. The PEG model of seasonal succession of planktonic events in freshwaters. *Archiv für Hydrobiologie*. 106 : 433-471.

Soohoo, J.B., Kiefer, D.A., Collins, D.J. et McDermid, I.S. 1986. In vivo fluorescence excitation and absorption spectra of marine phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 8: 197-214.

Staehr, P. A., Henriksen, P. et Markager, S. 2002. Photoacclimation of four marine phytoplankton species to irradiance and nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series*. 238: 47-59.

Straškraba, M. 2005. Reservoirs and other Artificial Water Bodies. *Dans: The Lakes Handbook (Volume 2): Lake Restoration and rehabilitation*. O'Sullivan, P.E. et Reynolds, C.S. (eds). Blackwell Publishing, Oxford. pp: 300-328.

Tadonlélé, R. D., Jugnia, L. B., Sime-Ngando, T., Zebaze, S. et Nola, M. 1998. Short-term vertical distribution of phytoplankton populations in a shallow tropical lake (Lake Municipal, Yaounde, Cameroon). *Archiv für Hydrobiologie*. 143: 469-485.

Thronsen, J. 1978. Preservation and storage. *Dans : Phytoplankton Manual*. Sournia, A. (ed). Unesco, Paris. pp : 69-74.

Tijdens, M., van de Waal, D.B., Slovackova, H., Hoogveld, H.L. et Gons, H.J. 2008. Estimates of bacterial and phytoplankton mortality caused by viral lysis and microzooplankton grazing in a shallow eutrophic lake. *Freshwater Biology*. 53 : 1126-1141.

Twiss, M. et McLeod, I. 2008. Phytoplankton community assessment in eight Lake Ontario tributaries made using fluorimetric methods. *Aquatic Ecosystems : Health and Management*. 11: 422-431.

Vaulot, D. 1989. CYTOPC: Processing software for flow cytometric data. *Signal and Noise*. 2: 8.

Villeneuve, A. 2008. Effets conjoints de facteurs physiques (lumière et vitesse du courant) et chimiques (pesticides) sur la structure et la composition du périphyton : une approche multi-échelles. Thèse de doctorat de l'Université de Savoie, 223 p.

Watanabe, M.M., Mayama, S., Hiroki, M. et Nozaki, H. 2000. Biomass, species composition and diversity of epipelagic algae in mire pools. *Hydrobiologia*. 421: 91-102.

Wetzel, R.G. 2001. *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Academic Press, London.

Zohary, T., PaisMadeira, A.M., Robarts, R. et Hambright, K.D. 1996. Interannual phytoplankton dynamics of a hypertrophic African lake. *Archiv für Hydrobiologie*. 136 : 105-126.

4. Classification de l'état écologique du réservoir Marne via 3 métriques : Chlorophylle *a*, Indice planctonique lacustre et Phosphore total

Note en préparation

Anne ROLLAND^{1*}, Stéphan JACQUET¹

¹ INRA, UMR 42 (CARRTEL), Station d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

Résumé

Le phytoplancton est un des éléments de qualité biologique à évaluer dans le cadre de la DCE. Les travaux récents de De Bortoli et Argillier (2008) ont permis de construire les limites de classes d'état écologique pour la métrique chlorophylle *a* et phosphore total pour l'ensemble des plans d'eau du territoire national et l'indice planctonique lacustre (Barbe *et al.* 2003) est utilisé pour définir le niveau trophique des plans d'eau en fonction de l'abondance relative de certaines classes algales. Ainsi, nous avons appliqué les trois métriques aux données recueillies sur quatre des six stations échantillonnées sur le réservoir Marne pendant deux années (2006-2007). Les résultats montrent que les eaux de la station H, assimilée à la station de référence, présentent un état écologique bon à moyen avec un niveau trophique mésotrophe, tout comme la station J (bassin nord-ouest). Par contre, les stations G (lac Champaubert) et K (bassin sud-est) présentent des eaux eutrophes et un état écologique médiocre.

Introduction

La Directive Cadre Européenne définit l'état écologique des lacs selon 5 classes de qualité auxquelles est associé un code couleur. Il s'agit du très bon état (TB, bleu), du bon état (B, vert), de l'état moyen (MO, jaune), de l'état médiocre (ME, orange) et du mauvais état (MA, rouge). Ces états sont évalués par un écart aux conditions de références qui sont les conditions représentatives d'une masse d'eau pas ou peu influencée par l'activité anthropique (Voir introduction générale).

Le compartiment biologique phytoplanctonique a été proposé par la DCE comme élément de qualité biologique. Il a été identifié comme la première communauté biologique à répondre à l'eutrophisation et par conséquent comme un bio-indicateur potentiel répondant aux changements trophiques des masses d'eau (Solheim *et al.* 2005). Dans l'attente du développement d'une méthode d'évaluation nationale conforme aux exigences de la DCE pour l'élément de qualité phytoplancton, deux métriques ont été retenues : la concentration de chlorophylle *a* (chl *a*) pour laquelle des conditions de références et des limites de classes d'état ont été définies (De Bortoli et Argillier 2008) et l'indice planctonique (I_{pl}) pour lequel des classes de niveaux trophiques ont été établies (Barbe *et al.* 2003).

Méthodes

La chlorophylle a

Les limites de classes pour la chl *a* dans le Réservoir Marne ont été définies par le CEMAGREF et sont classées comme suit : TB/B 3,9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, B/MO 6,9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MO/ME 12,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et ME/MA 21,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (De Bortoli et Argillier 2008). Les valeurs de référence sont des concentrations calculées sur la base d'un modèle de régression linéaire tenant compte exclusivement de la profondeur moyenne à partir de valeurs moyennes de chl *a* obtenues durant la période de production phytoplanctonique (pour la majorité des cas entre avril et octobre) sur des prélèvements dans la zone euphotique des lacs et réservoirs du réseau de référence (soit au total 23 lacs et 7 réservoirs en France). L'équation du modèle de référence est la suivante :

$$\log(\text{chl } a) = 0.754 - 0.489 \times \log(\text{prof moy})$$

$$\text{Référence} = 10^{0.754 - 0.489 \times \log(\text{prof moy})}$$

Pour le réservoir Marne, la valeur de référence est établie à $2.19 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ étant donné que la profondeur moyenne du plan d'eau était estimée à 7m. La limite de classe TB/B est définie en s'appuyant sur les intervalles de prédiction à 80% construits autour du modèle de référence. Ces derniers sont calculés selon l'équation suivante :

$$b + aX \pm t\left(n-2, 1-\frac{\alpha}{2}\right) S \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(X_0 - \bar{X})^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

où b est la constante du modèle de référence, a la pente du modèle de référence, n le nombre d'observations pour créer le modèle, X la variable explicative (X_0 la nouvelle observation), S la racine carrée de la variance des erreurs, t la loi de Student.

La détermination des autres limites de classes est réalisée en s'appuyant sur la relation qui existe entre la chlorophylle a et un gradient de pression, à savoir la concentration de phosphore total (PT). Pour faciliter les analyses statistiques, l'EQR (ratio de qualité écologique) est utilisé comme nouvelle métrique. Pour la chlorophylle a , qui augmente avec l'intensité de pression, l'EQR est égal au rapport entre la valeur de chl a de référence et la valeur de chl a observée. La démarche mise en place consiste dans un premier temps à linéariser la relation entre la nouvelle métrique et le phosphore total (permettant d'obtenir une proportionnalité à une constante près) qui suit une équation du type :

$$\log(EQR) = -1,685 - 0,907 \times \log(PT)$$

Dans un deuxième temps, les valeurs de référence (à savoir 1 dans le cas de l'EQR) et de limite TB/B (à savoir 0,56 dans le cas de l'EQR) permettent de calibrer une largeur de classe du point de vue du phosphore total (Figure 14).

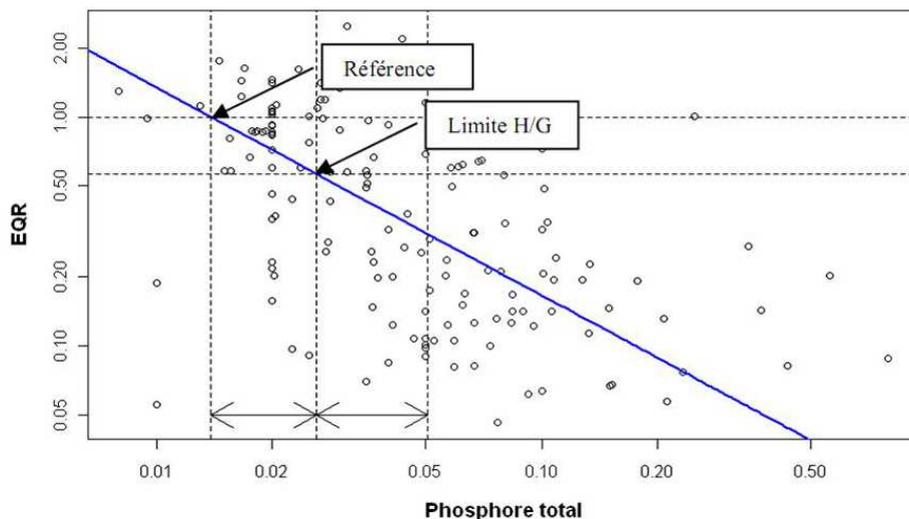


Figure 14 Relation entre l'EQR et la concentration en phosphore total ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (échelle log-log). La droite pleine bleue correspond à la régression linéaire. (Reproduit d'après De Bortoli et Argillier 2008, avec l'autorisation des auteurs)

Cette valeur de largeur est reportée autant de fois que nécessaire pour chacune des limites de classe selon les équations suivantes :

$$\text{largeur de classe} = \log(\text{limite TBIB}) - \log(\text{référence}) = \log(\text{limite TBIB}) - \log(1) = \log(\text{TBIB})$$

$$\text{limite BIMO} = 10^{2 \cdot \log(\text{limite TBIB})}$$

$$\text{limite MOIME} = 10^{3 \cdot \log(\text{limite TBIB})}$$

$$\text{limite MEIMA} = 10^{4 \cdot \log(\text{limite TBIB})}$$

Ainsi, des limites de classes pour la concentration de PT dérivées de la relation qui lie la chl *a* et le PT sont établies comme suit pour le réservoir Marne (Tableau IV):

Tableau IV Limites de classes de qualité définies pour la concentration de phosphore total (PT) dans le réservoir Marne (De Bortoli et Argillier 2008)

Limites de classes	REF	TB/B	B/MO	MO/ME	ME/MA
PT ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,014	0,026	0,049	0,092	0,173

L'indice planctonique

L'indice planctonique (I_{pl}), quant à lui, est estimé par la présence et l'abondance relative de différents groupes algaux et est calculé par la formule suivante :

$$I_{pl} = \sum Q_i * A_j$$

où Q_i est le coefficient attribué à chaque groupe d'algues et A_j est la classe d'abondance relative de chaque groupe d'algues.

Les coefficients de chaque groupe algal sont attribués comme suit :

Groupe algal	Q_i
Desmidiacées	1
Diatomées	3
Chrysophycées	5
Dinophycées et Cryptophycées	9
Chlorophycées (sauf Desmidiacées)	12
Cyanobactéries	16
Euglènes	20

Ainsi, un poids plus élevé est logiquement attribué aux groupes les plus liés à l'eutrophisation et/ou les plus indésirables (cyanobactéries, euglènes).

Les classes d'abondance relative de chaque groupe algal sont définies comme suit :

%	0	10	30	50	70	90	100
A_j	0		1	2	3	4	5

L'indice est calculé avec les résultats obtenus lors des trois campagnes de prélèvements (entre mi-mai et fin juin, juillet ou août, entre septembre et mi-octobre) sur quatre préconisées par la DCE, effectués au filet, au cours de la période de production biologique, qui peut aller de mai à octobre selon le plan d'eau.

