

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE
SCIENCES POUR L'INGÉNIEUR, GÉOSCIENCES, ARCHITECTURE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Année 2010

**Caractérisation hyperspectrale des biofilms
microphytobenthiques :**
**Cartographie de la biomasse de la micro à la
macro échelle**

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Sciences de la Terre
Spécialité : Télédétection

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Farzaneh KAZEMIPOUR

Le 1^{er} février 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs M. Stéphane JACQUEMOUD, *professeur*, université Paris VI, Paris
M. Jean-Marie FROIDEFOND, *chargé de recherche*, CNRS, université
Bordeaux I
Examineurs Mme. Sabine CHABRILLAT, *research scientist*, GFZ, Postdam
M. Marc ROBIN, *professeur*, université de Nantes

Directeur de thèse : Patrick LAUNEAU, professeur, université de Nantes

Co-encadrant de thèse : Vona MELEDER-TARD, maître de conférences, université de Nantes

ED : 498-105

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I.1. Introduction	6
I.2. Microphytobenthos.....	6
I.2.1. Définition générale	6
I.2.2. Rôles écologiques du microphytobenthos	8
I.2.2.1. Microphytobenthos et production.....	8
I.2.2.2. Rôle du microphytobenthos dans le réseau trophique.....	8
I.2.2.3. Le microphytobenthos et son rôle de stabilisateur du sédiment	9
I.2.3. Le microphytobenthos de la baie de Bourgneuf.....	10
I.2.4. Méthodes d'étude du microphytobenthos	13
I.2.4.1. À méso-échelle.....	13
I.2.4.2. À macro-échelle	14
I.3. Télédétection hyperspectrale	15
I.3.1. Définition Générale.....	15
I.3.1.1. Résolution spectrale	18
I.3.1.2. Bruit instrumental.....	19
I.3.2. Composition pigmentaire du microphytobenthos et optique des pigments.....	20
I.3.3. Méthodes de classification et de quantification par télédétection hyperspectrale.....	26
I.3.3.1. Méthodes empiriques	27
I.3.3.2. Utilisation des bibliothèques spectrales.....	28
I.3.3.3. Inversion des modèles physiques	30
I.4. Télédétection des vasières intertidales.....	36
I.5. Conclusion partielle.....	40
CHAPITRE II INSTRUMENTS ET IMAGES HYPERSPECTRAUX ...	43
II.1. Introduction.....	44
II.2. Images hyperspectrales et traitement.....	44
II.2.1. Réduction du bruit et lissage spectral.....	45
II.2.2. Correction atmosphérique des images hyperspectrales	46
II.2.2.1. Les méthodes de correction atmosphérique :	47
II.3. Images traitées	50
II.3.1. Campagne d'acquisition des images ROSIS.....	50
II.3.2. Campagne HySpex :.....	51
II.3.2.1. Caméra HySpex	52
II.3.2.2. Caractéristiques du vol.....	54
II.3.2.3. Traitement des images HySpex.....	58
II.4. Conclusion partielle	64

CHAPITRE III MÉTHODES ET DONNÉES EXPERIMENTALES ... 67

III.1. Introduction	68
III.2. Préparation et prélèvement des échantillons	68
III.2.1. Préparation des échantillons au laboratoire	68
III.2.1.1. Simulation du biofilm par filtration douce.....	69
III.2.1.2. Simulation du biofilm à l'aide de mélange d'agarose.....	71
III.2.1.3. Observation au Microscope Électronique à Balayage	72
III.2.2. Échantillonnage sur le terrain	73
III.2.2.1. Protocole d'échantillonnage du sédiment	74
III.2.2.2. Prélèvement du biofilm isolé du sédiment.....	74
III.2.2.3. Observation de la formation du biofilm au laboratoire.....	75
III.3. Mesures effectuées	75
III.3.1. Mesures de réflectance.....	76
III.3.1.1. Mesures de réflectance par ASD FieldSpec3 FR ®.....	76
III.3.1.2. Caméra HySpex.....	76
III.3.2. Mesures de biomasse par CLHP	77
III.4. Visualisation et analyses primaires des données obtenues.....	79
III.5. Conclusion partielle.....	89

CHAPITRE IV DÉVELOPPEMENT MÉTHODOLOGIQUE 93

IV.1. Introduction.....	94
IV.2. Modèle de transfert radiatif de la lumière à travers un biofilm benthique.....	94
IV.2.1. Quelles sont les propriétés optiques à prendre en compte ?.....	96
IV.2.1.1. Absorbance du rayonnement électromagnétique.....	96
IV.2.1.2. Diffusion du rayonnement électromagnétique.....	97
IV.3. Propriétés optiques d'un biofilm microphytobenthique	99
IV.3.1. Introduction.....	100
IV.3.2. Materials and methods	103
IV.3.2.1. Biological preparation and sample collection.....	103
IV.3.2.2. Laboratory spectral measurements	105
IV.3.2.3. Pigment analysis by HPLC.....	106
IV.3.3. Experimentation results.....	107
IV.3.3.1. Pigment composition and absorption	107
IV.3.3.2. Spectrum interpretation	108
IV.3.4. Modeling	110
IV.3.4.1. Biofilm reflectance and transmittance estimation	111
IV.3.4.2. Optical properties of biofilm	114
IV.3.4.3. Biomass estimation from absorption coefficient	117
IV.3.4.4. Validation of estimated biomass on a new data set	119
IV.3.5. Discussion-conclusion	119
IV.4. Récapitulatif des résultats et compléments de discussion.....	124
IV.4.1. Les incertitudes	125
IV.4.1.1. Données radiométriques	126
IV.4.1.2. Données CLHP.....	129
IV.4.1.3. Résultats de la radiométrie vs CLHP.....	129
IV.4.2. Saturation et glissement spectral.....	131

IV.5. Conclusion partielle	132
CHAPITRE V CARTOGRAPHIE DE LA BIOMASSE DANS LA BAIE DE BOURGNEUF	135
V.1. Introduction	136
V.2. Initialisation.....	136
V.2.1. Propriétés spectrales du substrat.....	137
V.2.1.1. Présence de l'eau :	137
V.2.1.2. Granulométrie :	138
V.3. Article.....	142
V.3.1. Introduction	143
V.3.2. Site description and image characteristics.....	144
V.3.2.1. Bourgneuf Bay.....	145
V.3.2.2. ROSIS images.....	146
V.3.2.3. HySpex images.....	146
V.3.3. Laboratory and field experiments and sampling.....	149
V.3.3.1. Laboratory preparation for radiometric and biological measurements	149
V.3.3.2. ASD field reflectance spectra of different components	150
V.3.4. Mapping procedure.....	151
V.3.4.1. Biomass retrieval from reflectance spectra.....	151
V.3.5. Application to image data	154
V.3.5.1. Image classification and diatom maps	155
V.3.6. Biomass quantification from images	156
V.3.6.1. Laboratory images	157
V.3.6.2. Field images: from micro- to macro-scale for a real case study	159
V.3.7. Discussion and perspectives	162
V.4. Récapitulatif des résultats et discussions complémentaires.....	164
V.4.1. Passage de la micro à la macro échelle	164
V.4.2. Eau superficielle.....	168
V.5. Conclusion partielle.....	170
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	171
ANNEXE 1 DÉVELOPPEMENT DES FORMULES.....	177
BIBLIOGRAPHIE.....	183

Introduction générale

La télédétection est la détermination des compositions d'une surface terrestre à distance et peut s'effectuer à partir de plateformes de terrain, aéroportées ou satellitaires, équipées de capteurs mesurant une quantité de lumière reçue depuis cette surface par réflexion de la lumière solaire visible – infrarouge (VIS-IR). La gamme de longueurs d'onde s'étend alors de 400 à 2500 nanomètres. Lorsque cette réflexion est analysée sur un nombre réduit de canaux larges, la télédétection est dite multispectrale. Elle est hyperspectrale lorsque les canaux sont suffisamment fins, nombreux et contiguës pour dessiner très précisément la forme d'un spectre de luminance. Celui-ci dépend de l'épaisseur et de la composition de l'atmosphère traversée et des propriétés de la surface retournant vers le capteur une luminance proportionnelle à son spectre de réflectance. Ce dernier est relié aux propriétés physico-chimiques des matériaux constituant la surface par des propriétés optiques dont la détermination repose sur des études de laboratoire en environnement contrôlé et/ou des mesures de terrain.

Parmi les surfaces terrestres, les écosystèmes côtiers font partie des plus productifs en réalisant une forte production primaire de matière organique (50% de la production globale des océans) et supportant une biodiversité élevée. Ces écosystèmes sont donc devenus des sites privilégiés pour diverses activités aquacoles qui ont une réelle importance économique au niveau régional, mais aussi pour la surveillance de l'évolution de la qualité de notre environnement. C'est notamment le cas de la baie de Bourgneuf, située au sud de l'estuaire de la Loire. Dans cette baie, les biofilms de microphytobenthos, des microalgues unicellulaires benthiques, couvrent la majorité de la surface des vasières d'estran pendant la marée basse. A l'origine d'une fraction importante de la production primaire totale des écosystèmes côtiers turbides, tel que la baie de Bourgneuf, le microphytobenthos est l'alimentation de base des huîtres en élevage et joue aussi un rôle important dans toute la chaîne trophique, pour les huîtres comme pour les oiseaux migrateurs par exemple.

Ce travail de thèse porte sur les vastes vasières intertidales de la baie de Bourgneuf. Comme tout autre écosystème côtier, la baie de Bourgneuf est un milieu écologiquement fragile qui nécessite une surveillance régulière. La télédétection peut être envisagée comme un outil idéal pour surveiller cet environnement dynamique difficile d'accès et sensible aux variations climatiques ou anthropiques. Grâce à ses performances techniques, la télédétection

hyperspectrale VIS-NIR (Visible - Proche Infra Rouge) permet de détecter des cortèges pigmentaires, tels que les chlorophylles *a*, *b* et *c*, jusqu'à aboutir à la quantification des biomasses photosynthétiques. La cartographie par télédétection de la biomasse microphytobenthique fournit ainsi des informations importantes sur la distribution spatiale de ces peuplements, leur diversité et leur productivité. Sachant que la synthèse organique d'origine végétale ne peut se faire qu'en passant par l'intermédiaire de la chlorophylle *a*, la biomasse microphytobenthique est plus spécifiquement estimée à partir de la concentration surfacique de ce pigment.

Cette thèse a pour principal objectif de mettre au point un modèle de transfert radiatif simple du microphytobenthos. Ceci consistera à mettre en relation la réponse spectrale du biofilm avec ses caractéristiques physico-chimiques à l'aide du calcul de ses propriétés optiques afin d'en estimer la biomasse. Cette caractérisation repose sur l'identification des facteurs qui modifient la réponse spectrale du biofilm obtenue par un capteur embarqué et sur leur mise en relation avec les propriétés du biofilm.

En effet, des études précédemment effectuées sur la zone ont permis d'obtenir des cartes de la distribution et de la biomasse du microphytobenthos à partir des images multispectrales du satellite SPOT et hyperspectrales aéroportées DAIS et ROSIS. Cependant, ces études sont basées sur la relation empirique entre la variation de la biomasse et celle des spectres de réflectance, ou bien sur une comparaison directe avec des tableaux de correspondance entre biomasse et combinaisons de spectres de réflectance. Aucune ne s'est appuyée sur l'étude des propriétés optiques du biofilm de microphytobenthos pour en extraire les valeurs de biomasse. La justification de leurs résultats, en absence de modèle physique décrivant la nature optique du biofilm et de sa réponse spectrale, n'est donc pas attestée. Les indices proposés pour établir les relations empiriques entre la biomasse et la réponse spectrale sont ceux utilisés dans le cas de la végétation supérieure, sans prendre en compte la structure interne spécifique des biofilms. La solution proposée pour le retrait du continuum est basée sur une droite passant au plus près d'un plateau infrarouge par simple observation de point invariant. Afin de justifier ces approches ou d'en développer de nouvelles, le besoin s'est fait sentir de réaliser une étude fondamentale sur la physique et l'optique des biofilms. Avec des données de meilleure qualité et des méthodes plus adaptées, la connaissance des propriétés du biofilm et de l'état biologique des cellules peut être considérablement affinée.

L'objectif final de ce travail est d'améliorer les résultats en terme d'identification du microphytobenthos et de quantification de la biomasse et, à terme, de produire une nouvelle cartographie de la biomasse à l'échelle de la baie de Bourgneuf à partir des images HySpex et ROSIS. La cartographie est basée sur l'inversion du modèle des propriétés optiques qui permet en retour de déduire la biomasse à partir des réponses spectrales observées sur les images.

L'inversion d'un modèle de propriétés optiques d'un milieu dépend fortement de nombreux facteurs initialement inconnus et dont il faut estimer les contributions dans la réponse spectrale. Nous avons donc étudié la possibilité de simplifier cette procédure pour extraire les informations quantitatives du biofilm microphytobenthique et ainsi cartographier la biomasse de ces peuplements des vasières intertidales de la baie de Bourgneuf, à partir des images hyperspectrales. La haute résolution spectrale des images disponibles, accompagnée d'une méthodologie robuste, a permis d'obtenir une grande précision dans les résultats.

Ce manuscrit s'articule en cinq chapitres :

Le **premier chapitre** est consacré à une synthèse bibliographique des différents domaines réunis dans ce travail et apporte des éléments sur la biologie du microphytobenthos, la zone d'étude, les différentes méthodes permettant d'étudier les zones intertidales et plus particulièrement la télédétection hyperspectrale.

Le **deuxième chapitre** porte sur la description de la télédétection hyperspectrale, les appareils et les images traitées pendant ce travail. Les notions de base de la spectroscopie et de l'imagerie hyperspectrale sont brièvement exposées. Les caractéristiques des appareils de mesures radiométriques utilisés au laboratoire, sur le terrain et embarqués y sont aussi détaillées.

Le **troisième chapitre** décrit les expérimentations et les protocoles de mesures biologiques et radiométriques effectuées au laboratoire et sur le terrain. Les mesures de la réflectance et de la biomasse des biofilms préparés au laboratoire, qui fournissent la base de données de la modélisation, y sont détaillées. Un premier aperçu synthétique des variations de la réponse spectrale en fonction de la biomasse et du substrat est proposé.

Le **quatrième chapitre** est consacré à la modélisation des propriétés optiques des biofilms à partir des mesures présentées au chapitre III : le modèle MPBOM. La réponse

spectrale du biofilm est analysée en détail en faisant varier la structure interne et le substrat. Le coefficient d'absorption et l'indice de réfraction du biofilm sont alors calculés grâce à la détermination des spectres de réflectance et de transmittance propres du biofilm. Enfin, une régression linéaire, physiquement justifiée, est établie entre les valeurs du coefficient d'absorption et la biomasse. Pour clore ce chapitre, une discussion est proposée, portant sur la qualité des mesures et un problème connu de la spectroscopie des organismes végétaux : la saturation.

Le dernier et **cinquième chapitre** porte sur une nouvelle approche de cartographie de la biomasse des vasières de la baie de Bourgneuf à l'aide du modèle MPBOM. Les caractéristiques spécifiques du biofilm microphytobenthique et celles de son substrat sont mises en avant afin de simplifier l'inversion du modèle et l'extraction des valeurs de la biomasse. Enfin, quelques sujets de débat dans le domaine de la télédétection et de la cartographie sont aussi discutés : pixels de mélange et validation sur le terrain.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Introduction

L'ensemble des contextes généraux concernés et des problématiques abordés dans ce travail de thèse est exposé dans ce chapitre. Quelques définitions générales, les applications et les sujets proches de notre cas d'étude et de notre méthodologie sont présentés afin de faire le point sur les méthodes existantes et d'introduire l'objectif principal de cette étude.

I.2. Microphytobenthos

I.2.1. Définition générale

Les microalgues (ou microphytes) sont des organismes microscopiques (< quelques 1/10^{ième} de mm), le plus souvent unicellulaires, photosynthétiques vivant principalement en milieu aquatique. Ces microalgues peuvent vivre soit dans la colonne d'eau, c'est le cas du phytoplancton, soit sur/dans/à proximité du fond, c'est le cas du benthos. Ce dernier vit en relation étroite avec le substrat auquel il reste attaché. Ainsi, le microphytobenthos est le terme le plus souvent utilisé par les auteurs pour désigner l'ensemble des microalgues unicellulaires, procaryotes (Cyanophyceae) ou eucaryotes vivant dans les premiers millimètres du sédiment, aussi bien subtidal (océan hauturier) qu'intertidal (zone de balancement des marées). Ces peuplements d'organismes photosynthétiques sont largement dominés par les diatomées (MacIntyre et Cullen 1996) de la classe des Bacillariophycées, phylum des Hétérokontophyta (Hoek et al. 1995). Les diatomées sont toutes caractérisées par leur couleur jaune-brun et la présence d'un exosquelette en silice constitué de deux valves s'emboîtant, le frustule (Figure I.1-a et c). Elles peuvent être mobiles (« épipéliques », libres dans la vase) ou non-mobiles (« épipsammiques », fixées à la surface des grains de sable) (Jesus et al. 2009; Méléder et al. 2005; Méléder et al. 2007; Round 1971; Sabbe 1997). A certaines périodes de l'année, les euglènes, microalgues de la classe des Euglenophyceae, du phylum des Euglenozoa (Reviere 2003) peuvent dominer les peuplements à la place des diatomées (Paterson et Hagerthey 2001; Paterson et al. 1998) et leur conférer une couleur verte (Figure I.1-b et d).

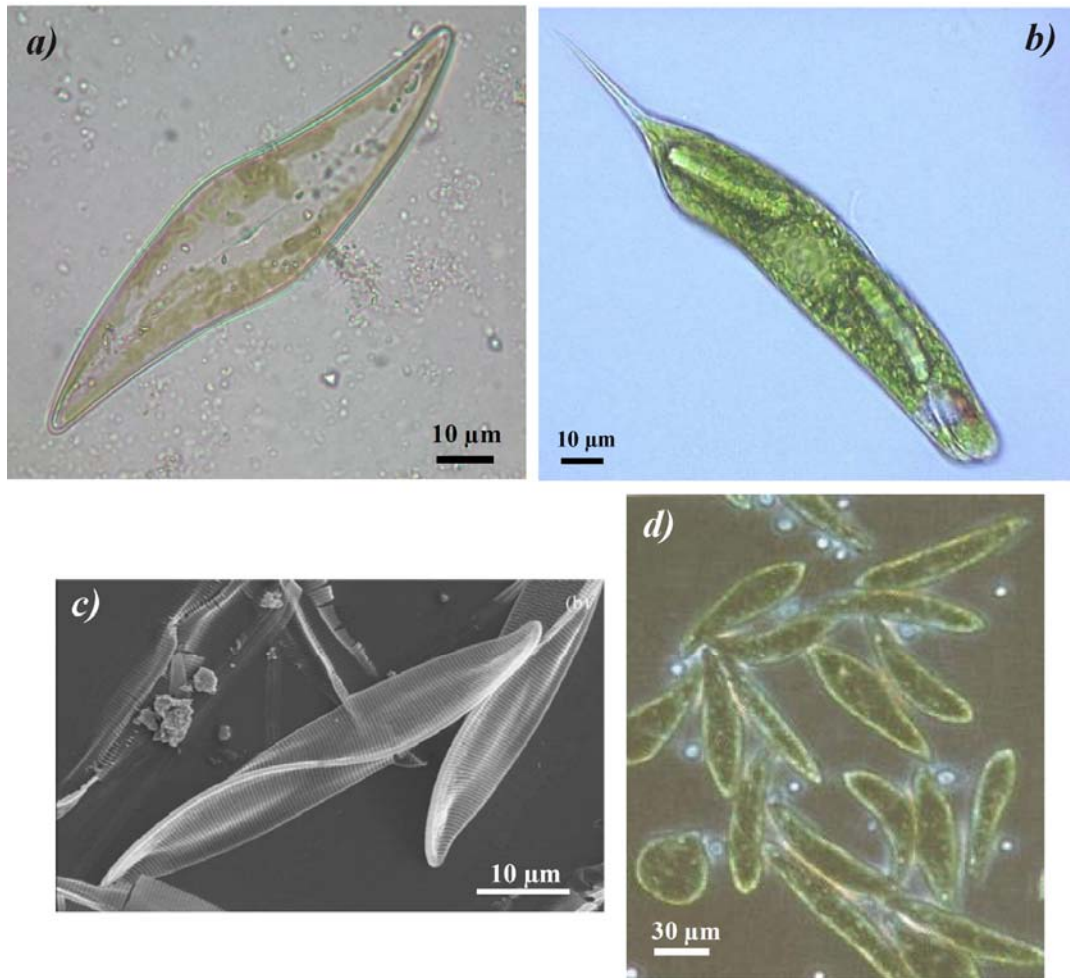


Figure I.1 : Illustrations microscopiques de deux classes principales de microalgues constitutives du microphytobenthos : (a) diatomée benthique en microscopie optique : *Pleurosigma angulatum* (photo : V. Méléder). La forme de la cellule est donnée par le frustule, les plastes sont pariétaux en position cingulaire ; (b) euglènes en microscopie optique (photo : L. Brient) ; (c) frustules de la diatomée *Entomoneis paludosa* en microscopie électronique à balayage (MEB) (photo : V. Méléder). (d) population d'euglène.

Le microphytobenthos occupe de vastes étendues de plusieurs centaines d'hectares de vasières (Figure I.2) au sein des espaces littoraux, comme par exemple les baies estuariennes (Combe et al. 2005; Guarini 1998; Kazemipour et al. 2011; MacIntyre et Cullen 1996; Méléder et al. 2003b). Les espaces littoraux sont généralement des hydrosystèmes semi-fermés connectés à l'eau océanique et dilués par des sources d'eau douce (Duxbury et al. 2000) apportée par le drainage continental (Pritchard 1967). Ces écosystèmes côtiers (mers côtières et zones estuariennes) représentent des milieux biologiques riches mais écologiquement et physiquement très fragiles. Ce sont des lieux d'échanges importants d'énergie et de matière entre le domaine marin et terrestre avec des mécanismes sédimentaires et hydrologiques spécifiques. L'abondance des éléments nutritifs est favorable au développement d'espèces végétales et animales et confère à ces écosystèmes un niveau de

biodiversité élevé. Ils couvrent 8 % de la surface et 50 % de la production de biomasse globale des océans (Méléder 2003). Ils présentent de forts niveaux de production nette de carbone, de l'ordre de $1500 \text{ g.m}^2.\text{an}^{-1}$ en moyenne¹ (Dajoz 1985; Walker et Mossa 1982). Ce sont des habitats remarquables que la législation internationale tend à protéger par des directives européennes².

I.2.2. Rôles écologiques du microphytobenthos

I.2.2.1. Microphytobenthos et production

Le rôle majeur de la production primaire benthique, par rapport à celle d'origine phytoplanctonique dans la colonne d'eau, a été montré par DeJonge et Colijn (1994) et DeJonge et VanBeusekom (1995). Le microphytobenthos représente jusqu'à 50 % de la production totale de biomasse dans certaines régions estuariennes (Underwood et Kromkamp 1999), le taux le plus fort ayant été mesuré sur les vasières intertidales (Colijn et DeJonge 1984; DeJonge et Colijn 1994).

En effet, ces algues benthiques peuvent soutenir une activité photosynthétique dans des conditions très variées, non seulement en milieu subtidal, à des profondeurs qui dépendent de la pénétration de la lumière dans l'eau, mais aussi en zone intertidale dans la pellicule superficielle des sédiments pendant les marées basses diurnes (Round 1971). La cellule peut convertir en matière organique (c'est-à-dire en biomasse végétale) le carbone inorganique et les nutriments dissous dans les eaux, en utilisant l'énergie solaire. La biomasse est donc l'ensemble de la matière végétale vivante présente à un moment donné dans un milieu donné. La photosynthèse s'effectue dans la cellule et au sein d'organites spécialisés : les plastes (Figure I.1-a), en utilisant les propriétés oxydo-réductrices des pigments qu'ils contiennent. Cette photosynthèse assure la productivité de biomasse de manière autotrophe.

I.2.2.2. Rôle du microphytobenthos dans le réseau trophique

Remis en suspension par les courants de marée ou le vent, le microphytobenthos occupe une part importante dans les flux de matière au sein des écosystèmes côtiers (Admiraal 1984;

¹ Les productions en tonnes par ha par an pour différents écosystèmes : Le désert 0.3, l'agriculture sèche 0.3-1.5, agriculture humide 1.5-5, zones estuariennes 5-10, zones côtières 1-1.5 et océan 0.3 selon Dajoz (1985).

² Mise en place de Natura 2000 en baie de Bourgneuf.

Baillie et Welsh 1980; DeJonge et VanBeusekom 1992; Denis et al. 1996). A la base des réseaux trophiques, les peuplements microphytobenthiques servent de nourriture à des organismes variés : poissons démersaux (Richard et al. 2006), oiseaux limicoles ou migrateurs (Kuwae et al. 2008) et représentent une part significative de l'alimentation des consommateurs primaires dont les huîtres en élevage (Decottignies et al. 2007b). Le microphytobenthos conditionne ainsi par son importance les capacités de structuration de l'ensemble du réseau trophique. Ainsi, en cas de pollution ou de destruction des vasières, une réduction importante de la production de biomasse microphytobenthique peut être observée et répercutée sur toute la chaîne trophique (Kuwae et al. 2008).

1.2.2.3. Le microphytobenthos et son rôle de stabilisateur du sédiment

En plus de son rôle déterminant dans la production de biomasse, l'existence du microphytobenthos a une importance pour la sédimentologie de son habitat. Dans le cas du microphytobenthos épipélique, les cellules présentent un rythme migratoire vertical, calqué sur les cycles tidaux et diurnes (Pinckney et Zingmark 1991; Round et Palmer 1996; Serodio et al. 1997) à l'origine de la formation de biofilms. Ils sont clairement visibles à la surface du sédiment pendant la marée basse (Figure I.2) sous forme d'une très fine couche brune, plus ou moins homogène (Saburova et al. 1995). Ces biofilms ont un véritable rôle de stabilisateur du sédiment (Paterson et Hagerthey 2001; Riethmuller et al. 2000) grâce à la production de substances extracellulaires (EPS³) dont les teneurs sont fortement corrélées à la biomasse microphytobenthique (Riethmuller et al. 2000; Underwood et Smith 1998). Les EPS participent à la locomotion des cellules qui sont capables de se déplacer dans le sédiment (Hay et al. 1993; Paterson et Hagerthey 2001) mais est également un produit de leur métabolisme (Perkins et al. 2001). Ce rôle de stabilisateur est plus prononcé dans les sédiments vaseux (cohésifs) dominés par des espèces épipéliques que dans les sédiments sableux (non cohésifs) colonisés par des espèces épipsammiques qui restent dispersées dans le sédiment sans former de véritable biofilm à la surface du sédiment, mais plutôt une matrice sédiment/cellules/ EPS (Paterson et Hagerthey 2001).

Ce comportement migratoire des épipéliques, physiquement actif vis-à-vis de la lumière est en relation directe avec la photosynthèse. Il permet aux cellules de se positionner dans des

³ Substances Polymériques Extracellulaires, composées principalement des polysaccharides, qui aident la fixation des micro-organismes sur une matrice.

conditions optiques optimum pour que la photosynthèse puisse se réaliser. La migration nette s'inverse lorsque la lumière devient insuffisante ou juste avant le flot de la marée montante. Les cellules re-migrent alors massivement de la surface vers les couches plus profondes du sédiment (Guarini 1998; Herlory et al. 2004). Un comportement intéressant des cellules migrantes est le fait qu'elles gardent ce rythme migratoire pendant quelques jours, même détachées de leur écosystème vital (Paterson 1986; Serodio et al. 1997). Il est alors possible de reproduire ces migrations naturelles en laboratoire, en prélevant simplement des échantillons de vase sur des estrans producteurs puis en laissant les diatomées poursuivre leur rythme migratoire au laboratoire pour en étudier les propriétés.



Figure I.2 : Photographie de vasière de la baie de Bourgneuf. Les biofilms de diatomées (en brun) et d'euglènes (en vert) sont clairement visibles sur la surface du sédiment. Une limite franche sépare les deux peuplements montrant que l'un tend toujours à dominer l'autre.

I.2.3. Le microphytobenthos de la baie de Bourgneuf

Située sur le littoral atlantique français, au sud de l'estuaire de la Loire (Figure I.3), la baie de Bourgneuf (46° 53' -47° 08' N, 1° 55' -2° 23' W) présente un écosystème côtier turbide

estuarien. C'est un écosystème macrotidal subissant des amplitudes de marée importantes pour la cote Atlantique (de l'ordre de 7 m pour les coefficients de marée les plus forts).

Elle communique avec l'océan au nord de l'île de Noirmoutier par une ouverture de 12 km et au sud par un passage de 800 m de large. Nous pouvons y distinguer trois types de littoraux : les côtes rocheuses, les plages sableuses et les vasières littorales. Les substrats durs comme les rochers et les bancs coquilliers peuvent être couverts par des macroalgues. De vastes vasières s'étendent le long de la côte orientale et émergent à basse mer. Larges de 3 à 4 km, elles couvrent environ 30% de la baie et sont le siège d'une intense activité de conchyliculture.

Au sein de ce vaste bassin sédimentaire d'une superficie de 340 km², nous nous intéressons à la zone intertidale de la baie occupant une superficie d'environ 100 km². C'est une zone comprise entre les niveaux des marées basses et des marées hautes de vives-eaux. Ces vasières intertidales sont en partie occupées par les parcs à huîtres (10% de la surface) (Barillé et al. 2007; Méléder et al. 2005) et présentent un sédiment avec une granulométrie variable, allant des vases (~2-8 µm) aux sables (> 50 µm), (voir Méléder et al. (2005), Méléder et al. (2007); Verpoorter (2009)).

Comme toutes les baies estuariennes, la baie de Bourgneuf a une importance remarquable pour l'économie et l'écologie de la région. Elle est le siège d'une forte activité économique tournée vers la mer : ostréiculture⁴, mytiliculture⁵ et pêche. Elle est ainsi le troisième site ostréicole français avec une production annuelle de 13000 tonnes d'huîtres, ce qui représente 10% de la production nationale (Barillé-Boyer et al. 1997). Développée à partir de 1947 sur les vastes étendues de l'estran (Figure I.4), c'est une des principales ressources économiques de ce bassin.

Or, depuis 1980, la baie de Bourgneuf comme toutes les baies conchylicoles, a subi une forte diminution des taux de croissances des huîtres en culture, pouvant être accompagné d'une surmortalité (Barillé-Boyer et al. 1997). Une des hypothèses retenues est la diminution de la capacité trophique du site au regard des besoins nutritionnels des huîtres en élevage (Héral et al. 1989; Méléder et al. 2003b). L'estimation de cette capacité passe par la compréhension de la structure et de la dynamique de ce type d'écosystèmes conchylicoles. La

⁴ L'élevage des mollusques appelés huîtres.

⁵ L'élevage des mollusques appelés moules.

baie de Bourgneuf étant caractérisée par des turbidités élevées⁶ (Haure et al. 1996), la production primaire dans la colonne d'eau est fortement limitée, ce qui renforce l'hypothèse du rôle prépondérant de la production primaire microphytobenthique, confirmée par les récents travaux utilisant les traçages isotopiques (Decottignies et al. 2007a; Decottignies et al. 2007b).

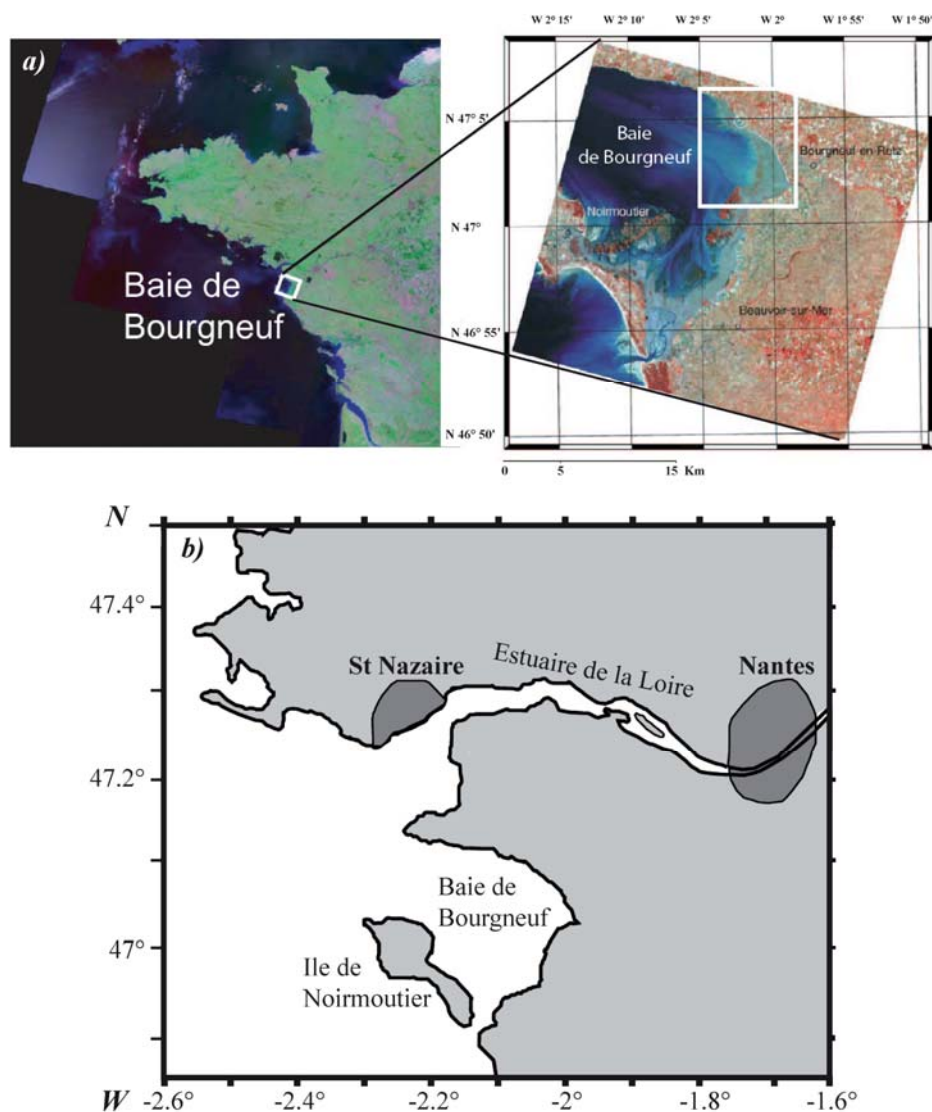


Figure 1.3 : (a) Localisation de la baie de Bourgneuf (mosaïque des images Landsat, source : <https://zulu.ssc.nasa.gov/mrsid/mrsid.pl>, et vue rapprochée (image SPOT d'après Méléder et al. (2003a)), (b) emplacement de la baie par rapport à l'estuaire de la Loire et la ville de Nantes.

Bien que les producteurs primaires benthiques semblent avoir un rôle majeur par rapport aux photoautotrophes planctoniques, ce sont pourtant ces derniers qui ont été les plus étudiés

⁶ Concentrations journalières moyennes de matière particulaire en suspension fluctuant de 4 à 415 mg.L⁻¹.

dans la colonne d'eau de la baie de Bourgneuf, notamment en ce qui concerne les variations saisonnières de la biomasse (Baud et al. 1990; Marion 1985). Afin de prendre en considération l'importance des peuplements phytobenthiques, de nombreuses études ont depuis été menées sur cette zone (Barillé et al. 2007; Cognie et al. 2006; Combe 2005; Dubois et al. 2003; Méléder et al. 2005; Méléder et al. 2003b; Méléder et al. 2007). La vasière intertidale de la baie de Bourgneuf et le microphytobenthos associé ont donc la particularité d'avoir été abordés par ces nombreuses études aussi bien sur la base d'échantillonnages à méso-échelle qu'à l'aide d'une approche synoptique, à macro-échelle.