Il est interprété selon la grille suivante :

Valeur de l'indice	0	20	50	100
Niveau trophique	Oligotrophie	Mésotrophie	Eutrophie	

Dans l'article intitulé « Assessing phytoplankton structure and spatio-temporal dynamics in a freshwater ecosystem using a powerful multiway statistical analysis » présenté en première partie de ce chapitre, nous avons identifié une station (potentielle) de référence, la station H, grâce aux données phytoplanctoniques de deux années d'échantillonnage (2006-2007) mais nous avons également mis en évidence que 3 autres stations G, K et J présentaient une dynamique et une composition spécifiques de la communauté phytoplanctonique, différente de celle présentée dans la station H suggérant ainsi le suivi régulier de ces 3 autres stations.

Pour illustrer plus en détails les différences retrouvées entre ces stations et pour définir l'état écologique du réservoir Marne, nous avons appliqué les deux métriques (chl *a* et I_{pl}) à nos données des années 2006 et 2007. Les résultats présentés sont issus de prélèvements effectués à une profondeur de 3 mètres (prélèvements discrets) dans la zone euphotique entre avril et septembre (10 mesures) pour la chl *a* et entre mai et septembre (9 mesures) pour l'I_{pl} selon les préconisations de De Bortoli et Argillier (2008) et Barbe *et al.* (2003) respectivement.

Résultats

Définition de l'état écologique du Réservoir Marne grâce aux limites de classe établies pour les concentrations de chlorophylle a et de phosphore total

L'état écologique des différentes stations échantillonnées, obtenu grâce aux classes de concentrations de chlorophylle *a* définies par le CEMAGREF, est présenté dans le tableau ci dessous (Tableau V).

Tableau V Concentrations de chlorophylle *a* (chl *a*) moyennes obtenues à partir de prélèvements à une profondeur de 3 mètres dans la zone euphotique pour les années 2006 et 2007 ainsi que les états écologiques associés.

Stations	H		G		K		J	
Années	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
[Chl <i>a</i>] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	6,5	7,0	17,0	17,9	14,1	8,0	3,72	4,57
Etat écologique	B	MO	ME	ME	ME	MO	TB	B

La station H (Giffaumont) qui est représentative du réservoir Marne dans son ensemble et sur laquelle nous pouvons nous appuyer pour classifier l'état écologique de cette masse d'eau, présente un état écologique bon (2006) à moyen (2007). Par contre, les stations G (lac Champaubert) et K (bassin sud-est) présentent une eau d'une qualité médiocre à moyenne. A l'opposé, la station J (bassin nord-ouest) présente un état écologique très bon à bon. Nous voyons donc que globalement il existe une grande disparité entre les stations échantillonnées qui se traduit par différents états écologiques associés aux concentrations de chl *a* moyenne estivale obtenues durant les deux années d'échantillonnage.

De la même manière, l'état écologique, basé sur les concentrations de phosphore total dont les limites de classes sont dérivées de la relation qui lie les valeurs d'EQR pour la chl *a* et le PT, est présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau VI) pour les différentes stations d'intérêt du réservoir Marne.

Tableau VI Concentrations de phosphore total (PT) moyennes obtenues à partir de prélèvements à une profondeur de 3 mètres en 2006 et 2007 ainsi que les états écologiques associés.

Stations	H		G		K		J	
Années	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
[PT] ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	nd*	0,011	0,037	0,038	0,038	0,038	nd*	0,01
Etat écologique	nd*	TB	B	B	B	B	nd*	TB

* données non disponibles

La concentration moyenne de PT obtenue en 2007 à la station H laisse penser que cette dernière présente un très bon état écologique, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus avec la métrique chl *a* présentés précédemment. Il en va de même des stations G et K qui, d'après les concentrations de phosphore, présentent un bon état écologique alors que ce dernier semblait médiocre au regard des valeurs de chl *a*. Par contre, l'état écologique bon à très bon de la station J est également reflété avec les valeurs de phosphore obtenues en 2007.

Définition de l'état trophique du Réservoir Marne grâce aux niveaux trophiques établis selon les valeurs de l'indice planctonique.

L'indice planctonique a été calculé sur des échantillons prélevés à une profondeur de 3 mètres à l'aide d'une bouteille de Van Dorn (non pas au filet) au cours de la période de production biologique (entre mai et septembre) des années 2006 et 2007 et identifiés par la technique d'Utermöhl. Il s'applique généralement sur des plans d'eau naturels ou artificiels présentant une stratification thermique durable en été, ce qui n'est pas le cas pour le réservoir Marne. Cet indice est donc présenté à titre indicatif dans le tableau ci-dessous (Tableau VII) pour les 4 stations d'intérêt du réservoir Marne.

Tableau VII : Indices planctoniques (I_{pl}) calculés à partir de prélèvements à une profondeur de 3 mètres dans la zone euphotique pour les années 2006 et 2007 et niveaux trophiques associés.

Stations	H		G		K		J	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Années	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
I_{pl}	46	48	65	65	58	57	44	40
Niveau trophique	mésotrophe	mésotrophe	eutrophe	eutrophe	eutrophe	eutrophe	mésotrophe	mésotrophe

Les résultats des calculs des I_{pl} semblent indiquer que l'eau de la station H présente un niveau mésotrophe constant entre les deux années d'échantillonnage. De façon assez attendue, les eaux des stations G et K présentent un caractère eutrophe et le niveau trophique associé à l' I_{pl} ne change pas de 2006 à 2007. Finalement, le niveau trophique de la station J apparaît comme étant mésotrophe, c'est à dire identique à celui de la station de référence (H).

Discussion

Globalement, les résultats des deux métriques (chl *a* et I_{pl}) donnent des informations relativement similaires sur l'état écologique et le niveau trophique global du réservoir et des 3 autres stations qui présentent une dynamique et une composition assez spécifique de la communauté phytoplanctonique. Ainsi, le bon état écologique des stations H et J établi grâce aux valeurs de chl *a* pourrait être associé au statut mésotrophe obtenu à partir des I_{pl} . De la même manière, l'état écologique médiocre des stations G et K obtenu à partir des concentrations de chl *a* correspondrait au statut eutrophe mis en évidence par l' I_{pl} . Rappelons que la station G reçoit les eaux des rivières Marne et Blaise chargées en éléments nutritifs et en matières organiques grâce à deux canaux d'amenée. De plus, cette station du lac Champaubert est peu profonde par rapport au lac du Der. L'eau est donc plus vite chargée en éléments nutritifs et en matières organiques dissoutes, ce qui aurait tendance à se traduire par une croissance plus rapide des communautés phytoplanctoniques expliquant ainsi les concentrations moyennes de chl *a* et les I_{pl} élevés. Notons cependant, que l'indice planctonique reste une estimation très grossière du niveau trophique des plans d'eau car il considère que toutes les espèces d'une même classe (ou d'un même groupe) ont un poids écologique identique. Or, au sein d'une même classe, il est très fréquent de rencontrer des espèces indicatrices d'un statut oligotrophe et d'autres d'un statut eutrophe. Typiquement, la classe des diatomées grâce à laquelle un indice biologique diatomique (IBD) (Lenoir et Coste 1996) a été constitué renferme des espèces indicatrices de tous les niveaux trophiques. C'est pour cette raison également que les études sur les espèces (Anneville *et al.* 2002) ou sur les assemblages d'espèces indicatrices d'un même niveau trophique (Reynolds *et al.* 2002) sont préconisées. Il convient donc d'émettre certaines réserves quant à la validité de cet indice qui ne semble pas compatible avec les exigences de la DCE. D'autre part, la station K qui est un bassin nautique fermé par une digue de cloisonnement présente également une qualité dégradée de son eau. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le bassin sud-est reçoit les eaux d'un petit ruisseau extrêmement pollué, « le ru de Braucourt », qui se déverse dans l'étang de la Dame à la pointe sud-est du bassin et charge les eaux de ce dernier en nutriments favorisant ainsi la croissance algale. A ce propos, en juillet 2001, une efflorescence d'*Anabaena* sp. s'est produite à raison de 130 000 colonies par ml et des risques d'hépatotoxicité aiguës (concentrations d'équivalents microcystine-LR par litre d'eau supérieures à $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) puisque des concentrations de 27 μg d'équivalents microcystine-LR par litre d'eau ont été mesurées

causant ainsi des risques sanitaires graves (Martin 2001). En ce qui concerne la station H, elle est, pour sa part, beaucoup plus profonde et est située dans le lac du Der qui constitue la majeure partie du réservoir Marne. Elle ne reçoit pas les eaux des rivières mais celles de la station G. Etant donné le volume du lac du Der, il est possible que les eaux du lac Champaubert soient diluées et par conséquent beaucoup moins chargées en éléments nutritifs et en matières organiques susceptibles de favoriser le développement du phytoplancton. C'est ainsi que de la station G à la station H, le passage d'un statut eutrophe à un statut mésotrophe et d'un état écologique médiocre à bon/moyen au regard de la concentration de chl *a* est à la fois logique et attendu. Finalement, la station J qui constitue le deuxième bassin nautique situé au nord-ouest du lac du Der présente également un statut mésotrophe et un bon état écologique. Comme le bassin sud-est, il est fermé par une digue de cloisonnement mais par contre il ne fait pas l'objet de pollution par des arrivées d'eau. De plus, lorsque le niveau d'eau du lac du Der est supérieur au niveau de la digue, les eaux du bassin se mélangent aux eaux de la retenue principale qui présente également un statut mésotrophe et des eaux de bonne à moyenne qualité selon les critères de la DCE. Ce bassin est donc beaucoup moins exposé à une quelconque pollution, ce qui peut expliquer les concentrations de chl *a* faibles et le statut mésotrophe enregistré.

Les résultats concernant l'état écologique du réservoir Marne, issus des différentes limites de classe établies pour le PT ne coïncident pas avec l'état écologique et le niveau trophique obtenus à l'aide des deux métriques précédemment évoquées. L'état écologique résultant des concentrations de PT est toujours meilleur que l'état écologique fourni par les concentrations de chl *a* et le niveau trophique estimé par les I_{pl} . Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que la largeur des classes de qualité définie par le modèle de pression est trop grande et attribuerait ainsi un bon état écologique à des eaux qui présentent des concentrations de phosphore élevées. Si nous considérons les classes définies par Vollenweider et Kerekes (1982) qui constituent un référentiel encore utilisé de nos jours, nous pouvons constater que le très bon état écologique qui regroupe des valeurs entre 14 et 26 μgL^{-1} de PT correspond à des eaux mésotrophes dans la classification des deux auteurs. Il en va de même pour le bon état écologique dont les concentrations de PT se situent entre 26 et 49 μgL^{-1} et qui sont associées à un statut méso-eutrophe dans la classification de Vollenweider et Kerekes. Ainsi, si les valeurs de PT obtenues étaient comparées aux classes de Vollenweider, les stations G et K auraient un statut eutrophe et les stations H et J auraient un statut

mésotrophe. Cette constatation semble être plus en accord avec les résultats du niveau trophique et de l'état écologique obtenus grâce à l' I_{pl} et aux classes de chl a respectivement. Une seconde hypothèse qui pourrait expliquer le manque d'adéquation entre les concentrations de phosphore et celles de chlorophylle a concerne la cinétique de ces deux variables. En effet, il n'est pas rare d'observer un décalage entre la diminution des concentrations de phosphore et la diminution des concentrations de chlorophylle a , phénomène également appelé hystérésis (retard dans l'évolution d'un phénomène par rapport à un autre, dont il dépend). Ainsi, Jacquet *et al.* (données non publiées) ont montré que la diminution des concentrations d'orthophosphates depuis les années 1980 (de $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en 1980 à moins de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en 2008) dans le lac du Bourget n'avait pas entraîné une diminution des concentrations de chlorophylle a (Figure 15) proportionnelle à celle des orthophosphates. Les concentrations de chlorophylle a présentent de grandes fluctuations entre 1987 et 2008 et on peut noter d'ailleurs qu'entre 2005 et 2008, les concentrations de phosphore ont continué à diminuer alors que les concentrations de chlorophylle a ont augmenté de nouveau. Par conséquent, la relation qui lie la chlorophylle a au phosphore total présente une limite et la forme de la relation n'est pas forcément linéaire.

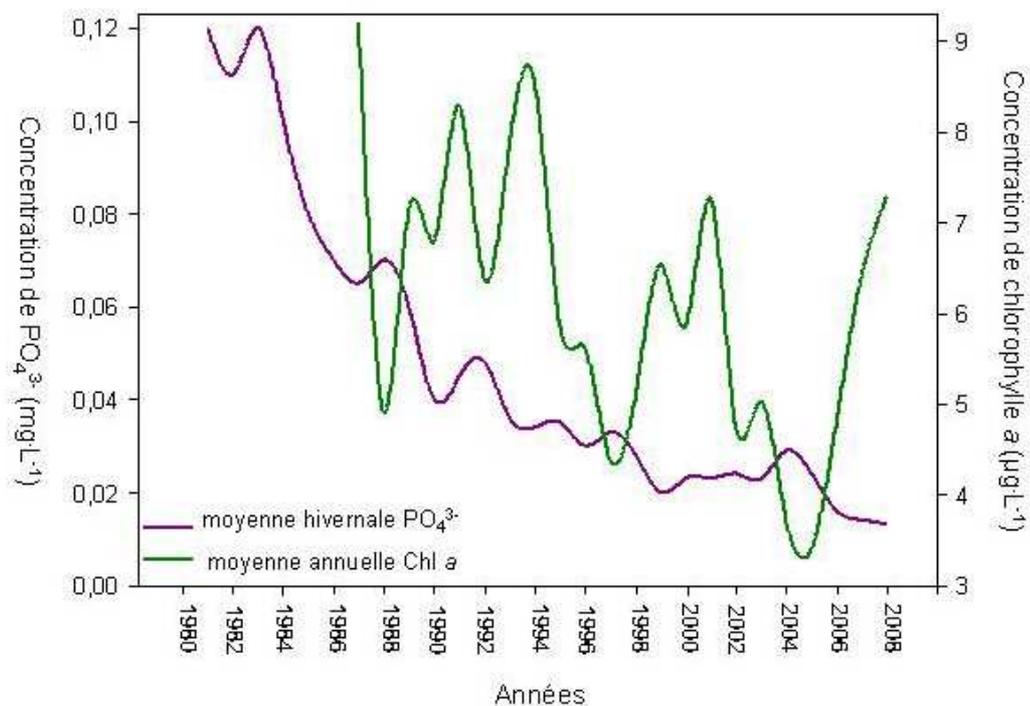


Figure 15 Dynamiques de la concentration hivernale moyenne d'orthophosphates (PO_4^{3-}) exprimée en milligrammes par litre d'eau et de la concentration annuelle moyenne de chlorophylle a (Chl a) exprimée en microgrammes par litre d'eau dans le lac du Bourget entre 1980 et 2008.

Conclusion

Les limites de classes d'état définies par De Bortoli et Argillier (2008) pour la chlorophylle *a* ont permis d'établir l'état écologique de la station H assimilée à la station de référence et des 3 autres stations d'intérêt du réservoir Marne. Cependant, le niveau d'eau de la retenue artificielle est très changeant à la fois dans le temps et dans l'espace. Par conséquent, l'utilisation du modèle de référence, qui est directement dépendant de la profondeur moyenne du réservoir, pour la définition de la valeur de référence ne semble pas très approprié. D'autre part, le modèle de pression impliquant le PT est à améliorer car les classes de qualité établies semblent trop larges. Finalement, l' I_{pl} , bien que très grossier, est en accord avec la définition des statuts trophiques de Vollenweider et Kerekes (1982) et peut donc, de façon très globale, apporter une information de base sur le niveau trophique de la masse d'eau.

Références

- Anneville, O., Ginot, V., Druart, J.C. et Angeli, N. 2002. Long-term study (1974-1998) of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva : a multi-table approach. *Journal of Plankton Research*. 24 : 993-1007.
- Barbe, J., Lafont, M., Mouthon, J. et Philippe, M. 2003. Protocole actualisé de la diagnose rapide des plans d'eau. Rapport CEMAGREF, Lyon. 24 pp.
- De Bortoli, J. et Argillier, C. 2008. Définition des conditions de référence et des limites des classes d'état sur la base d'une approche pressions/impacts - Plans d'eau - Paramètre chlorophylle-a. Rapport CEMAGREF, Aix en Provence. 51 pp.
- Lenoir, A. et Coste, M. 1996. Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the french national water board network. *Dans* : Proceedings of Use of Algae for Monitoring Rivers. Whitton, B.A. et Rott, E. (eds). Institut de Botanique, Université d'Innsbruck. 2 : 29-43.

Martin, C. 2001. Suivi écologique des lacs-réservoirs de Champagne : expertise de l'étang de la Dame. Rapport CIA, 30 pp.

Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L. et Melo, S. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 24 : 417-428.

Vollenweider, R.A., et Kerekes, J. 1982. Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. Programme de coopération sur le suivi des eaux intérieures. OCDE, Paris. 154 pp.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

&

CONCLUSIONS GENERALES

Ce chapitre final nous permet de conclure en reprenant les grandes questions auxquelles nous avons tenté de répondre au cours de cette étude et permet de faire une synthèse sous la forme d'une discussion générale. Le chapitre est divisé en trois parties en lien avec les trois thèmes majeurs de ce travail de thèse : un thème technique/instrumental, un thème sur la stratégie d'échantillonnage et un thème sur l'écologie du réservoir marne, en lien avec la DCE.

1. Les techniques et les méthodes instrumentales

Durant cette étude, nous avons utilisé quatre outils ou techniques différents qui permettent le suivi (analyse directe ou indirecte) du phytoplancton, à savoir la microscopie optique, le dosage de la chlorophylle *a* par spectrophotométrie en laboratoire, le dosage de la chlorophylle *a* par spectrofluorométrie *in situ* et la cytométrie en flux avec tri.

La microscopie nous a permis d'obtenir des informations très précises, qualitatives et quantitatives, sur la diversité et le biovolume des espèces rencontrées dans le réservoir Marne ainsi que leur dynamique spatiale et temporelle. Le dosage de la chlorophylle *a* par spectrophotométrie nous a fournis une information globale sur la biomasse phytoplanctonique, ne tenant pas forcément compte du statut physiologique des cellules (actives ou sénescents). Comparativement, la spectrofluorométrie *in situ*, basée sur la mesure de la fluorescence des cellules, a constitué un estimateur quantitatif de la biomasse phytoplanctonique active. Quant à la cytométrie en flux, elle a permis le suivi de certaines populations majoritaires, notamment après tri, mise en culture et reconnaissance de ces dernières.

Ainsi, le lecteur néophyte sur ces aspects méthodologiques aura compris que toutes ces techniques ne mesurent pas la même chose *sensu stricto*, qu'elles sont potentiellement complémentaires et qu'il peut être difficile de recommander plutôt l'une que l'autre, notamment auprès des gestionnaires de plans d'eau. Notre travail aura permis de tester et valider l'utilisation de la sonde immergeable spectrofluorométrique bbe FluoroProbeTM, au regard de la relation forte entre le dosage de chlorophylle *a* totale mesurée par spectrophotométrie (c'est-à-dire la technique classique) et les mesures données par la sonde. Ainsi une première conclusion de ce travail pourrait être de proposer, dans le cadre d'un suivi intensif de la qualité des eaux, de remplacer les dosages de la chl *a* en laboratoire, forcément limités dans l'espace au niveau de son échantillonnage, par des traits de sonde le long de la

colonne d'eau (permettant tout type de mesure, discrète ou intégrée suivant les besoins). Toutefois, nous préconisons également qu'un minimum des analyses classiques perdure afin de toujours s'assurer du bon fonctionnement et du calibrage de la sonde. Typiquement, dans le cadre de l'approche DCE qui préconise à ce jour 4 échantillonnages annuels, avec une périodicité de tous les 3 ans, il paraît raisonnable de conserver ce dosage de la chlorophylle *a* en laboratoire afin de pouvoir parer à toute éventualité logistique fâcheuse qu'il est possible de rencontrer avec ce type de sonde à savoir, manque ou défaut de batterie, grande turbidité et donc mauvaise transmission du signal, LED souillés, et autres pannes diverses. Il faut également garder à l'esprit que ce type d'outils présente quelques limites. Ainsi, avons-nous mis en évidence que les données de chlorophylle *a* fournies par la sonde spectrofluorométrique pour les différents groupes spectraux n'étaient pas toujours étroitement liées aux biovolumes des différentes classes phytoplanctoniques. Les relations linéaires étaient fortes pour le groupe des diatomées, dinoflagellés et chrysophycées, pour le groupe des cryptophycées et cyanobactéries rouges mais moins évidentes pour le groupe des chlorophycées et des desmidiacées ainsi que pour le groupe des cyanobactéries bleues, bien que toutes les relations aient été identifiées comme hautement significatives. Pour les cyanobactéries bleues, des concentrations souvent proches de zéro ont été mesurées si bien qu'il était alors difficile d'obtenir de bonnes corrélations linéaires. C'est pour cette raison que l'analyse canonique des correspondances nous a permis de mettre en évidence une bonne adéquation entre les matrices 'spectrofluorométrie' et 'biovolume' excepté pour les algues vertes. A notre sens, pour tester l'adéquation entre les différents groupes spectraux et les classes phytoplanctoniques, des analyses pigmentaires à réaliser en Chromatographie Liquide à Haute Performance/Pression devraient être envisagées puisque l'analyse de certains pigments permet la ségrégation de certaines classes algales. D'autre part, dans le cadre d'un suivi régulier annuel, il serait préférable de conserver un travail microscopique afin de pouvoir vérifier la proportion des grandes classes phytoplanctoniques présentes ainsi que les classes/espèces potentiellement problématiques et ayant tendance à former des efflorescences (notamment les cyanobactéries et dans une moindre mesure les diatomées, les dinoflagellés, les cryptophycées). La sonde bbe FluoroProbeTM est un exemple d'instrument relativement puissant et d'utilisation facile. Notons pour conclure ici que d'autres outils sont régulièrement développés et mis sur le marché. Pour ne citer qu'un seul exemple, en lien avec le suivi de la chlorophylle *a* et des cyanobactéries qui peuvent être le groupe présentant un intérêt plus particulier pour les gestionnaires de plan d'eau, la compagnie bbe moldaenke vient de

proposer cette année un outil appelé « Algae Torch ». Cette sonde manuelle (mais pouvant aussi être adaptée pour un déploiement le long de la colonne d'eau) permet la quantification de la chlorophylle *a* totale et des cyanobactéries. Les mesures sont basées sur la fluorescence naturelle des cellules algales. Ces dernières sont excitées par trois LEDs de couleur différente (470 nm ; 525 nm ; 610 nm). En réponse, les algues émettent une fluorescence rouge (680 nm). L'intensité de la fluorescence est utilisée pour calculer la concentration des différents types d'algues (cyanobactéries et la totalité du phytoplancton). Les mesures sont effectuées instantanément et s'affichent sur un écran digital en moins de 15 secondes (BIONEF, Paris).

Finalement, la cytométrie en flux, bien que très puissante, semble moins adaptée pour les gestionnaires des plans d'eau. Elle nécessite en effet un investissement financier très important ainsi que la formation d'un personnel qualifié alors qu'elle ne permet pas forcément le suivi global des communautés phytoplanctoniques ou de certaines populations pour lesquelles elle n'est pas toujours adaptée (i.e. les grandes formes filamenteuses ne sont pas adaptées à certains appareils dont les diamètres de certaines tubulures internes à l'appareil sont limités). Cette technique en est encore à ses prémices pour le suivi du phytoplancton lacustre et nécessite d'être encore améliorée avant de pouvoir être envisagée comme technique de routine pour les gestionnaires des plans d'eau. Toutefois, certains dispositifs basés sur la technique de cytométrie en flux ont été développés durant les deux dernières décennies (Dubelaar *et al.* 1999), pour un déploiement *in situ*, et permettant de réaliser le suivi de communautés phytoplanctoniques dans des eaux marines côtières ou pour les plans d'eau (Sosik et Olson 2007; Thyssen *et al.* 2008). On peut citer le CytoBuoy à titre d'exemple. Ce cytomètre compact, *in situ*, est incorporé à une plate-forme flottante pour analyser la distribution et l'abondance du phytoplancton sur des séries temporelles à haute fréquence, à des points fixes et sans avoir besoin de préparer préalablement les échantillons. L'estimation en direct de la biomasse phytoplanctonique et la capacité de cet outil à distinguer différents groupes phytoplanctoniques permet l'analyse d'échantillons naturels au moyen d'observations *in situ* quantitatives et continues (Dubelaar et Gerritzen 2000). Notons aussi qu'il existe une nouvelle génération d'appareils qui de par leur capacité de reconnaissance des organismes (par exemple le FlowCam) ou grâce à des fonctions de tri extrêmement performantes (par exemple avec le FACS Aria ou l'Influx) pourraient séduire les scientifiques gestionnaires dans les années à venir.