Figure I.4 : Photographie des concessions ostréicoles en baie de Bourgneuf (Grossel et al. 2001)

I.2.4. Méthodes d'étude du microphytobenthos

Les études portant sur le microphytobenthos, ponctuelles ou à l'échelle de l'écosystème, ont le plus souvent pour objectif l'étude de la structure du peuplement : sa répartition spatiale, sa composition taxonomique et sa biomasse. Selon les méthodes d'étude et l'étendue des zones considérées, nous pouvons nommer deux types d'études distinctes sur les peuplements de microphytobenthos des zones intertidales.

1.2.4.1. À méso-échelle

Les différentes études portant sur les peuplements du microphytobenthos des vasières intertidales à méso-échelle sont basées sur la structure et la dynamique du microphytobenthos

et regroupent les échantillonnages ponctuels (Brotas et al. 1995; Cariou-Le Gall et Blanchard 1995; Davis et McIntire 1983; DeJonge et Colijn 1994; Méléder et al. 2005; Méléder et al. 2007; Riaux 1982). Les résultats issus de ces observations locales *in-situ* sont parfois extrapolés à tout l'écosystème (par exemple à l'ensemble d'une baie estuarienne) malgré le nombre souvent limité de mesures pourtant indispensables pour appréhender la structure spatiale et temporelle des peuplements à l'échelle de l'écosystème. Cette limitation est essentiellement due à la difficulté d'accès en raison de la présence de sédiments fins constituant des vasières littorales (Figure I.5).

1.2.4.2. À macro-échelle

La seule étude à l'échelle d'un écosystème à partir d'échantillons du sédiment est le travail de Guarini et al. (1998). Ces auteurs ont cartographié la biomasse du microphytobenthos à l'échelle du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, à l'aide d'une technique de géostatistique (krigeage). Ce type d'étude nécessite de se présenter régulièrement sur le terrain avec le matériel de mesures et les outils d'échantillonnage. Toutefois, la surface échantillonnée ne représente qu'une très petite fraction de la surface totale étudiée (10^{-6} à 10^{-5}), ce qui apparaît problématique au moment du passage dimensionnel de l'échantillon à l'écosystème. De plus, ce type de technique nécessite un nombre important d'échantillonnage du sédiment, ce qui peut être très difficile et long à réaliser.

C'est la raison pour laquelle, afin d'avoir une vision synoptique du site d'étude, il a été proposé une méthode alternative d'étude du microphytobenthos à macro-échelle reposant sur l'utilisation de la télédétection et plus particulièrement la télédétection hyperspectrale. L'optimisation de cette méthode est le principal objectif de ce travail de thèse afin de cartographier la biomasse du microphytobenthos des vasières de la Baie de Bourgneuf.



Figure I.5 : Échantillonnage du microphytobenthos épipsammique à Lyarne (9/9/10, 12h-13h, coefficient de marée : 105).

I.3. Télédétection hyperspectrale

I.3.1. Définition Générale

A la base de toutes les techniques d'observation et d'identification à distance, la télédétection est l'étude de l'interaction entre le rayonnement électromagnétique et une cible. Parmi les applications multiples de la télédétection, la classification et la quantification des matériaux de la surface sont les plus courantes dans le domaine de l'environnement. La classification consiste à distinguer une classe de matériau selon ses propriétés spectrales et de retrouver sur une image les pixels qui ressemblent le plus à cette classe pour leur attribuer une étiquette ou un code comme par exemple le numéro d'ordre de la classe définie.

Dans le cas de l'étude d'une zone intertidale qui s'avère être couverte par des matériaux ayant des propriétés spectrales proches (Combe et al. 2005), l'utilisation de capteurs hyperspectraux devient indispensable. En effet, il s'agit de capteurs ayant une capacité d'acquisition du rayonnement électromagnétique dans un grand nombre de bandes spectrales (>100), étroites (<10 nm) et contiguës. Ces derniers favorisent la distinction entre matériaux de composition similaire, non séparables sur les quelques canaux d'images multispectrales (<10 bandes spectrales). Ainsi, l'imagerie hyperspectrale combine la technologie d'imagerie numérique et la spectroscopie. On parle alors de spectro-imageurs (Figure I.6).

La spectroscopie consiste à mesurer les propriétés optiques de l'objet par l'analyse de sa réponse spectrale. La réponse spectrale, ou spectre de réflectance (R), mesurée par le capteur est la fraction de la lumière incidente qui est réfléchiée de la cible vers le capteur. Le reste de la lumière incidente est soit absorbée par la cible (A), soit transmise en passant à travers la cible (T), à condition de ne pas avoir été diffusée dans les autres directions que celle du capteur. La gamme spectrale détectée varie selon les capteurs. Ainsi pour l'observation des surfaces terrestres ce sont les domaines visible-infrarouge et thermique qui sont les plus utilisés (Figure I.7). Dans le cas des vasières intertidales et du microphytobenthos associé, les domaines d'intérêt sont le visible et le proche infrarouge dans lesquels les caractéristiques spécifiques des matériaux végétaux apparaissent.

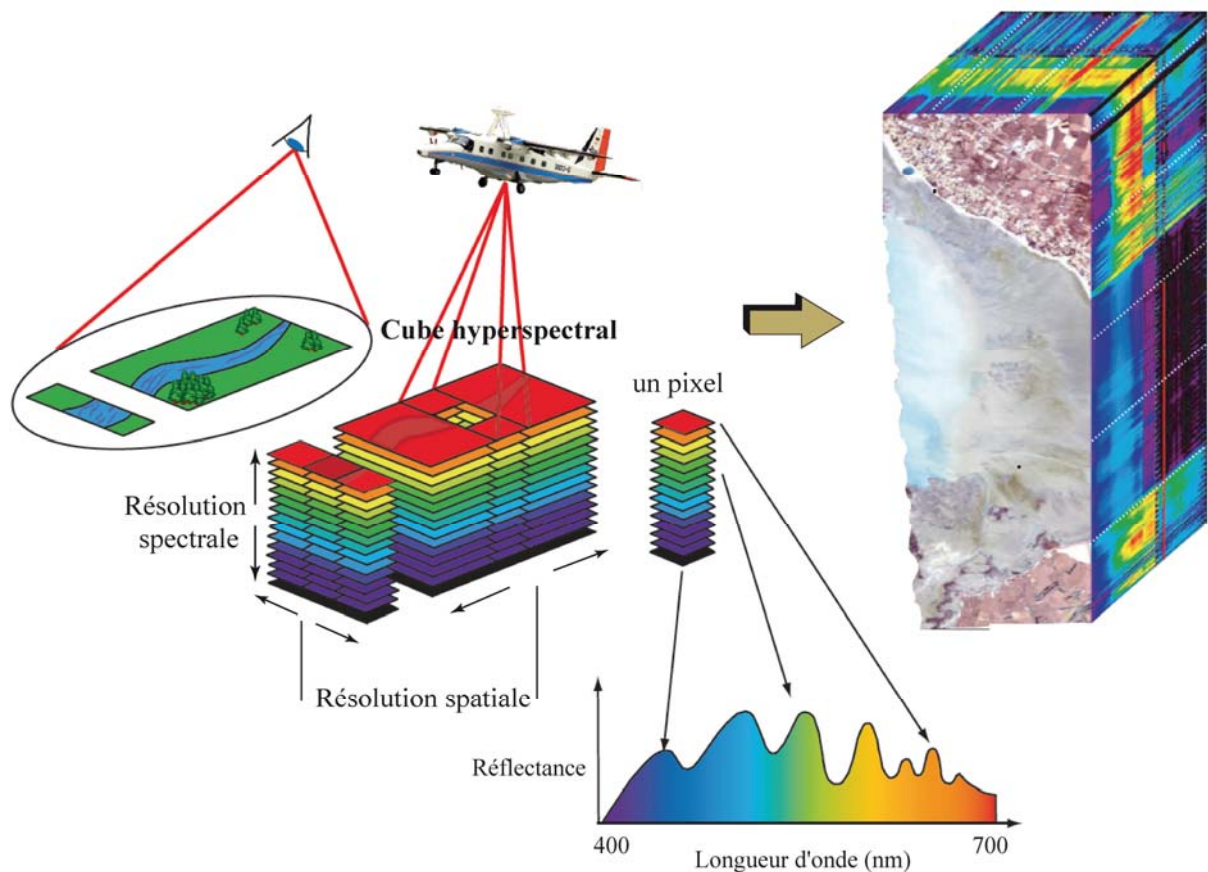


Figure I.6 : Principe de l'imagerie à haute résolution spectrale produisant un cube hyperspectral (Ex : 400-700 nm).

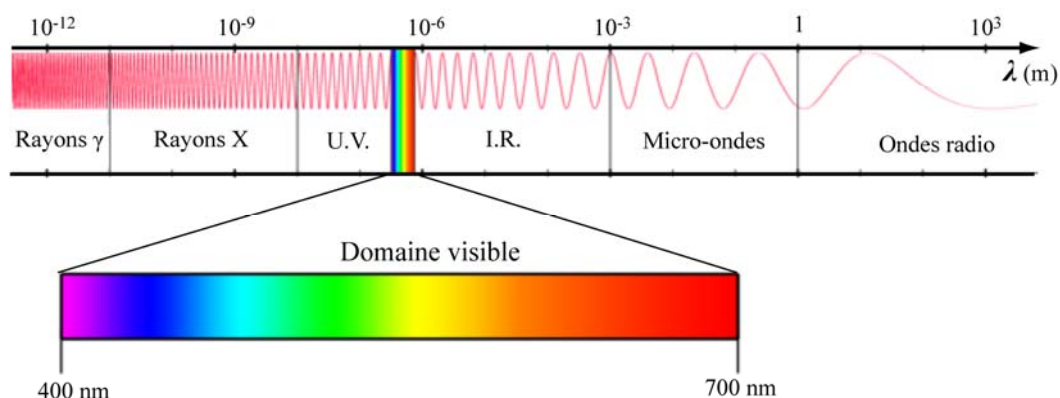


Figure I.7 : Divers domaines spectraux du rayonnement électromagnétique selon les longueurs d'onde (ou la fréquence). D'après la loi de Planck, les longueurs d'onde plus petites portent une quantité d'énergie plus importante.

Pour chaque pixel d'un cube hyperspectral, l'intensité de la lumière réfléchie (luminance ou radiance) est enregistrée pour un nombre important de bandes spectrales. Les unités physiques utilisées dans la télédétection sont listées dans le Tableau I.1. Cette énergie réfléchie se présente sous la forme d'un spectre contiguë dont la qualité dépend de la résolution spectrale du capteur et du bruit instrumental.

Tableau I.1 : Unités physiques utilisées en physiques des images.

Terme astrophysique	Terme physique	Unité physique
Luminosité	Flux lumineux	W
Flux émis	Éxitance	$W \cdot m^{-2}$
Flux reçu	Éclairement	$W \cdot m^{-2}$
	Intensité	$W \cdot sr^{-1}$
	Luminance	$W \cdot m^{-2} \cdot sr^{-1}$
Radiance (flux)	Luminance spectrale	$W \cdot m^{-2} \cdot nm^{-1}$ ou $W \cdot m^{-2} \cdot Hz^{-1}$
Éclairement (flux)	Éclairement (irradiance) spectral(e)	$W \cdot m^{-2} \cdot nm^{-1}$ ou $W \cdot m^{-2} \cdot Hz^{-1}$
Luminance, brillance (ou intensité spécifique) monochromatique	Luminance spectrale	$W \cdot m^{-2} \cdot sr^{-1} \cdot Hz^{-1}$

1.3.1.1. Résolution spectrale

La résolution spectrale est la capacité d'un spectromètre à enregistrer les variations en longueur d'onde sur un spectre. Elle dépend des spécificités techniques de l'instrument de mesure, définies par les paramètres suivants :

- *Largeur de bande spectrale*

C'est la largeur d'un canal individuel dans le spectromètre. Plus cette largeur est faible, meilleure est la capacité de détection de bandes d'absorption, à condition que l'écart entre deux canaux adjacents soit suffisamment petit (Figure I.8). Cet écart contrôle la définition de spectre « contiguë » qui est une des propriétés nécessaires des spectromètres. C'est aussi la principale différence entre les images multi- et hyper- spectrales. Les images multi- sont faites de canaux larges et discontinus alors que les images hyper- sont faites de canaux étroits et contigus simulant une continuité du spectre.

- *Forme de la bande passante et résolution spectrale*

La bande passante détermine la quantité d'énergie mesurable dans l'intervalle de longueur d'onde dans lequel le spectromètre collecte le rayonnement (Figure I.8). L'énergie distribuée dans cet intervalle possède une forme gaussienne, l'intensité maximum étant observée pour la longueur d'onde centrale. La bande passante est souvent définie par la largeur à mi-hauteur (Full Width Half-Maximum, FWHM) qui correspond à la largeur en longueur d'onde pour la moitié du niveau de réponse de la fonction. C'est aussi la définition la plus rigoureuse de la résolution spectrale. Toute bande d'absorption inférieure à FWHM n'est pas détectable.

- *Échantillonnage spectral*

Il s'agit de la distance en longueur d'onde entre les profils de bande passante pour chaque canal du spectre (Figure I.8). Pour éviter d'introduire un biais d'échantillonnage, les échantillons doivent être assez proches les uns des autres. Classiquement, l'échantillonnage est égal à la résolution spectrale FWHM. Dans la pratique la résolution spectrale effective est plus large et il convient de ne pas confondre résolution spectrale et échantillonnage spectral.

I.3.1.2. Bruit instrumental

Le bruit est un facteur inhérent aux capteurs ou aux conditions environnementales d'acquisition des données. En général, nous pouvons distinguer deux types de bruits : le bruit périodique qui se présente de la même manière sur l'ensemble des spectres de l'image et le bruit non-périodique qui varie en fonction de la longueur d'onde et de la position des pixels. Le bruit périodique a le plus souvent une source instrumentale. Ce bruit est lié directement aux propriétés du capteur. Pour une cible sombre (signal faible), le bruit instrumental est plus remarquable que pour une cible claire (signal fort). Le rapport du signal sur le bruit (S/B) est donc employé comme un critère de qualité des images. Il dépend de la profondeur de la bande d'absorption étudiée, de la sensibilité du détecteur, de la largeur de la bande spectrale et de l'intensité du rayonnement réfléchi par la surface examinée.

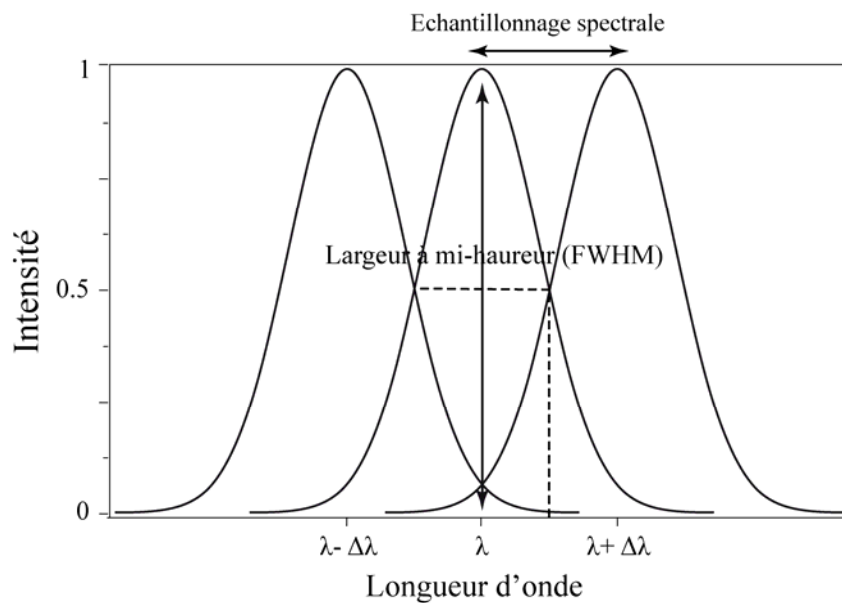


Figure I.8 : Définition des termes propres à la résolution spectrale à l'aide de trois profils gaussiens centrés à trois longueurs d'ondes et dont la largeur à mi-hauteur est de $\Delta\lambda$.

Ces facteurs, la résolution spectrale et le rapport du signal sur le bruit, contrôlent grandement la qualité des données obtenues. Plus grands sont ces facteurs, plus grande est la probabilité d'avoir une meilleure classification des objets à partir de leurs propriétés spectrales représentées. C'est particulièrement le cas des surfaces couvertes par les matériaux ayant les réponses spectrales similaires.

En outre, la forme du spectre de réflectance étant le plus souvent gouvernée par les propriétés d'absorbance du milieu, la spectroscopie est une méthode indispensable d'extraction de l'information quantitative des composantes du milieu. Dans le cas du biofilm microphytobenthique, les composantes absorbantes sont les pigments qui absorbent la lumière pour les besoins physiologiques de la cellule. La composition pigmentaire est donc le facteur le plus important de l'étude spectrale de microphytobenthos.

I.3.2. Composition pigmentaire du microphytobenthos et optique des pigments

La composition pigmentaire est extrêmement diversifiée entre les plantes supérieures, les différentes classes d'algues et les Cyanobactéries (Tableau I.2). Toutefois, pour le microphytobenthos comme pour l'ensemble des organismes photoautotrophes procédant à la photosynthèse oxygénique, la chlorophylle *a* (Chl *a*), est le principal pigment photosynthétique. Son abondance est donc en relation directe avec la production de biomasse. Cette dernière ne pouvant être estimée directement par des méthodes non invasives, plusieurs auteurs ont proposé différents indicateurs de biomasse. Le seul indicateur estimable par des méthodes non-invasives est la teneur en Chl *a* dans les sédiments superficiels par spectroradiométrie (Jesus et al. 2009; Méléder et al. 2003b; Metternicht et Zinck 2003; Serodio et al. 1997). Cet indicateur offre une estimation de la biomasse du microphytobenthos (Gieskes 1991; Méléder et al. 2007; Pinckney et al. 1994; Riaux-Gobin 1987), bien qu'il ait des limitations liées à la variabilité du rapport Carbone / Chl *a* (De jonge 1980). Toutefois, il reste actuellement un des meilleurs indicateurs pour estimer la biomasse des microphytobenthos (Méléder et al. 2007) et plus particulièrement la biomasse photosynthétique active. Par conséquent, nous utiliserons par la suite le terme de biomasse pour biomasse photosynthétique active (PAB) afin de désigner la concentration de Chl *a* par unité de surface ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$).

Il existe d'autres pigments photosynthétiques, dits 'accessoires', qui participent à l'activité de la photosynthèse. Il s'agit des autres chlorophylles (*b*, *c*, *d* et *e*), de certains caroténoïdes (fucoxanthine, diadinoxanthine, entre autres) et des phycobiliprotéines (phycocyanine, allophycocyanine et phycoérythrine). Ces pigments voient leur concentration cellulaire augmenter à faible éclaircissement afin d'optimiser la photosynthèse (Post et al. 1984). D'autres pigments ont un rôle de photoprotecteur comme certains caroténoïdes

(diadinoxanthine, diatoxanthine et carotènes α et β) et augmentent au sein des cellules fortement éclairées (Falkowski et Raven 2007).

Bien que la photosynthèse soit réalisée grâce au pigment photosynthétique, la Chl *a*, identique chez tous les végétaux supérieurs et les algues, la différence entre les organismes divers réside principalement dans la composition des pigments accessoires et photoprotecteurs (Tableau I.2). Ainsi, l'association au sein du microphytobenthos de la Chl *c*, de la fucoxanthine, de la diadinoxanthine et accessoirement de la diatoxanthine caractérise la présence de diatomées (Brotas et Plante-Cuny 1998; Gieskes 1991; Mackey et al. 1996; Schlüter et al. 2000), alors que la Chl *b* et l'absence de fucoxanthine marquent la présence d'euglènes.

Tableau I.2 : Distribution des pigments caractéristiques pouvant être utilisés en tant que biomarqueurs taxonomiques, dans les différentes divisions algal d'après Jeffrey et Vesk (1997).

	Algues vertes	Cyanobactérie	Diatomée	Euglène
Chlorophylle <i>a</i>	>10%	>10%	>10%	>10%
Chlorophylle <i>b</i>	>10%			>10%
Chlorophylle <i>c</i>			>10%	
$\beta\beta$ caroténoïde	1-10%	1-10%	1-10%	1-10%
Diadinoxanthine			1-10%	>10%
Diatoxanthine			1-10%	1-10%
Fucoxanthine			>10%	

Analyser la composition pigmentaire des microphytobenthos est nécessaire pour faire le lien entre la spectroscopie/ télédétection hyperspectrale (ce qui est réfléchi par le microphytobenthos) et la biologie de ces organismes (ce qui est absorbé). Ces analyses pigmentaires sont réalisées en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) afin d'identifier et de quantifier les pigments chlorophylliens et caroténoïdes. Chaque pigment absorbe la lumière dans des longueurs d'ondes spécifiques caractérisant leur capacité chimique et optique (Falkowski et Raven 2007; Porra et al. 1997). Le spectre d'absorption des pigments dépend de la sensibilité physique de ces molécules. En effet, l'onde électromagnétique est capable d'exciter les doubles liaisons conjuguées d'une molécule. Cette

excitation correspond au passage d'un état stable à un état excité qui nécessite l'absorption d'énergie. Le pic de maximum d'absorbance est lié à la taille de l'organe absorbant et sa position en longueur d'onde dépend de la structure moléculaire. La Chl *a* présente ainsi deux bandes d'absorption principales autour de 430 nm et de 650 nm. Ces deux bandes d'absorption sont liées à la présence d'un atome Mg au centre de la molécule de chlorophylle (voir Falkowski et Raven (2007) et Figure I.9). Les caroténoïdes ont une absorbance liée au nombre de groupements fonctionnels de la chaîne de liaisons conjuguées (liaisons C=C, C-OH par exemple, Figure I.9). Les propriétés chimiques et optiques des principaux pigments des diatomées sont présentées dans le Tableau I.3 pour les pigments chlorophylliens et dans le Tableau I.4 pour les pigments caroténoïdiens.

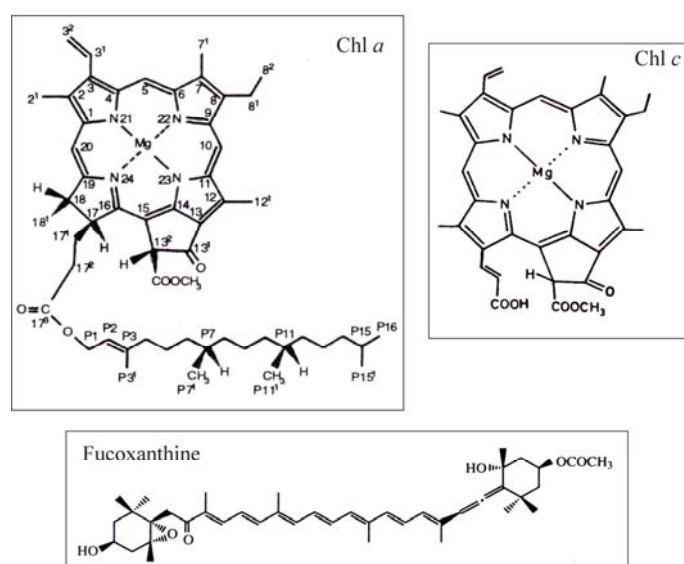


Figure I.9 : Formule chimique des molécules de Chl *a*, Chl *c* et fucoxanthine.

Tableau I.3 : Caractérisation de l'absorbance de deux pigments chlorophylliens importants des microalgues, observés par CLHP, d'après Jeffrey et al. (1997a).

Propriété	Information	
Nom	Chlorophylle <i>a</i>	Nom
Abréviation	Chl <i>a</i>	Abréviation
Occurrence	Toutes les algues photosynthétiques et la végétation supérieure	Occurrence
Couleur	Bleu-vert	Couleur
Formule moléculaire	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₅ Mg	Formule moléculaire
Coefficient d'extinction spécifique <i>in-vitro</i> (l g ⁻¹ cm ⁻¹)	87.67 (à 664 nm dans l'acétone à 90%)	Coefficient d'extinction spécifique <i>in-vitro</i> (l g ⁻¹ cm ⁻¹)
Maximum d'absorbance <i>in-vivo</i>	673 nm	Maximum d'absorbance <i>in-vivo</i>

Tableau I.4 : Caractérisation de l'absorbance de deux pigments caroténoïdiens importants des microalgues, observés par CLHP, d'après Jeffrey et al. (1997a).

Propriété	Information	
Nom	Diadinoxanthine	Nom
Abréviation	Diadino	Abréviation
Occurrence	Pigment majeur des diatomées, chrysophytes	Occurrence
Couleur	Jaune	Couleur
Formule moléculaire	$C_{40}H_{54}O_3$	Formule moléculaire
Coefficient d'extinction spécifique <i>in-vitro</i> (100 ml g⁻¹ cm⁻¹)	2250 (à 444.5 nm dans le méthanol)	Coefficient d'extinction spécifique <i>in-vitro</i> (100 ml g⁻¹ cm⁻¹)
Maximum d'absorbance <i>in-vivo</i>	500 nm	Maximum d'absorbance <i>in-vivo</i>

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot C_m \cdot d = \alpha \cdot c \cdot d \quad I.1$$

A : absorbance (densité optique).

I_0 : intensité lumineuse transmise par le solvant pur.

I : intensité lumineuse transmise par la solution de pigment.

d : épaisseur interne de la cuvette en cm.

C_m : concentration molaire

c : concentration pigmentaire en g. L⁻¹.

ε : absorbance d'une solution d'une mole à λ_{\max} pour une cuvette de 1cm (coefficient d'extinction d'une mole).

α : absorbance à λ_{\max} d'une solution de 1 g par litre et pour une cuvette de 1 cm (coefficient d'extinction d'un g.L⁻¹).

L'absorbance (A) est, en théorie, une grandeur physique additive, c'est-à-dire que pour un solvant contenant plusieurs composantes, l'absorbance totale est la somme des absorbances de toutes les composantes. En conséquence, la composition pigmentaire et les propriétés d'absorption d'un biofilm microphytobenthique est en relation directe avec les absorbances pigmentaires. Toutefois, il existe des phénomènes qui modifient l'absorbance d'un biofilm. En effet, les plastes des cellules sont composés de membranes en plusieurs couches (les thylakoïdes) contenant des pigments. L'absorbance de l'ensemble des

membranes est la somme des absorbances de chaque membrane s'ils ne se cachent pas l'un et l'autre par un phénomène d'auto ombrage (Figure I.10). Si ce dernier se passe, le même nombre de membranes absorbe une quantité inférieure au premier cas. Ce phénomène, appelé le « package effect », réduit l'efficacité d'absorption de pigmentation croissante (Berner et al. 1989; Dubinsky et al. 1986; Kirk 1994). Il est donc possible que l'absorbance mesurée des cellules *in-vivo* dans la structure du biofilm ne soit pas tout à fait proportionnelle à la quantité de pigments mesurée par CLHP.

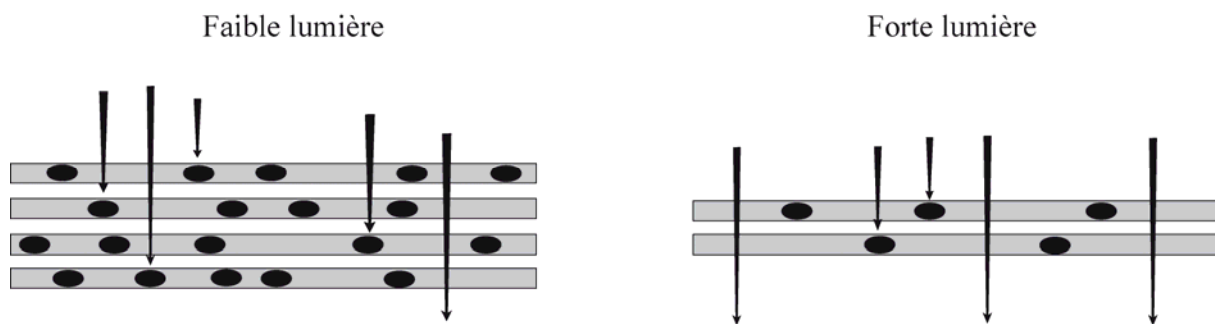


Figure I.10 : Influence de l'intensité de la lumière sur la structure des membranes thylakoïdales au sein de la cellule photosynthétique, d'après Falkowski and Raven (2007). À gauche, les thylakoïdes et les molécules de Chl a se multiplient et s'empilent pour faire face à une lumière trop faible, à droite, le nombre de thylakoïdes et de molécules de Chl a diminue pour éviter une absorption trop importante de lumière qui endommagerait l'appareil photosynthétique.

En plus d'influencer l'efficacité de l'absorbance, ce « package effect » modifie aussi l'emplacement des pics d'absorption entre les mesures *in-vivo* et *in-vitro*. Ainsi, il existe un décalage de longueur d'onde entre des mesures *in-vitro* dans le solvant (CLHP) des pigments libres et des mesures *in-vivo* au sein des cellules (mesures par télédétection) pour les quelles les pigments associés en complexes protéiques vont voir leurs propriétés d'absorbance modifiées en fonction des autres pigments et protéines aux quelles ils sont associés (Figure I.11). Prenant en compte ces deux phénomènes liés à la différence entre les pigments *in-vivo* et *in-vitro*, il n'est pas possible de reproduire un spectre d'absorbance *in-vivo* à partir des mesures *in-vitro*.

Toutefois, l'ensemble des propriétés d'absorption des pigments détermine l'aspect général des caractéristiques spectrales des biofilms (Guillaumont et al. 1988; Paterson 1986). Dans tous les cas, les analyses pigmentaires *in-vitro* offrent des informations utiles sur l'état physiologique (Peñuelas et al. 1997), mais aussi sur la biomasse. Les paramètres spectraux des pigments qui forment les caractéristiques de la réponse spectrale du biofilm de diatomées

sont visibles sur le spectre de réflectance du biofilm (Figure I.12-a). Nous pouvons distinguer les bandes d'absorption de : Chl *a* à 673nm et Chl *c* à 630 nm. L'intervalle de 500-550 nm est la région où tous les pigments absorbent.

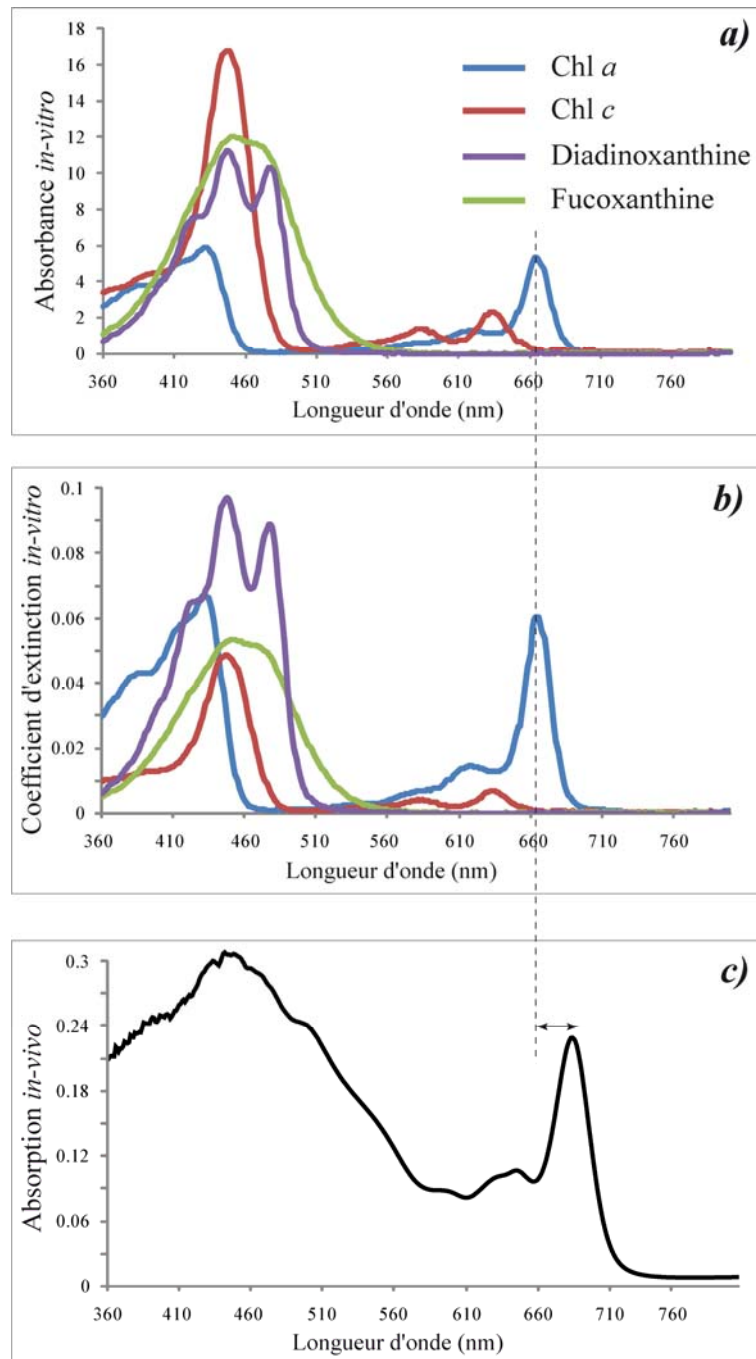


Figure I.11 : (a) spectres d'absorbance des pigments détectés par spectrophotomètre d'une solution de diatomées (*in-vitro*). Les chlorophylles sont en solution dans de l'acétone à 90% et les autres pigments sont dans du méthanol à 100% ; (b) spectres du coefficient d'extinction des mêmes pigments dans les mêmes solvants ; (c) spectre d'absorption de diatomées calculé à partir des mesures de réflectance des cellules (*in-vivo*), d'après Kazemipour et al. (2011).

Les caractéristiques spectrales du biofilm microphytobenthique ont fait l'objet de plusieurs études pour l'identification du microphytobenthos ou pour la quantification de sa biomasse. Nous allons donc présenter une synthèse des méthodes classiques utilisant des données hyperspectrales et susceptibles d'être utilisées dans le cas des biofilms microphytobenthiques.

I.3.3. Méthodes de classification et de quantification par télédétection hyperspectrale

La réponse spectrale d'une cible, obtenue par un capteur hyperspectral embarqué ou *in-situ*, est fonction de différents paramètres. En télédétection, il s'agit normalement de rechercher les propriétés caractéristiques et spécifiques d'une cible à partir de sa réponse spectrale. Toutefois, cette réponse contient non seulement les informations recherchées, mais elle porte aussi beaucoup d'autres informations qui peuvent parfois masquer les informations d'intérêt. Cette portion d'informations non désirées est principalement constituée du bruit, des effets environnementaux, de la morphologie de la cible et de l'effet des pixels adjacents (adjacency effect). Afin d'extraire les informations qualitatives et quantitatives qui traduisent les propriétés spécifiques de la cible, il faut pouvoir « nettoyer » la réponse spectrale. Plusieurs méthodes ont été développées à la fois pour obtenir des données propres et pour en extraire les informations recherchées. Nous présenterons ici celles qui sont les plus utilisées pour les surfaces terrestres.