2. La stratégie d'échantillonnage

La stratégie d'échantillonnage est un aspect déterminant du suivi écologique et de la gestion efficace des plans d'eau. Notre travail a notamment porté sur cette question, celle-ci devant tenir compte d'un schéma idéal et de manière plus terre-à-terre de la logistique (disponibilité humaine, météorologie locale, faisabilité des analyses et du traitement). Durant cette étude nous avons pu identifier qu'il y avait un nombre minimal de stations à échantillonner pour rendre compte de la dynamique et de la diversité du phytoplancton dans l'ensemble du réservoir. Comme nous l'avons montré, trois stations H, I et N présentaient de fortes similitudes en termes de dynamique et de diversité de la communauté phytoplanctonique. La station H, qui est située dans le bassin principal du réservoir Marne, était celle qui était le plus corrélée au compromis, c'est-à-dire la situation moyenne de l'ensemble des stations échantillonnées pour la dynamique et la diversité du phytoplancton. Ainsi, cette station a pu être proposée comme pouvant être désormais la station de référence du réservoir Marne. Cependant, les trois autres stations, G (lac Champaubert), J (bassin nord-ouest) et K (bassin sud-ouest) étaient également intéressantes et présentaient des caractéristiques spécifiques de leur communauté phytoplanctonique, reflétant le caractère très hétérogène du réservoir. Les stations J et K sont des bassins clos où sont installées de nombreuses infrastructures récréatives. Il semble primordial d'y accorder une attention toute particulière en terme sanitaire et de maintenir également un suivi minimal (typiquement en période estivale) dans ces stations. Par ailleurs, la station G, qui est située dans le lac Champaubert, est la source d'alimentation du réservoir Marne et plus précisément du lac du Der étant donné que les canaux d'amenée arrivent dans cette station. Par conséquent, il semble également important de pratiquer un suivi régulier de cette station afin d'avoir connaissance du pool algal présent.

L'identification de cette station de référence a été rendue possible grâce à une méthode statistique puissante qui laisse entrevoir des perspectives intéressantes quant à la stratégie d'échantillonnage à adopter pour tout type de plans d'eau dès lors que ces derniers disposent de jeux de données assez larges. Nous avons disposé de deux années de données ce qui est à la fois suffisant (pour ne pas se baser sur une seule année) et aussi insuffisant pour conclure de manière définitive. Il est évident qu'un set de données sur plusieurs années permettrait de confirmer définitivement nos conclusions. Il reste que ce type de méthodes d'analyses est complexe et nécessite une formation poussée. Pour cette raison, les

collaborations multidisciplinaires doivent être favorisées et encouragées puisqu'elles peuvent s'avérer très fructueuses et permettre d'obtenir des réponses clés sur le plan de la gestion d'un écosystème.

En ce qui concerne les principales périodes d'échantillonnage, il est primordial et crucial de bien les choisir car leur mauvais positionnement dans l'année pourrait entraîner l'omission de certains cortèges algaux et par conséquent des biais dans l'interprétation des données collectées. La DCE préconise aujourd'hui 4 campagnes de prélèvement au cours de l'année pour les lacs : la première à la fin de l'hiver - début de printemps correspondant à la toute première phase de croissance du phytoplancton et à la période de brassage, la seconde entre mi-mai et fin juin (hors phase des eaux claires), phase printanière de croissance du phytoplancton et de mise en place de la thermocline, la troisième en juillet ou en août, en plein été, quand la thermocline est bien installée, correspondant à la deuxième phase de croissance du phytoplancton et la dernière entre septembre et mi-octobre, avant que la température ne baisse et que la stratification ne disparaisse. Dans le réservoir Marne, nous avons pu mettre en évidence 3 phases importantes dans la dynamique du phytoplancton. Une première phase pourrait correspondre à la première campagne de prélèvement préconisée par la DCE. En effet, début mars et début avril correspondent au sortir de l'hiver et au début du printemps, phase durant laquelle les diatomées sont les premières colonisatrices. La deuxième phase que nous avons mise en évidence correspond à la fin du printemps et au début de l'été et elle constituait un intermédiaire entre la deuxième et la troisième phase préconisée par la DCE. Nous y avons identifié des espèces de fin de printemps, entre autres des diatomées (*Fragilaria crotonensis*, *Cyclotella bodanica*), et des espèces de début d'été, essentiellement des chrysophycées (*Dinobryon sertularia*, *D. bavaricum*, *D. sociale* var *stipitatum*, *D. elegantissimum*). Finalement, la troisième phase que nous avons mise en évidence fait référence à la fin de l'été et au début de l'automne qui est une phase transitoire entre la troisième et la quatrième période de prélèvement recommandée par la DCE. Cette période était caractérisée dans le réservoir par une communauté mixte. Il est possible que les conditions hydrologiques instables du réservoir Marne ne permettent pas de clairement identifier les quatre périodes exactes recommandées par la DCE mais il reste que les trois périodes que nous avons identifiées au cours de ces deux années sont valables et validées par une méthode statistique adéquate.

Finalement, nos résultats ont globalement révélé qu'une seule profondeur pouvait être échantillonnée pour rendre compte de l'ensemble de la colonne d'eau. Pour éviter d'être trop

proche de la surface ou au contraire du fond, zones potentiellement très variables et non représentatives, il est proposé ici qu'une profondeur entre 3 et 6 m puisse être utilisée à l'avenir.

3. L'écologie du réservoir Marne et sa classification au regard de la DCE

L'analyse en composantes principales réalisée sur les variables environnementales et le biovolume phytoplanctonique total à la station de référence (H) nous a permis de constater que la dynamique du phytoplancton n'était pas contrôlée par les mêmes variables tout au long de la période d'échantillonnage. Au début du printemps, les concentrations de nitrates élevées et les forts débits entrants étaient associées au début de la croissance du phytoplancton. Cette période correspondait également à la phase de remplissage du réservoir qui s'étend généralement de novembre à juillet. Au printemps et au début de l'été, l'augmentation du biovolume phytoplanctonique était associée à la diminution de la silice dissoute, utilisée par les chrysophycées bien que généralement la consommation de silice accompagne la croissance des diatomées qui l'utilisent pour la formation de leur frustule. En plein été, on retrouvait les biovolumes phytoplanctoniques maximaux, associés aux fortes températures. De plus, cette même période associait les concentrations de chl *a* avec les abondances des bactéries et de certains virus (le groupe des VLP2). Finalement, la fin de l'été et le début de l'automne étaient caractérisés par un débit sortant important dans le canal Marne et des concentrations d'orthophosphates importantes résultant probablement d'une intensification de la dégradation de la matière organique.

Cependant, ces conclusions sont valables pour cette station et ne nous donnent pas d'information sur les variations spatiales de la dynamique phytoplanctonique du réservoir. Or, il est désormais généralement admis que l'étude de la structure et du fonctionnement des écosystèmes ne peut être faite rigoureusement sans prendre en compte les variables spatiales et temporelles. Dans le champ de l'écologie des communautés, déterminer les facteurs de l'environnement qui influent sur l'organisation dans l'espace et dans le temps des organismes vivants constitue donc la problématique centrale des écologistes. Dans ce contexte, l'identification des structures des organismes vivants et des paramètres du milieu, et l'étude de leur stabilité ou de leur variabilité dans le temps et dans l'espace sont des objectifs majeurs. Dans tous les cas, l'ambition de percevoir les changements de la structure des communautés à la fois dans l'espace et dans le temps mène à l'étude de données

tridimensionnelles, espace-temps-variables. Ainsi, les méthodes multitableaux semblent parfaitement adaptées pour l'analyse de telles données à trois dimensions et nous avons pu utiliser l'une des ces méthodes, l'analyse triadique partielle (ATP), afin d'étudier la stabilité spatiale de structure temporelle du peuplement phytoplanctonique du Réservoir Marne. Pour appréhender de façon plus précise le fonctionnement du réservoir Marne, nous aurions pu étudier les relations entre le peuplement phytoplanctonique et le milieu (variables environnementales mesurées) dans un cadre spatio-temporel, c'est à dire en prenant en compte non seulement toutes les dates mais également toutes les stations ou bien encore de tester l'hypothèse selon laquelle la structure des assemblages d'espèces dépend de celle du milieu. A cet effet, une méthode appelée STATICO, qui couple k paires de tableaux (espèces /milieu), permettrait de répondre à cet objectif (Blanc 2000).

Grâce aux trois métriques associées à l'élément phytoplancton (chlorophylle a , indice planctonique, phosphore total), nous avons pu classer l'état écologique de réservoir Marne. Ces métriques ont été appliquées à la station de référence et aux trois autres stations G, J et K afin de visualiser les différences entre la masse d'eau principale et les autres bassins. Il en ressort que les stations H et J présentent un bon état écologique et un statut mésotrophe grâce aux valeurs de chl a et d' I_{pl} respectivement. Cependant, il est intéressant de noter que malgré le même état trophique, ces deux stations ne présentent pas la même diversité taxonomique et le même biovolume phytoplanctonique étant donné que l'inter-structure présentée dans l'analyse triadique partielle ne les plaçait pas dans le même groupe de stations. Il en va de même pour les stations G et K qui ont toutes les deux un statut trophique plutôt eutrophe et un état écologique médiocre mais qui présentent une composition et un biovolume phytoplanctoniques différents. Cela souligne une fois de plus l'importance à accorder à ces trois autres stations (G, J et K) de par leur statut trophique et leur composition phytoplanctonique. Par ailleurs, cette constatation met en évidence le caractère fragmenté de cet écosystème si on considère l'ensemble de la masse d'eau, bassins y compris, plutôt que le lac du Der uniquement qui représente la majorité du volume du Réservoir. D'autre part, il convient de souligner que l'état écologique du réservoir Marne, issu des limites de classes établies pour le phosphore, ne coïncide pas avec l'état écologique mis en évidence avec les deux autres indices. Il semble en effet que la diminution des concentrations de phosphore total et de chl a ne suivent pas une relation linéaire et que par conséquent les classes de qualité ne tiennent pas compte du phénomène d'hystérésis (retardement) qui peut être souvent trouvé dans la relation impliquant ces deux variables.

D'après les résultats obtenus avec l'élément de qualité phytoplancton, la plus grande partie de la masse d'eau du réservoir Marne (lac du Der) semble d'ores et déjà avoir atteint le bon état écologique tel que préconisé par la DCE. D'autre part, il est tout à fait possible que des rejets locaux dans les bassins nautiques (notamment le bassin sud) puissent avoir des impacts négatifs qui contrarient les usages récréatifs sans que cela n'affecte le fonctionnement global du réservoir. Par contre, d'ici à l'horizon 2021, des efforts devront être consentis en amont de l'entrée du réservoir afin de réduire les apports de matières et les pollutions par les nutriments dans le lac de Champaubert qui constitue la source d'alimentation du réservoir Marne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AESN. 2008. Projet de circulaire actualisant les règles d'évaluation de l'état écologique et de l'état chimique des eaux douces de surface en vue de la production des cartes des états écologique et chimique actuels des masses d'eau dans les SDAGE. 51 pp.

Allee, R.J. et Johnson, J.E. 1999. Use of satellite imagery to estimate surface chlorophyll a and Secchi disc depth of Full Shoals Reservoir, Arkansas, USA. *International Journal of Remote Sensing*. 20 : 1057-1072.