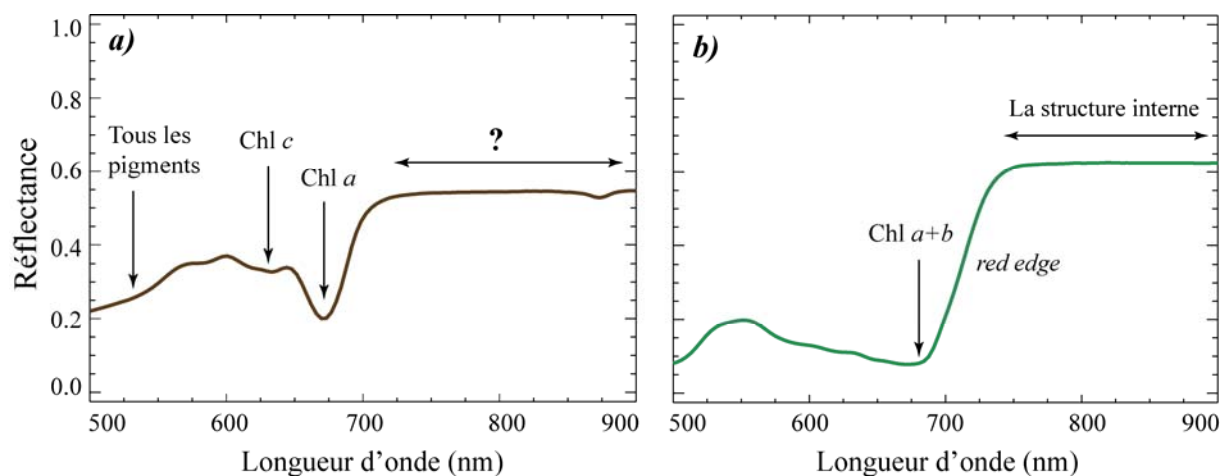


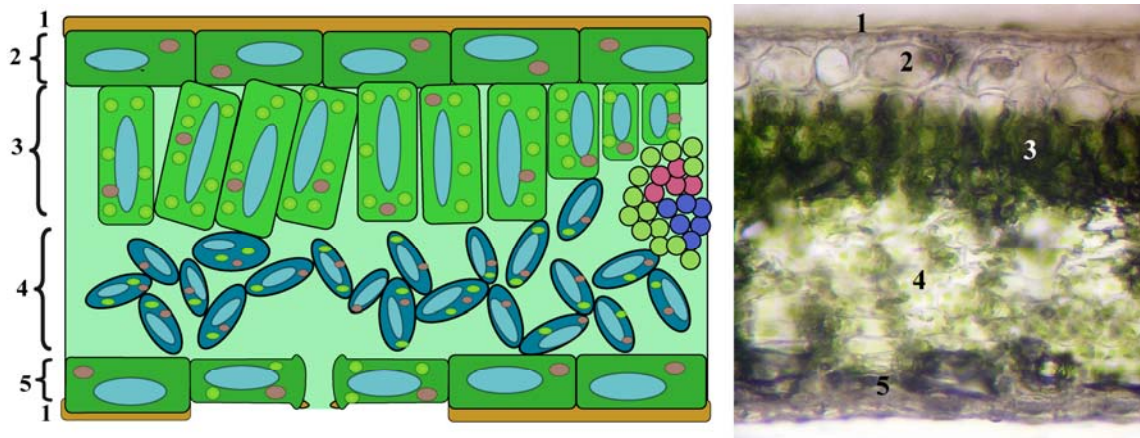
Figure I.12 : Spectre de réflectance mesuré : (a) d'un biofilm de diatomée ; (b) d'une feuille verte. Si le plateau infrarouge des feuilles est relié à la structure interne réfléchissante, celui des diatomées est mal connu.

1.3.3.1. Méthodes empiriques

Parmi les méthodes de quantification à partir des données hyperspectrales, les approches empiriques sont les plus simples et souvent les plus utilisées. Ces méthodes consistent en l'utilisation de techniques statistiques afin d'obtenir une corrélation entre une des propriétés de la cible et sa signature spectrale. Elles fournissent, plus particulièrement, des informations qualitatives en se basant sur la forme spectrale ou sur des bandes d'absorption spécifiques correspondant à la présence des pôles purs (end-members) susceptibles d'être retrouvés en mélange. En ce qui concerne la quantification, l'utilisation d'indices spectraux est bien connue pour l'étude de la végétation (Gitelson et al. 2003; Richardson et al. 2002; Ustin et al. 2009) mais aussi en géologie (Adams 1974; Cloutis et al. 1986) et pour l'étude des océans (Bricaud et Stramiski 1990; Gons 1999; Ruiz-Verdú et al. 2008). Certains indices spectraux ont également été utilisés pour étudier les sédiments des vasières intertidales et la biomasse du microphytobenthos (Barillé et al. 2007; Méléder et al. 2005; Méléder et al. 2003b). Ces indices, suivant le même principe que ceux de la végétation supérieure, reposent sur la détermination des longueurs d'onde ou des bandes spectrales susceptibles de fournir des informations importantes et fiables sur les propriétés biochimiques et biophysiques de la cible. Une relation empirique entre la quantité de matière recherchée (par exemple la Chl *a*) et les réponses spectrales concernées est établie à partir d'une série de mesures au laboratoire et/ou *in-situ*. Cette relation est ensuite utilisée pour établir des tableaux de correspondance (on parle aussi de Look Up Table, LUT) entre des biomasses théoriques et des données hyperspectrales mesurées.

Comme pour tout autre organisme végétal, la présence des pigments végétaux détermine l'aspect général du spectre d'absorbance des biofilms microphytobenthiques dans le domaine visible. Il est donc pertinent d'utiliser aussi les indices proposés pour la végétation supérieure dans le cas des biofilms. Ces indices sont basés sur la variation de la réponse spectrale dans le rouge et dans le proche infrarouge (NIR). Cette variation est caractérisée par un saut brutal entre rouge et NIR appelé « *red edge* » (Figure I.12-b). Ce saut correspond au passage de la zone où les pigments chlorophylliens les plus importants absorbent fortement la lumière à la zone où la texture des feuilles forme un réflecteur très efficace de la lumière NIR en raison de leur structure interne (Figure I.13). Cette structure interne est définie par la présence du

mésophylle⁷ et l'espace intracellulaire (Galisan et al. 1970; Gausman et Allen 1973). Plusieurs études présentent la synthèse de nombreux indices spectraux pour estimer la teneur en chlorophylle foliaire (Gitelson et al. 2003; Richardson et al. 2002; Simis et al. 2007; Ustin et al. 2009). Cependant, ces indices doivent être appliqués prudemment dans le cas des biofilms de microphytobenthos. Bien que leur comportement spectral soit assez bien connu dans le visible, ressemblant à celui des feuilles vertes à cause de la présence des mêmes pigments végétaux, leur réponse spectrale dans le NIR n'est en revanche pas très bien connue (Figure I.12). À notre connaissance, les propriétés spectrales de la structure interne d'un biofilm de microphytobenthos n'a jamais été étudiée et mérite donc une analyse détaillée.



1: Cuticule 2: Épiderme supérieur 3: Mésophylle pallissadique 4: Mésophylle spongieux 5: Épiderme inférieur

Figure I.13 : Coupe transversale d'une feuille et sa représentation schématique, source : <http://en.wikipedia.org/wiki/Leaf>

1.3.3.2. Utilisation des bibliothèques spectrales

Parmi les méthodes empiriques basées sur l'établissement de tableaux de correspondance, celles de Combe et al. (2005) s'appuient sur la réalisation de bibliothèques spectrales. Il s'agit d'utiliser une classification supervisée dans laquelle les connaissances *a priori* sur l'image ne sont pas les spectres issus de l'image même mais des combinaisons de spectres de pôles purs obtenus en laboratoire, représentant tous les mélanges possibles et regroupées dans une bibliothèque. Les spectres de l'image sont ensuite comparés avec tous les spectres de la bibliothèque afin de trouver le spectre le plus ressemblant. Les spectres de

⁷ Mésophylle : tissu lâche occupant la majeure partie de l'espace entre les épidermes supérieure et inférieure de la feuille.

références de la librairie doivent tenir compte d'une large gamme de variation de la biomasse ainsi qu'être suffisamment représentatifs des caractéristiques du site d'étude, c'est-à-dire d'inclure également les propriétés des matériaux supports. Ces librairies peuvent alors atteindre des tailles conséquentes et devenir de plus en plus difficile à utiliser au fur et à mesure que les problèmes de mélange se complexifient.

La comparaison entre l'image et la librairie est basée sur le calcul de la distance spectrale entre le spectre de chaque pixel de l'image et chaque spectre de la librairie. Plus cette distance est petite, plus les spectres sont similaires. La distance calculée est soit une distance euclidienne appliquée à des spectres normalisés, soit une distance angulaire entre les deux vecteurs mesurée dans un espace à b dimensions (b étant le nombre de canaux). Le calcul de cette distance est l'une des méthodes les plus simples pour étudier les similitudes spectrales entre le spectre de référence (R_1) et le spectre de la cible (R_2). La Figure I.14 présente ces deux types de métrique de calcul de ressemblance, chacun ayant ses avantages et ses inconvénients. Le choix de la métrique doit être effectué soigneusement et dépend du cas considéré (voir Combe et al. (2005)).

Bien que l'utilisation de librairies spectrales s'avère efficace, ces méthodes nécessitent des traitements spécifiques qui dépendent du cas d'application. Notamment, les spectres de la librairie et ceux de l'image doivent être tout à fait comparables. Or, les effets qui modifient l'aspect général des spectres ne sont pas identiques pour des mesures au laboratoire et des images. Ainsi la calibration des spectres est une étape cruciale avant l'utilisation d'une librairie pour les comparaisons et la quantification. Combe et al. (2005) ont adapté un Modèle Gaussien Modifié (MGM), mis au point par Sunshine et al. (1990), pour le retrait de continuum (enveloppe générale du spectre) et qui est donc censé retirer tous les effets autres que ceux liés aux propriétés spectrales propre de la surface étudiée. Ils ont utilisé ce modèle pour cartographier la biomasse du microphytobenthos à partir des images DAIS⁸ de la baie de Bourgneuf. Le modèle MGM nécessite une connaissance *a priori* de la position des bandes d'absorption caractéristiques et de leur largeur à mi-hauteur. Ce modèle a été par la suite automatisé en se basant sur les bandes d'absorption issues d'une dérivée seconde du spectre de réflectance (Verpoorter 2009). Une autre méthode de calibration des images et des librairies, établie à partir d'un filtre passe-bas, a été définie par Roy et al. (2009) et a été appliquée dans le cadre d'une étude lithologique.

⁸ DAIS 7915 (Digital Airborne Imaging Spectrometer) est le spectromètre imageur utilisé par DLR (Deutsche Zentrum für Luft-und Raumfahrt).

Toutes ces méthodes de calibration proposent donc des solutions au problème de comparabilité entre les bibliothèques spectrales et les images hyperspectrales mais qui nécessitent des calculs souvent lourds et longs, comme dans le cas de la méthode MGM. De plus, quelque soit la métrique utilisée, le calcul de l'angle entre vecteurs ou la distance euclidienne entre spectres normalisés à leur continuum, l'utilisation de bibliothèques, les plus complètes possibles car devant contenir tous les mélanges observables, est à l'origine de confusions entre les matières ayant des réponses spectrales proches. Afin de limiter les temps de calculs liés à la méthode basée sur les bibliothèques, des tentatives ont été réalisées pour corrélérer directement la biomasse à la profondeur de la gaussienne correspondant à la Chl *c* (Barillé et al. 2007; Verpoorter 2009).

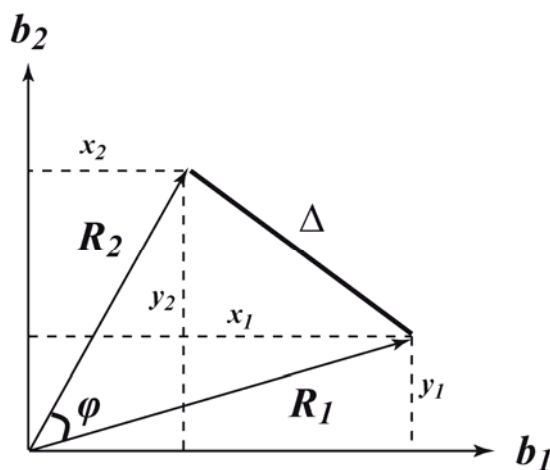


Figure I.14 : Principe du calcul de la distance spectrale euclidienne et angulaire. Les spectres R_1 et R_2 sont projetés sur les axes représentant les bandes (ici nombre de canaux=2).

$$\Delta = \|R_1 - R_2\| = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}$$

$$\varphi = \cos^{-1} \frac{(x_1 \cdot y_1) + (x_2 \cdot y_2)}{\sqrt{(x_1^2 + x_2^2) \cdot (y_1^2 + y_2^2)}}$$

1.3.3.3. Inversion des modèles physiques

Le principe des méthodes d'inversion de modèles physiques repose sur l'étude de l'interaction entre la lumière incidente et la cible, afin de décrire par un modèle analytique tous les processus accompagnant la transformation de la lumière depuis la source jusqu'au récepteur. On parle alors de « modèle de transfert radiatif » à travers tous les matériaux qui séparent la source du récepteur. Les paramètres primaires pour établir ce modèle sont issus

des connaissances sur la nature des milieux traversés. S'agissant de l'étude d'un biofilm en particulier, il faut déterminer si le milieu correspondant à ce biofilm peut être considéré comme une couche homogène compacte, un ensemble multicouche ou une suspension de particules dispersées dans un volume de composition connu. En fonction de ces représentations, il existe déjà plusieurs modèles de transfert radiatif pour différents milieux tels que sol, océan ou végétation. Ce n'est pas le cas des biofilms de microphytobenthos. En effet, les modèles physiques connus semblant *a priori* les plus proches, sont ceux qui sont utilisés pour le calcul des propriétés optiques des cellules planctoniques et benthiques en suspension dans l'eau (connaissance de couleur de l'eau, affleurement planctonique, etc.). Dans ces études, les cellules sont considérées comme les particules absorbantes et diffusantes, dispersées dans une colonne d'eau (Gohin et al. 2002; Gordon et al. 1983; Gordon et McCluney 1975; Kiefer et SooHoo 1982; Lee et Carder 2004; Lee et al. 1998; Liu et al. 1999). Cependant, Gouleau (1975) et plus récemment Herlory et al. (2004), ont montré qu'un biofilm est composé de cellules serrées les unes contre les autres en recouvrant une surface homogène sur la vase (Figure I.15-a et b). Ces cellules forment en général une couche dense, sans beaucoup d'espace libre (air ou eau) entre elles. Physiquement, un biofilm aurait donc une forme intermédiaire entre une feuille verte aux cellules bien organisées dans une structure et des cellules libres dans une colonne d'eau. Les cellules sont posées les unes sur les autres, de manière aléatoire, ce qui assure une meilleure couverture de la surface exposée au soleil (Figure I.15-c et d).

Nous allons donc décrire les méthodes qui nous permettront de calculer les propriétés optiques des biofilms de microphytobenthos à partir de leur spectre de réflectance. Nous présenterons tout d'abord les modèles de transfert radiatif de la végétation, à travers des cas ayant les caractéristiques les plus similaires de celles des biofilms. Ensuite, nous présenterons des méthodes utilisées pour l'étude d'autres couches compactes et qui ont eu l'avantage d'avoir déjà été mises au point à partir du formalisme de l'optique d'un milieu donné.

I.3.3.3.1. Modèles de transfert radiatif de la végétation

Les modèles les plus simples de la réflectance et de la transmittance de la végétation sont basés sur le formalisme de Kubelka and Munk (1931). Les modèles dits de Kubelka-Munk expliquent le passage de lumière à travers une couche de peinture. Décrivons brièvement ces équations.

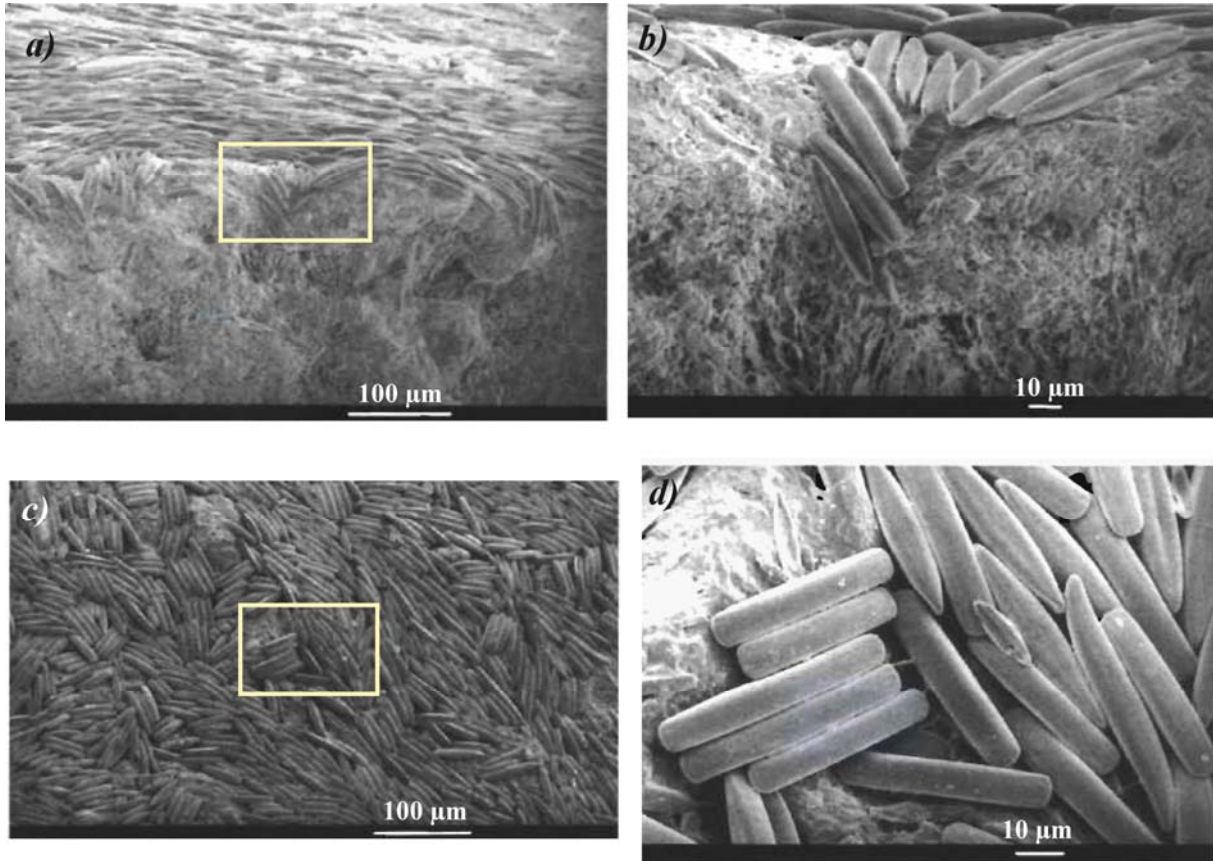


Figure I.15 : Photographies en MEB du biofilm formé à la surface du sédiment (photos : D. Gouleau) : (a) profil vertical du sédiment, les cellules couvrent la surface du sédiment de manière homogène et l'épaisseur du biofilm ne dépasse pas la longueur d'une cellule ; (b) zoom vertical pour montrer la pénétration de certaines cellules dans le sédiment ; (c) vue de haut du biofilm montrant une couche dense de cellules ; (d) zoom horizontal pour visualiser l'emplacement des cellules du biofilm.

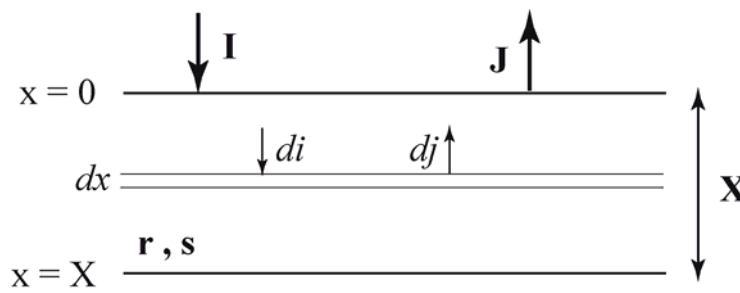


Figure I.16 : Représentation schématique du milieu considéré par les formalismes de Kubelka-Munk. Voir le texte pour les définitions.

Imaginons une couche mate, sans réflexion spéculaire et à réflexion diffuse dominantes, d'épaisseur X constituée de plans parallèles, éclairée par une lumière incidente I . Notons J la fraction réfléchie (dans toutes les directions) et étudions un élément infiniment petit d'épaisseur dx dans cette couche (Figure I.16). Cet élément absorbe et diffuse une fraction constante de la lumière à travers son épaisseur : $sdx+rdx$ où s et r sont les constantes

spécifiques d'absorption et de diffusion de la couche à l'intérieur du milieu. En passant à travers la couche dx , i et j vont varier de manière décroissante :

$$(r + s).i \, dx ; (r + s).j \, dx \quad \text{I.2}$$

Considérons que l'intensité lumineuse disparue par diffusion de la lumière descendante (par transmission diffuse) s'ajoute à la celle de la lumière ascendante (par réflexion diffuse) et vice-versa, nous obtenons :

$$\begin{cases} -di = -(r+s)i \, dx + rj \, dx \\ dj = -(r+s)j \, dx + ri \, dx \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} -\frac{di}{i} = -(r+s) \, dx + r \cdot \frac{j}{i} \, dx \\ \frac{dj}{j} = -(r+s) \, dx + r \cdot \frac{i}{j} \, dx \end{cases} \quad \text{I.3}$$

$$\Rightarrow \frac{dj}{j} - \frac{di}{i} = d \ln \frac{j}{i} = -2(r+s) \, dx + \left(\frac{i}{j} + \frac{j}{i}\right) r \, dx$$

Le signe négatif de d_i vient du fait que la direction de sa décroissance est opposée à la direction du calcul de l'épaisseur.

Posons $j/i = h$ (similaire à $H = J/I$, la réflectance), nous obtenons :

$$d \ln h = \frac{dh}{h} = -2(r+s) \, dx + \left(\frac{1}{h} + h\right) r \, dx \Rightarrow dh = [r \cdot h^2 - 2(r+s)h + r] \, dx ;$$

$$\int \frac{dh}{h^2 + \frac{r+s}{r}h + 1} = -r \int dx \quad \text{I.4}$$

En posant $(r+s)/r = a$, l'intégration sur l'intervalle de $x=0 \rightarrow X$ donne :

$$\ln \frac{(H - a - \sqrt{a^2 - 1})(H' - a - \sqrt{a^2 - 1})}{(H' - a - \sqrt{a^2 - 1})(H - a - \sqrt{a^2 - 1})} = 2 \cdot r \cdot X \cdot \sqrt{a^2 - 1} \quad \text{I.5}$$

Cette équation présente de manière synthétique la relation qui unit la transmittance et la réflectance de la couche d'une part et les propriétés d'absorption et de diffusion d'autre part. Afin de pouvoir appliquer ce genre d'équation, il faut d'abord l'adapter au cas particulier considéré, tout en faisant le bilan des paramètres connus et inconnus du système d'équation.

Allen and Richardson (1968) ont adapté ce système d'équations au cas des feuilles. Ils ont donc proposé un nouveau modèle de transfert radiatif des feuilles, le « K-M model ». Allen et al. (1969) ont complété ce travail en mettant au point le « Plate Model » qui explique la réflectance et la transmittance d'une lumière diffuse à travers une feuille compacte. Le « Plate Model » est à la base d'un autre modèle de transfert radiatif des feuilles, PROSPECT de Jacquemoud et Baret (1990). Ces auteurs ont modélisé le spectre d'absorbance d'une feuille dans le domaine visible en fonction de la concentration en chlorophylle $a+b$ et du coefficient d'absorption spécifique correspondant. Dans le domaine infrarouge, PROSPECT est basé sur la teneur en eau et le coefficient d'absorption spécifique de l'eau, mais aussi sur la structure interne de la feuille. Dans le visible, là où les seuls éléments absorbants sont les pigments, pour une longueur d'onde (λ) nous pouvons écrire :

$$\alpha_{\lambda} = K_{\lambda,1} \cdot C_1 + K_{\lambda,2} \cdot C_2 + \dots + K_{\lambda,n} \cdot C_n \Rightarrow \alpha = [K_1 \ K_2 \ \dots \ K_n]_{\lambda} * \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \dots \\ C_n \end{bmatrix} \quad \text{I.6}$$

α : coefficient d'absorption

K_i : coefficient spécifique d'absorption du pigment (i)

C_i : concentration du pigment (i)

n : nombre d'éléments absorbants

Nous cherchons à estimer la matrice des coefficients spécifiques d'absorption (\mathbf{K}) à partir des calculs du coefficient d'absorption (α) et des mesures de concentration (\mathbf{C}). En utilisant un nombre de mesures de concentration et les coefficients d'absorption supérieur au nombre des éléments à estimer ($m > n$), nous serons capables de calculer la matrice de (\mathbf{K}) :

$$\underbrace{[\alpha_1 \ \alpha_2 \ \dots \ \alpha_m]}_{\alpha} = \underbrace{[K_1 \ K_2 \ \dots \ K_n]}_K * \underbrace{\begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} & \dots & C_{1m} \\ C_{21} & C_{22} & \dots & C_{2m} \\ \dots & & & \\ C_{n1} & C_{n2} & \dots & C_{nm} \end{bmatrix}}_C \Rightarrow K = \alpha \cdot C^{-1} \quad \text{I.7}$$

Cette équation n'a des solutions que si la matrice C est inversible. Lorsque les concentrations pigmentaires sont corrélées, ce système matriciel n'a pas de solution. Dans le cas où le pigment (n) présente une bande d'absorption spécifique et isolée, à une certaine longueur d'onde (l), cette équation peut être simplifiée comme il suit :

$$K_l = \alpha_l \cdot C_n \quad \text{I.8}$$

Ce coefficient d'absorption spécifique (K_i) peut être utilisé pour extraire la concentration d'un pigment à partir du spectre de coefficient d'absorption à la longueur d'onde correspondante (α_i).

I.3.3.3.2. Autres méthodes d'extraction des propriétés optique

D'autres auteurs ont présenté des méthodes basées sur le formalisme de Fresnel et l'optique des couches solides, afin d'estimer les propriétés optiques de ces couches solides à partir de leur spectre de réflectance. Le principe de base reste toujours identique aux méthodes présentées précédemment : le passage de la lumière dans le milieu et l'estimation de la lumière atténuée.

Les équations de Fresnel décrivent le comportement d'une onde électromagnétique à l'interface entre deux milieux (Figure I.17). Les paramètres qui interviennent dans ces équations sont tous les paramètres de la surface tels que la réflectance à l'interface (R_F), la transmittance à l'interface (T_F), l'indice de réfraction (n) et le coefficient d'absorption (α).

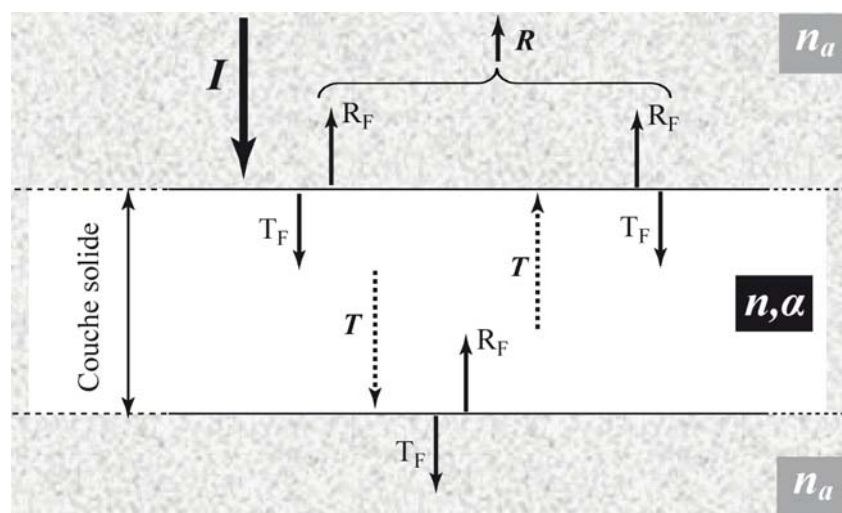


Figure I.17 : Présentation théorique du comportement de la lumière à l'interface d'une couche et son trajet à travers la couche. Voir le texte pour les définitions.

En mode direct du modèle, les spectres de réflectance (R) et de transmittance (T) sont calculés à partir de l'indice de réfraction (n) et du coefficient d'absorption (α). Sur cette base, certaines études proposent des méthodes de calcul des propriétés optiques de la couche (n, α) à partir de ces mesures de réflectance. Ainsi, Khashan et El-Naggar (2000) présentent une approche itérative pour estimer l'indice d'atténuation de la couche et, en utilisant ses propriétés à l'interface, calculer son coefficient d'absorption toujours à partir des spectres de réflectance. Dans le même but, Nichelatti (2002) présente une méthode analytique de calcul de l'indice de réfraction complexe d'une couche diélectrique.

I.4. Télédétection des vasières intertidales

Les premiers auteurs à décrire l'influence des microalgues benthiques sur la signature spectrale du substrat intertidal sont Jobson et al. (1980) qui ont travaillé dans l'estuaire de North Inlet en Caroline du Sud (États-Unis). Au Japon, Uno et Gotoh (1992) ont montré qu'il est possible de cartographier les zones de fort développement microphytobenthique à partir de mesures radiométriques dans le domaine proche infrarouge (bande 4 des satellites LANDSAT-TM et MOS-MESSR). Guillaumont et al. (1988), Kokke (1995), Paterson et al. (1998) et Zbinden (1985) ont mis en relation l'absorption autour de 680 nm (due à la Chl a) avec la microflore algale se développant à la surface des sédiments intertidaux.

Méléder et al. (2003b) ont proposé une relation exponentielle entre le NDVI⁹ et la biomasse, en se basant sur une série de mesures de réflectance et des mesures de biomasse par CLHP sur des biofilms simulés au laboratoire à partir d'une culture monospécifique. De même, Barillé et al. (2007) utilisent directement la profondeur de la gaussienne centrée sur la Chl *c* par la méthode MGM pour estimer la biomasse (cf. I.3.3.2). Une première cartographie du microphytobenthos à partir des images SPOT de la baie de Bourgneuf a ensuite été présentée par Méléder et al. (2003b) sans pouvoir arriver à l'information de biomasse. Une méthodologie adaptée aux images hyperspectrales est alors mise en place par Combe et al. (2005) sur les images DAIS de la baie de Bourgneuf. La quantification passe par la comparaison des spectres de réflectance de chaque pixel avec une librairie spectrale contenant un panel de biofilms simulés avec des biomasses variées en mélange ou non avec d'autres composants de la vasière (cf. I.3.3.2). Ce travail mène à une cartographie relativement précise de la biomasse mais reste difficilement applicable en routine. Une optimisation de la cartographie de la biomasse microphytobenthique devenait donc nécessaire pour une opérationnalité de la méthodologie, en s'assurer, effectivement, de ne travailler que sur l'information spectrale microphytobenthique.

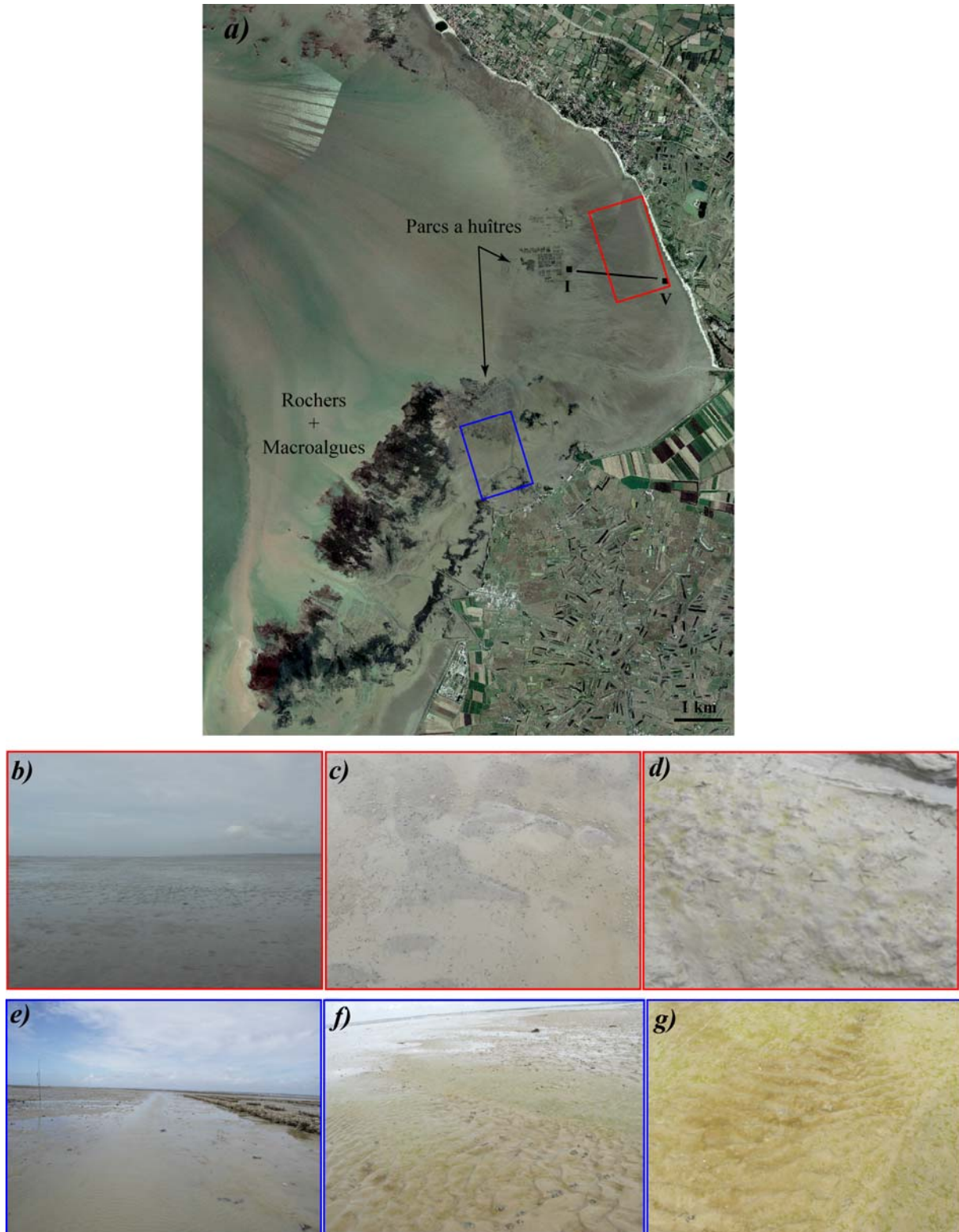
En effet, la texture et la composition des sédiments ont aussi des caractéristiques spectrales spécifiques (Carrère et al. 2002; Verpoorter 2009) qui modifient de manière importante l'intensité de la réponse spectrale du biofilm. En plus des caractéristiques des cellules benthiques et de leur production de biomasse, le fonctionnement de la baie dépend aussi de la sédimentologie. La texture et la composition des sédiments modifient la structuration des peuplements (Méléder et al. 2005). Les compositions granulométriques portent des informations sur les habitats qui peuvent être à l'origine de différentes niches écologiques, notamment pour les algues unicellulaires formant le microphytobenthos (Méléder 2003). Ce fait est lié au comportement différent entre les cellules épipéliques, qui forment un biofilm dense sur le sédiment vaseux, et les cellules épipsammiques, qui adhèrent par petits groupes aux grains de sable. Ce comportement distinct peut être à l'origine des mécanismes de diffusion de la lumière dans les substrats vaseux et sableux.

La Figure I.18 présente des photographies de différentes zones peuplées de divers types de microphytobenthos et ayant une sédimentologie variée. Ces photographies, localisées sur une ortho-photo de la baie, montrent que la partie nord-est de la baie est constituée plus

⁹ NDVI : Normalized Difference Vegetation Index, indice classique pour l'identification de la végétation par télédétection.

particulièrement de sédiment sableux-vaseux, saturé d'eau et couvert par une pellicule d'eau. Cette région est dominée par les diatomées épipsammiques de basse concentration (d'après Méléder et al. (2005)) où les biofilms ne se forment pas (Figure I.18-b et c). En effet, Méléder et al. (2005) ont analysé la couche supérieure (0-2 mm) de carottes de sédiment prélevées en 5 stations le long d'une radiale de 1,2 km (Figure I.18-a). Les résultats de cette étude indiquent une présence majoritaire de diatomées (97%), atteignant des biomasses de l'ordre de 50 mg Chl *a.* m⁻², le reste (3%) appartenant aux euglènes et aux microalgues vertes. Au contraire, la partie sud située à proximité des parcs à huîtres est couverte par de la vase fine et les biofilms de diatomées et d'euglènes sont clairement visibles à la surface du sédiment (Figure I.18-e, f et g). Ces biofilms peuvent atteindre de fortes biomasses dépassant les 100 mg Chl *a.* m⁻² (V.Méléder, Communication personnelle).

Ainsi, lorsque les informations correspondant à la biomasse et à la l'écologie du microphytobenthos sont en relation proche avec les caractéristiques sédimentologiques de la zone, ces informations sont complémentaires mais aussi corrélées : une cartographie de la biomasse portant les informations sur les espèces et la variation spatiale de la biomasse apporte aussi des connaissances fondamentales sur la granulométrie.



I.5. Conclusion partielle

La baie de Bourgneuf et ses vasières recouvertes de microphytobenthos ont fait l'objet de nombreuses études dont cette thèse. Ce site subit de fortes variations :

- saisonnières, liée à l'existence des organismes végétaux et plus particulièrement du microphytobenthos,
- spatiales, par variation de la sédimentologie et de la distribution spatiale des espèces appropriées à chaque habitat,
- journalières, liées aux marées et à la remise en suspension des matières organiques,
- et finalement dues aux activités humaines associées à l'exploitation des ressources dans les concessions ostréicoles.

Par conséquent, une surveillance temporelle régulière de l'ensemble de la zone est nécessaire afin de connaître la structure et le fonctionnement des vasières. La télédétection hyperspectrale constitue donc un choix idéal pour la cartographie de cette zone.

Les méthodes à mettre en œuvre pour cette cartographie doivent produire des résultats précis en termes d'identification et de quantification sans pour autant être trop lourdes et trop longues à utiliser. Les méthodes développées jusqu'à présent sont empiriques et ne fournissent pas d'information sur les propriétés optiques et la structure interne du biofilm microphytobenthique. En conséquence, les résultats produits ne seront pas justifiés d'un point de vue physique et optique. Nous montrerons donc que le développement d'un modèle de transfert radiatif du biofilm est indispensable pour répondre à ces attentes et d'obtenir des connaissances de base. Cette méthode, robuste et supportée par les raisonnements physiques, est destinée pour améliorer la cartographie de la structure du microphytobenthos des vasières de la baie de Bourgneuf.

CHAPITRE II

INSTRUMENTS ET IMAGES HYPERSPECTRAUX

II.1. Introduction

Depuis août 2002, la baie de Bourgneuf est le site littoral français le plus prospecté par des campagnes hyperspectrales aéroportées. Avant cette date, les études spatiales étaient basées sur les images satellites multispectrales, par exemples les images SPOT par Méléder et al. (2003b).

Les premières campagnes ont été opérées par DLR en août 2002 en mettant en œuvre des vols embarquant les capteurs DAIS et ROSIS¹⁰ dans la cadre d'un programme européen Hysens et en septembre 2008 avec le capteur HyMap dans la cadre du programme régional GERRICO¹¹ entre l'Université de Nantes et l'Ifremer. Depuis février 2009, le Laboratoire de Planétologie et Géodynamique de Nantes possède son propre spectro-imageur, HySpex, qui a permis d'acquérir des images en mai et en septembre 2009. Les données DAIS et ROSIS ont été en partie utilisées précédemment pour la cartographie de la distribution spatiale et la biomasse du microphytobenthos ainsi que la sédimentologie de la baie (Combe et al. 2005; Méléder 2003; Verpoorter 2009). Les résultats obtenus par ces études varient en fonction des méthodes utilisées et aussi des caractéristiques des images traitées. Il est donc indispensable, avant toute application d'une méthode de cartographie, de bien connaître les caractéristiques des images afin de pouvoir appliquer les traitements nécessaires qui doivent être aussi adaptées aux paramètres des images.

Dans cette étude, les images ROSIS et HySpex ont été utilisées pour cartographier la biomasse microphytobenthique en raison de leur haute résolution spectrale.

Dans ce chapitre nous allons présenter les méthodes générales de traitements des données hyperspectrales, suivie par la description des caractéristiques des imageurs et du radiomètre dont les données sont utilisées dans ce travail, ainsi les traitements adaptés à ces données.

II.2. Images hyperspectrales et traitement

¹⁰ Reflective Optics System Imaging Spectrometer

¹¹ Gestion globale des Ressources marines et des Risques dans les es

Le traitement des images hyperspectrales fait appel à une combinaison des techniques de spectrométrie et d'imagerie numérique. En fonction du type de capteur utilisé, le spectre est construit par balayage d'un faisceau lumineux diffracté par un réseau ou par numérisation directe du résultat de la diffraction sur une barrette de détecteur selon une direction z correspondant au spectre de la lumière. Une ligne est ensuite constituée sur une direction x par un balayage complémentaire (les images sont de type *wisk broom*) ou par l'emploi d'une matrice de détecteur collectant colonne par colonne les spectres de chaque pixel (les images sont de type *push broom*). Enfin, l'image est construite ligne par ligne en scannant l'un par rapport à l'autre, selon une direction y , capteurs et cible de l'image. En pratique les échantillons se déplacent devant des détecteurs fixes en laboratoire et en extérieur le scanne est fourni par le détecteur monté sur un dispositif de scanne ou sur un avion ou un satellite.

Les données hyperspectrales sont très souvent accompagnées par une grande quantité d'information non-désirées et perturbées par du bruit provenant de différentes sources. Les effets les plus importants sont l'absorption atmosphérique le long du trajet de la lumière : capteur-cible-capteur. Le bruit le plus observé est le bruit instrumental lié à la calibration de la caméra ainsi qu'aux mouvements de l'avion.

II.2.1. Réduction du bruit et lissage spectral

Puisque les images hyperspectrales fournissent des spectres contigus sur une large gamme de longueur d'onde, elles produisent aussi un nombre important de données qui doivent être traitées et analysées. Il est possible que beaucoup de ces données soient redondantes. C'est notamment le cas si les propriétés des matériaux induisent une forte corrélation de canal à canal et sur tout le domaine de longueurs d'onde. Ce type de spectre favorise l'apparition de bruit de classification en raison de la discrimination difficile des matériaux entre eux. De nombreuses approches statistiques ont été développées afin de maximiser la variance spectrale des données. La technique la plus utilisée est l'analyse en composantes principales (ACP). Les données d'origine sont projetées dans un nouveau repère de coordonnées orthogonales qui sont définies par les propriétés statistiques des données de départ. L'ACP est basée sur la matrice de corrélations entre les canaux spectraux calculée à partir des données d'une scène. Cette matrice est décomposée en valeurs propres et vecteurs propres définissant une nouvelle série d'axes orthogonaux pour lesquels la variance est maximisée par rotation. Ces axes sont donc des combinaisons linéaires des canaux spectraux.

Cette technique sépare les contributions du signal selon leur niveau de variance. Elle permet d'obtenir des images dé-corrélées entre elles, de retirer les composantes bruitées, et de diminuer le nombre de dimensions des séries de données. Pour diminuer le bruit il suffit de sélectionner les composantes principales les plus significatives, c'est-à-dire, les premières dans l'ordre des valeurs propres, puis d'effectuer la transformation inverse pour travailler à nouveau dans l'espace des longueurs d'onde et de la réflectance. Le cube de données des images hyperspectrales, retranscrit dans le domaine spectral par l'ACP, ne doit contenir que les composantes significatives. Généralement, l'essentiel de l'information est contenue dans les premières images qui contiennent plus de 95% de la variance et les autres sont associées au bruit.

Pour améliorer les performances d'élimination du bruit, Green et al. (1998) ont développé un autre type de traitement, appelé 'transformé au minimum du bruit' (Minimum Noise Fraction, MNF), qui est une modification de l'ACP. L'hypothèse prise en compte par rapport à l'ACP repose sur les propriétés aléatoires du bruit. Ce bruit est distribué de manière égale parmi les bandes, les données de réflectance sont échelonnées pour que le bruit devienne isotrope avec une variance unité dans toutes les longueurs d'ondes. En télédétection hyperspectrale, la MNF et l'ACP sont couramment utilisées dans le cas d'un rapport signal / bruit faible.

L'inconvénient de ces techniques est qu'elles reposent sur une statistique spatiale de toute l'image. L'unicité de l'information portée par un pixel indépendamment de ses voisins, ou limité aux seuls plus proches voisins, est perdue. C'est cette information spatiale et la redondance du signal entre pixels voisins de même nature qui favorise justement l'efficacité de ces corrections. Dans le cas d'images aéroportées, la complexité de la géométrie des acquisitions conduit systématiquement les premières composantes des ACP et MNF à porter une information non négligeable sur la géométrie d'acquisition des images. Le filtrage classique par réduction du nombre de composantes avant inversion des ACP et MNF ne peut donc pas être utilisé. C'est la principale raison qui explique le non recours à ces techniques dans ce travail.

II.2.2. Correction atmosphérique des images hyperspectrales

La moitié de la région spectrale VIS-IR (400-2500 nm) est affectée par l'absorption des gaz atmosphériques. De plus, la région inférieure à 1000 nm est affectée par la diffusion

moléculaire et les aérosols. Le trajet parcouru par le rayonnement entre le capteur aéroporté et la cible au sol est influencé par l'absorbance et la diffusion atmosphérique.

Parmi environ trente gaz atmosphériques, seulement huit (vapeur d'eau, dioxyde de carbone, monoxyde de carbone, ozone, protoxydes d'azote, dioxyde d'azote, méthane, et oxygène) sont responsables des caractéristiques d'absorption observables sur les spectres obtenus par capteur hyperspectral entre 400 et 2500 nm. La vapeur d'eau est le composé le plus absorbant de l'atmosphère dans ce domaine. Les principales bandes d'absorption de la vapeur d'eau atmosphérique sont centrées approximativement à 940, 1100, 1380 et 1880 nm. Celles de l'oxygène et du dioxyde de carbone sont localisées respectivement autour de 760 nm et de 2080 nm.

Les molécules des gaz atmosphériques, la vapeur d'eau et les aérosols peuvent aussi diffuser le rayonnement solaire. La zone des longueurs d'onde courtes entre 400 et 700 nm est fortement affectée par la diffusion moléculaire (diffusion de Rayleigh). Son effet décroît rapidement pour les grandes longueurs d'ondes (avec une proportion de l'ordre de λ^{-4}). L'effet de diffusion des aérosols décroît également pour les grandes longueurs d'ondes mais moins rapidement (la proportion de l'ordre λ^{-2} à λ^{-1}).

Ces effets atmosphériques doivent être retirés des spectres de l'image afin de pouvoir en extraire les informations propres à la cible et indépendantes de l'atmosphère.

II.2.2.1. Les méthodes de correction atmosphérique :

Il existe plusieurs méthodes permettant de prendre en compte l'influence de l'atmosphère sur la radiance mesurée au niveau du capteur. Parmi toutes ces méthodes, les modèles de transfert radiatif sont les plus performantes, mais les données d'entrées nécessaires ne sont pas toujours faciles à obtenir. D'autres méthodes, comme les méthodes « Empirical Line », sont basées sur la relation empirique entre les spectres de radiance au niveau du capteur et les spectres de réflectance vraie.

Nous présentons ici un résumé des algorithmes de corrections atmosphériques développées pendant ces deux dernières décennies (d'après Gao et al. (2009)) :

- Méthodes empiriques :

La démarche « Empirical Line » (Conel et al. 1987; Ferrier 1995; Smith et Milton 1999) exige des mesures de terrain de réflectance d'au moins deux cibles de réponse spectrale différente. La régression linéaire entre les données d'imagerie de ces cibles et celles mesurées sur le terrain, permet de calculer le « gain » et « l'offset » de la droite de correspondance entre compte numérique ou radiance (selon le capteur) et réflectance. Ces paramètres sont ensuite appliqués sur tous les pixels de l'image afin de déterminer la réflectance de chaque pixel. Ces méthodes donnent des spectres de réflectance comparables avec ceux mesurés sur le terrain ou au laboratoire. Il est intéressant de noter que dans le cas des méthodes empiriques, il n'est pas nécessaire d'effectuer d'étalonnage radiométrique absolu des données hyperspectrales pour estimer la réflectance relative de surface. Le système imageur doit dans tous les cas rester stable pendant l'acquisition des données. Dans la pratique des problèmes de non linéarité des capteurs en limite de sensibilité (à faible et forte intensité) ne permettent pas d'utiliser directement ces corrections. Elles sont cependant utiles pour réaliser des ajustements résiduels.

- Modélisation du transfert radiatif :

Les spectres de réflectance de la surface peuvent être estimés à partir des données d'imagerie hyperspectrale à l'aide un modèle de transfert radiatif de l'atmosphère. La première génération de ce type de modèles date de 1980. La sortie de ces modèles est une « réflectance calée de la surface » en supposant les surfaces horizontales et « lambertiennes ».

La radiance mesurée avec un spectro-imageur en satellite comprend le trajet atmosphérique du rayonnement (lié à la diffusion de Rayleigh et aux aérosols) et la radiance réfléchi de la surface. Les spectres de transmittance des gaz atmosphériques H₂O, CO₂, O₃, N₂O, CO et O₂ sont simulés en se basant sur la valeur calculée dans la zone 400-2500 nm pour la vapeur d'eau et la position du soleil par rapport à la géométrie de l'acquisition. L'effet de diffusion des molécules d'atmosphère et des aérosols est calculé en utilisant les codes 5S¹². Les valeurs de radiance sont divisées par l'irradiance solaire au-dessus de l'atmosphère afin d'obtenir la réflectance apparente. Les spectres de réflectance à la surface sont calculés à partir des réflectances apparentes en utilisant les données de transmittance des gaz atmosphériques et de la diffusion des molécules et des aérosols. Pour le calcul de la

¹² Simulation du Signal Satellitaire dans le Spectre Solaire

réflectance à la surface la connaissance de la géométrie de la surface étudiée comme sa pente et son orientation est nécessaire.

Actuellement, il existe plusieurs codes de transfert radiatif pour corriger l'effet de l'atmosphère sur les images hyperspectrales : ACORN (the Atmospheric CORrection Now, ACORN 2001), FLAASH (the Fast Line-of-sight Atmospheric Analysis of Spectral Hypercubes, par Adler-Golden et al. (1998)) HATCH (the High-accuracy Atmospheric Correction for Hyperspectral data, par Qu et al. (2000)) et une série de codes ATCOR (Atmospheric and Topographic CORrection, par Richter (1996)). Quelques uns de ces codes offrent des options plus avancées comme le lissage spectral, la correction topographique et la correction de l'effet des pixels adjacents (adjacency effect). Ces modèles sont tous désignés pour l'application à la télédétection des surfaces continentales qui ont des caractéristiques tout à fait différentes de celles de l'océan.

La surface de l'océan est beaucoup plus sombre par rapport à la surface des continents et l'effet de la réflexion directionnelle est beaucoup plus prononcé. Une modélisation précise prenant en compte la réflectance spéculaire de la surface de l'eau est donc nécessaire. Parmi les modèles de transfert radiatif en télédétection hyperspectrale de la couleur d'eau, nous pouvons parler de l'algorithme TAAFKA (Gao et al. 2000). Cet algorithme utilise des bibliothèques de référence, générées avec des codes de transfert radiatif et une classification basée sur la distance spectrale. Les canaux de longueur d'onde supérieure à 860 nm, zone dans laquelle la réflectance de l'eau est presque nulle, ont été utilisés pour extraire des informations sur les aérosols. Les résultats ont été obtenus en appliquant cet algorithme sur des données hyperspectrales AVIRIS (aéroportées) et Hyperion (satellites).

- Démarches Hybrides

Des auteurs (Boardman 1998; Goetz et al. 1997; Goetz et al. 1998) ont utilisés une combinaison des modèles de transfert radiatif et des méthodes empiriques pour extraire la réflectance de surface à partir des images hyperspectrales. Par exemple, Clark et al. (2002) ont combiné la méthode ATREM (Gao et al. 1993) avec des mesures spectrales sur le terrain, sur un site d'étalonnage terrestre. Le modèle ATREM permet d'améliorer les corrections atmosphériques en hauteur, lorsqu'il y a des différences par rapport aux sites d'étalonnage. Ensuite, l'étalonnage final permet d'enlever les résidus associés habituellement aux modèles de transfert radiatif.

En plus des méthodes citées précédemment, il existe d'autres types de corrections atmosphériques simples pour les cas particuliers. Elles sont en fait plus proches des méthodes de type « Empirical Line » que des méthodes de corrections atmosphériques. Si sur l'image il existe une zone dont la réflectance est invariable pour différentes longueur d'ondes, comme une plage ou un grand parking, cette zone peut être utilisée pour corriger la totalité de l'image : les pixels de l'image vont être divisés par le spectre moyen d'une telle zone.

Eventuellement, cette méthode n'est pas du tout adaptée pour extraire des données quantitatives ; les spectres d'image ne sont pas comparables avec ceux du laboratoire. Cette méthode ne nécessite pas de mesure spectral *in-situ* durant le vol (Kruse 1988; Roberts et al. 1986). Cette correction est intéressante si un traitement rapide est nécessaire pour les études qualitatives ou, juste une comparaison entre les spectres de l'image pour un traitement visuel. Ce type de correction n'a pas d'utilité dans le cas de notre étude qui nécessite des données très précises pour le but de quantification de la biomasse.

II.3. Images traitées

Parmi toutes les images dont nous disposons, nous avons choisi les images ROSIS car elles possèdent la meilleure résolution spatiale et spectrale. De plus, une nouvelle campagne aéroportée (HySpex) a été effectuée en septembre 2009, et ces images ont aussi été traitées et utilisées dans ce travail. Dans la suite de ce chapitre, nous détaillons les propriétés de ces images.

II.3.1. Campagne d'acquisition des images ROSIS

Durant la mission aéroportée HySens effectuée en août 2002, l'acquisition des images hyperspectrales ROSIS de la Baie de Bourgneuf a été effectuée par le DLR. Le spectro-imageur ROSIS est constitué d'un module à barrette hyperspectrale (push-broom), permettant l'acquisition ligne par ligne de la scène. Les lignes de l'image sont acquises par déplacement de la plate-forme. ROSIS couvre 115 canaux, du visible jusqu'au proche infrarouge, dans l'intervalle de 430-860 nm. Les paramètres du vol ont été fixés de manière à avoir une résolution spatiale de 2m. La Figure II.1 illustre le fonctionnement interne de la caméra. Des

conditions atmosphériques convenables, une visibilité importante et une faible humidité, ont permis une bonne qualité des images. La Figure II.2-a présente la mosaïque de 3 images ROSIS sur la quelle nous pouvons distinguer les différents matériaux (Figure II.2-b). Les caractéristiques générales des images ROSIS et les conditions du vol sont reportées en Figure II.2-c. Les calibrations radiométriques et géométriques des images ont été conduites par le DLR à partir des mesures au sol effectuées le jour et à l'heure de survol (Combe et al. 2005).

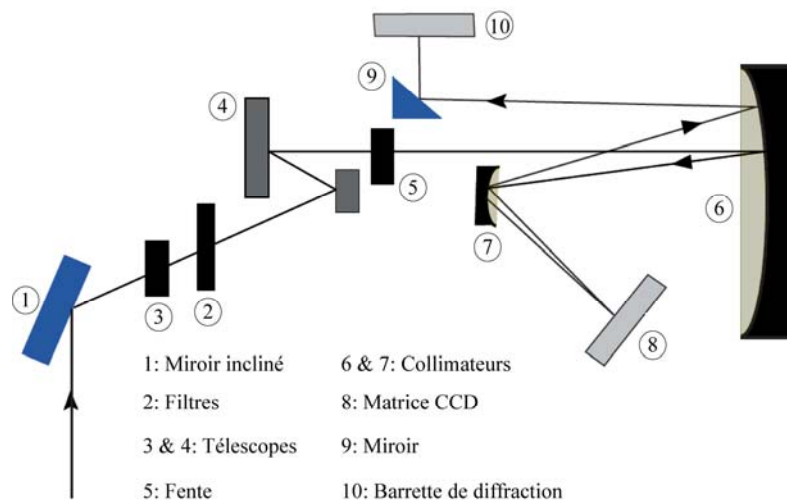


Figure II.1 : Schéma du fonctionnement interne de la caméra ROSIS.

II.3.2. Campagne HySpex

Le LPGNantes a bénéficié du CPER des Pays de la Loire 2007-2013 pour s'équiper de caméras hyperspectrales HySpex dans le cadre du programme « génie civil environnemental et développement durable de la ville » comportant un volet d'application aux environnements côtiers. La Région des Pays de la Loire a ensuite contribué par le programme GERRICO¹³, commun entre Université de Nantes et l'Ifremer, au financement de la campagne aéroportée.

La société ActiMar met en œuvre les caméras HySpex du LPGNantes dans le cadre d'une convention de partenariat avec l'OSUNA¹⁴. Elle a ainsi été en charge de la mise en place de la campagne aéroportée HySpex de l'OSUNA des 21 et 22 septembre 2009 sur les zones de « Bernerie » et « Noirmoutier ». Seules les images de 21 septembre de la « Bernerie » ont été utilisées dans ce travail de thèse.

¹³ Gestion globale des ressources marines et des risques dans les espaces côtiers.

¹⁴ Observatoire des Sciences de l'Univers Nantes Atlantique.

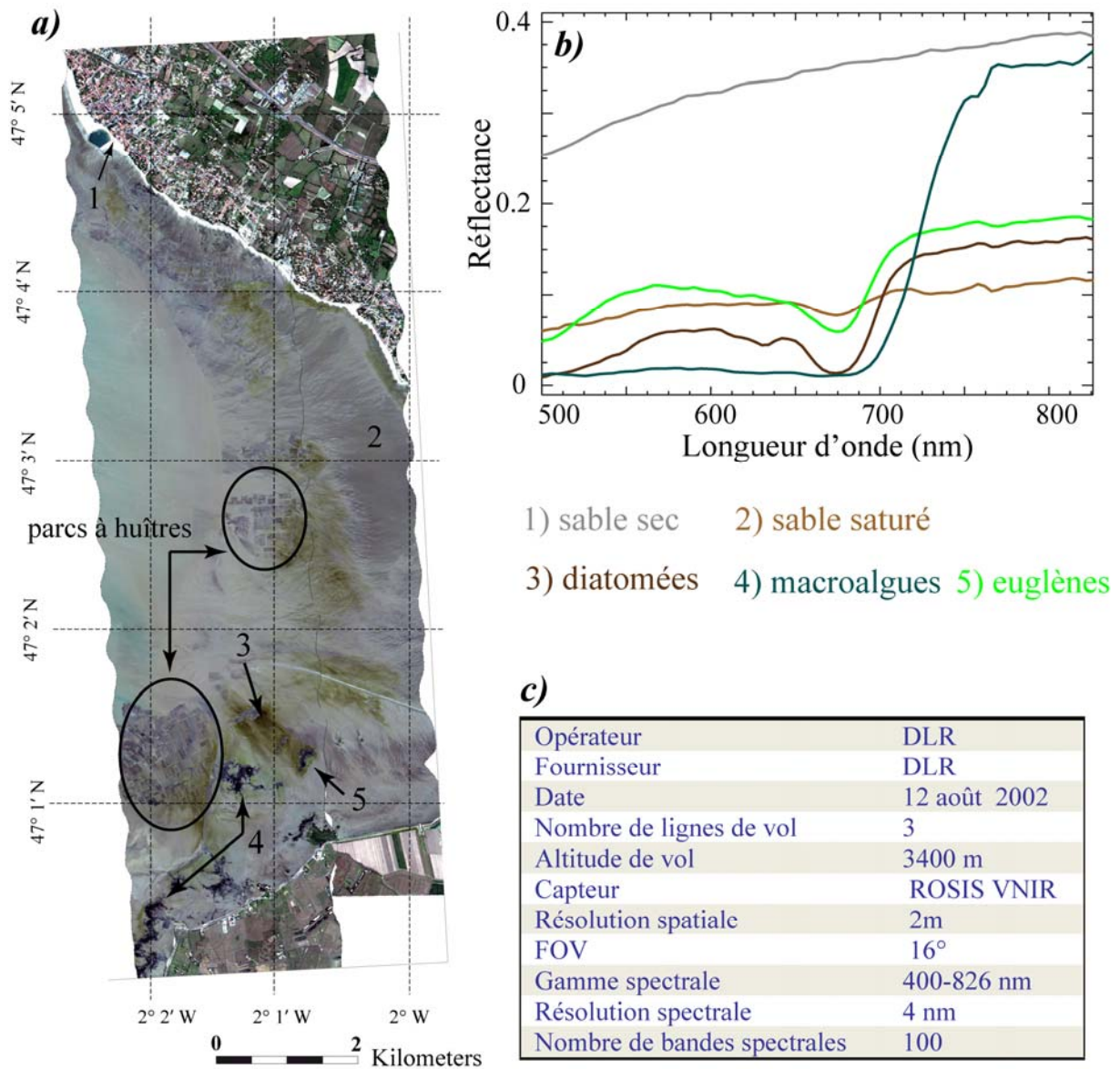


Figure II.2 : (a) mosaïque de 3 lignes de vol ROSIS. La composition colorée est B : 498 nm, V : 550 nm et R : 638 nm, (b) spectres des matériaux les plus présents sur la zone intertidale. (c) quelques caractéristiques de la campagne ROSIS.

II.3.2.1. Caméra HySpex

La Figure II.3 présente brièvement le fonctionnement interne de cette caméra. La lumière reçue est focalisée par un miroir focalisant, puis passe à travers une fente. Un miroir collimateur envoie la lumière en parallèle vers un élément dispersif (une grille de diffraction par réseau de transmission) qui sépare les différentes longueurs d'ondes. Ensuite, la lumière est à nouveau focalisée vers un détecteur à barrettes. Le rôle du système optique est de produire un spectre isolé pour chaque pixel d'une ligne définie par la fente, et de le projeter

sur une colonne du détecteur matriciel. Les données sont enregistrées au niveau de la matrice de détecteurs en une ligne de l'image hyperspectrale dont les informations spectrales sont projetées sur une colonne. Puisqu'à chaque acquisition une seule ligne étroite est enregistrée, il est nécessaire d'effectuer un balayage (push broom scanning) afin d'obtenir une image 2D de la scène et une image cubique hyperspectrale. Plusieurs méthodes de balayage existent, notamment :

- translation linéaire de la caméra (la caméra est montée sur un plateau mobile),
- rotation de la caméra (système panoramique),
- translation linéaire de la scène (les échantillons sont sur un plateau mobile).

Le choix du mode de fonctionnement est effectué lors de la configuration de l'appareil. L'appareil est assisté par un logiciel d'acquisition fourni avec la caméra. Ce logiciel contrôle les paramètres de translation du plateau et le temps d'intégration pour chaque acquisition. En laboratoire, le plateau mobile avance selon la vitesse d'acquisition choisie dans la configuration du logiciel de façon à obtenir des pixels carrés. Chaque image VNIR et SWIR, dont les gammes spectrales sont reportées dans le Tableau II.1, a donc une résolution spatiale différente en fonction de la largeur d'acquisition des matrices de détecteurs : 1600 pixels par ligne pour VNIR et 360 pixels par ligne en SWIR (Tableau II.1). En mode aéroporté, la vitesse de déplacement de l'avion étant identique pour les deux caméras, la différence de résolution est uniquement fonction de l'ouverture et de la vitesse de l'avion. On passe généralement de 1m au sol en VNIR à 2m au sol en SWIR. Une visualisation de l'image dans la fenêtre du logiciel est accessible au fur et mesure de l'avancement de l'acquisition. Un panel de contrôle de qualité de l'image est créé à la fin de l'acquisition de chaque image.

L'instrument est étalonné en temps réel à chaque enregistrement afin de fournir une haute qualité radiométrique. L'étalonnage consiste plus particulièrement à enlever le bruit instrumental (par fermeture de l'objectif pour obtenir le noir) et à définir les paramètres d'échantillonnage spectral. Les pixels de l'image sont encodés en niveau de luminosité. Chaque pixel est associé à un compte numérique (CN). Ces images sont ensuite modifiées en considérant les corrections et les étalonnages en temps réel. En mode aéroporté, l'étalonnage de l'appareil se fait avant et après chaque vol, tandis que le bruit de fond (dark current) est enregistré durant le vol. Puis, les images de radiance [$W \cdot nm^{-1} \cdot m^{-2} \cdot sr^{-1}$] sont obtenues à l'aide d'un des outils du logiciel qui utilise les bases de données propres de la caméra (fichiers de calibration en usine). Le Tableau II.1 présente les caractéristiques de la caméra HySpex.

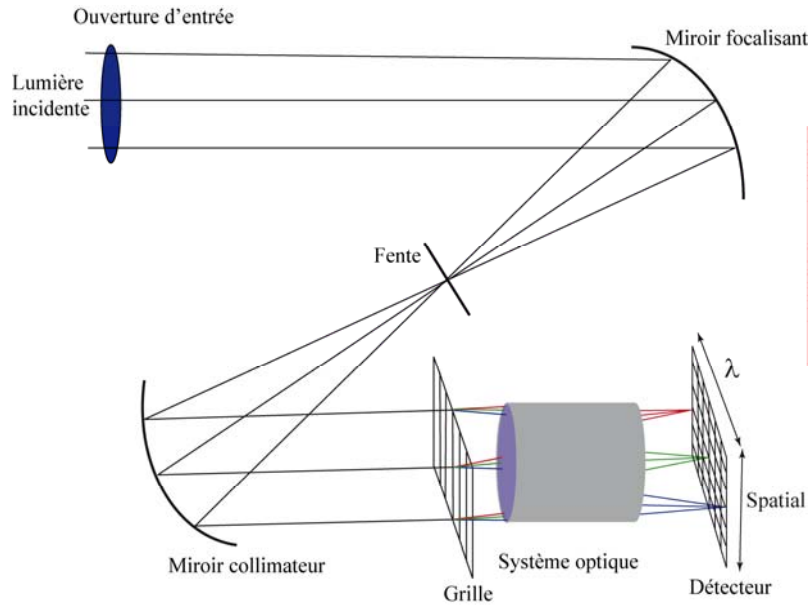


Figure II.3 : Représentation schématique du fonctionnement interne de la caméra HySpex.

Tableau II.1 : Caractéristiques spécifiques des caméras HySpex.

	VNIR-1600	SWIR-320i	SWIR-320m
Détecteur	Si CCD 1600*1200	InGaAs 320*256	HgCdTe 320*256
Intervalle spectral	400-1000 nm	900-1700 nm	1300-2500 nm
Nombre de pixels	1600	320	320
FOV (across/ along)	17°/ 34°	14°/ 28°	14°/ 28°
IFOV across/ along	0.18 / 0.36 mrad	0.75/ 0.75 mrad	0.75 / 0.75 mrad
Échantillonnage	3.7 nm	5 nm	5nm
Résolution spectrale	4.5 nm		
Nombre de bandes	160/160	147/160	256
Terrain/ laboratoire			

II.3.2.2. Caractéristiques du vol

Le Tableau II.2 présente les configurations spécifiques employées durant la campagne HySpex. Les dates et l'heure ont été choisies auparavant en fonction du coefficient de la marée (supérieur à 90). Le plan du vol et la campagne de terrain effectuée parallèlement au survol ont été préparés simultanément afin de pouvoir suivre les lignes du vol dans le temps pour les relevées de terrain. Les détails du vol sont listés dans le Tableau II.2.

Tableau II.2 : Caractéristiques de la campagne HySpex effectuée par ActiMar le 21 septembre 2009.

	Propriété	Information
Générale	Organisation	OSU Nantes Atlantique
	Fournisseur	SAS ActiMar
	Date	21 Septembre 2009
	Coefficient de marée	104/99
	L'heure locale de basse mer	13h30
	Hauteur d'eau	0.6 m
Paramètres d'acquisition	Nombre de lignes de vol	22
	Longueur	190 Km
	Largeur moyenne	780m
	Superficie	148 Km ²
	Superficie utile	90 Km ²
	Altitude de vol	8500 pieds
	Capteur (LPGNantes)	HySpex VNIR/ SWIR
	Pixels par image	1600/ 320
	Résolution spatiale	1 m/ 2m
	FOV	17°/ 14°
	Gamme spectrale	400-900nm/ 900-1700 nm
	Résolution spectrale	4.5 nm/ 6 nm
	Échantillonnage spectrale	3.7 nm/ 5 nm
	Nombre de bandes spectrales	160/ 147
Dynamique	12 bitb	

Les acquisitions ont été effectuées de façon à minimiser la couverture nuageuse et la hauteur d'eau dans les zones imagées. Normalement, les lignes de l'image suivent la descente de la mer lors de la marée de manière à acquérir la dernière ligne au moment de la marée basse. Cet ordre peut toutefois être inversé si les conditions atmosphériques contraignent le vol à être effectué dans l'autre sens : la première ligne commence alors à marée basse et le plan du vol suit la remontée de l'eau. C'est ce qui s'est passé dans le cas de la campagne de 21 septembre. Entre deux images consécutives il y a 8 minutes de décalage, ce qui n'est pas négligeable par rapport la vitesse de descente ou de remontée de l'eau. Ce décalage dans le temps se voit clairement sur les zones communes de deux bandes voisines : le niveau de l'eau n'est pas identique en un même lieu entre deux images. Ce point doit être pris en compte au moment d'effectuer la mosaïque des images afin de garder le maximum de zones dégagées et recouvertes par les biofilms qui tend à disparaître de la surface, avant l'arrivée de l'eau montante. En effet, la marée a un rôle très important pour l'acquisition des images d'une zone intertidale. Les « quick looks » des images HySpex du 21 et 22 septembre 2009 sont illustrés en Figure II.4. L'heure de la marée basse et le coefficient de marée pour chaque jour sont marqués. Les deux images sont illustrées par une composition colorée identique. Les

variations des couleurs sont liées aux changements des conditions climatiques et d'éclairement entre les deux jours ainsi qu'entre les différentes lignes d'image du même jour. Les zones émergées et couvertes par le microphytobenthos sont plus abondantes sur l'image du 21 par rapport à celle du 22 en raison du coefficient de marée différent. Nous pouvons cependant remarquer dans les zones comparables, là où la migration a été complète sur les deux jours, que le microphytobenthos migre exactement en même endroit d'un jour à l'autre.