Anneville, O., Ginot, V., Druart, J.C. et Angeli, N. 2002. Long-term Study (1974-1998) of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva : a multi-table approach. *Journal of Plankton Research*. 24 : 993-1007.

Anneville, O., Kaiblinger, C., Tadonlélé, R.D., Druart, J.C. et Dokulil, M.T. 2008. Contribution of Long-Term Monitoring to the European Water Framework Directive Implementation. *Proceedings of Taal2007 : The 12th World Lake Conference*. Sengupta, M. et Dalwani, R. (eds). pp 1122-1131.

Aquascop. 2002a. Analyses des sédiments du lac-réservoir Marne : Campagne préliminaire à la vidange décennale. Rapport C3741. 47 pp.

Aquascop. 2002b. Demande d'autorisation vidange décennale 2003 du lac-réservoir Marne. Rapport C3599. 95 pp.

Asconit. 2002. Hydrosystème Marne. *Dans Synthèse de l'année 2001 de la qualité physico-chimique et biologique des lacs-réservoirs de Champagne*. pp 26-40.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. et Thingstad, F. 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology – Progress Series*. 10 : 257-263.

Azam, F. et Malfatti, F. 2007. Microbial Structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*. 5 : 782-791.

Barbe, J., Lavergne, E., Rofes, G., Lascombe, M., Rivas, J., Bornard, C. et De Benedittis, J. 1990. Diagnose rapide des plans d'eau. *Informations techniques du CEMAGREF*. 79 : 1-8.

Barbe, J., Lafont, M., Mallet, L., Mouthon, J., Philippe, M. et Vey, V. 2003. Actualisation de la méthode de diagnose rapide des plans d'eau. Analyse critique des indices de qualité des lacs et propositions d'indices de fonctionnement de l'écosystème lacustre. 108 pp.

Babichenko, S., Leeben, A., Poryvkina, L., Van Der Wagt, R., De Vos, F. 2000. Fluorescent screening of phytoplankton and organic compounds in sea water. *Journal of Environmental Monitoring*. 2: 378-383.

Barbini, R., Colao, F., Fantoni, R., Palucci, A. et Ribezzo, S. 2001. Differential lidar fluorosensor system used for phytoplankton bloom and seawater quality monitoring in Antarctica. *International Journal of Remote Sensing*. 22: 369-384.

Behrenfeld, M. J., Randerson, J.T., McClain, C.R., Feldman, G.C., Los, S.O., Tucker, C.J., Falkowski, P.G., Field, C.B., Frouin, R., Esaias, W.E., Kolber, D.D et Pollack, N.H. 2001. Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science*. 291 : 2594–2597.

Beutler, M., Wiltshire, K.H., Meyer, B., Moldaenke, C., Lüring, C., Meyerhöfer, M., Hansen U.P. et Dau, H. A. 2002. Fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthesis Research*. 72: 39-53.

Billen, G., Garnier, J. et Hanset, P. 1994. Modelling phytoplankton development in whole drainage networks : the Riverstrahler model applied to the Seine river system. *Hydrobiologia*. 289 : 119-137.

BIONEF, Paris. <http://www.bionef.fr>

Bissett, W.P., Schofield, O., Mobley, C.D., Crowley, M.F. et Moline, M.A. 2001. Optical Remote Sensing Techniques in Biological Oceanography. *Dans: Methods in Microbiology*, 30. Paul J, (ed). Academic Press, London. pp. 519-538.

Blanc, L. 2000. Données spatio-temporelles en écologie et analyses multitableaux : examen d'une relation. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard – Lyon I. 265 pp.

Blandin P., 1986. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'écologie*, 17 : 215-307.

Borja, A. 2007. What does 'good ecological potential' mean, within the European Water Framework Directive ? *Marine Pollution Bulletin*. 54 : 1559-1564.

Bourelly, P. 1985a. Les algues d'eau douce: Initiation à la systématique. Tome I: Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines. Société nouvelle des éditions Boubée, Paris.

Bourelly, P. 1985b. Les algues d'eau douce: Initiation à la systématique. Tome III: Les algues Vertes. Editions N. Boubée & Cie, Paris.

Bright, D.I. et Walsby, A.E. 1999. The relationship between critical pressure and width of gas vesicles in isolates of *Planktothrix rubescens* from lake Zurich. *Microbiology*. 145 : 2769-2775.

Brussaard, C.P.D. 2004. Viral control of phytoplankton populations – A review. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51 : 125-138.

Canter-Lund, H et Lund, J.W.G. 1995. *Freshwater Algae : Their microscopic world explored*. Biopres Limited, Bristol.

Carrol, J.D. 1968. A generalization of canonical correlation analysis to three or more sets of variables. *Proceeding of the 76th Convention of the American Psychological Association*. 3 : 227-228.

Carty, S. 2003. Dinoflagellates. *Dans* : Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification. Wehr, J.D. et Sheath, R.G. (eds). Academic Press, Paris.

Cellamare, M., Rolland, A. et Jacquet, S. 2009. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* (sous presse).

Centre d'Ingénierie Aquatique. 2001. Suivi écologique des lacs réservoirs de Champagne : Expertise de l'étang de la Dame.

Chessel, D. et Hanafi, M. 1996. Analyses de la co-inertie de K nuages de points. *Revue de Statistique Appliquée*. 44 : 35-60.

Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J.B. et Welschmeyer, N.A. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*. 6180 : 340-343.

Chisholm, S.W. 1995. The iron hypothesis : Basic research meets environmental policy. *Reviews of Geophysics*. 33 : 95RG00743.

Claustre, H. 1994. The trophic status of various oceanic provinces as revealed by phytoplankton pigment signatures. *Limnology and Oceanography*. 39: 1206-1210.

Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. et Franson, M.A.H. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Water Works Association, New York.

Codd, G.A., Chorus, I. et Burch, M. 1999. Design of monitoring programmes (Chapitre 10). *Dans* : Toxic Cyanobacteria in Water. Chorus, I et Bartram, J. (eds). E & FN Spon, New York. pp 313-328.

Collier, J. L. and L. Campbell. 2000. Flow cytometry in molecular aquatic ecology. *Hydrobiologia*. 401 : 33-53.

Colyer, C.L., Kinkade, C.S., Viskari, P.J. et Landers, J.P. 2005. Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 382 : 559-569.

Commission Européenne. 2005. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/CE). Guidance on the intercalibration process 2004-2006. Guidance document n°14.

http://circa.europa.eu/Public/irc/env/wfd/library?l=/framework_directive/guidance_document/s/intercalibration/ EN 1.0 &a=d

Commission Européenne. 2008. Décision de la Commission notifiée sous le numéro C(2008)6016 établissant, conformément à la Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil, les valeurs pour les classifications du système de contrôle des Etats membres à la suite de l'exercice d'interétalonnage. JO L332. 25 pp.

Conseil des Communautés Européennes. 1979. Directive 1979/409/CEE du Conseil des Communautés Européennes concernant la conservation des oiseaux sauvages. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. JO L 103. 18 pp.

Conseil des Communautés Européennes. 1992. Directive 1992/43/CEE du Conseil des Communautés Européennes concernant la conservation des habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore sauvages. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. JO L 377. 43 pp.

Courties, C., Vaquer, A., Trousselier, M., Lautier, J., Chretiennot-Dinet, M.J., Neveux, J., Machado, C. et Claustre, H. 1994. Smallest eukaryotic organism. *Nature*. 370 : 255.

Crosbie, N.D., Pockl, M. et Weisse, T. 2003. Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *Journal of Microbiological Methods*. 55 : 361-370.

Cullen, J.J., Ciotti, A.M., Davis, R.F. et Lewis, M.R. 1997. Optical detection and assessment of algal blooms. *Limnology and Oceanography*. 42 : 1223-1239.

Davey, H.M., and Kell, D.B. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microbiological Reviews*. pp. 641-696.

De Bortoli, J. et Argillier, C. 2008. Définition des conditions de référence et des limites des classes d'état sur la base d'une approche pressions/impacts - Plans d'eau - Paramètre chlorophylle-a. Rapport CEMAGREF. 51pp.

Domaizon, I., Viboud, S. et Fontvieille, D. 2003. Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbiology Ecology*. 46 :317-329.

Druart, J.C. et Rolland, A. 2005. La vie microscopique dans les lacs de haute montagne. *Nature et Patrimoine*. 15: 7-11.

Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., Beeker, A.E.R., Jonker, R.R. et Tagen, K. 1999. Design and first results of the CYTOBUOY: an autonomous flow cytometer with wireless data-transfer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry*. 37: 247-254.

Dubelaar, G.B.J. et Gerritzen, P.L. 2000. Flow cytometric monitoring with CYTOBUOY. *Scientia Marina*. 64: 255-265.

Dubelaar, G.B.J. et Jonker, R.R. 2000. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Scientia Marina*. 64: 135-156.

Dussard, B. 1966. *Limnologie : L'étude des eaux continentales*. Gauthier-Villars, Paris.

Escofier, B. et Pagès, J. 1994. Multiple factor analysis (AFMULT package). *Computational Statistics and Data Analysis*. 18 : 121-140.

Escoufier, Y. 1973. Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics*. 29 : 750-760.

Escoufier, Y. 1987. The duality diagram : a means of better practical applications. *Dans* : Development in numerical ecology. Legendre, P. & Legendre, L. (eds). NATO advanced Institute, Serie G. Springer Verlag, Berlin. pp : 139-156.

Ettl, H. 1978. Xanthophyceae. Ettl, H., Gerloff, J. et Heynig, H. (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

Ettl, H. 1983. Chlorophyta I (Phytomonadina). Ettl, H., Gerloff, J. Heynig, H. et Mollenhauer, D. (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

Ettl, H. et Gärtner, G. 1988. Chlorophyta II (Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales). Ettl, H., Gerloff, J. Heynig, H. et Mollenhauer, D. (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M. et Codd, G.A. 1999. Safe levels and safe practices (Chapitre 5). *Dans* Chorus, I. et Bartram, J. (eds). Toxic cyanobacteria in water. A guide to public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, Londres.

Falkowski, P.G. 1980. Primary Productivity in the Sea. Plenum Press, New York.

Fietz, S., Kobanova, G., Izmet'eva, L. et Nicklisch, A. 2005. Regional, vertical and seasonal distribution of phytoplankton and photosynthetic pigments in Lake Baikal. *Journal of Plankton Research*. 27 : 793-810.

Figuerola, R.I., Garcés, E., Massana, R. et Camp, J. 2008. Description, host-specificity, and strain selectivity of the dinoflagellate parasite *Parvilucifera sinerae* sp. nov. (Perkinsozoa). *Protist*. 159: 563-578.

Gallegos, C.L. et Jordan, T.E. 2002. Impact of the Spring 2000 Phytoplankton Bloom in Chesapeake Bay on Optical Properties and Light Penetration in the Rhode River, Maryland. *Estuaries*. 25 : 508-518.

Ganf, G.G., Heaney, S.I. et Corry, J. 1991. Light absorption and pigment content in natural populations and cultures of a non-gas vacuolate cyanobacterium *Oscillatoria bourrellyi* (= *Tychomema bourrellyi*). *Journal of Plankton Research*. 13 : 1101-1121.

Garnier, J. et Billen, G. 1993. Ecological interactions in a shallow sand-pit lake (Lake Créteil Parisian basin, France) : A modelling approach. *Hydrobiologia*. **275/276** : 97-114.

Garnier, J., Billen, G., Sanchez, N., Leporcq, B. et Hanset, P. 1994. Etude du fonctionnement écologique du barrage-réservoir de la Marne (Lac du Der) : Bilans biogéochimiques et modélisation du fonctionnement du réservoir. Rapport PIREN-Seine, thème « Corridor fluvial ». 69 pp.

Garnier, J., Billen, G. et Coste, M. 1995. Seasonal succession of Diatoms and Chlorophyceae in the drainage network of the Seine River : Observations and modelling. *Limnology and Oceanography*. **40** : 750-765.

Garnier, J., Billen, G. et Levassor, A. 1998. Réservoirs : Fonctionnement et impacts écologiques (Chapitre 6). Dans Meybeck, M., De Marsily, G. et Fustec, E. (eds). *La Seine en son bassin : Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé*. Elsevier, Paris. pp. 263-300.