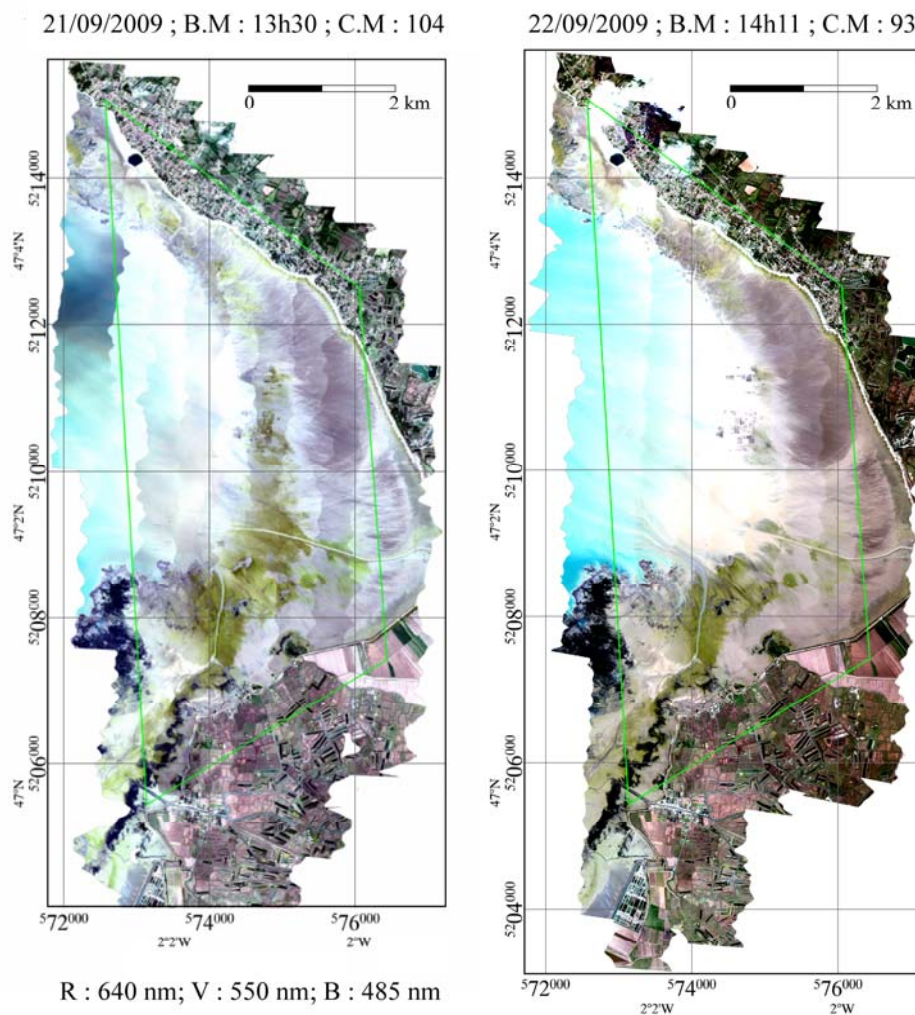


Figure II.4 : « Quick look » des images HySpex du 21 et 22 septembre 2009. Les informations concernant chaque date sont marquées au dessus des images. La variation du niveau de l'eau et l'apparition des biofilms est clairement visible sur les deux images.

La décision finale d'effectuer le vol a été prise la veille du jour prévu par l'équipe d'acquisition en fonction des conditions de météorologiques, l'idéal étant d'avoir un ciel complètement dégagé et, si possible, une absence de vent fort. La zone définie au niveau de la

Bernerie a été couverte en totalité deux fois soit 20 lignes de vol (Figure II.5-a). Les données ont été acquises dans la gamme VIS-NIR avec une résolution spatiale de 1 mètre et comprennent 160 bandes spectrales dont la résolution FWHM est égale à 4.5 nm. La surface acquise est de 395 km², dont 235 km² qualifiée d'utile du fait du recouvrement entre lignes adjacentes. Le temps d'intégration du capteur a été ajusté durant le vol grâce au survol préliminaire de la zone. Seule l'image VIS-NIR est utilisée dans ce travail. La Figure II.5-b illustre la mosaïque de 10 lignes des images HySpex, après corrections atmosphériques. Des exemples de spectres obtenus à l'issue des corrections sont illustrés en Figure II.5-c.

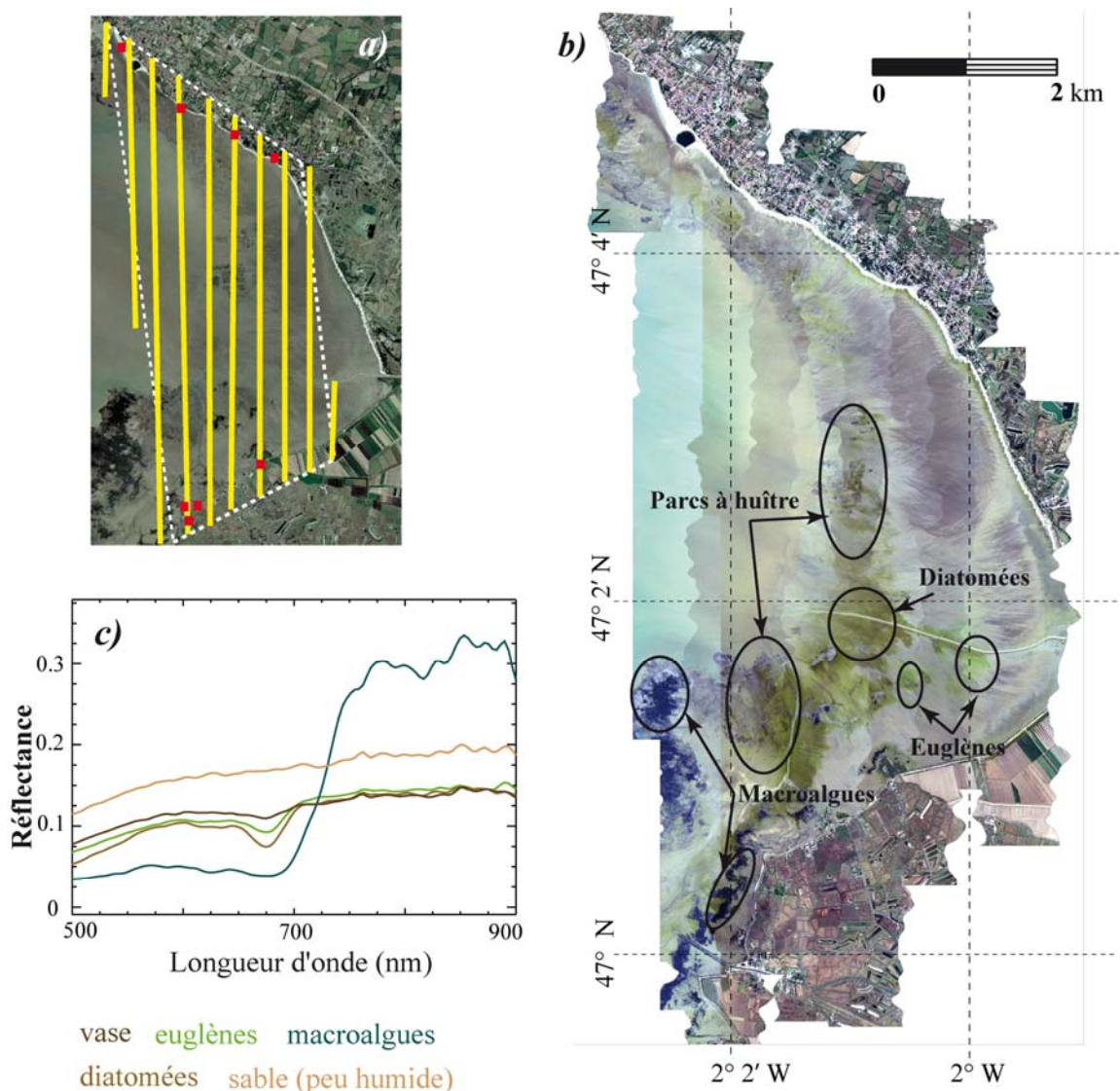


Figure II.5 : (a) plan du vol HySpex sur Bernerie (encadré en pointillé blanc) et lignes du vol du 21 septembre (en jaune). Les carrés rouges montrent l'emplacement des sites de mesures de calibration. (b) mosaïque de 10 bandes HySpex couvrant la totalité de la zone intertidale. La composition colorée est B : 452 nm, V : 558 nm et R : 609 nm. Les matériaux reconnaissables à l'œil nu sont encadrés dont les zones couvertes par le biofilms de diatomées et d'euglènes, les macroalgues et les parcs à huîtres. (c) spectres issus des pixels de différents types de matériaux, après corrections.

II.3.2.3. Traitement des images HySpex

Les images fournies en luminance ($W.m^{-2}.nm^{-1}.sr^{-1}$) ont été corrigées géométriquement et géoréférencées dans le système UTM 30N par ActiMar à partir des données de central inertielle et GPS acquise de façon synchronisée avec la numérisation des pixels des images. Nous réalisons au laboratoire LPG la fin de la chaîne de traitement correspondant aux corrections atmosphériques, aux calibrations et à la réalisation de mosaïques d'images de réflectance.

II.3.2.3.1. Correction atmosphérique des images HySpex par FLAASH

FLAASH est l'outil de correction atmosphérique qui corrige les longueurs d'ondes en visible jusqu'au NIR et SWIR. Contrairement aux autres programmes de correction atmosphérique qui utilisent une base de données pré-calculée pour l'interpolation des propriétés de transfert du rayonnement, FLAASH est basé sur les codes de transfert radiatif MODTRAN (Berk et al. 1999; Vermote et al. 1997). Il a les caractéristiques suivantes :

- correction de l'effet adjacent (adjacency effect : mélange des pixels à cause de la déviation du rayonnement à la suite de sa rencontre avec les molécules de l'atmosphère ou les aérosols), mais limité à un petit voisinage contrairement à une ACP ou MNF
- option de calcul de visibilité moyenne de scène
- carte des cirrus et des nuages opaques
- lissage spectral

FLAASH supporte également certains capteurs multi- et hyper-spectraux (AVIRIS, HYDICE, HYMAP, CASI, HYPERION et AISA). Les paramètres d'entrées sont les suivantes (Figure II.6) :

- image en radiance en format BIL (la taille doit être inférieure de 2GB) ;
- facteur d'échelle paramétré pendant le vol et inscrit dans le fichier d'entête des images HySpex
- coordonnées géographiques du centre de l'image ;
- date et heure (en temps universel) d'acquisition de l'image ;
- modèle d'aérosol (selon la visibilité) et de l'atmosphère (type de zone) ;

- lorsque le capteur n'est pas reconnu par FLAASH, ce qui est le cas des nouvelles caméras HySpex, des informations complémentaires concernant le capteur sont nécessaires. Le numéro de bande d'absorption de l'oxygène permet de re-calibrer des longueurs d'onde pour optimiser la correction atmosphérique. Cette correction est de l'ordre d'une fraction du pas d'échantillonnage du spectre, environ 2 nm.

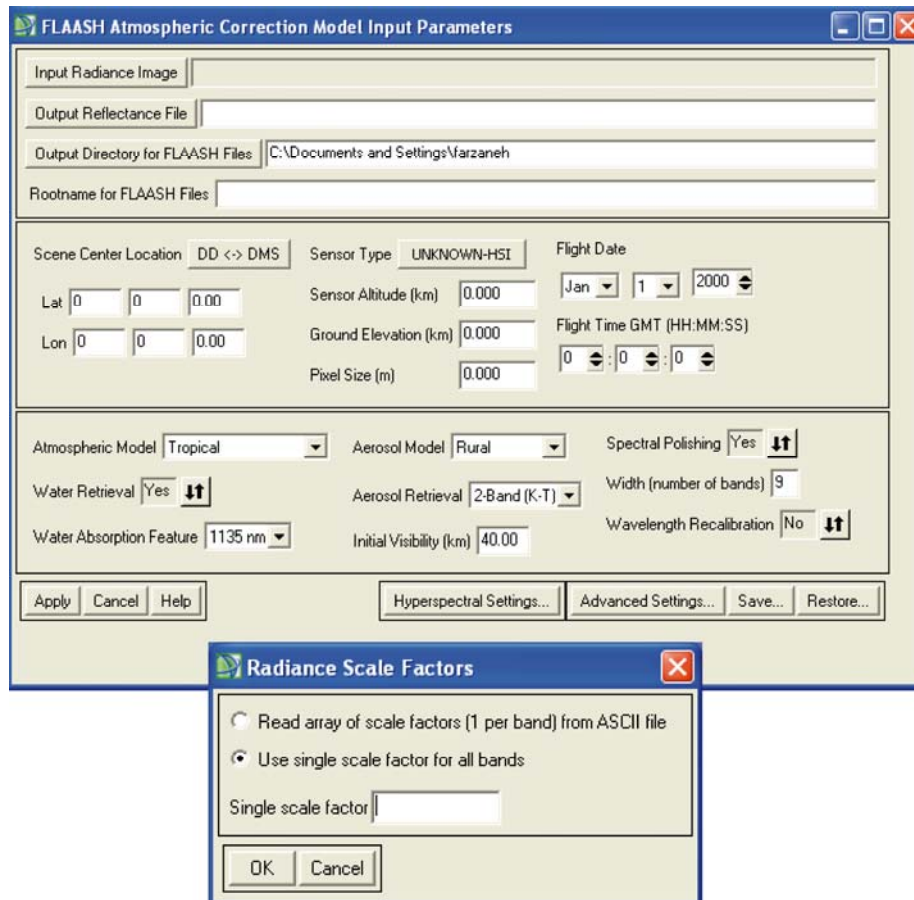


Figure II.6 : Interface de l'outil FLAASH du logiciel ENVI.

II.3.2.3.2. Étalonnage des données

Bien que le logiciel de correction atmosphérique (FLAASH) produise les images en réflectance, il arrive que les spectres de réflectance acquis à distance ne soient pas directement comparables aux mesures prises au sol en raison d'un déficit d'évaluation des effets environnementaux mais aussi en raison du changement d'échelle. Dans ce cas, un étalonnage

supplémentaire peut être appliqué de manière empirique. Les mesures spectrales de différentes cibles ont été mesurées durant le vol à l'aide d'un spectromètre de terrain.

Spectroradiomètre ASD FieldSpec3 FR[®]

Le Laboratoire de Planétologie et de Géodynamique de Nantes dispose d'une série de spectromètres qui permettent d'examiner des échantillons prélevés sur le terrain, soit directement sur le terrain, soit dans un environnement contrôlé en laboratoire. Dans ce travail, nous avons utilisé un spectromètre ASD pour les mesures spectrales au laboratoire et sur le terrain.

Le spectroradiomètre ASD FieldSpec3 FR[®] mesure la luminance sur 2150 canaux dans le domaine spectral 350-2500 nm (Tableau II.3). Cet appareil peut être utilisé au laboratoire aussi bien que sur le terrain. Il utilise une fibre optique pour récupérer le signal réfléchi par la surface. La fibre optique, dont le champ de vision (FOV) est de 25°, est montée sur un système optique spécialisé permettant le montage de différents accessoires dotés de champs de visions variables (1° et 8°). Elle peut aussi être montée sur une sonde de contact équipée d'une demi-sphère et d'une source propre de lumière. La surface analysée est alors donnée par celle de l'ouverture de la sonde. La demi-sphère intégrante permet de recevoir la lumière réfléchie de façon homogène et non-polarisée.

Quelque soit le dispositif utilisé, le rayonnement électromagnétique est récupéré à l'aide d'un faisceau de fibres spécifique à chacun des trois détecteurs (MacArthur et al. 2006). Comme nous pouvons voir dans le Tableau II.3 présentant les caractéristiques de l'appareil par intervalle de longueur d'onde, la lumière est collectée par différents types de détecteurs.

Tableau II.3 : Caractéristiques du spectroradiomètre ASD.

Région spectrale	350-2500 nm
Résolution spectrale moyenne	3nm pour UV-VNIR et 10nm pour SWIR
Intervalle d'échantillonnage	1.4 nm jusqu'à 1000nm et 2 nm pour le reste
Temps de balayage	100 ms
Détecteurs	1 photodiode Si de 512 éléments en 350-1000nm 2 photodiodes InGaAs séparés en 1000-2500nm
Optique	Fibre optique de 1.5 m
FOV	25° (1°, 8° et 18° aussi accessibles)
Échantillonnage	1 nm

L'acquisition des spectres en réflectance, sur le terrain ainsi qu'au laboratoire, se fait en deux étapes. La première étape consiste à effectuer la mesure du rayonnement électromagnétique d'un panneau de référence, le Spectralon®. Le spectralon (Labsphere, Inc., North Sutton, NH) est constitué d'une surface polymérique blanche en halon, parfaitement lisse, qui se comporte comme un diffuseur parfait. Théoriquement, le spectralon ne présente aucune absorption dans la gamme de mesures considérée et réfléchit le rayonnement dans toutes les directions (99% du flux entre 350-1500 nm ; 95% du flux réfléchi entre 1500-2500 nm). La seconde étape consiste à mesurer l'intensité de la lumière réfléchie par la cible. Les spectres obtenus pour ces deux surfaces correspondent à des mesures en luminance ($\mu\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}\cdot\text{sr}^{-1}$), c'est à dire qu'ils contiennent tous les effets environnementaux, même si les mesures sont effectuées au laboratoire. Ces effets n'existent pas lors de l'utilisation de la sonde de contact mais en revanche la position de la sonde doit être rigoureusement en contact pour que les conditions géométriques de mesures soient respectées. Un écart de 1 mm suffit à modifier l'intensité du signal de réflexion. Au contraire de son utilisation au laboratoire, dans sa configuration terrain le spectromètre ASD utilise le soleil comme source d'éclairage.

Pour avoir des mesures homogènes et comparables des cibles sur le terrain, le pistolet contenant la fibre optique est monté sur un trépied dont la hauteur reste fixe pendant toute la campagne de terrain. On fixe des conditions stables sur le terrain : les mesures à 1m du sol avec l'optique à 8° et une série de 10 acquisitions pour chaque échantillon à la suite d'une mesure de référence (spectralon). L'ensemble des mesures effectuées sur un même échantillon est ensuite moyenné pour obtenir le spectre de réflectance de la cible. La réflectance de la cible est calculée en divisant le spectre de la cible par celui du spectralon.

De plus, lorsque les différents détecteurs dans les domaines VIS (350-1000nm), NIR (1000-1800 nm) et SWIR (1800-2500 nm) n'observent pas rigoureusement la même surface, des sauts apparaissent sur le spectre à 1000 nm et 1800 nm (Figure II.7). Afin de s'affranchir de ce type d'artefacts lié à la conception de l'instrument et d'obtenir ainsi un spectre continu, une régression linéaire est appliquée sur les 20 canaux qui se situent de chaque côté de ces deux décalages. Ceci permet d'ajuster sur le niveau de réflectance en visible, c'est-à-dire celui du détecteur Si. Le même type de correction est aujourd'hui fourni par le fabricant de ce spectromètre pour des « raisons cosmétiques ». C'est en fait un vrai problème de conception qui peut être minimisé en s'assurant que la scène est parfaitement homogène. Ce qui a fait sur la vase comme sur le sable. De microrugosités locales de surface pouvant malgré toutes les

précautions prises faire varier l'intensité de la réflexion, cette même variation, assurément produite par une même composition, peut être corrigée par la méthode proposée.

La Figure II.8-a illustre le spectre d'une cible (le sable de plage) et celui du spectrlon®, mesurés sur le terrain. Le spectre de réflectance obtenu est propre dans le domaine visible où les effets atmosphériques sont complètement supprimés. La Figure II.8-b présente les spectres de réflectance des matériaux présents sur les vasières de la baie de Bourgneuf mesurés par le spectromètre ASD.

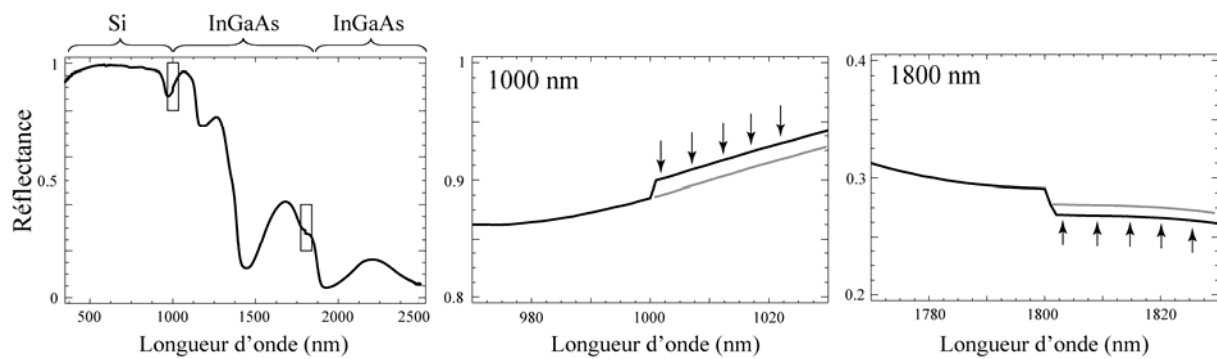


Figure II.7 : Exemples de décalages spectraux liés aux différents détecteurs à 1000 et 1800 nm. Les corrections ont été effectuées dans le sens des flèches afin d'obtenir les spectres en gris.

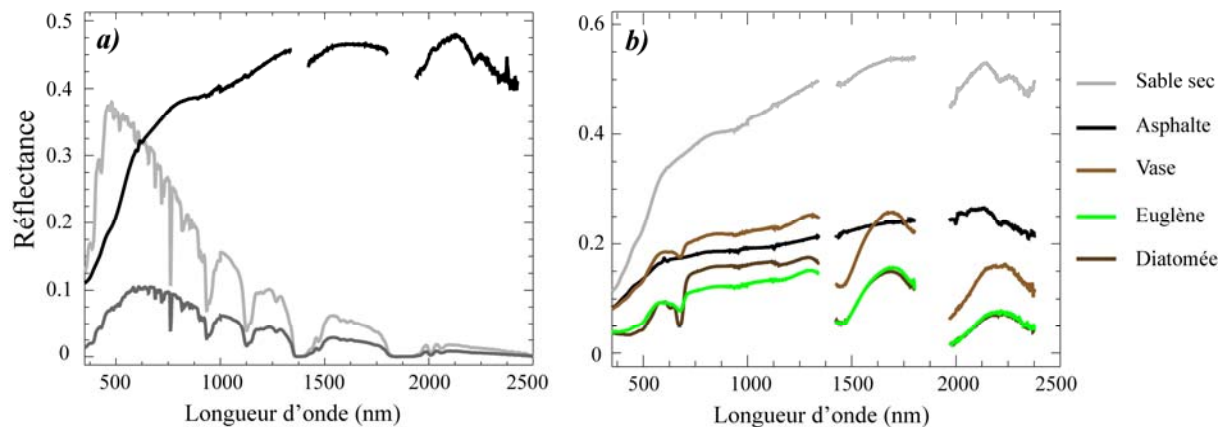


Figure II.8 : (a) spectres de radianse de la référence (en gris clair) et de la cible (en gris foncé) et spectre de réflectance calculé (en noir). (b) exemples des spectres ASD mesurés.

Les surfaces destinées pour l'utilisation dans l'étalonnage des images doivent être homogène sans présenter les bandes d'absorption spécifique dans le domaine VIS-NIR. Pour cela, des cibles sombres et claires ont été choisies : la surface de contrôle sombre correspond à l'asphalte et la surface claire correspond du sable sec de la plage. Toutefois, les images

fournies ont été affectées par une dynamique forcée non favorable ; les valeurs de réflectance supérieur à 0.4 ont été saturées et n'étaient donc pas exploitables. Par conséquent, les cibles claires sur le sable n'ont pas été utilisées dans l'étalonnage final. Finalement, les deux cibles qui ont été utilisées pour l'étalonnage final de l'image corrigée sont deux types d'asphalte (Figure II.9). Sachant que les spectres de réflectance des pixels de microphytobenthos ne contiennent pas de valeurs supérieures à 0.2, ce choix des cibles d'étalonnage est correct et justifiable dans notre cas.

Dans tous les cas, le choix des spectres utilisés pour l'étalonnage est très délicat. Il faut faire attention à bien vérifier l'image en sortie afin de ne pas avoir des valeurs négatives dans les cas de forte absorbance, comme c'est le cas par exemple pour la végétation dans le domaine visible. La Figure II.10 présente les étapes de corrections effectuées sur les spectres de l'image en radiance pour un exemple sur un biofilms de diatomée.

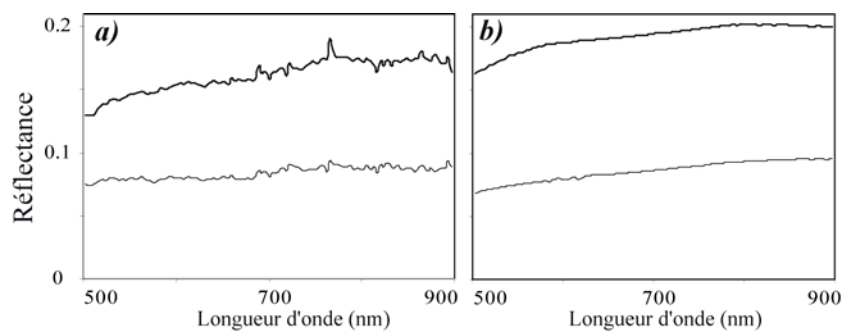


Figure II.9 : Exemples des spectres utilisés pour l'étalonnage des images HySpex. Ils s'agissent de spectres de réflectance de deux types d'asphalte (a) extraits de l'image et (b) mesurés sur le terrain.

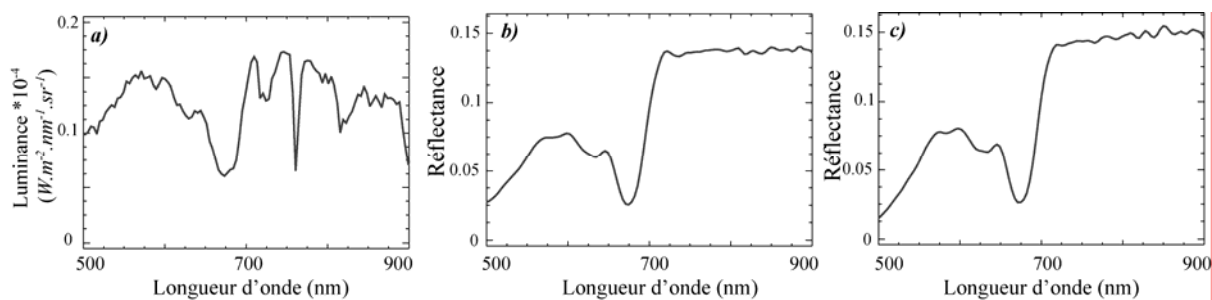


Figure II.10: Étapes de traitement des images de radiance HySpex. (a) spectre en radiance, (b) spectre corrigé en réflectance après les corrections atmosphériques, (c) spectre après ajustement final effectué par la méthode « Empirical Line ». Le spectre final est un peu dégradé vers 900 nm mais bien amélioré entre 500 et 600 nm ce qui est fondamental pour une bonne discrimination entre biofilm à diatomées et biofilm à euglènes.

II.3.2.3.3. Mosaïque des images HySpex

La dernière étape de traitement des images est la réalisation de la mosaïque à partir des 10 lignes d'images géoréférencées. Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, l'ordre de superposition des images dans la mosaïque doit être choisi en fonction du sens d'avancement de la campagne par rapport à la marée. La mosaïque finale doit contenir les images ayant les vasières les plus dégagées.

II.4. Conclusion partielle

Les conditions à réunir pour obtenir des images de vasières sont particulièrement difficiles en comparaison d'autres cas. En effet, les possibilités pour un capteur en orbite d'acquérir les images de la zone intertidale pendant la marée basse, et avec un coefficient de marée élevé, sont réduites. Dans notre cas, il a donc été nécessaire d'organiser de campagnes aéroportées pour un suivi régulier de ces zones.

Les images traitées dans ce travail, ROSIS et HySpex, présentent une haute qualité spectrale et spatiale. Ceci était nécessaire car, si les matériaux assez similaires que sont les euglènes et les diatomées sont reconnaissables visuellement grâce à leur couleur différente (verte et brune), la différenciation de leurs spectres n'est pas si évidente. Cette différence de couleur existe aussi sur les images DAIS ayant une résolution spectrale de 16 nm, toutefois les spectres de diatomées et d'euglènes sur ces images ne sont pas distincts (Figure II.11). Cela est un facteur crucial dans l'identification de ces deux biofilms, fortement lié à la résolution spectrale. Pour les trois images les spectres de diatomées et d'euglènes restent quand même très similaires et la distinction entre ces deux surfaces est très délicate. Cette distinction à partir des images aéroportées n'a jamais été évaluée, à notre connaissance, auparavant. De plus, la faible résolution spectrale déforme la bande d'absorption de la Chl *a* du spectre de réflectance (comparer la bande d'absorption de la Chl *a* de l'image DAIS avec celles des images ROSIS et HySpex) ce qui gêne grandement sa quantification.

Les corrections atmosphériques effectuées sur l'image HySpex par l'outil FLAASH et son étalonnage final utilisant les spectres du terrain ont permis d'obtenir des spectres pouvant être utilisés dans les modèles.

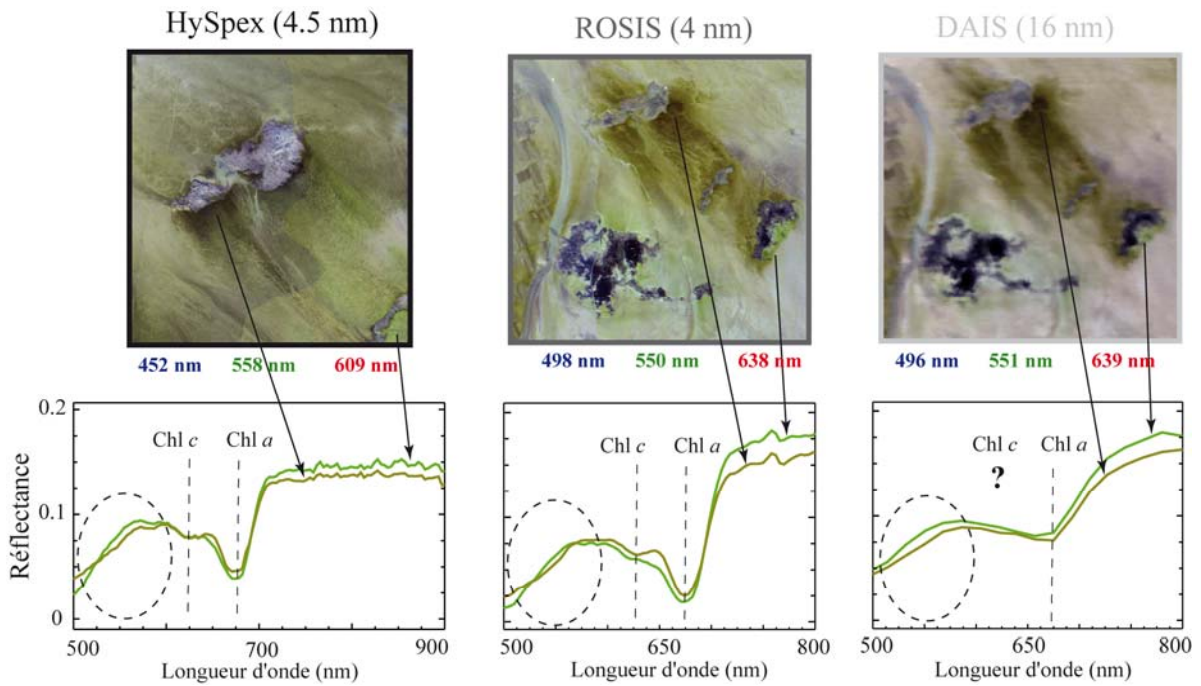


Figure II.11 : Comparaison des spectres de biofilms de diatomées et d'euglènes des images HySpex (résolution spectrale de 4.5 nm), ROSIS (résolution spectrale de 4 nm) et DAIS (résolution spectrale de 16 nm). La différence de couleur entre les biofilms de diatomées et d'euglènes qui existe sur les trois images n'est pas détectable sur les spectres de DAIS à cause de sa faible résolution spectrale interdisant la détection de la Chl c.

CHAPITRE III

MÉTHODES ET DONNÉES EXPERIMENTALES

III.1. Introduction

Afin de modéliser la relation entre la biomasse photosynthétique active et la radiométrie, les données expérimentales sont acquises en radiométrie (physique) et chromatographie (biologie) sur des biofilms microphytobenthiques choisis pour avoir des teneurs pigmentaires différentes et représentatifs des classes dominant le microphytobenthos : les diatomées et les euglènes. Ces différents biofilms sont prélevés sur le terrain ou reconstitués au laboratoire à partir de cultures monospécifiques. Les biofilms d'euglènes de laboratoire, obtenus à partir d'une espèce d'eau douce relativement différentes de celles des vasières, sont présentés afin de tester leur panel pigmentaire et obtenir des paramètres d'identification taxonomique. Ces mesures n'ont pas été utilisées dans la modélisation de la relation entre la biomasse et la radiométrie. Pour cela il faudrait disposer d'espèces marines de cultures comme pour les diatomées. Quelques mesures ont été effectuées sur le terrain et des échantillons ont été prélevés par différentes méthodes pour validation.

Dans ce chapitre nous allons expliquer tout d'abord les méthodes de préparation et de prélèvement des échantillons puis les méthodes de mesures radiométriques et chromatographiques. A la fin, des exemples de différents types de données obtenues sur les échantillons variés seront présentés. Ces données contiennent une large variation de la structure du biofilm, du support, de la biomasse et de la classe des cellules d'algues et donc du panel pigmentaire, afin de trouver le rôle de chacun dans la réponse spectrale.

III.2. Préparation et prélèvement des échantillons

III.2.1. Préparation des échantillons au laboratoire

La compréhension de la structure d'un biofilm et de sa réponse spectrale en proportion de sa biomasse a été acquise au laboratoire à partir d'échantillons préparés en conditions contrôlées. Deux modèles analogiques sont testés afin de choisir le modèle le plus représentatif du biofilm naturel et d'en estimer les propriétés optiques spécifiques : l'un par filtration douce de cellules sur un support translucide afin de reproduire un biofilm dans le

quel les cellules sont en contact étroit, l'autre par la constitution de pastilles d'agarose dans lesquelles les cellules restent en suspension et sans contact entre elles.

La totalité du travail de préparation des échantillons et les mesures chromatographiques a été réalisé au laboratoire Mer, Molécule et Santé de l'université de Nantes, selon les protocoles mis en place par Méléder et al. (2003a). Toutes les mesures radiométriques, par sonde ASD ou caméras HySpex, sont elles réalisées au Laboratoire de Planétologie et Géodynamique de Nantes.

III.2.1.1. Simulation du biofilm par filtration douce

La première étape consiste à reconstituer de façon simplifiée un biofilm en conditions contrôlées au laboratoire. Les biofilms de diatomées et d'euglènes sont simulés par analogie en utilisant des cellules issues des cultures monospécifiques de diatomées et d'euglènes benthiques les plus proches possibles de celles qui sont rencontrées sur le terrain. Les cellules sont déposées artificiellement sur un support en polycarbonate ou en fibre de verre, afin de pouvoir se rapprocher le plus possible d'un biofilm naturel (Méléder 2003; Méléder et al. 2003a).

Plusieurs espèces de la vasière de la Baie de Bourgneuf ont été testées mais seuls les résultats de l'espèce *Entomoneis paludosa*¹⁵ ont été traités pour la modélisation des biofilms de diatomées. La culture mère est utilisée en phase de croissance exponentielle, phase pour laquelle le panel pigmentaire est stable. Afin d'obtenir une variation de biomasse cette culture est diluée avec l'eau de mer. Le volume final de chaque concentration est resté identique pour tous les échantillons d'une série de mesures. Chaque concentration est préparée en 3 exemplaires afin de pouvoir en extraire des informations statistiques. Les cellules sont déposées sur un support par filtration douce (< 1 bar) de la suspension cellulaire afin de ne pas abîmer les cellules par une pression du pompage trop forte, surtout à la fin du dépôt. Deux types de filtres ont été utilisés pour ce travail : des filtres en polycarbonate (diamètre de 47 et 25 mm ; porosité de 0.4 µm) qui ont la propriété de devenir transparent lorsqu'ils sont humides et des filtres en fibre de verre (diamètre de 47 mm ; porosité de 1.2 µm) qui restent opaques. Un filtre humecté par l'eau de mer et sans cellule (× 3) joue le rôle de témoin pour chaque série de mesure. Une représentation schématique de différentes étapes de la

¹⁵ Provenant de « Nature Culture Collection » de l'université de Nantes, ref. : NCC 18.

préparation des biofilms est illustrée en Figure III.1-a. Pendant la préparation, les filtres prêts ont été placés à l'abri de la lumière et de la chaleur afin d'éviter toute dégradation de pigment.

Le choix des concentrations préparées a été fait afin de couvrir une large gamme de variation de biomasse, en commençant par de petites concentrations, à peine visible sur le filtre, pour arriver, par intervalle régulier, à une forte concentration. La concentration maximale à filtrer dépend cependant de la porosité des filtres. En effet, les filtres en fibre de verre ayant une porosité autour de 1 micron limitant le phénomène de colmatage et favorisant le drainage de l'eau lors de la filtration, permettent d'atteindre des concentrations beaucoup plus fortes que celles atteintes sur les filtres en polycarbonate dont la porosité n'est que de 0.4 microns et qui donc colmatent rapidement.

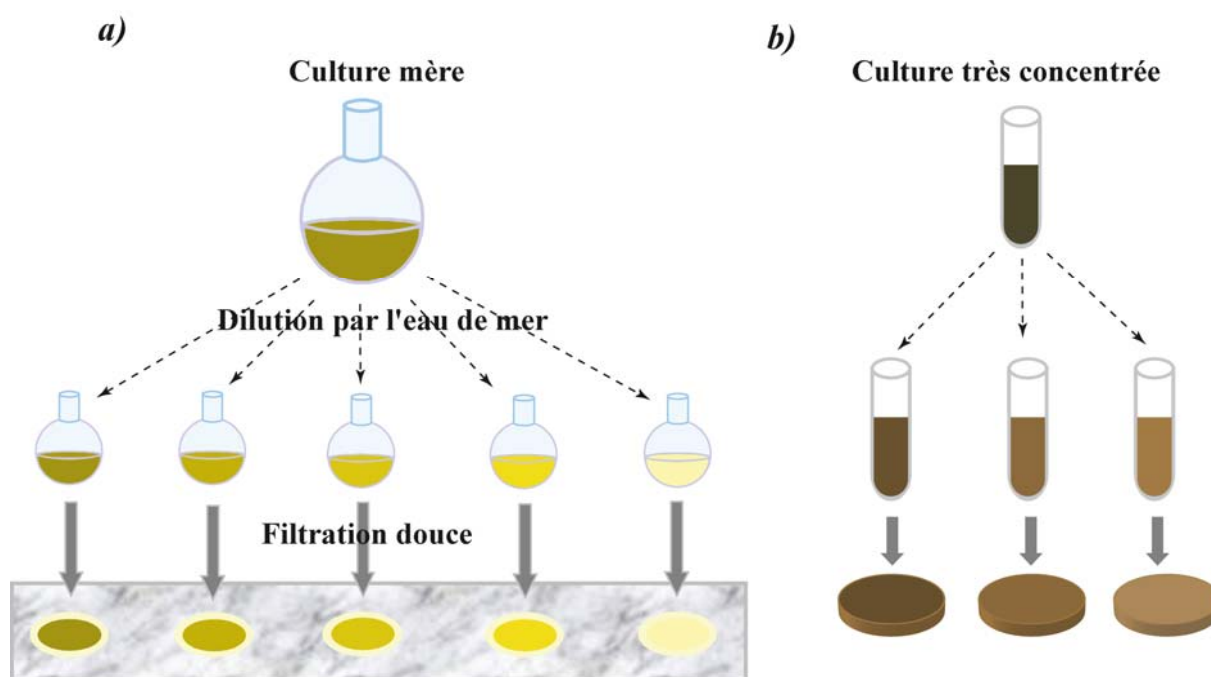


Figure III.1 : Représentation schématique de la préparation des biofilms : (a) à par filtration douce d'une culture monospécifique sur des filtres adaptés, (b) par piégeage de cellules dans un mélange d'agarose.

Les biofilms d'euglènes ont été préparés de la même manière que les biofilms de diatomées. L'espèce utilisée pour la simulation de biofilm d'euglènes, *Euglena gracilis* (Klebs 1883)¹⁶, est une souche issue de l'eau douce, les souches marines d'euglène n'existant

¹⁶ Provenant de la « Culture Collection of Algae and Protozoa » de Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, UK, ref : CCAP 1224/5Z.

pas au moment de l'expérimentation. De la même façon que pour les biofilms de diatomées, nous avons préparée une série sur filtres en polycarbonate par filtration douce afin de simuler différentes biomasses. La seule différence a concernée le milieu de dilution de la culture mère : les dilutions ont été faites avec le milieu de culture spécifique de l'espèce utilisée¹⁷.

III.2.1.2. Simulation du biofilm à l'aide de mélange d'agarose

Notre idée initiale était de simuler les biofilms ressemblants le plus possible à ceux que l'on trouve sur le terrain à la surface du sédiment. La présence des filtres en tant que supports des filtrations douces limite cette ressemblance en formant une couche supplémentaire entre les cellules et le substrat. Nous avons donc proposé d'utiliser une autre simulation du biofilm en piégeant les cellules en suspension dans un mélange de poudre d'agarose¹⁸ et de NaCl (Figure III.1-b) afin de reproduire la matrice cellules/EPS, ce dernier étant reproduit par l'agarose. Un volume connu de la culture mère est prélevé après le comptage des cellules. Ce volume est ensuite passé à la centrifugeuse, à une faible force centrifuge (4000 g), afin de passer à une concentration 200 fois supérieure à celle de départ sans altérer les cellules. Un nouveau comptage des cellules est alors effectué et c'est cette culture, à très haute concentration, qui est diluée, toujours dans de l'eau de mer, afin de fournir la gamme de variation de biomasse. Les dilutions de différentes concentrations cellulaires sont ensuite mélangées avec l'agarose dans une proportion volume à volume de 2:3 (culture: agarose). 5 ml du volume final de mélange sont enfin passés dans un vortex pour obtenir une mixture homogène, et immédiatement injectée dans un moule en verre cylindrique de faible épaisseur. Un couvercle en verre est glissé par-dessus la surface du gel pour obtenir une surface lisse et une épaisseur équivalente pour tous les échantillons. Ces gels forment ainsi des pastilles cylindriques de 36 mm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur. Les gels sont démoulés au bout de 5 minutes et posés dans des boîtes de Petri.

La Figure III.2-a présente un exemple d'une série de biofilms à diatomées déposées sur des filtres en polycarbonate blancs. L'intensité de la couleur du biofilm déposé sur les filtres varie en fonction de la concentration cellulaire du volume filtré. Les biofilms les plus foncés correspondent aux concentrations les plus élevées.

¹⁷ Pour plus de détails voir la fiche 'Euglena gracilis Medium' sur le site de la CCAP : <http://www.ccap.ac.uk/media/pdfrecipes.htm>

¹⁸ Produit gélifiant purifié, obtenu à partir des parois cellulaires de certaines espèces d'algues.

L'exemple d'une série de biofilms d'euglènes déposés sur les filtres en polycarbonate blancs est illustré dans la Figure III.2-b. Comme pour les diatomées, l'intensité de la couleur du biofilm devient de plus en plus foncée avec l'augmentation de la biomasse.

Quelques exemples de gels posés sur un support blanc sont présentés en Figure III.2-c. Cette série a une concentration croissante. Bien que la même constatation puisse être faite sur l'assombrissement des couleurs en fonction de la concentration, les aspects physiques de ces deux types d'échantillons sont tout à fait différents.

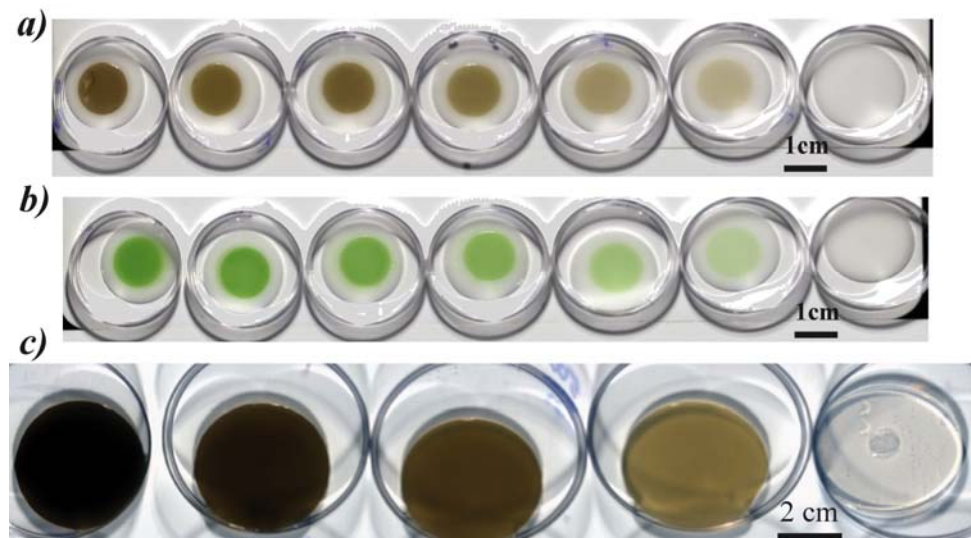


Figure III.2 : (a) et (b) exemples de simulations au laboratoire par les couches déposées sur les filtres blancs en polycarbonate de diatomées et d'euglènes, respectivement. (c) exemple d'une série de biofilms simulés par un mélange des cellules et l'agarose. Pour les trois séries, les échantillons incorporent différentes concentrations en cellule : de la plus concentrée à gauche à la moins concentrée à droite. L'échantillon à l'extrême droite ne contient pas de cellules est joué le rôle de témoin.

A la fin de la préparation d'une série d'échantillons (filtres ou gels), les mesures radiométriques sont immédiatement mises en œuvre à l'aide de la caméra HySpex VNIR 1600 en numérisant directement les images hyperspectrales des biofilms simulés. Les échantillons ont ensuite été stockés au congélateur à -80°C au maximum 3 mois dans l'attente de leur caractérisation et quantification pigmentaires par CLHP afin d'en estimer la biomasse par unité de surface.

III.2.1.3. Observation au Microscope Électronique à Balayage

La filtration douce des cultures, même effectuée avec beaucoup de précaution, pourrait abîmer les cellules. De plus, il est important de savoir si les échantillons simulés ressemblent

bien aux biofilms en conditions naturelles et s'ils conservent bien la structure des cellules entre elles. Pour cela, une série d'échantillon a été établie par filtration douce sur filtre de verre pour des observations au Microscope Électronique à Balayage (MEB). Ce microscope, dont le fonctionnement est basé sur les interactions électron-matière, est situé au Service Commun de Microscopie Électronique à Balayage et de Microanalyse X de l'Université de Nantes (SMEBM). Cette technique permet d'obtenir des photos de très haute résolution afin d'étudier les domaines de très petites dimensions comme illustré sur la Figure III.3.

Pendant nos observations, nous n'avons pas rencontré de cas de cellules abimées. Comme il était attendu, les cellules et le mucus couvraient la surface des filtres de façon assez homogène. A biomasse croissante, les cellules étaient empilées les unes sur les autres, comme c'est le cas pour les biofilms observés sur leur substrat naturel (Gouleau 1975; Herlory et al. 2004).

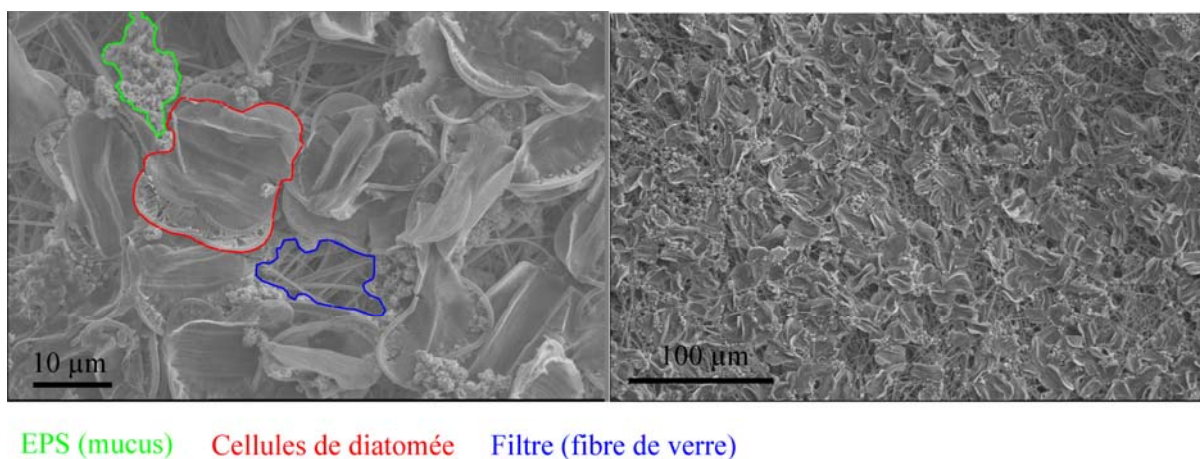


Figure III.3 : Photographie MEB de biofilms simulés au laboratoire sur des filtres de fibre de verre. À gauche, vue rapprochée des cellules déposées sur le filtre où nous pouvons distinguer clairement les cellules, le mucus, et les endroits du filtre non couverts par les cellules. À droite, vue plus large du même biofilm qui montre la couverture homogène du filtre par les cellules et le mucus.

III.2.2. Échantillonnage sur le terrain

En complément des biofilms simulés au laboratoire, des échantillons de terrain sont aussi prélevés pour y effectués les mesures radiométriques et biologiques. Ces échantillons sont prélevés soit pour connaissance taxonomique, soit pour identification de la composition pigmentaire soit pour l'étude de la granulométrie.

III.2.2.1. Protocole d'échantillonnage du sédiment

La technique que nous avons utilisée est l'échantillonnage par carottage qui permet de prélever un cylindre de sédiment sur au minimum les 3 premiers cm de profondeur et une surface de 20 cm² afin d'échantillonner dans un biofilm homogène (voir Méléder et al. (2005)). Le sédiment isolé à l'intérieur du carottier a été congelé *in-situ* par l'azote liquide afin de ne pas détruire la structure initiale de l'échantillon lors du prélèvement (Figure III.4-a, b, c et d). Ces échantillons ont été ensuite conservés dans l'azote liquide jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils ont été stockés dans un congélateur à -80°C. La carotte du sédiment congelé peut être coupée sur différentes épaisseurs afin d'effectuer les mesures de concentration pigmentaire et de granulométrie et établir des profils verticaux (Méléder et al. 2005).



Figure III.4 : Étapes de l'échantillonnage du sédiment à l'aide d'un carottier: (a) et (b) emplacement du carottier dans le sédiment, congélation et prélèvement ; (c) place du carottier dans le sédiment après prélèvement ; (d) échantillon congelé. (e) Échantillonnage du biofilm à l'aide des papiers optiques ; (f) place du biofilm enlevé après le retrait du papier.

III.2.2.2. Prélèvement du biofilm isolé du sédiment

Afin d'établir la relation entre les mesures de réflectance et celles de chromatographie (CLHP) il est nécessaire de pouvoir récupérer le biofilm sur lequel les mesures de réflectance ont été effectuées pour en mesurer la biomasse. Ceci est particulièrement difficile dans le cas des biofilms dont la réflectance a été mesurée sur le terrain. En effet, il est très délicat de savoir quelles sont la profondeur et la superficie du biofilm dont le spectre de réflectance a été

mesuré. La méthode mise en place par Eaton et Moss (1966) et utilisée par Combe et al. (2005) et Méléder (2003) est apparue intéressante pour récupérer les biofilms sur le terrain. Cette méthode a pour principe de piéger les cellules de microphytobenthos à travers un papier de nettoyage d'optiques, plus communément appelé 'papier optique' (Lens cleaning tissue, Whatman), grâce à leur migration naturelle générée par phototactisme. Des feuilles de papier optique dont l'épaisseur est estimée à 0.05 mm sont posées directement sur le sédiment pendant la formation du biofilm (Figure III.4-e). Les cellules situées à la surface du sédiment migrent dans le tissu afin de trouver la lumière que cache ce papier, et elles y restent alors piégées. Le biofilm peut être ensuite prélevé par simple retrait du papier (Figure III.4-f). Cependant cette méthode peut être relativement sélective par rapport aux autres méthodes. En effet, les cellules migrent dans les tissus en fonction de leur taille et il est donc probable que l'échantillon prélevé ne soit pas tout à fait représentatif du biofilm formé sur la surface du sédiment. On constate cependant que la zone pelée par un tel procédé (Figure III.4-f) reste dépourvue de cellules.

III.2.2.3. Observation de la formation du biofilm au laboratoire

En plus des méthodes d'échantillonnage et de congélation immédiate, nous avons aussi collectés des échantillons de sédiment pour les observer au laboratoire. Cette méthode tire partie de la capacité des diatomées à garder leur rythme de migration pendant plusieurs jours (en moyenne une semaine) après leur isolement de leur écosystème naturel (Paterson 1986; Serodio et al. 1997). A l'arrivée au laboratoire, le sédiment restant immobile et au repos dans la chambre de culture, les diatomées reprennent leur rythme de migration en fonction des cycles tidaux et circadiens. Il est donc possible de suivre l'évolution de la formation du biofilm dans le temps et en fonction de la lumière avec un suivi régulier autour de l'heure locale de la marée basse.

III.3. Mesures effectuées

Les échantillons de biofilms préparés ou prélevés ont fait l'objet de mesures radiométriques et chromatographique au laboratoire.

III.3.1. Mesures de réflectance

Nous avons tout d'abord effectué les mesures de réflectance à l'aide d'un spectromètre ASD sur une première série de biofilms, puis avec une caméra HySpex sur une seconde série de biofilms. Ces deux types de mesures sont présentés successivement sachant que leurs caractéristiques générales ont été déjà expliquées dans le Chapitre II. Les mesures de réflectance des biofilm préparés sur les filtres en polycarbonate sont effectuées sur différents support, les spectralons à 99%, 50% et 20% de réflectance, afin d'étudier le rôle de substrat.

III.3.1.1. Mesures de réflectance par ASD FieldSpec3 FR ®

Contrairement à la configuration de mesures sur le terrain, pour les mesures effectuées au laboratoire nous avons utilisé l'éclairage artificiel (lampe halogène) intégré dans la sonde de contact, en essayant de bien isoler l'échantillon de la lumière ambiante. Pour chaque échantillon, une série de 10 mesures de la radiance a été enregistrée pour réduire l'effet du bruit et puis ramenée à la radiance incidente (Spectralon 99%) pour obtenir le spectre de réflectance. La moyenne des 10 mesures a été retenue comme la réflectance de l'échantillon. Lorsque la sonde de contact est utilisée, celle-ci doit être plaquée à la cible pour respecter la géométrie hémisphérique. Toutefois, nous n'avons pas la possibilité de coller la sonde sur le biofilm car les cellules collaient à l'appareil et rendait impossible la suite de l'expérimentation. Ce décalage est suffisant pour provoquer des variations d'intensité de réflectance. Les mesures ont été effectuées à une distance d'environ de 3 mm au dessus des échantillons.

III.3.1.2. Caméra HySpex

Les mesures de réflectance au laboratoire ont également été faites à l'aide d'images acquises par la caméra HySpex du laboratoire LPGN. La Figure III.5 illustre la configuration de la caméra HySpex telle que nous l'avons utilisée au laboratoire. Pour l'acquisition des images de biofilms simulés, les échantillons sont posés sur un plateau mobile, à une distance d'environ 1m de la caméra. Nous n'avons utilisé qu'une seule des sources d'éclairements possible, à savoir une lampe halogène à 100W.

Les images finales ont une très haute résolution spatiale (0.2 mm) et spectrale (4.5 nm). Les acquisitions ont été réalisées en l'absence de toute autre source d'éclairement que celle du

dispositif de balayage. Lorsque la durée d'acquisition est supérieure à une minute, les échantillons sont retirés au fur et mesure de leur passage devant la caméra pour éviter leur dessèchement et une dégradation des pigments sous la lumière intense.

Les images en réflectance ont été obtenues en divisant tous les pixels d'image de radiance par le spectre moyenné sur au moins 50 lignes d'une image de spectralon à 99% acquise sur la même scène que les biofilms.

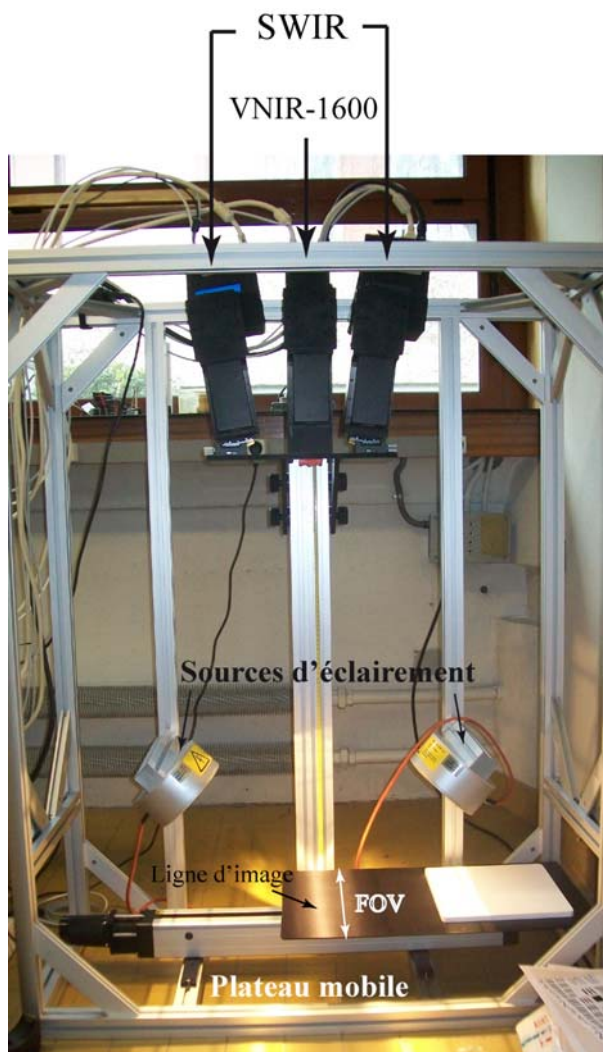


Figure III.5 : Installation de la caméra HySpex au laboratoire LPGN. La vitesse du plateau se règle à l'aide du logiciel d'acquisition. Une seule source d'éclairage (celle de gauche) a été utilisée pendant les mesures.

III.3.2. Mesures de biomasse par CLHP

Avant l'étude pigmentaire, les pigments doivent être extraits des cellules et mis en solution dans des solvants appropriés. Les pigments végétaux (chlorophylles et caroténoïdes)

sont solubles dans des solvants organiques. Le protocole d'extraction choisi pour cette étude est celui utilisé en routine au laboratoire MMS : les échantillons sont mis à extraire dans de l'acétone à 90 % à 4° C au noir durant 24h (Méléder et al. 2003a).

Les pigments, une fois extraites, vont voir leur polarité modifiée en fonction des solvants dans les quels ils sont en solution. Ils peuvent alors être séparés en fonction de leur polarité selon des séquences de mélange de solvants *ad hoc*. C'est le principe de la chromatographie. Pour ce travail, comme la plus part des travaux actuels portant sur les microalgues, la méthode utilisée est la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) qui permet de séparer, d'identifier et de quantifier plus de 30 pigments chlorophylliens et caroténoïdes (Jeffrey et al. 1997a; Millie et al. 1993). Cette technique associe une phase liquide correspondant à un mélange de solvants dans des proportions variant durant le temps de l'analyse et une phase solide, une colonne en silice greffée de C₁₈, sur laquelle s'accrochent puis se décrochent les pigments en fonction de leur polarité.

Les pigments vont donc être élués les uns après les autres, les plus polaires comme la Chl *c*, en premier, les moins polaires comme le β-carotène, en dernier. L'identification des pigments élués repose alors sur la mesure de leurs propriétés d'absorption dans le domaine visible (400-800 nm) par le détecteur à barrette de diode intégrée dans l'appareillage de la CLHP ainsi que leur différence de temps de rétention sur la colonne. La concentration de chacun d'eux, exprimée en mg de pigment par m⁻², est ensuite estimée à partir du chromatogramme à 440 nm, longueur d'onde à laquelle tous les pigments absorbent et pour laquelle la CLHP a été calibrée. La calibration est effectuée à l'aide de pigments standards de concentration connues (Brotas et Plante-Cuny 1996; Jeffrey et al. 1997a; Méléder et al. 2003a). Les résultats sont traités à l'aide du logiciel Millénium® et dans le cas des pigments qui se présentent sous différentes formes chimiques, la concentration finale est la somme des concentrations de toutes les formes chimiques.

Les protocoles d'extraction et de mesure sont mis en place par Mantoura et Llewellyn (1983) et utilisé par Méléder et al. (2003a). L'ensemble des mesures effectuées et les objectifs de ces mesures est listé dans le Tableau III.1.

Tableau III.1 : Récapitulatif des mesures effectuées et les échantillons préparés ou prélevés.

Type d'échantillon		Mesures effectuées	Objectif de mesures
Biofilms simulés	Filtres	Radiométriques (ASD, HySpex) ; biologiques (CLHP)	Modélisation de la relation entre la biomasse et la réflectance
	Agarose	Radiométrique (HySpex)	Étude de la structure interne du biofilm
Prélèvement du sédiment	Carottage	Biologiques (CLHP)	Étude taxonomique, analyse pigmentaire
	Simple	Radiométriques (HySpex)	Étude de la formation du biofilm
Biofilm sur papier optique		Biologiques (CLHP)	Étude de surface du sédiment, nature du biofilm

III.4. Visualisation et analyses primaires des données obtenues

- Données CLHP

Un exemple de résultats brutes obtenus en CLHP pour un extrait pigmentaire provenant d'un biofilm de laboratoire de diatomées *Entomoneis paludosa* est présenté en Figure III.6 : le graphique en 3D (Figure III.6-a) représentant les spectres d'absorptions (en abscisse) des différents pigments élués à des temps différents (en ordonnée) dans le visible (en profondeur), et le chromatogramme extrait de ce graphique à 440 nm (Figure III.6-b). Les pigments les plus importants identifiés dans tous les extraits pigmentaires de diatomées de biofilms soit préparés au laboratoire, soit prélevés *in-situ* sont, dans l'ordre croissant des temps de rétention: chlorophylle c (Chl *c*), fucoxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine, chlorophylle a (Chl *a*) et β -carotène.

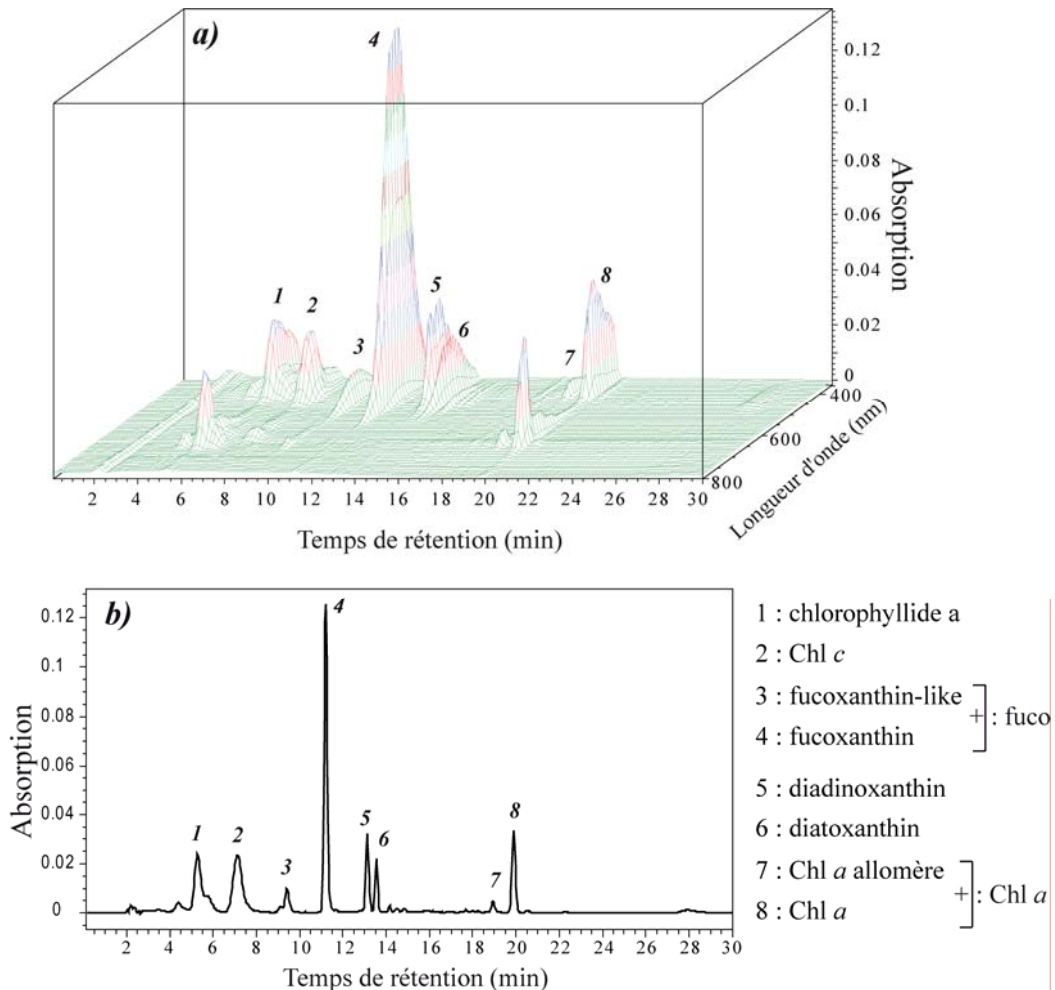


Figure III.6 : Exemples de résultats brutes en CLHP pour un extrait pigmentaire d'un biofilm monospécifique d'*Entomoneis paludosa* : (a) graphique 3D d'absorption des pigments dans le domaine visible en fonction du temps de rétention ; (b) chromatogramme extrait du graphique précédent à 440 nm.

La Figure III.7-a présente les résultats quantitatifs obtenus par traitement des données brutes c'est-à-dire la concentration des pigments les plus abondants observés pour une série d'échantillons de biofilms simulés sur filtres en polycarbonate (Figure III.2-a). L'étude des valeurs mesurées montre qu'il existe une très forte corrélation entre la concentration des différents pigments (Figure III.7-b). Les rapports entre la Chl a et les autres pigments peuvent ainsi être utilisés comme marqueurs taxonomiques (Mackey et al. 1996; Schlüter et al. 2000). Mais ces mêmes rapports peuvent aussi être utilisés comme marqueurs de l'état physiologique (Brotas et Plante-Cuny 1998; Cariou-Le Gall et Blanchard 1995; Lucas et Holligan 1999; Lucas et al. 2000; Wiltshire 2000). Il devient donc difficile de faire la part exacte entre les changements de cortège pigmentaire par variation d'espèce et par variation de conditions environnementales. La Figure III.8 présente la répartition de ces pigments pour les peuplements de diatomées issus de différents types d'échantillons : les cellules épipéliques

échantillonnées dans le papier optique (Figure III.8-a), les carottes du sédiment contenant les cellules épipsammiques (Figure III.8-b) et une série des biofilms déposés sur les filtres préparés au laboratoire (Figure III.8-c). Une première comparaison nous mène à remarquer les points suivants puis à aussi à poser quelques hypothèses :

a) Le β -carotène présente un pourcentage très faible pour les trois cas et considéré comme étant un pigment en trace ;

b) La Chl *a* est le pigment majoritaire dans tous les cas (>49%) avec toutefois des variations d'un cas à l'autre. Pour les cellules obtenues à l'aide des papiers optiques, la concentration de Chl *a* est notamment plus basse que dans les deux autres cas. L'hypothèse peut être le fait que seules les cellules les plus grosses ont la possibilité de monter dans le tissu du papier et sont les seules à être piégées. Ces grosses cellules produisent moins de Chl *a* que les cellules de petite taille, ce qui se traduit par une plus faible concentration en Chl *a* pour ce type de prélèvement. Cependant il a aussi été montré par Méléder (2003) que le signal analysé par spectrométrie portait uniquement sur les cellules visibles en surface ce qui n'est pas le cas de mesures faites sur les carottes qui inclut une proportion de Chl *a* provenant d'autres composantes de la vase et non des diatomées. S'agissant en plus de diatomées épipsammiques analysées en carottes et de diatomées épipelagiques analysées par papier optique la comparaison n'est pas absolument rigoureuse.

c) La fucoxanthine est présente dans la même proportion pour les deux types d'échantillons de terrain (~24%), alors que cette valeur est nettement plus haute pour les échantillons du laboratoire. Cela peut être expliqué par l'effet de la lumière. La fucoxanthine est un pigment d'ombre dont la proportion peut logiquement être plus importante dans les cultures gardées en chambre de culture au laboratoire que sous une lumière naturelle plus forte sur le terrain.

d) La diadinoxanthine et la diatoxanthine sont beaucoup plus abondantes dans les échantillons de terrain que dans ceux du laboratoire. Cela est compatible avec le fait que ce sont toutes les deux des pigments connus pour être photoprotecteurs chez les diatomées. Les cellules prélevées sur le terrain produisent donc logiquement plus de pigments photoprotecteurs que ceux du laboratoire pour se protéger de la lumière naturelle.