Garnier, J., Leporcq, B., Sanchez, N. et Philippon, X. 1999. Biogeochemical budgets in three large reservoirs of the Seine basin (Marne, Seine & Aube reservoirs). *Biogeochemistry*. **47**: 119-146.

Garnier, J., Billen, G., Sanchez, N. et Leporcq, B. 2000. Ecological functioning of the Marne reservoir (Upper Seine basin, France). *Regulated Rivers : Research and Management*. 16 : 51-71.

Garnier, J., Thieu, V., Billen, G., Touvenot, M., Guillon, T. et Amon-Moreau, D. 2007. Fonctionnement écologique du Réservoir Marne (1993-2005). Fonctionnement écologique du réservoir Marne (1993-2005). Rapport 2006, PIREN-Seine. cd-rom, 38 pp.

Gerdeaux, D., Anneville, O., Druart, J.C., Lainé, L., Lazzarotto, J., Richard, A., Rolland, A. et Zanella, D. 2005. Suivi de la qualité des eaux du lac d'Annecy. Rapport 2004. SILA (ed) et INRA-Thonon.

Gerdeaux, D., Anneville, O., Druart, J.C., Lainé, L., Lazzarotto, J., Navarro, L. et Robert, M. 2006. Suivi de la qualité des eaux du lac d'Annecy. Rapport 2005. SILA (ed) et INRA-Thonon.

Gerdeaux, D., Druart, J.C., Lainé, L., Lazzarotto, J. et Perga, M.E. 2007. Suivi de la qualité des eaux du lac d'Annecy. Rapport 2006. SILA (ed) et INRA-Thonon.

Germain, H. 1981. Flore des diatomées : eaux douces et saumâtres. Société nouvelle des éditions Boubée, Paris.

Gieskes, W.W.C. et Kraay, G.W. 1983. Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the Central North-Sea detected by HPLC analysis of pigments. *Marine Biology*. 75 : 179-185.

Gleason, F.H., Kagami, M., Lefèvre, E. et Sime-Ngando, T. 2008. The ecology of chytrids in aquatic ecosystems : roles in food web dynamics. *Fungal Biological Review*. 22 : 17-25.

Goddard, V.J., Baker, A.C., Davy, J.E., Adams, D.G., De Ville, M.M., Thackeray, S.J., Maberly, S.C. et Wilson, W.H. 2005. Temporal distribution of viruses, bacteria and phytoplankton throughout the water column in a freshwater hypereutrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*. 39 :211-223.

Grabowski, B., Cunningham, F. X. et Gantt, E. 2001. Chlorophyll and carotenoid binding in a simple red algal light-harvesting complex crosses phylogenetic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Plant Biology)*. 98 : 2911-2916.

Gregor, J. and Maršálek, B. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll *a* : a comparative study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* methods. *Water Research*. 38 : 517-522.

Griffin, S.L. et Rippingale, R.J. 2001. Zooplankton grazing dynamics: top-down control of phytoplankton and its relationship to an estuarine habitat. *Hydrological Processes*. 15 : 2453-2464.

Grime, J. P. 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley and Sons, New York.

Grover, J.P. et Chrzanowski, T.H. 2005. Seasonal dynamics of phytoplankton in two warm temperate reservoirs : association of taxonomic composition with temperature. *Journal of Plankton Research*. 27 : 1-17.

Hasle, G.R. 1978. The inverted-microscope method (*Dans Chapitre 5*). *Dans : Phytoplankton manual*. Sournia, A. (ed). Unesco, Paris. pp : 88-96.

Havskum, H., Schluter, L., Scharek, R., Berdalet, E. et Jacquet, S. 2004. Routine quantification of phytoplankton groups - microscopy or pigment analyses? *Marine Ecology – Progress Series*. 273 : 31-42.

Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kieschtel, D., Zohary, T., Pollinger, U. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*. 35: 403-424.

Hutchinson, G.E. 1967. *A Treatise on Limnology. Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton (Volume II)*. John Wiley and Sons, New York.

Ibelings, B.W., Debruin, A., Kagami, M., Rijkeboer, M., Brehm, M. et Van Donk, E. 2004. Host parasites interactions between freshwater phytoplankton and chytrid fungi (*Chytridiomycota*). *Journal of Phycology*. 40: 437-453.

Iglesias-Rodriguez, M.D., Schofield, O.M., Batley, J., Medlin, L.K. et Hayes, P.K. 2006. Intraspecific genetic diversity in the marine coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae): The use of microsatellite analysis in marine phytoplankton population studies. *Journal of phycology*. 42 : 526-536.

Jacquet, S., Lennon, J.F. et Vaulot, D. 1998a. Application of a compact automatic sea water sampler to high frequency picoplankton studies. *Aquatic Microbial Ecology*. 14 : 309-314.

Jacquet, S., Lennon, J.F., Marie, D. et Vaulot, D. 1998b. Picoplankton population dynamics in coastal waters of the NW Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*. 43 : 1916 – 1931.

Jacquet, S. 2001. La variabilité physiologique et numérique du picophytoplancton marin à petite échelle de temps. *Journal de la Recherche Oceanographique*. 26 : 61-72.

Jacquet, S. 2004. An introduction to flow cytometry : from simplified theory to simple applications and use. Department of Microbiology. University of Bergen, Norway. 67 pp.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. et Wright, S.W. 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography*. UNESCO publishing.

John, D.M. 1994. Alternation of generations in algae: its complexity, maintenance and evolution. *Biology Review*. 69: 275-291.

Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. 1993. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis publishers, CRC press, Florida. 800 pp.

Kettering, R.J. 1971. Canonical analysis of several sets of variables. *Biometrika*. 58 : 433-451.

Kirkpatrick, G.J., Millie, D.F., Moline, M.A. and Schofield, O. 2000. Optical discrimination of a phytoplankton species in natural mixed populations. *Limnology and Oceanography*. 45: 467-471.

Kofoed, C.A. 1909. On *Peridinium steinii* Jörgensen, with a note on the nomenclature of the skeleton of the Peridinidae. *Archiv für Protistenkunde*. 16 : 25-47.

Komárek, J. 2003. Coccoid and colonial cyanobacteria. *Dans* : Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification. Wehr, J.D. et Sheath, R.G. (eds). Academic Press, Paris.

Kugrens, P. et Clay, B.L. 2003. Cryptomonads. *Dans* : Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification. Wehr, J.D. et Sheath, R.G. (eds). Academic Press, Paris.

Kutser T. 2004. Quantitative detection of chlorophyll in cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Limnology and Oceanography*. 49 : 2179-2189.

Laplace-Treuture, C., Barbe, J., Dutartre, A., Druart, J.C., Rimet, F. et Anneville, O. 2009. Protocole standardisé d'échantillonnage, de conservation et d'observation du phytoplancton en plan d'eau. Version 3.3. 37 pp.

Latasa, M., Bidigare, R.R., Ondrusek, M.E. et Kennicutt, M.C. 1996. HPLC analysis of algal pigments: a comparison exercise among laboratories and recommendations for improved analytical performance. *Marine Chemistry*. 51: 315-324.

Lavit, C. 1988. *Joint Analysis of Quantitative Tables*. Masson, Paris.

Lavit, C., Escoufier, Y., Sabatier, R. et Traissac, P. 1994. The ACT (Statis method). *Computational Statistical Data Analysis*. 18 : 97-119.

Leboulanger, C., Dorigo, U., Jacquet, S., Le Berre, B., Paolini, G. et Humbert JF. 2002. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbiol Ecology*. 30 : 83-89.

Legendre, L., and C. M. Yentsch. 1989. Overview of flow cytometry and image analysis in biological Oceanography and limnology. *Cytometry*. 10: 501-510.

Letelier, R.M., Bidigare, R.R., Hebel, D.V., Ondrusek, M., Winn, C.D. et Karl, D.M. 1997. Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis. *Limnology and Oceanography*. 38 : 1420-1437.

Ley, A.C. 1980. The distribution of absorbed light energy for algal photosynthesis. *Dans* : Primary productivity in the sea. Falkowski, P.G. (ed.). Plenum Press, London.

L'Hermier des plantes, H. (1976) Structure of tables with three indices. Theory and application of a joint analysis method. PhD dissertation, University of Sciences and techniques from Languedoc, Montpellier II.

Li, W.K.W. and Dickie, P.M. 2001. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford basin) by flow cytometry. *Cytometry* 44:236-246.

Lorenzen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments : spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*. 12 : 343-346.

Lund, J.W.G., Kilpling, C. et Le Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*. 11 : 143-170.

MacArthur, R.H. et Wilson, E.O. 1967. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Mantoura, R.F.C. et Llewellyn, C.A. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry Acta*. 151 : 297-311.

Marker, A.F.H., Crowther, C.A. et Gunn, R.J.M. 1980. Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry. *Archiv für Hydrobiologie. Beiheft Ergebnisse der Limnologie*. 14 : 52-69.

Marker, A.F.H. et Jinks, S. 1982. The spectrophotometric analysis of chlorophyll a and pheopigments in acetone, ethanol and methanol. *Archiv für Hydrobiologie. Beiheft Ergebnisse der Limnologie*. 16 : 3-17.

MEDDAD. 2007. Circulaire DCE 2007/24 du 31 juillet 2007 relative à la constitution et à la mise en oeuvre du programme de surveillance (contrôles opérationnels) pour les eaux douces de surface (cours d'eau, canaux et plans d'eau). Bulletin Officiel 2007/16. Texte 10/36. 6 pp.

Métézeau, P., Miglierina, R. et Ratinaud, M.H. 1997. La cytométrie en flux : Guide pratique de préparation à l'analyse des cellules. Presse de l'Université de Limoges, Limoges.

Millie, D.F., Fahnenstiel, G.L., Carrick, H.J., Lohrenz, S.E. et Schofield, O.M.E. 2002. Phytoplankton pigments in coastal Lake Michigan: distributions during the spring isothermal period and relation with episodic sediment resuspension. *Journal of Phycology*. 38 : 639-648.

Moline, M.A., Prezelin, B.B. et Schofield, O. 1997a. Palmer LTER: Stable interannual successional patterns of phytoplankton communities in the coastal waters off Palmer Station. *Antarctic Journal of the United States*. 32 : 151-153.

Moline, M.A., Prezelin, B.B., Schofield, O. et Smith, R.C. 1997b. Temporal dynamics of coastal Antarctic phytoplankton: Environmental driving forces and impact of a 1991-1992 summer diatom bloom on the nutrient regimes. *Dans: Antarctic communities*. Battaglia, B., Valencia, J. et Walton, D.W.H. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp 67-72.

Moline, M.A. et Prezelin, B.B. 1997. High-resolution time-series data for in situ carbon fixation at a Palmer LTER site and its implications for modeling primary production in the Southern Ocean. *Polar Biology*. 17 : 39-53.

Moreno-Ostos, E., Cruz-Pizarro, L., Basanta, A. et Glen Georges, D. 2008. The spatial distribution of different phytoplankton functional groups in a Mediterranean reservoir. *Aquatic Ecology*. 42 : 115-128.

Mur, L.R., Skulberg, O.M. et Utkilen, H. 1999. Cyanobacteria in the environment. *Dans : Toxic cyanobacteria in water*. Chorus, I. et Bartram, J. (eds). E & FN Spon, London.

Murray, A.P., Gibbs, C.F. et Longmore, A.R. 1986. Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorimetric methods. *Marine Chemistry*. 19 : 211-220.

Nieke, B., Vincent, W.F., Therriault, J.C., Legendre, L., Berthon, J.F. et Condal, A. 1997. Use of a Ship-Borne Laser Fluorosensor for Remote Sensing of Chlorophyll *a* in a Coastal Environment. *Remote Sensing Environment*. 60 : 140-152.

Nielsen, E.S. 1933. Uber Quantitative Untersuchungen von Marinem Plankton mit Utermohl's umgekehrten Mikroskop. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*. 8: 201-210.