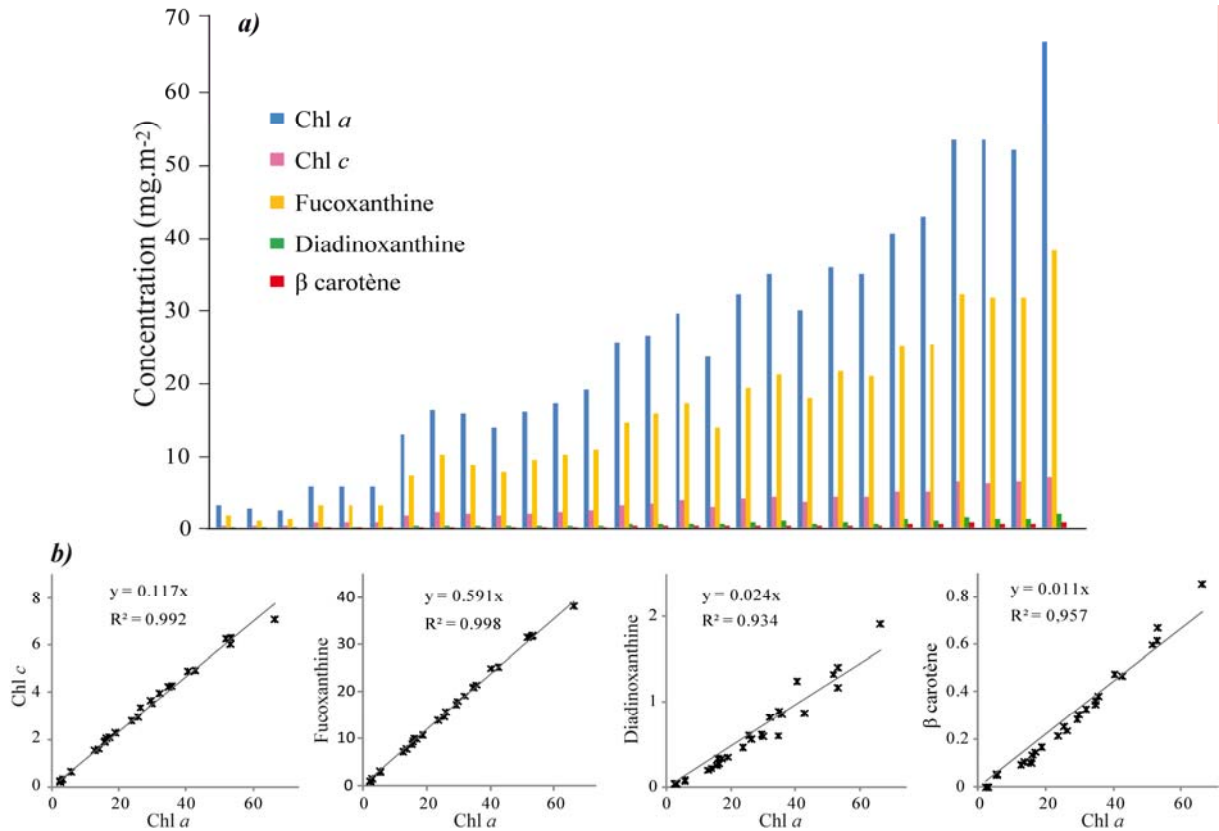


Figure III.7 : Résultats quantitatifs obtenus pour un extrait pigmentaire d'un biofilm monospécifique d'*Entomoneis paludosa* analysée lors de sa phase de croissance exponentielle: (a) concentration en mg. m⁻² des pigments les plus abondants. (b) concentrations en Chl a en fonction des autres pigments majoritaires. La diatinoxanthine n'est pas présentée sur la figure car sa concentration est très basses et donc difficile à représentée vis-à-vis de celle des autres pigments.

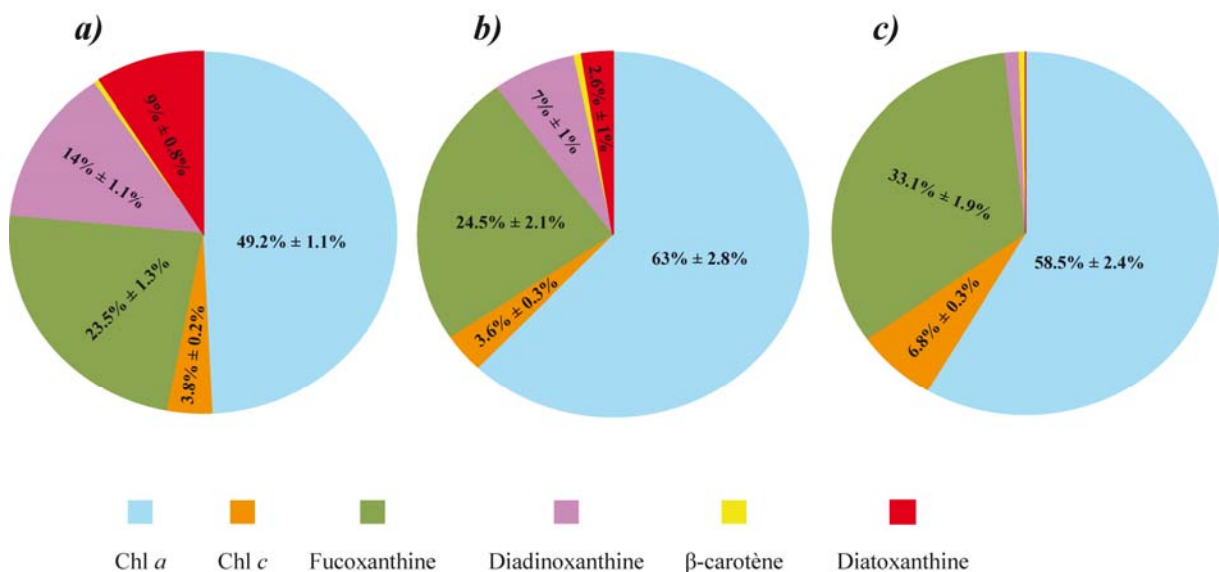


Figure III.8: Répartition des pigments dans les différentes séries de données: (a) retrait du biofilm (épipélique) par papier optique; (b) carottage du sédiment (épipsammique) et (c) biofilms simulés au laboratoire.

Un exemple de chromatogramme de CLHP à 440 nm de biofilms d'euglènes déposés sur le filtre de polycarbonate est illustré en Figure III.9. Les pigments détectés dans un extrait d'euglènes sont les suivants :

chlorophyllide a, néoxanthine, diadinoxanthine, anthéroxanthine, chlorophylle *b* (Chl *b*), Chl *a* et β -carotène.

Les euglènes sont caractérisées par la présence de la Chl *b* qui peut être utilisée comme marqueur taxonomique des euglènes. En effet cette classe d'algue est la classe majoritaire à Chl *b* au sein du MPB. Des dinophycées peuvent être rencontrées au sein du MPB, pouvant posséder de la Chl *b*, mais cette classe est très marginale sur les vasières atlantiques, et n'a jamais été observée en baie de Bourgneuf. En plus de la présence de la Chl *b* et de l'absence de la Chl *c*, l'absence de la fucoxanthine dans les biofilms d'euglènes fait partie des variations entre le panel pigmentaire de ces deux biofilms microphytobenthiques. La connaissance de la composition pigmentaire des biofilms d'euglènes et de diatomées, comme pour tout autre organisme végétal, est très importante afin de pouvoir les distinguer entre elles à partir de leurs spectres de réflectance.

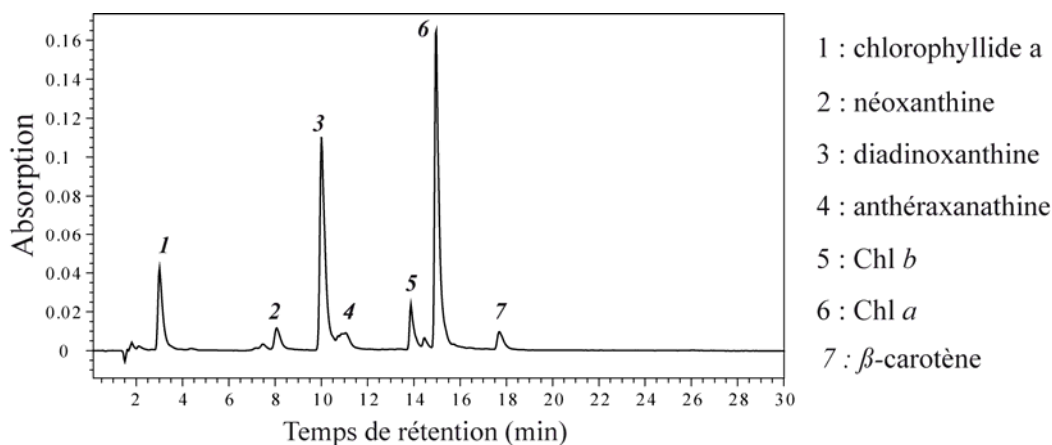


Figure III.9 : Exemples de chromatogrammes obtenus à 440 nm par CLHP pour une culture monospécifique d'euglènes (*Euglena gracilis*) analysée lors de sa phase de croissance exponentielle.

- Spectres ASD

La Figure III.10 présente les spectres de réflectance mesurés sur une série des biofilms de diatomée ayant des biomasses croissantes et déposés sur des filtres blancs en fibre de verre. Le premier spectre est celui du témoin, le filtre en fibre de verre seul humecté avec l'eau de

mer. Les mesures sont faites à une distance de 2-5 mm et, en conséquence, le niveau du plateau infrarouge varie selon les mesures. Le filtre séchant plus rapidement sans couverture de biofilm sa réflectance apparaît plus claire sur pour les faibles biomasses que pour les fortes biomasses.

La bande d'absorption de la Chl *a* est très prononcée par un pic isolé à 673 nm. La bande d'absorption de la Chl *c* est aussi visible par un petit pic autour de 633 nm. La région d'absorption de tous les pigments entre 400-520 nm est aussi remarquable. L'approfondissement de toutes ces différentes bandes lors de l'augmentation de biomasse est clairement visible. Nous pouvons aussi remarquer un niveau de saturation, à partir duquel les spectres de réflectance restent invariables alors que la biomasse augmente passant de 87.61 à 102 mg Chl *a*.m⁻².

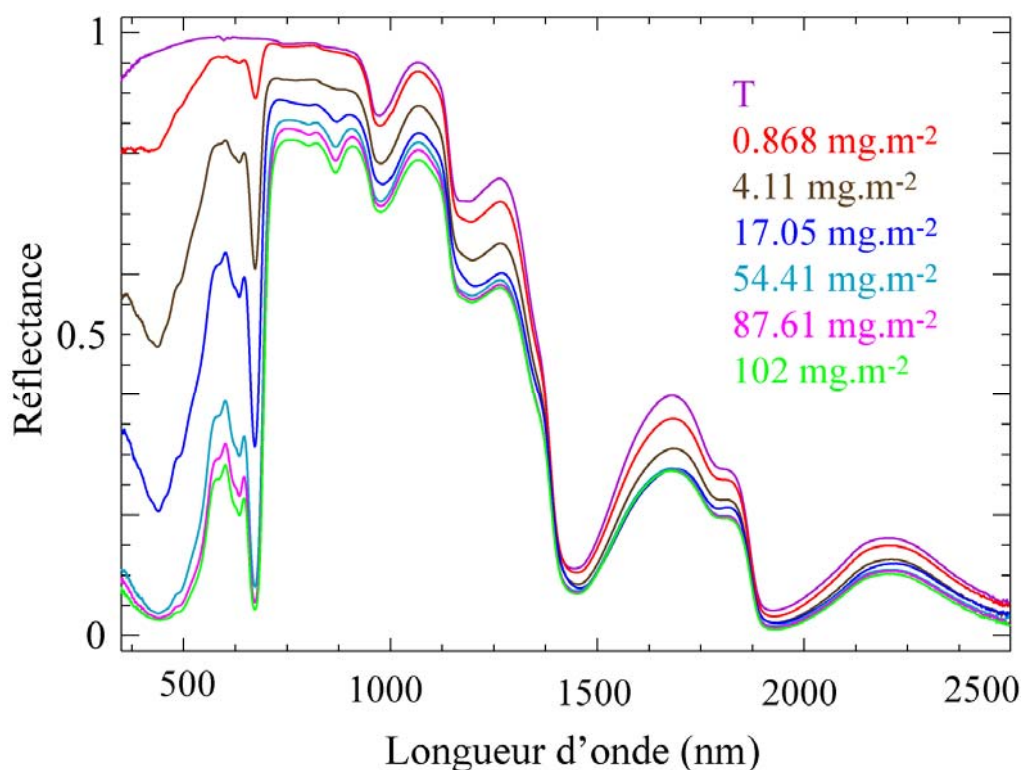


Figure III.10 : Exemples des spectres ASD entre 350 nm et 2500 nm pour 6 biofilms d'*Entomoneis paludosa* de biomasse croissante. Le spectre le plus haut présente la réflectance du filtre en fibre de verre humide sans aucun biofilm.

- Spectres et images HySpex

Les exemples des images HySpex d'une série de biofilms de diatomées et d'euglènes sur les filtres en polycarbonate ainsi que des exemples de spectres mesurés sont illustrés en Figure III.11. Les filtres couverts par ces biofilms sont posés sur 3 supports différents, des spectralons à 99%, 50% et 20%. Par combinaison entre filtre humecté transparent et supports en spectralon nous simulons ainsi des substrats de biofilms à 95%, 45% et 35% de réflectance (valeurs moyennes des témoins). Les spectres illustrés sont ceux d'un pixel situé au milieu du biofilm, en évitant les endroits touchés par l'ombre ou à la lumière indirecte réfléchi par la boîte de Pétri. Les premières remarques pour les biofilms de diatomées et d'euglènes sont les suivantes :

- tout comme dans le cas des spectres ASD, les bandes d'absorption de différents pigments sont visibles et s'approfondissent quand la biomasse augmente ;
- au contraire des mesures d'ASD, en raison des conditions d'acquisition, simultanée et à une distance plus importante de la source lumineuse qui limitant le chauffage des échantillons, les spectres se superposent tous sur le plateau NIR et atteignent le niveau du réflectance du témoin, pour les différents supports.

Malgré la ressemblance entre les formes spectrales des biofilms de diatomées et d'euglènes, il existe quelques dissimilitudes liées à leurs panels pigmentaires :

- la bande d'absorption de la Chl *c* est absente dans les spectres des biofilms d'euglènes ;
- la bande d'absorption liée à la présence de la Chl *a* est plus large pour les biofilms d'euglènes en raison de la présence de la Chl *b* dont la bande d'absorption très proche de celle de la Chl *a* ne peut pas être séparée.
- l'absence de la fucoxanthine dans les biofilms d'euglènes se traduit par l'apparition d'une bosse autour de 550 nm avec un changement de pente entre 500 et 550 nm par rapport aux spectres des biofilms de diatomées.

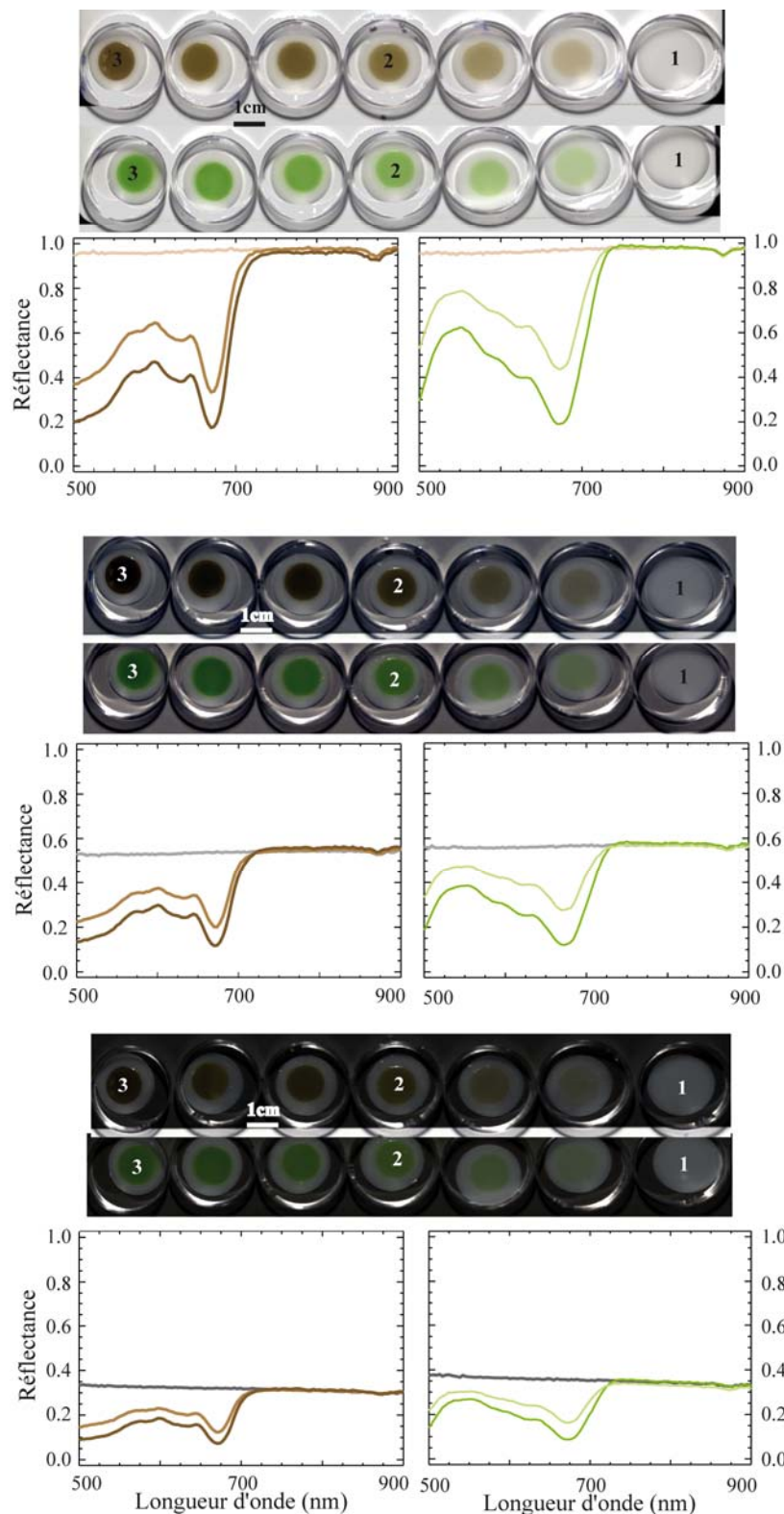


Figure III.11 : Images HySpex des biofilms sur filtres de polycarbonate, pour des biomasses croissantes de gauche à droite. Ces échantillons ont été posés sur trois supports différents : spectralons® de 99% (en haut), 50% (au milieu) et 20% de réflectance (en bas). Les spectres de réflectance sont mesurés à gauche sur les biofilms de diatomées, à droite, sur ceux d'euglènes pour un pixel du milieu de trois filtres : 1, témoin ; 2, biomasse moyenne ; 3, biomasse forte.

La Figure III.12 présente une image HySpex d'une série des biofilms de diatomées simulés par le mélange des cellules et d'agarose à différentes concentrations cellulaires, posés sur un spectralon® à 99%, ou sur un support en velours¹⁹ noir réfléchissant globalement moins de 3% de la lumière incidente entre 500-700 nm. A l'instar des mesures effectuées sur les biofilms reposant sur des filtres, les spectres de réflectance sont mesurés pour un pixel au milieu de chaque biofilm. Le comportement spectral de ces biofilms montre des différences remarquables à celui des biofilms sur filtres :

- Sur un support blanc, nous pouvons toujours observer le phénomène des bandes d'absorption plus profondes pour les biomasses plus importantes.
- En revanche, le plateau infrarouge varie en fonction de la concentration cellulaire : il descend quand la biomasse augmente.
- Sur un support d'une réflectance proche de zéro dans le domaine visible (en velours noir), l'approfondissement des bandes d'absorption n'est plus observable. Les spectres de réflectance des biomasses croissantes se superposent tous dans le domaine visible. Le comportement du plateau NIR est inverse de celui des spectres mesurés sur un support blanc : ils montent avec l'augmentation de biomasse.

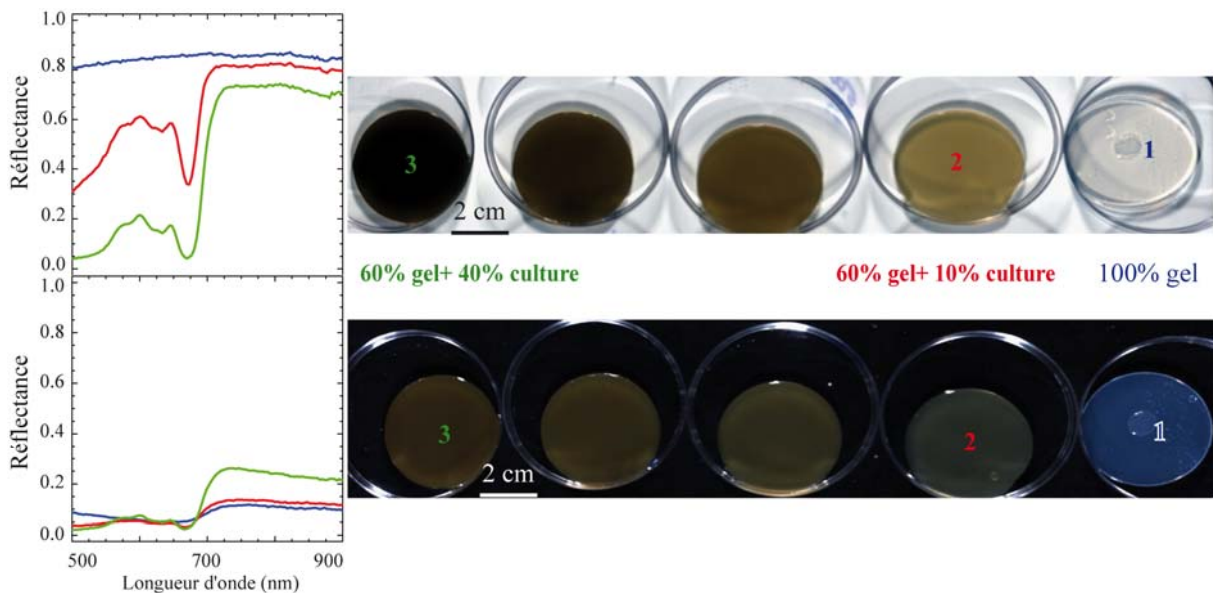


Figure III.12 : Images HySpex des biofilms de diatomées sur gels contenant des biomasses croissantes. A gauche, les spectres de réflectance d'un pixel du milieu de trois échantillons : 1, gel seul ; 2, culture mère concentrée à 25% ; 3, culture mère concentrée à 100%, en haut sur spectralon 99%, en bas sur support noir.

¹⁹ Les spectralons à 50 et 20 % n'étant pas disponible à la date de cette expérimentation

La comparaison entre la structure interne de ces deux types de biofilms simulés et leur comportement spectral va permettre d'identifier les propriétés spectrales et de caractériser la structure interne d'un biofilm naturel.

Afin de comparer les mesures spectrales de ces biofilms expérimentaux à des mesures spectrales de biofilm naturels, des échantillons de sédiment ramenés du terrain ont aussi fait l'objet de mesures radiométriques par caméra HySpex. Les échantillons de sédiments ont été observés au laboratoire pendant 3 heures le lendemain de l'échantillonnage. Une partie des échantillons est resté sans bouger et le reste a été agité et retourné la veille (Figure III.13-a). L'acquisition des images a débuté 1 heure avant l'heure locale de la marée basse (BM -2 heure) s'est terminée 1 heure après (BM + 1 heure), avec un intervalle de temps de 15-30 min entre deux acquisitions.

Comme la Figure III.13-b le montre clairement, le sédiment qui a eu le temps d'être recouvert par le biofilm est identifiable par sa couleur et son spectre de réflectance caractéristiques d'un biofilm de diatomées. En effet, la bande d'absorption due à la Chl *c* à 630 nm, et l'épaule à 550 nm due à la présence de fucoxanthine sont bien visibles. La formation du biofilm sur les autres échantillons est aussi visible bien que beaucoup moins prononcée en raison de l'agitation de la vase. L'effet de l'augmentation de la biomasse entre BM - 3 heures et BM sur le spectre de réflectance d'un même pixel est illustré sur la Figure III.13-c. L'approfondissement des bandes d'absorption des pigments associé à la formation du biofilm est net dans le visible. En revanche, le spectre de réflexion ne change pas dans le NIR. Le plateau NIR est donc invariant, il ne dépasse jamais celui de son substrat. Ceci permet de conclure en un résultat capital pour la compréhension du signal spectral du microphytobenthos et de sa mise en relation avec la biomasse : les biofilms de ces peuplements photoautotrophes sont donc transparents dans le domaine spectral NIR. Le terme de « *red edge* » est donc impropre au regard de sa signification pour une feuille par exemple. Ceci explique pourquoi les indices se basant sur cette caractéristique, tel le NDVI, restent toujours faibles pour le MPB, alors que les biomasses peuvent être très fortes.

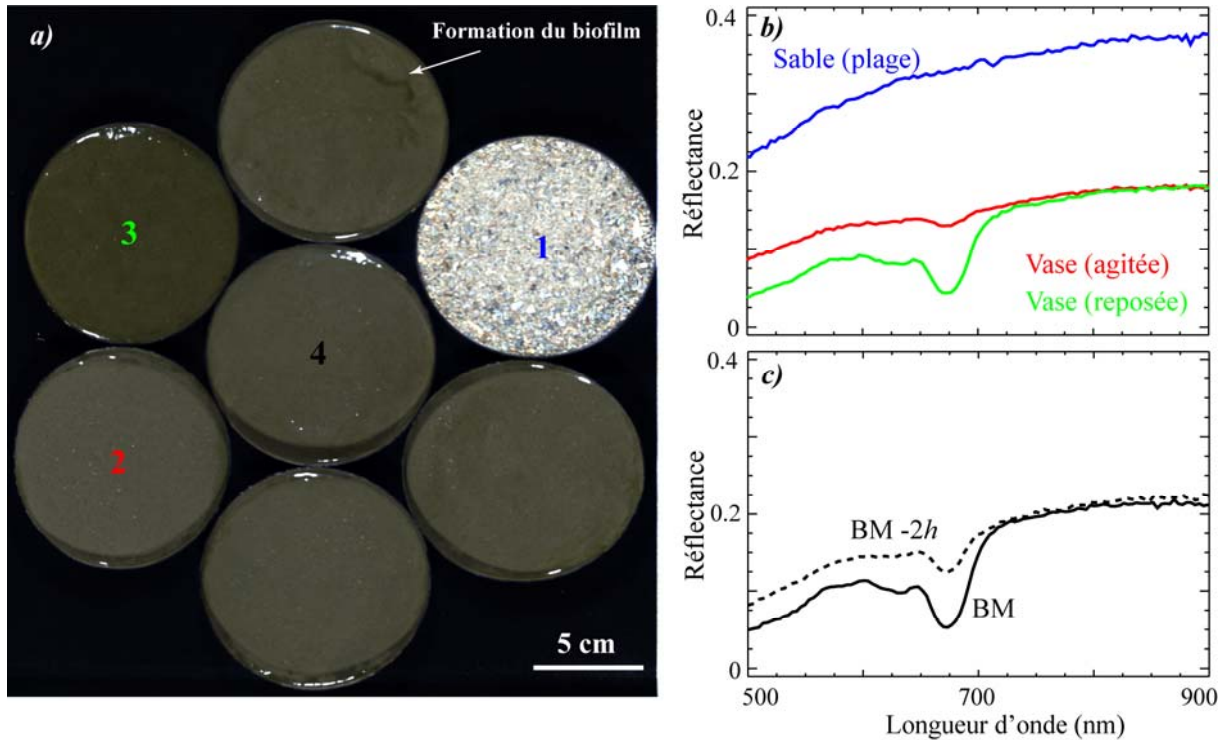


Figure III.13 : (a) image HySpex du sédiment et du sable échantillonnés puis conservés en chambre de culture. Parmi les 6 échantillons, 5 ont été mélangé la veille des mesures et un ne l'a pas été. (b) Spectres de réflectance d'un pixel de sable (en bleu, n°1), du sédiment mélangé (en rouge, n°2) et du sédiment reposé (en vert, n°3). (c) Spectres d'un pixel (n° 4) à BM-2 heures et à BM sont représentés respectivement en pointillé et en trait plein.

III.5. Conclusion partielle

Les analyses pigmentaires effectuées sur différents types de données ont montré que le cortège pigmentaire ne reste pas le même pour tous les types d'échantillons (biofilms artificiels, sédiment et biofilm retiré par le papier optique). L'assemblage des pigments varie selon différents paramètres, notamment les conditions d'éclairage, l'état physiologique et la taille des cellules. La variation de ce cortège pigmentaire modifie la forme globale des spectres de réflectance qui doivent donc être utilisés prudemment. C'est pour cela que le choix a été fait pour la suite de cette thèse de se focaliser sur la Chl *a* et sa bande d'absorption seuls véritables marqueurs de la biomasse photosynthétique active. Toutefois, la différence très marquée entre les réponses spectrales de deux classes d'algue est utilisée par la suite pour les identifier et les distinguer les uns des autres.

De plus, les spectres de réflectance des biofilms simulés au laboratoire ou ramenés du terrain, ont permis d'analyser la variation de la réponse spectrale en fonction de la variation de la biomasse. Deux types de simulations du biofilm de diatomées, l'un sur filtre et l'autre

dans un gel, ont été confrontés afin d'étudier la forme et la structure interne des biofilms en confrontant ces résultats à ceux d'un biofilm naturel en cours de formation. Les résultats montrent que les spectres de réflectance dépendent du type de substrat, de la biomasse et du type de simulation utilisé pour le biofilm.

Ces informations acquises par l'expérimentation constituent des données cruciales pour la compréhension des réponses spectrales de biofilms microphytobenthiques et sont à la base de la mise en place d'une modélisation physique de la réflectance présentée au chapitre suivant.

CHAPITRE IV

DÉVELOPPEMENT MÉTHODOLOGIQUE

IV.1. Introduction

La cartographie quantitative est l'estimation de la quantité d'un élément à partir des données de télédétection. Elle requiert une étape importante qui est l'expérimentation permettant de produire des quantités connues de l'élément recherché que se soit en laboratoire ou *in-situ*. Elle repose ensuite sur des méthodes qui sont soit empiriques, par exemple l'utilisation de bibliothèques spectrales constituant des tableaux de correspondance (ou look up table, LUT) entre une forme spectrale et une quantité d'élément, soit physiques en s'appuyant sur des modèles de transfert radiatif de la lumière à travers l'élément recherché. Dans tous les cas, il s'agit d'établir une relation entre les données quantitatives et les spectres observés. Plus une méthode approche les propriétés physico-chimiques de la cible, c'est-à-dire ses caractéristiques spectrales propres, plus les estimations sont précises et robustes. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes attachés à déterminer les propriétés optiques des biofilms microphytobenthiques dans le but final d'estimer des valeurs de biomasse photosynthétique active.

Le recours à un modèle physique pour décrire un milieu permet d'acquérir les informations essentielles sur sa structure et d'en déduire sa réponse spectrale. Cette méthode n'a encore jamais été utilisée pour l'étude des biofilms de microphytobenthos. La première question est donc de savoir comment simuler physiquement un biofilm en fonction de sa structure et de sa forme, et de comprendre comment ses caractéristiques modifient la réponse spectrale du biofilm en relation avec ses propriétés optiques. Inversement, en connaissant ces propriétés optiques, il est possible d'identifier les propriétés physiques ou chimiques du biofilm, comme par exemple la biomasse.

IV.2. Modèle de transfert radiatif de la lumière à travers un biofilm benthique

La lumière incidente sur un biofilm peut en partie :

- être directement réfléchi à la surface par une réflexion spéculaire ou diffuse surfacique, sans pénétrer dans la couche du biofilm (flèche noire 1 sur la Figure IV.1);
- pénétrer dans le biofilm et être réfléchi à la suite d'une série de diffusions consécutives à l'intérieure de ce biofilm (flèches jaunes résultant en la flèche 2 sur la Figure IV.1);
- traverser le biofilm et atteindre le substrat (flèche rouge résultant en la flèche 3 sur la Figure IV.1);
- pénétrer le biofilm et être absorbée par les éléments absorbants (pas de résultante).

L'ensemble de ces comportements (1 + 2 + 3 Figure IV.1) vis-à-vis de la lumière incidente forme la réponse spectrale du biofilm ; les parties qui retournent vers un capteur placé au dessus du biofilm constituent son spectre de réflectance. De même, la partie qui traverse le biofilm et sort par la face opposée pour forme le spectre de transmittance. La loi de conservation énergétique indique que la fraction de la lumière qui est ni réfléchi ni transmise est absorbée par les éléments absorbantes.

Afin de connaître les caractéristiques physico-chimiques du biofilm nous devons identifier les facteurs qui modifient la réponse spectrale et estimer la fraction de leurs participations dans la réponse spectrale finale. C'est pour cette raison que nous étudierons les 'propriétés optiques' du biofilm de microphytobenthos dans ce chapitre.

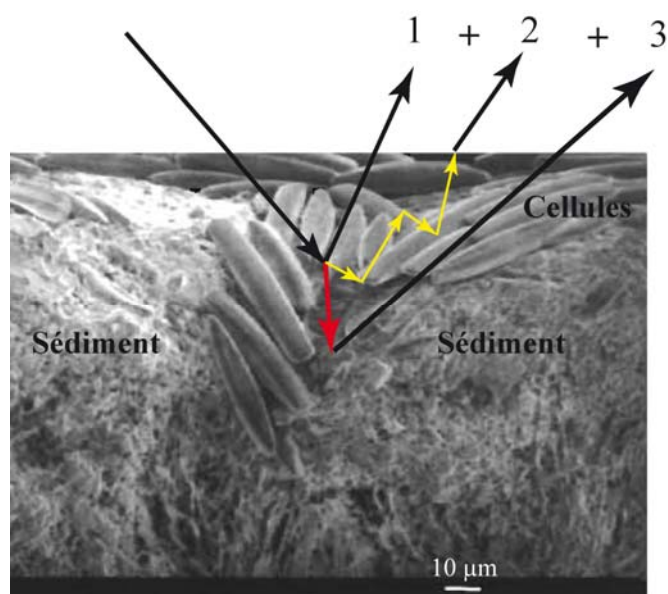


Figure IV.1 : Trajets possibles de la lumière à travers un biofilm sur son substrat naturel. La somme de ces comportements (1, 2 et 3) forme le spectre de réflectance obtenu par un capteur posé au dessus du biofilm. Pour les détails, voir le texte.

IV.2.1. Quelles sont les propriétés optiques à prendre en compte ?

Le calcul des propriétés optiques d'un biofilm consiste à estimer la réponse spectrale de ce milieu en termes de « diffusion » et « d'absorption ». Ces dernières sont des processus quantifiables qui font le lien entre la réponse spectrale du biofilm, ses propriétés internes et surfaciques, comme par exemple la concentration en pigments, la taille des particules ou la rugosité de surface. La « diffusion » et « l'absorption » sont réciproquement définies en optiques par les termes « d'indice de réfraction » et de « coefficient d'absorption » d'un milieu.

IV.2.1.1. Absorbance du rayonnement électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique qui pénètre dans un milieu est en partie absorbé par les éléments absorbants soumis à ce rayonnement en fonction du coefficient d'absorption et du trajet parcouru dans le milieu (loi de Beer-Lambert). Le coefficient d'absorption dépend du nombre d'interactions, et donc le nombre des particules absorbantes, mais aussi de leur composition.

En effet, les photons sont absorbés par les particules grâce à plusieurs processus qui dépendent de la composition de ces particules et qui se manifestent à différentes longueurs d'onde. Ces processus d'absorption interviennent au niveau moléculaire et s'expliquent à l'aide de notions de mécanique quantique. Ainsi, l'interaction du rayonnement avec le milieu est basée sur des échanges d'énergie et les différents types de liaisons chimiques spécifiques au sein des matériaux. Ces liaisons sont à l'origine des différents processus d'absorption qui dépendent du domaine de longueur d'onde. La compréhension des causes de ces processus est donc importante afin de mieux identifier les bandes d'absorption des matériaux. Nous allons étudier deux processus qui interviennent dans le domaine de longueur d'onde de notre étude

Transition électronique :

Les électrons d'un atome existent dans des orbites isolées et, par conséquent, les atomes isolés ont des états d'énergie discrets. L'absorption par les photons d'une longueur d'onde spécifique provoque une élévation de l'état d'énergie par transition d'une orbite initiale basse à une orbite haute. Une transition dans le sens inverse, provoquant une diminution d'énergie, se manifeste par un phénomène d'émission de photon de fluorescence dont la longueur d'onde est plus grande que le photon incident. Ces transitions créent souvent les bandes

d'absorptions très prononcées et concernent les courtes longueurs d'onde (400- 1000 nm). Les molécules qui absorbent la lumière dans ce domaine spectral sont principalement les pigments.