Not, F., Valentin, K., Romari, K., Lovejoy, C., Massana, R., Tobe, K., Vaultot, D. et Medlin, L.K. 2007. Picobiliphytes: A marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. *Science*. 5809 :253-255.

Nozaki, H. 2003. Flagellated Green Algae. *Dans : Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification*. Wehr, J.D. et Sheath, R.G. (eds). Academic Press, Paris.

Nusch, E.A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment determination. *Archiv für Hydrobiologie. Beiheft Ergebnisse der Limnologie*. 14 : 14-36.

Oliver, R.L. et Ganf, G.G. 2000. Freshwater blooms (Chapitre 6). *Dans : The Ecology of Cyanobacteria*. Whitton, B.A. et Potts, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. pp 149-194.

Olrik, K. 1994. Phytoplankton ecology: determining factors for the distribution of phytoplankton in freshwater and the sea. Danish Environmental Protection Agency, Denmark.

Olson, R.J., Frankel, S.L., Chisholm, S.W. et Shapiro, H.M. 1983. An inexpensive flow cytometer for the analysis of fluorescence signals in phytoplankton : chlorophyll and DNA distributions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 68 : 129-144.

Olson, R.J., Zettler, E.R., Chisholm, S.W. et Dusenberry, J.A. 1991. Advances in oceanography through flow cytometry. *Dans : Particle Analysis in Oceanography*. Demers, S. (ed). Springer-Verlag, Berlin. pp 351-399.

Olson, R. J., E. R. Zettler, and M. D. Durand. 1993. Phytoplankton analysis using flow cytometry. *Dans : Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. pp 175-186.

Ott, D.W. et Oldham-Ott, C.K. 2003. Eustigmatophyte, Raphidophyte and Tribophyte Algae. *Dans : Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification*. Wehr, J.D. et Sheath, R.G. (eds). Academic Press, Paris.

Padisák, J., Reynolds, C.S. et Sommer, U. 1993. Intermediate Disturbance Hypothesis in Phytoplankton Ecology. *Developments in Hydrobiology* 81. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 199 pp.

Padisák, J. 2004. Phytoplankton. (Chapitre 10). *Dans : The Lakes Handbook (volume 1)*. O'Sullivan, P.E. et Reynolds, C.S. (eds). Blackwell Publishing, Oxford. pp 251-308.

Padisák, J., Borics, G., Grigorszky, I. et Soróczki-Pinter, E. 2006. Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive : the assemblage index. *Hydrobiologia*. **553** : 1-14.

Pannard, A., Bormans, M. et Lagadeuc, Y. 2007a. Short-term variability in physical forcing in temperate reservoirs : effects on phytoplankton dynamics and sedimentary fluxes. *Freshwater Biology*. 52 : 12-27.

Pannard, A., Bormans, M. et Lagadeuc, Y. 2007b. Phytoplankton species turnover controlled by physical forcing at different time scales. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 65 : 47-60.

Park, M.G., Yih, W. et Coats, D.W. 2004. Parasites and Phytoplankton, with special emphasis on dinoflagellates infections. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51: 145-155.

Parlement Européen. 2000. Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Journal Officiel de l'Union Européenne. JO L 327. 72 pp.

http://ec.europa.eu/environment/water/index_en.htm

Partensky, F., Hess, W.R. et Vaultot, D. 1999. Prochlorococcus, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 : 106-124.

Pearl, H.W. 2000. Marine Plankton (Chapitre 5). *Dans : The Ecology of Cyanobacteria*. Whitton, B.A. et Potts, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. pp 121-148.

Peperzak, L., Vrieling, E.G., Sandee, B. et Rutten, T. 2000. Immuno flow cytometry in marine phytoplankton research. *Scientia Marina*. 64 : 165-181.

Personnic, S., I. Domaizon, U. Dorigo, L. Berdjeb and S. Jacquet. 2009. Seasonal and spatial variability of virio, bacterio- and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. *Hydrobiologia (sous presse)*.

Phinney, D.A. et Cucci, T.L. 1989. Flow Cytometry and Phytoplankton. *Cytometry*. 10: 511-521.

Pomeroy, L.R., Williams, P.J.I. et Azam, F. 2007. The microbial loop. *Oceanography*. 20 (SI): 28-33.

Prescott, L.M., Harley, J.P. et Klein, D.A. 2003. *Microbiologie*, 2^{ème} édition. De boeck Université, Bruxelles.

Reckerman, M. 2000. Flow sorting in aquatic ecology. *Scientia Marina*. 64: 235-246.

Reynolds, C.S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.

Reynolds, C.S. 1987. The response of phytoplankton communities to changing lake environments. *Scweizerische Zeitschrift für Hydrologie*. **49** : 220-236.

Reynolds, C.S. 1988. Fonctionnal morphology and the adaptative strategies of freshwater phytoplankton. *Dans: Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Sandgren, C.D. (ed) Cambridge University Press, New York. pp: 388-433.

Reynolds, C.S. 1990. Temporal scales of variability in pelagic environments and the response of phytoplankton. *Freshwater Biology*. **23** : 25-53.

Reynolds, C.S. 1997. *Vegetation Processes in the Pelagic. A Model for Ecosystem Theory*. ECI, Oldendorf.

Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-flores, L. et Melo, S. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. **24** : 417-428.

Riemann, B. 1980. A note on the use of methanol as an extraction solvent for chlorophyll *a* determination. *Archiv für Hydrobiologie. Beiheft Ergebnisse der Limnologie*. 14 : 70-78.

Rosowski, J.R. 2003. Photosynthetic Euglenoids. *Dans : Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification*. Wehr, J.D. et Sheath, R.G. (eds). Academic Press, Paris.

Saez, A.G., , Zaldivar-Riveron, A. et Medlin, L.K. 2008. Molecular systematics of the Pleurochrysidaceae, a family of coastal coccolithophores (Haptophyta). *Journal of Plankton Research*. 30 : 559-566.

Salsamo, N., Morabito, G., Buzzi, F., Garibaldi, L., Simona, M. et Mosello, R. 2006. Phytoplankton as an indicator of the water quality of the deep lakes south of the Alps. *Hydrobiologia*. **563** : 167-187.

Sanders, R.W., Porter, K.G. et Caron, D.A. 1990. Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. *Microbial Ecology*. 19 : 97-109.

Sartory, D.P. et Grobelaar, J.U. 1984. Extraction of chlorophyll *a* from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*. 114 : 177-187.

Schagerl, M. et Donabaum, K. 2003. Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 1. Cyanoprokaryota, Rhodophyta and Cryptophyta. *Annales de Limnologie*. 39 : 35-47.

Schanz, F., Micheletti, S. et Walsby, A.E. 1997. Factors leading to the success of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. *Phycologia*. 36 : 89-99.

Scheffer, M., Reinaldi, S., Huisman, J. et Weissing, F.J. 2003. Why plankton communities have no equilibrium : solutions to the paradox. *Hydrobiologia*. 491 : 9-18.

Solheim, A.L. 2005. Reference Conditions of European Lakes. Indicators and methods for the Water Framework Directive Assessment of Reference conditions. Version 5. REBECCA Working Group. 105 pp.

Sommer, U. 1981. The role of r- and K-selection in the succession on phytoplankton in Lake Constance. *Acta Oecologica. Oecologia Generalis*. 2: 327-342.

Sommer, U. 1985. Comparison between steady-state and non steady-state competition : experiments with natural phytoplankton. *Limnology and Oceanography*. **30** : 335-346.

Sommer, U., Gliwicz, M., Lampert, W. et Duncan, A. 1986. The PEG model of seasonal succession of planktonic events in freshwaters. *Archiv für Hydrobiologie*. **106** : 433-471.

Sommer, U. 1988. Some size-relationships in phytoplankton motility. *Hydrobiologia*. 161 : 125-131.

Soohoo, J.B., Kiefer, D.A., Collins, D.J. et McDermid, I.S. 1986. In vivo fluorescence excitation and absorption spectra of marine phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 8: 197-214.

Sosik, H.M. et Olson, R.J. 2007. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnology and Oceanography - Methods*. 5: 204-216.

Staehr, P.A. et Sand-Jensen, K. 2006. Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshwater Biology*. 51 : 249-262.

Starmach, K. 1974. Cryptophyceae, Dinophyceae, Raphidophyceae. *Flora Slodkowodna Polski*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.

Stewart, W.D.P. 1973. Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Microbiology*. 27 : 283-316.

Suttle, C.A., Chan, A.M. et Cottrell, M.T. 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature*. 347 :467-469.

Suttle, C.A. 2000. Ecological, evolutionary and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. Dans Hurst, C. (ed). *Viral Ecology*. Academic Press, San Diego. pp 247-296.

Testard, P., Pourriot, R., Miquelis, A. et Rougier, C. 1993. Fonctionnement de l'écosystème fluvial : Organisation et rôle du zooplancton. *Dans Billen, G. et Allardi, J. (eds). PIREN-Seine, Rapport de synthèse 1989-1992. Vol.1. Le fonctionnement de l'écosystème : analyse des processus de modélisation*. CNRS, Paris.

Thioulouse, J. and Chessel, D. 1987. Multi-table analyses in factorial ecology. From state typology to functional typology with the triadic analysis. *Acta Oecologica*. 8 : 463-480.

Thyssen, M., Tarran, G.A., Zubkov, M.V., Holland, R.J., Gregori, G., Burkill, P.H. et Denis M. 2008. The emergence of automated high-frequency flow cytometry : revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *Journal of Plankton Research*. 30 : 333-343.

Tijdens, M., van de Waal, D.V., Slovackova, H., Hoogveld, H.L. et Gons, H.J. 2008. Estimates of bacterial and phytoplankton mortality caused by viral lysis and microzooplankton grazing in a eutrophic lake. *Freshwater Biology*. 53 : 1126-1141.

Toepel, J., Wilhelm, C., Meister, A., Becker, A., Martinez-Ballesta, M. del C. 2004. Cytometry of freshwater phytoplankton. *Methods in Cell Biology*. 75 : 375-407.

Toepel, J., Langner, U. and Wilhelm, C. 2005. Combination of flow cytometry and single cell absorption spectroscopy to study the phytoplankton structure and to calculate the chl *a* specific absorption coefficients at the taxon level. *Journal of Phycology*. 41 : 1099-1109.

Trees, C.C., Clark, D.K., Bidigare, R.R., Ondrusek, M.E. et Mueller J.L. 2000. Accessory pigments versus chlorophyll *a* concentrations within the euphotic zone : A ubiquitous relationship. *Limnology and Oceanography*. 45 : 1130-1143.

Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*. 9: 1-38.

Vaulot, D. et Marie, D. 1999. Diel variability of photosynthetic picoplankton in the Equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research – Oceans*. 104 : 3297-3310.

Veldhuis, M.J.W. et Kraay, G.W. 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina*. 64: 121-134.

Vives-Rego, J., Lebaron, P., Nebe-von Caron, G. 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 24 : 429-448.

Walsby, A.E. et Reynolds, C.S. 1980. Sinking and floating. *Dans* Morris, I. (ed). *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Blackwell Scientific Publishers, Oxford. pp: 371-412.

Walsby, A.E., Ng, G., Dunn, C. et Davis, P.A. 2004. Comparison of the depth where *Planktothrix rubescens* stratifies and the depth where the daily insolation supports its neutral buoyancy. *New Phytologist*. 162 : 133-145.

Walsby, A.E. 2005. Stratification by cyanobacteria in lakes: a dynamic buoyancy model indicates size limitations met by *Planktothrix rubescens* filaments. *New Phytologist*. 168 : 365-376.

Wetzel, R.G. 2001. *Limnology : Lake and River Ecosystems*. 3rd Edition. Academic Press, London.

Wetzel, R.G. et Likens, G.E. 2000. *Limnological analyses*. 3rd edition. Springer, New-York.

Wright, S.W. et Jeffrey, S.W. 1987. Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. *Marine Ecology Progress Series*. 38 : 259-266.

Yentsch, C.M., Horan, P.K. 1989. Cytometry in the aquatic sciences. *Cytometry*. 10 : 497-499.

Zubkov, M.V. et Tarran, G.A. 2008. High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature*. 455 : 224.

ANNEXE 1

ANNEXE1

Tableau I Définitions des états écologiques « très bon », « bon » et « moyen » pour les lacs (Annexe 5, Directive 2000/60/CE, Parlement Européen 2000)

Eléments de qualité biologique

Elément	Très bon état	Bon état	Etat moyen
Phytoplancton	<p>Composition taxonomique et abondance correspondent totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées.</p> <p>Biomasse moyenne correspond aux conditions physico-chimiques caractéristiques et n'altère pas les conditions de transparence.</p> <p>Efflorescence de fréquence et d'intensité qui correspondent aux conditions physico-chimiques caractéristiques.</p>	<p>Composition taxonomique et abondance légèrement modifiées par rapport aux communautés caractéristiques. Pas de croissance accélérée des algues entraînant des perturbations indésirables de l'équilibre des organismes présents dans la masse d'eau ou de la qualité physico-chimique de l'eau ou du sédiment.</p> <p>Efflorescence de fréquence et d'intensité en légère augmentation.</p>	<p>Composition taxonomique et abondance différent modérément de celles des communautés caractéristiques.</p> <p>Abondance modérément perturbée produisant une forte perturbation des valeurs d'autres éléments de qualité biologique et de la qualité physico-chimique de l'eau ou du sédiment.</p> <p>Efflorescence de fréquence et d'intensité en augmentation modérée. Possibilité d'efflorescence persistante durant les mois d'été.</p>
Macrophytes et phytobenthos	<p>Composition taxonomique correspond totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées. Pas de modification détectable de l'abondance moyenne.</p>	<p>Composition taxonomique et abondance légèrement modifiées par rapport aux communautés caractéristiques. Pas de croissance accélérée entraînant des perturbations indésirables de l'équilibre des organismes présents dans la masse d'eau ou de la qualité physico-chimique de l'eau.</p> <p>Communauté non perturbée par des touffes et couches bactériennes dues à des activités anthropiques</p>	<p>Composition taxonomique diffère modérément de celle de la communauté caractéristique et est sensiblement plus perturbée que dans le bon état.</p> <p>Modifications modérées de l'abondance moyenne.</p> <p>Communauté perturbée et déplacée par des touffes et couches bactériennes dues à des activités anthropiques.</p>
Faune benthique invertébrée	<p>Composition taxonomique et abondance correspondent totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées.</p> <p>Ratio taxa sensibles/taxa insensibles aux perturbations n'indique</p>	<p>Composition taxonomique et abondance légèrement modifiées par rapport aux communautés caractéristiques.</p> <p>Ratio taxa sensibles/taxa insensibles aux perturbations indique une</p>	<p>Composition taxonomique et abondance différent modérément de celles des communautés caractéristiques.</p> <p>Importants groupes taxonomiques font défaut.</p> <p>Ratio taxa sensibles/taxa</p>

	aucune détérioration. Diversité des taxa n'indique aucune détérioration.	légère détérioration. Diversité des taxa indique de légères détériorations.	insensibles aux perturbations et niveau de diversité sont inférieurs à ceux du bon état.
Ichtyofaune	Composition taxonomique et abondance correspondent totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées. Espèces caractéristiques sensibles aux perturbations sont présentes. Structures d'âge des communautés n'indique pas de perturbation anthropique. Pas de trouble de la reproduction ou du développement.	Composition taxonomique et abondance légèrement modifiées par rapport aux communautés caractéristiques en raison d'effets anthropiques sur les éléments de qualité physico-chimiques ou hydromorphologiques. Structures d'âge des communautés indiquent des signes de perturbation. Troubles de la reproduction et du développement d'une espèce, certaines classes d'âge font défaut.	Composition taxonomique et abondance différent modérément de celles des communautés caractéristiques. Structures d'âge des communautés indiquent des signes importants de perturbations anthropiques, une proportion modérée de l'espèce caractéristique est absente ou très peu abondante.

Eléments de qualité hydromorphologique

Elément	Très bon état	Bon état	Etat moyen
Régime hydrologique	Quantité et dynamique du débit, niveau, temps de résidence et connexion résultante aux eaux souterraines correspondent totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique
Conditions morphologiques	Variations de profondeur du lac, qualité et structure du substrat, état des rives correspondent totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique

Eléments de qualité physico-chimique

Elément	Très bon état	Bon état	Etat moyen
Conditions générales	Les valeurs des éléments physico-chimiques correspondent totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées. Les concentrations de nutriments restent dans la fourchette normalement associée aux conditions non perturbées. Niveaux de salinité, pH,	Température, bilan d'oxygène, pH, capacité de neutralisation des acides, transparence, salinité ne dépassent pas les niveaux établis pour assurer le fonctionnement de l'écosystème caractéristique et pour atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique

	bilan d'oxygène, capacité de neutralisation des acides, transparence, température n'indiquent pas de signe de perturbation anthropique et restent dans la fourchette normalement associée aux conditions non perturbées.	les éléments de qualité biologique. Les concentrations de nutriments ne dépassent pas les niveaux établis pour assurer le fonctionnement de l'écosystème.	
Polluants synthétiques spécifiques	Concentrations proches de zéro et au moins inférieures aux limites de détection des techniques d'analyse les plus avancées d'usage général	Concentrations ne dépassant pas les normes fixées conformément à la procédure visée au point 1.2.6 Annexe V Directive 2000/60/CE	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique
Polluants non synthétiques spécifiques	Les concentrations restent dans la fourchette normalement associée à des conditions non perturbées	Concentrations ne dépassant pas les normes fixées conformément à la procédure visée au point 1.2.6 Annexe V Directive 2000/60/CE	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique

Tableau II Définitions des potentiels écologiques maximal, bon et moyen en ce qui concerne les masses d'eau fortement modifiées ou artificielles (Annexe 5, Directive 2000/60/CE, Parlement Européen 2000)

Elément	Potentiel écologique maximal	Bon potentiel écologique	Potentiel écologique moyen
Eléments de qualité biologique	Les valeurs des éléments de qualité biologique pertinents reflètent celles associées au type de masse d'eau de surface le plus comparable	Légères modifications dans les valeurs des éléments de qualité biologique pertinents par rapport aux valeurs trouvées pour un potentiel écologique maximal.	Modifications modérées dans les valeurs des éléments de qualité biologique pertinents par rapport aux valeurs trouvées pour un potentiel écologique maximal.
Eléments hydromorphologiques	Les conditions hydromorphologiques correspondent aux conditions normales, les seuls effets sur la masse d'eau étant ceux qui résultent des caractéristiques artificielles ou fortement modifiées de la masse d'eau dès que toutes les mesures pratiques d'atténuation ont été prises afin d'assurer qu'elles autorisent le meilleur rapprochement possible d'un continuum écologique.	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique.	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique.
Eléments physico-chimiques			
Conditions générales	Les éléments physico-chimiques correspondent totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées. Les concentrations de nutriments restent dans la fourchette normalement associée aux conditions non perturbées. Température, bilan d'oxygène et pH correspondent à ceux des types de masse d'eau de surface les plus comparables dans des conditions non perturbées	Les valeurs des éléments physico-chimiques ne dépassent pas les valeurs établies pour assurer le fonctionnement de l'écosystème. Température et pH ne dépassent pas les valeurs établies pour assurer le fonctionnement de l'écosystème. Concentrations en nutriments ne dépassent pas les niveaux établis pour assurer le fonctionnement de l'écosystème.	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique.
Polluants synthétiques	Concentrations proches de 0 et au moins	Concentrations ne dépassant pas les normes	Conditions permettant d'atteindre les valeurs

Annexe I

spécifiques	inférieures aux limites de détection des techniques d'analyse les plus avancées d'usage général	fixées conformément à la procédure visée au point 1.2.6 Annexe V Directive 2000/60/CE.	indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique.
Polluants non synthétiques caractéristiques	Les concentrations restent dans la fourchette normalement associée, dans des conditions non perturbées, au type de masse d'eau de surface le plus comparable à la masse artificielle ou fortement modifiée concernée.	Concentrations ne dépassant pas les normes fixées conformément à la procédure visée au point 1.2.6 Annexe V Directive 2000/60/CE.	Conditions permettant d'atteindre les valeurs indiquées ci-dessus pour les éléments de qualité biologique.

RESUME

La mise en place de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et l'atteinte du bon état écologique pour les masses d'eau artificielles à l'horizon 2015 obligent les gestionnaires à définir ou adopter une certaine stratégie d'échantillonnage afin d'assurer le suivi écologique des réservoirs et renseigner quelques indices d'état. Parmi les indices biologiques, le phytoplancton a été proposé par la DCE comme élément de qualité pour les lacs et est identifié aujourd'hui comme un bio-indicateur potentiel puisque répondant aux changements trophiques des masses d'eau. Face à l'existence et/ou l'émergence de nombreux outils de détection et de suivi du phytoplancton, nous avons testé et utilisé un spectrofluoromètre immergeable *in situ* (bbe FluoroProbe) et la cytométrie en flux (FACSCalibur) afin de proposer la possibilité de les utiliser dans le cadre du suivi de la communauté phytoplanctonique pour le réservoir Marne. Parallèlement, un dosage de la chlorophylle *a* et une analyse taxonomique du phytoplancton ont été réalisés. Le lac-réservoir Marne, également appelé Lac du Der-Chantecoq, a été mis en service en 1974, et constitue l'un des plus grands réservoirs d'Europe occidentale. Nos travaux ont porté sur deux années, 2006 et 2007, où plusieurs stations et profondeurs ont été échantillonnées. Il ressort de notre étude que les mesures de la sonde spectrofluorométrique et les concentrations de chlorophylle *a* mesurées en laboratoire ont présenté une corrélation hautement significative, et que les groupes pigmentaires majoritaires détectées par la sonde étaient significativement corrélés aux biovolumes des espèces caractéristiques de ces groupes. De par la facilité d'utilisation et la fiabilité de cet outil, nous avons pu conclure qu'il était approprié pour le suivi de la qualité des eaux du réservoir Marne. Plus compliquée d'utilisation et ne donnant qu'un message partiel, la cytométrie en flux, bien que très puissante, a montré ces limites pour ce type d'application. Grâce à une méthode multitableaux appelée Analyse Triadique Partielle, nous avons pu identifier qu'il y avait un nombre minimal de stations à échantillonner pour rendre compte de la dynamique et de la diversité du phytoplancton dans l'ensemble du réservoir. Trois stations H, I et N présentaient de fortes similitudes en termes de dynamique et de diversité de la communauté phytoplanctonique et la station H a pu être proposée comme station de référence du réservoir Marne. Trois autres stations, G (lac Champaubert), J (bassin nord-ouest) et K (bassin sud-ouest) présentaient des caractéristiques spécifiques, rendant également leur échantillonnage pertinent. L'étude préliminaire des variables environnementales à la station de référence nous a permis de constater que la dynamique du réservoir et de sa communauté phytoplanctonique n'était pas contrôlée par les mêmes variables tout au long de la période d'échantillonnage. Au début du printemps, les concentrations de nitrates élevées et les forts débits entrants étaient associés au début de la croissance du phytoplancton. Au printemps et au début de l'été, l'augmentation du biovolume phytoplanctonique était associée à la diminution de la silice dissoute. En plein été, on retrouvait les biovolumes phytoplanctoniques maximaux, associés à de fortes températures. Finalement, la fin de l'été et le début de l'automne étaient caractérisés par un débit sortant important dans le canal Marne et des concentrations d'orthophosphates élevées. Finalement, deux métriques (sur 3 utilisées) directement associées à l'élément phytoplancton (chlorophylle *a*, indice planctonique) nous ont permis de classer l'état écologique du réservoir Marne. Ces métriques ont été appliquées à la station de référence et aux trois autres stations G, J et K afin de visualiser le caractère fragmenté de cet écosystème, c'est à dire les différences entre la masse d'eau principale et les autres bassins. Il ressort que les stations H et J présentaient un bon état écologique et un statut mésotrophe bien que présentant une composition phytoplanctonique différente et les stations G et K avaient plutôt un statut trophique eutrophe et un état écologique médiocre.