Vibration de molécules polyatomiques :

Les processus vibrationnels sont le résultat du mouvement des atomes autour de leur centre de masse. Ce phénomène est lié à la capacité de déplacement des noyaux d'une molécule autour de leur position d'équilibre, entraînant une vibration de la molécule. Ce type d'absorption d'un photon a donc lieu aux longueurs d'onde de la résonance des molécules. La vibration peut se présenter sous la forme d'une translation (énergie cinétique), d'une rotation (énergie cinétique), ou de vibrations (énergie cinétique et potentielle). Ces vibrations ressemblent à celles d'un oscillateur harmonique dont l'énergie est caractérisée par le nombre quantique des vibrations. L'absorption se fait sous l'effet d'un faisceau lumineux dont la fréquence est proche de celle de l'oscillateur. Ce type d'absorption concerne les domaines NIR et SWIR (1000-2500 nm). Le composé principal chimique impliqué à cette absorption est l'eau qui absorbe à 970 nm (faiblement), 1200 nm, 1450 nm, 1940 nm et 2500 nm.

IV.2.1.2. Diffusion du rayonnement électromagnétique

Le terme général de diffusion regroupe des phénomènes complexes de réflexion, de réfraction et de diffraction à la surface et à l'intérieur du milieu. A l'échelle macroscopique pour laquelle la surface rencontrée a une dimension supérieure à la longueur d'onde, des changements brusques d'indice de réfraction à la frontière entre deux milieux créent des limites optiques à chaque passage. Si la surface est suffisamment régulière par rapport à la longueur d'onde, les lois de l'optique géométrique sont valables : la lumière est en partie réfléchie de façon spéculaire²⁰ et en partie réfractée à la surface de séparation (lois de Snell-Descartes²¹). Dans le cas d'une surface rugueuse, il n'y a pas de direction privilégiée de la lumière réfléchie et les facettes composant la surface rugueuse réfléchissent la lumière dans toutes les directions, créant ce qui s'appelle la diffusion. Les surfaces naturelles ne sont ni

²⁰ Pour une surface parfaitement lisse la réflexion est directionnelle, et s'appelle « réflexion spéculaire ». Ce phénomène dépend de la rugosité relative de la surface par rapport à la longueur d'onde rencontrée mais aussi de l'angle de visé.

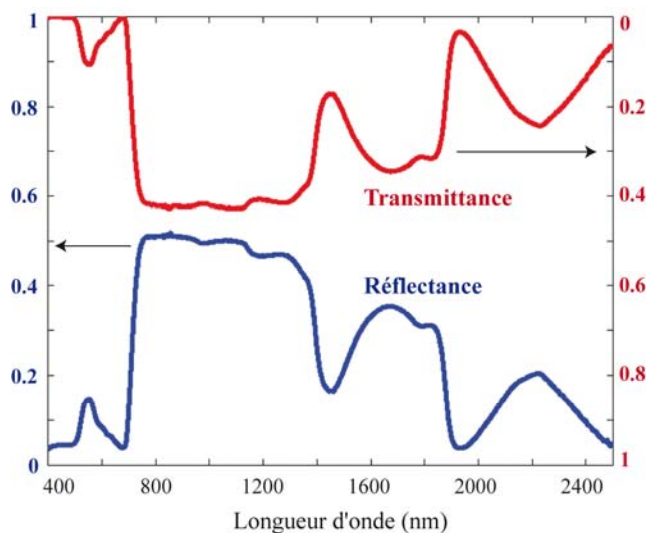
²¹ Ces lois sont à la base de l'optique géométrique ; elles décrivent les phénomènes de réflexion et de réfraction de la lumière à l'interface entre deux milieux.

parfaitement réfléchissantes ni parfaitement diffusante, et selon l'angle incident et la longueur d'onde, l'une ou l'autre peut être dominante.

En plus de la diffusion à la surface, la diffusion interne est aussi une composante qui sera ajoutée à la réflectance finale. Les particules rencontrées par la lumière qui pénètre dans le milieu peuvent réfléchir la lumière les unes vers les autres. Cela crée une réflexion souvent uniforme dans toutes les directions, dont une partie est observée par le capteur et apparaît dans le spectre de réflectance. La diffusion interne influence le spectre de réflectance en général en modifiant son albedo dans un certain intervalle de longueur d'onde. Ce phénomène se remarque surtout dans les régions de longueur d'onde où il n'y a pas d'absorbance spécifique du milieu.

Dans le cas d'un biofilm, la seule source possible de diffusion interne vient des parois cellulaires et de l'espace intracellulaire. Ces caractéristiques varient en fonction de la taille des cellules, mais aussi de la manière dont les cellules sont agencées. La diffusion à la surface, elle, est fortement liée aux propriétés de la première surface rencontrée par la lumière. Pour les biofilms, cette première surface est composée directement par les parois cellulaires. Au fur et à mesure de sa pénétration dans le biofilm, la lumière rencontre ensuite un certain nombre de limites optiques qui contrôlent sa distribution à l'intérieur du biofilm. Ces limites optiques correspondent notamment aux interfaces entre les cellules et l'espace intracellulaire. Plus l'espace intracellulaire est important, plus le niveau de diffusion augmente. Ce phénomène est bien connu et particulièrement prononcé dans le cas de la végétation supérieure. Par exemple, Gausman et al. (1970) ont mis en relation les niveaux de réflectance des feuilles vertes dans le domaine NIR avec le nombre d'espaces intracellulaires. Ce dernier est aussi un paramètre très important dans la modélisation du transfert radiatif des feuilles vertes (Jacquemoud et Baret 1990). Ainsi, c'est l'organisation anatomique des feuilles qui détermine les propriétés optiques dans ce domaine spectral (Grant 1987; Sinclair et al. 1973). Même dans le visible, le domaine d'absorbance des pigments, les propriétés de réflectance et de transmittance des feuilles sont fortement liées à leur structure interne. La structure de l'épiderme avec sa cuticule qui entoure la totalité de la feuille est capable de réfléchir la lumière transmise et c'est la raison pour la quelle les spectres de réflectance et de transmittance d'une feuille verte présentent la même forme (Figure IV.2). Qu'en est-il des biofilms ? Autant les études sur les propriétés de diffusion de la végétation supérieure sont nombreuses, autant celles concernant les biofilms sont, à notre connaissance, inexistantes.

Nous allons donc étudier comment la structure interne d'un biofilm modifie sa réponse spectrale en termes de diffusion à l'aide d'un modèle physique.



IV.3. Propriétés optiques d'un biofilm microphytobenthique

Dans cette partie, les processus d'absorption et de diffusion qui viennent d'être présentés sont étudiés dans le cas des biofilms de microphytobenthos à l'aide d'un modèle de propriétés optiques établi à partir d'une série de mesures précises faites au laboratoire. Cette partie reprend l'intégralité de la version originale de la publication de la revue « Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer ». Les détails des calculs sont reportés en Annexe. A.

Optical properties of microphytobenthic biofilms (MPBOM): Biomass retrieval implication

Abstract

MPBOM (MicroPhytoBenthos Optical Model) provides the optical properties, absorption coefficient and refractive index, of a laboratory simulated microphytobenthic biofilm by using the reflectance measurements derived from HySpex laboratory images, with the final aim of estimating photosynthetically active biomass. The high correlation between this biomass, expressed in chlorophyll *a* (mg Chl *a*.m⁻²), and the absorption coefficient at the corresponding absorption wavelength of Chl *a* (673 nm) yielded the estimation of biomass for any possible absorption coefficient calculated from reflectance measurements of any other data set. The latter was validated for an independent data set which performed an acceptable estimation of biomass in comparison with biomass measured by HPLC (R²=0.96). Finally, this model is designed to be applied to hyperspectral images, like airborne or satellite, in order to map biomass in the field.

Keywords: Microphytobenthos; Biofilm; Optical Properties; Radiative transfer; Photosynthetically Active Biomass; Chlorophyll *a*, Pigments

IV.3.1. Introduction

Microphytobenthos (MPB) consists of unicellular phototrophic microorganisms, dominated by diatoms (Bacillariophyceae class) at northern mid-latitudes (Europe and America), and inhabiting the first millimeters of sediment. Epipelagic diatoms (Figure IV.3-a) until now the most studied group of MPB, are able to migrate through the sediment and form a brown biofilm at the mudflat surface during diurnal low tide (e.g. Jesus et al. (2009), MacIntyre et al. (1995), MacIntyre and Cullen (1996) and Underwood and Barnett (2006); Figure IV.3-b). These biofilms are easily observable (Figure IV.3-c) and can cover several hectares (Combe et al. 2005; Guarini et al. 1998; Méléder 2003; Méléder et al. 2003a). In highly turbid intertidal areas, MPB contributes up to 50% of primary production

(e.g. Underwood and Kromkamp (1999)). Thus, it is frequently the major primary producer in estuarine mudflat systems (MacIntyre et al. 1995; MacIntyre and Cullen 1996; Underwood and Kromkamp 1999), where it represents a significant food source for cultivated oysters (e.g. Middleburg et al. (2000)). MPB also has an important role in the mediation of nutrient fluxes between sediment and the water column (Cabrita and Brotas 2000) and exudes extracellular polymeric substances (EPS) which can have a strong influence on sediment stabilization (Paterson 1989). Despite the importance of such ecosystem functioning, only a few studies have dealt with microphytobenthic structure, including biomass assessment, using field samples at mesoscale (Brotas and Plante-Cuny 1998; Jesus et al. 2009; Lucas and Holligan 1999; Méléder et al. 2005; Méléder et al. 2007; Saburova et al. 1995) and only one at macroscale (Guarini et al. 1998) because of the difficulty of reaching the muddy regions. Therefore, remote sensing became an important tool to detect at once on a wide area, from an aircraft or from a satellite, a collection of pigments (chlorophylls and carotenoids) revealing the presence of a phototrophic assemblages like MPB (Combe et al. 2005; Jesus et al. 2009; Jesus et al. 2008; Méléder 2003; Méléder et al. 2010; Paterson et al. 1998). The chlorophyll *a* (Chl *a*) is the main photosynthetic pigment commonly used as oceanic plant biomass and productivity indicator (Jeffrey et al. 1997b). In case of MPB study, Chl *a* is an indicator of photosynthetically active biomass (Kelly et al. 2001; Méléder et al. 2005), although this biomass estimator has some limitations because of carbon/Chl *a* ratio variability (De jonge 1980). It displays a specific spectral response in accordance with the fraction of MPB cell raising the top of mudflat due to cell concentration but also by the substrate on which the biofilm is formed. Such a complex problem could cause an inaccurate estimation of biomass by semi-empirical methods (Combe et al. 2005; Méléder et al. 2003a). To overcome these difficulties, the present work focused on constructing a physical model which links MPB photosynthetically active biomass concentration per area of substrate, expressed in mg Chl *a*.m⁻² called 'MPB biomass', to spectral data by means of the inherent optical properties of the biofilm. Several studies have presented empirical or physical models of spectral absorption characteristics as a function of the pigment concentration of phytoplankton in water (Bricaud et al. 2007; Bricaud and Stramiski 1990; Froidefond et al. 2002; Gohin et al. 2002) and also the diatom cell suspension in water (Shibata et al. 1954). Until now, however, no model has been proposed to predict the pigment content or biomass of the MPB biofilm. Therefore, the simulation of a biofilm and its spectral properties still remains a challenge.

In this work, we are interested in estimating the optical properties of a biofilm simulated in laboratory, MicroPhytoBenthos Optical Model (MPBOM), and describing the essential properties of a natural biofilm combined with the substrate effect. This modeling approach requires data acquired under controlled conditions and in the absence of other effects influencing field data such as roughness and shadowing. Thus, the determination of the optical properties of MPB biofilm involved estimating the characteristics of both scattering and absorption. In fact, these characteristics are highly correlated with the biophysical and biochemical parameters of a biofilm and are represented by refractive index and absorption coefficient respectively. The latter is directly affected by pigment content and thus could be used to estimate some quantitative information such as the biomass.

The proposed model is mainly based on radiative transfer formulae and the assumption that a biofilm is a thin homogenous layer. Following Khashan and El-Naggar (2000) and Nichelatti (2002), a thin homogenous layer is characterized by its absorption coefficient, α , and refractive index, n , calculated using reflectance/transmittance spectra. In order to study more precisely the scattering and absorption properties of a biofilm, two kinds of biofilm were analyzed. The first was formed by cells deposited on a polycarbonate substrate, and the second one by cells trapped in a gelatin substance to assess the scattering properties of the cells. Finally, a new data set was used in order to test and validate the most reliable model of MPB, in both direct and inverse mode.

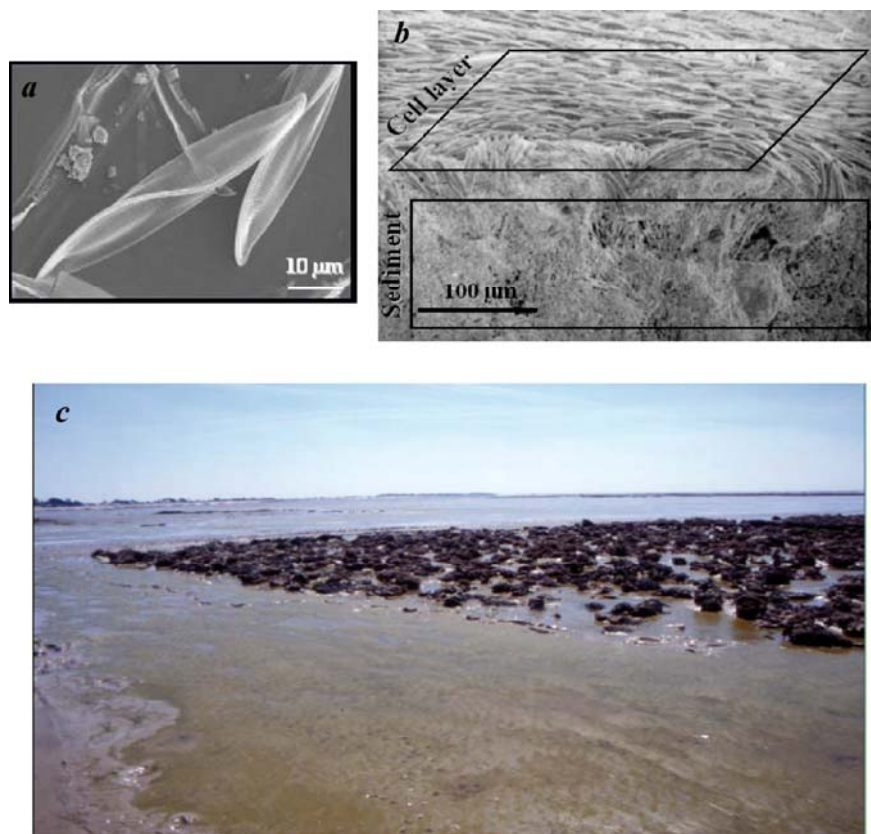


Figure IV.3 : (a) *Entomoneis paludosa* frustules under a Scanning Electron Microscope (SEM) (b) microscopic view of a vertical section of layered cells on the sediment surface, from Guarini et al. (2000). (c) visible biofilm on the sediment surface of the intertidal zone during diurnal low tide.

IV.3.2. Materials and methods

IV.3.2.1. Biological preparation and sample collection

The diatom strain used in this study, *Entomoneis paludosa* belonging to the Bacillariophyceae class, Naviculales order [(W. Sm.) in in Reimer and Patrick (1975)], characterized by a Chl *a* content reaching up to 0.5 % of the total amount of the dried organic matter, was provided by Nantes Culture Collection (NCC WDCM 856; strain ref. NCC 18). It was grown in f/2 medium (Guillard 1975) under controlled conditions in a laboratory culture room ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in a 14/10 h light/dark cycle at 14°C in a 5 L medium-sized flask). The biofilms, including the cells incorporated in a matrix of EPS were grown covering the inner surface of the flask. Blended cells and EPS in the flask by magnetic agitation were sampled and diluted in filtered sea water to obtain a set of various suspensions of cells and EPS concentrations (Méléder et al. 2003b). Cells and EPS were then deposited on white polycarbonate (PC) filters (47 mm Ø; porosity: $0.4 \mu\text{m}$) by slow filtering ($\sim 2.5 \text{ mm Hg}$) to simulate a biofilm (Figure IV.4-a, Méléder et al. (2003b)). For each concentration we

prepared 3 equivalent samples for statistical purpose, giving a total number of three datasets. Nine increasing concentration filters were prepared in three examples for a final number of 27 filters. However, the presence of the filters prevents the deposit of the biofilm in direct contact on a mud substrate. Therefore, a mixture of *E. paludosa* culture cells and gelatin (low melting point agarose from Sigma (A-9414)) was prepared (Figure IV.4-b). Due to the volume limitation of these types of preparation, the initial culture was centrifuged at low g-force (4000) in order to reduce its volume (from 2 L to 5 mL) and to obtain a cell concentration of about 3.8×10^7 cells mL^{-1} . The total sample volume of each concentration, containing agarose (40%) and culture (60%), was homogenized using a vortex mixer. The culture was diluted with seawater to provide various concentrations of cells in suspension in the agarose to simulate biofilms which could then be deposited directly on different backgrounds.

In addition to the laboratory made samples, measurements were carried out on a field sample in laboratory. This sediment sample, covered by a noticeable biofilm, was brought to the laboratory and kept immobile in the culture room. Such a sample conserves its tidal diurnal rhythm for a few days after sampling (Paterson 1986). The samples were monitored in the laboratory for three hours in order to study the effect of cell migration on reflectance spectra.

The validation was carried out with a new data set made by slow filtering of *E. paludosa* culture cells on white fiberglass filters (GF/C) instead of polycarbonate filters.

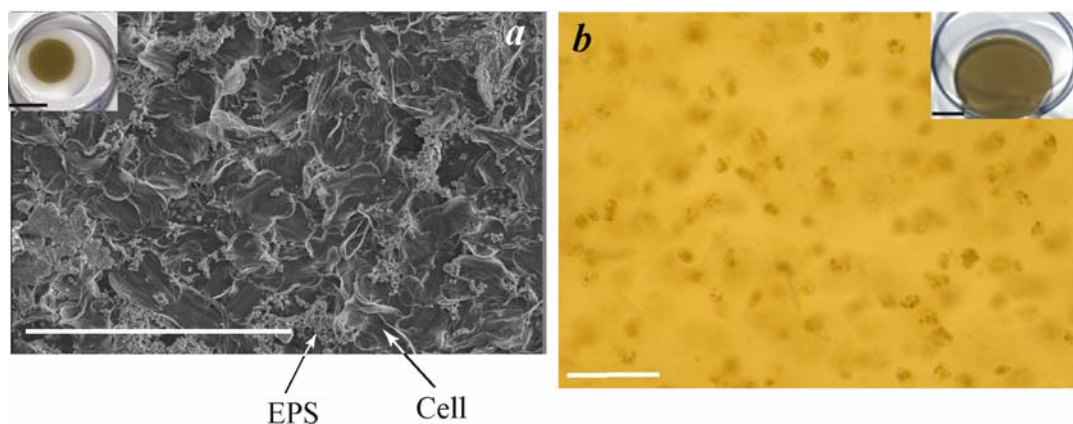


Figure IV.4 : Microscopic views of simulated samples: (a) cells deposited on a polycarbonate filter seen by SEM. Cells and EPS are clearly detectable on the image. (b) cells in suspension in agarose seen by optical microscope (white lines represent $100 \mu\text{m}$). Full size samples are presented in the upper corners of the pictures (black lines represent 1 cm).

IV.3.2.2. Laboratory spectral measurements

The reflectance spectra of samples were collected in the laboratory with a nadir looking VNIR-1600 HySpex hyperspectral camera. The light reflected on a scene is collected by a fore optic and passes through a slit as a narrow line. After collimation, a transmission grating system separates the different wavelengths of light which are focused onto a Si CCD detector array. Consequently, for each pixel interval along the line defined by the slit, a full spectrum is projected onto a column of array detectors. The spectral sampling between 400 and 990 is 3.7 nm. This instrument images the scene, line by line, using a pushbroom scanning mode and is set in the laboratory to scan samples with square pixels providing a spatial resolution of about 0.2 mm per pixel for an elevation of 1 m above the scene. Illumination was provided by a halogen quartz lamp (100 W) positioned 35 cm above the target with a vertical angle of 40°. The camera first acquired a dark line and stored, during the scan, a raw image, line by line, with a digital count (DN) per pixel proportional to the detector sensitivity tuned by integration time and frame period used to limit the smearing effect. An average of 10 acquisitions per line (and thus per pixel) maximizes the signal to noise ratio. The HySpex radiometric calibration software transforms each DN pixel into radiance with a scaling factor. It includes a correction of the non-uniformity between pixels inherent in the sensor. Each taken image contained samples and also a reference panel, a 99% reflectance Spectralon®, for reflectance calculation. The reflectance is given by dividing each column of the image by the mean intensity of the Spectralon® taken in the same scene to avoid the residual non-uniformity of the sensor. Multiplication by the standard Labsphere 8° Hemispherical Spectral Reflectance Factor of the 99% Spectralon® is not required since it is equal to 99% in the effective spectral range used in this study (500 to 900 nm).

Filter samples were observed on two backgrounds (Spectralon®, reflectance = 99% and 50%) and the agarose samples were measured on a 99% Spectralon® and a dark velvet panel. The experimental data set presented in the following study contains the average spectra collected by ROIs (Region Of Interest from ENVI tool) surrounding the overall filter surface covered by cells. Each average reflectance spectrum corresponds to one prepared filter, giving a total number of 24 spectra (three filters had been damaged during the experimentation) which provides the radiometric dataset.

Reflectance spectra of the field sample, brought to the laboratory, were measured from 2 hours before to 2 hours after the local maximum low tide (12:30 UT) with a time interval of about 15 minutes.

For the validation data set, the reflectance of samples and backgrounds was measured above a white panel by an ASD FieldSpec3 spectrometer. An average of 10 acquisitions was made for each sample in order to reduce noise.

IV.3.2.3. Pigment analysis by HPLC

Immediately after their spectral analyses, the filters were stored at -80°C until their pigment analyses by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The HPLC device consisted of a dual-piston pump (Waters 600 E), an automatic injector (Waters 715 Ultra Wisp) connected to a separating column in inverse phase C18 (Waters NovoPack C18 150 \times 3.9) preceded by a pre-column (Waters NovoPack C18), and a photodiode array detector (Waters 996). HPLC data were obtained using Millennium32 software. For pigment analyses, extraction and elution protocols were those adapted by Méléder et al. (2003b) from Mantoura and Llewellyn (1983). This method enabled the separation of about 30 chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products. After sample injection (100 μL), pigments were eluted as a function of their polarity, and then detected by diode array measurements of their absorption spectra between 400 and 800 nm. The identification was carried out by comparing the absorption properties with a spectral library of standard pigments (Brotas and Plante-Cuny 1998; Méléder et al. 2003b). Following the calibration protocol, the biomass of each identified pigment was estimated from peak areas of chromatograms at 440 nm and finally the pigment content was expressed per surface unit: $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$. For some pigments, concentrations were added together because their absorption properties and chemical structures are similar: chlorophyll a and its allomer, chlorophyll c1 and c1+c2, fucoxanthin and fucoxanthin-like compounds. The ubiquitous pigment in the plant kingdom, chlorophyll a (Chl *a*), was used as the proxy of MPB biomass, as in numerous MPB studies (De jonge 1980; Méléder et al. 2003a; Méléder et al. 2005; Murphy et al. 2005). However, Chl *a* is not the only pigment responsible for MPB optical properties. Indeed, pigments characterizing diatoms, Chl *c*, fucoxanthin (Fuco), diadinoxanthin (DD) and diatoxanthin (DT), also play an important role in absorption bands within the reflectance spectrum (Méléder et al. 2003b). These pigments, except Chl *c*, are produced as a physiological response to environmental variation, particularly in light conditions (Jesus et al. 2009) which could occur during the experimentation. Therefore, it was necessary to estimate the fraction of these pigments for each biomass, to ensure that the variation in the MPB optical properties was solely due to biomass variation, estimated by increased Chl *a* content, and not to light variation. The ratios

used to estimate the physiological response of cells were Fuco/Chl *a* and DD/(DT + DD) (Lavaud 2007). Variations in these ratios were analyzed using the relative standard deviation (RSD) which is the absolute value of the variation coefficient. The RSD is widely used to express the precision and repeatability of an assay: the lower is the value, the smaller is the deviation from the average.

Finally, the values of Chl *a* concentration, corresponding to each of 24 filters, provides the biomass dataset.

IV.3.3. Experimentation results

IV.3.3.1. Pigment composition and absorption

Ten pigments were identified as chlorophylls and carotenoids on the basis of their absorption properties measured by HPLC and their retention time (see Méléder et al. (2003a) and Tableau IV.1). Maximum measured absorption wavelengths and elution orders were similar to those in the standard pigment library and the literature (Jeffrey et al. 1997a). The major pigments were those with the highest biomass: chlorophyll *a*, fucoxanthin, chlorophyll *c* and diadinoxanthin. Other pigments were considered as minor: diatoxanthin, and β -carotene. Diatoxanthin was detected in only half of the analyzed samples corresponding to the highest biomass. The five pigments having the greatest influence on the reflectance spectra regarding their *in-vitro* absorption properties, measured by HPLC, are illustrated in Figure IV.5. They all absorb *in-vitro* (solvent eluent) between 400-550 nm which makes a wide absorption band in this wavelength range *in-vivo* whereas the *in-vitro* absorption peaks of Chl *a* (665 nm) and Chl *c* (630 nm) are distinguishable by their *in-vivo* absorption peaks (673 nm for Chl *a* and 633 nm for Chl *c*), respectively. The narrow absorption peak of Chl *a* at 673 nm is of great importance because it is located where no other pigment absorbs. This is why Chl *a* is considered, radiometrically, as MPB index and is an important point to recognize and distinguish MPB biofilms from other materials in terms of image classification. In addition, both ratio values \pm RSD are: 0.57 ± 0.09 and 0.99 ± 0.01 for Fuco/Chl *a* and DD/(DT+DD) respectively. These values of RSD indicate that pigment contents did not vary during the period of the experiment and the spectrum shape changes are only due to the biomass variation and substrate/background type.

Tableau IV.1 : Pigment characterizations by HPLC: retention time, absorbance maxima and biomass range ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$) for both data sets (calibration and validation) and for all detected pigments.

Pigment name	Retention Time (min)	Maximum absorption wavelengths					Biomass range (Calibration)		Biomass range (Validation)	
							Min	Max	Min	Max
Chlorophyll c_1	3.24	442		573	630		0.20	4.92	0.09	2.9
Chlorophyll c_1+c_2	4.21	443		580	632					
Fucoxanthin	7.49	451	(465)							
Fucoxanthin-like 1	9.23	451	(465)				0.95	25.22	0.51	26
Fucoxanthin-like 2	9.51	451	(465)							
Diadinoxanthin	10.14	447	477				0.04	1.24	0.12	4.8
Diatoxanthin	11.21	453	481				0.00	0.03	0.00	0.07
Chlorophyll a allomer	14.62	428			618	665				
Chlorophyll a	15.11	431		(581)	618	665	2.36	42.72	0.9	38
β -carotene	17.87	453	481				0.00	0.48	0.00	0.34

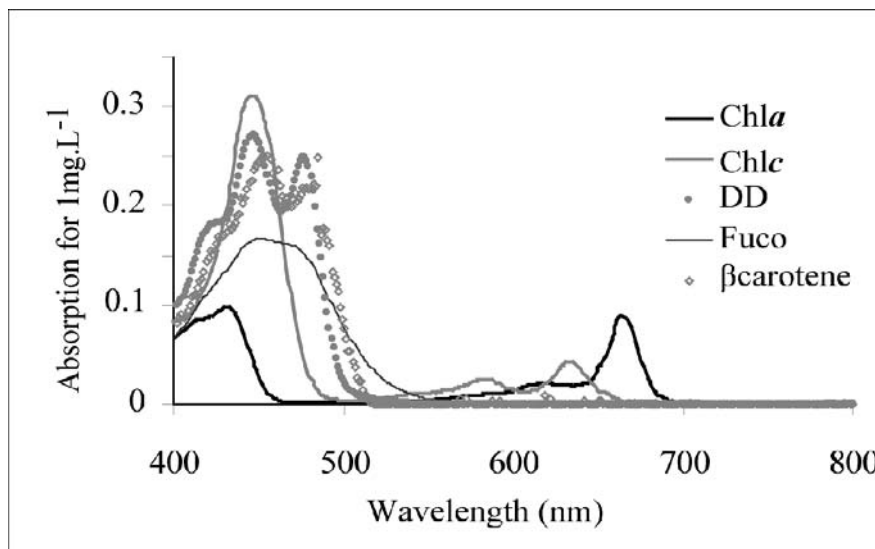


Figure IV.5 In-vitro (solvent eluent) absorption coefficients of pigments present in *Entomoneis paludosa* sample.

IV.3.3.2. Spectrum interpretation

The reflectance spectra of the field sample for the same pixel observed at 10:30 and 12:30 (time of maximum tide) are presented in Figure IV.6. Obviously, having more migrated cells in the mud surface makes the reflectance spectrum deeper in the visible wavelength region (VIS), the pigment absorption region (Figure IV.5), but does not affect the spectral response in the near infrared region (NIR). The reflectance spectra of 3 increasing biomasses (arrow direction) layered on PC filters and deposited on two different backgrounds (99% and

50% Spectralon®) are illustrated in Figure IV.7-a and b, respectively. Each spectral response varied with biomass and substrate surface reflectance. They all reach the background reflectance (dashed lines) in the NIR, regardless of the biomass variation and background, and they all present a deepening of pigment absorption features with increasing biomass, similarly to those observed for natural biofilms on the sediment surface. The flattening of spectra between 500 and 673 nm at high biomass is commonly attributed to a saturation phenomenon.

The reflectance spectra of agarose samples of three different concentrations, measured above the light (99% Spectralon®) and dark (black velvet) backgrounds, are shown in Figure IV.7-c and d. For a light background, the full reflectance spectra decrease with increasing biomass. A stronger deepening, however, occurs in pigment absorption feature bands. For a dark background (Figure IV.7-d), the reflectance does not change with biomass in the VIS. On the contrary, the reflectance increases with increasing biomass in the NIR, which was never seen on natural biofilms. This suggests that cells in suspension in agarose probably disperse the light and increase the reflectance.

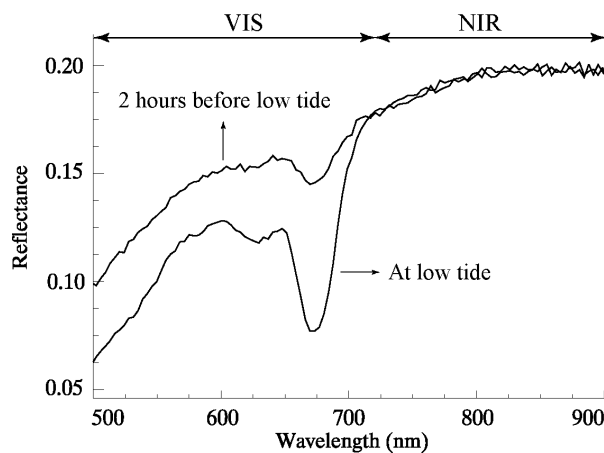


Figure IV.6 : Reflectance measurements of a field mud sample in the laboratory. The biofilm forms during the low tide and the spectra are measured for the same pixel at an interval of 2 hours (before the maximum low tide, 10:30 UT and at maximum low tide, 12:30 UT).

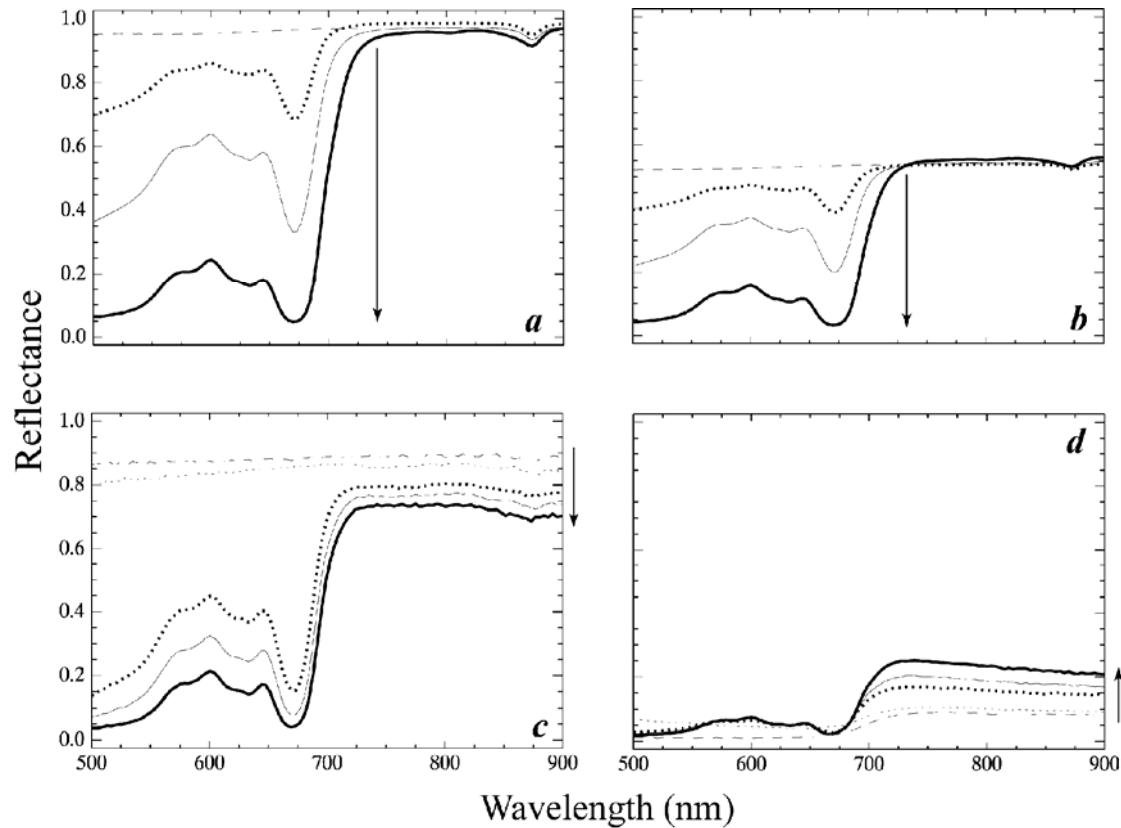


Figure IV.7 : Measured reflectance spectra: (a), (b) polycarbonate samples of three increasing biomasses deposited on two different backgrounds (dashed lines: blank (humidified) polycarbonate filters on 99% and 50% reflectance Spectralon®); (c) and (d) agarose samples with light and dark backgrounds for three increasing biomasses respectively (dashed lines: background reflectance spectra; upper dotted lines: reflectance spectra of a 100% agarose sample). The arrows show the increasing concentration.

IV.3.4. Modeling

the biofilm as a homogenous compact layer, the dense medium radiative transfer models (e.g. Duntley (1942); Park and Deering (1982) and Stokes (1860)) generally based on Kubelka formalism (Duntley 1942; Kubelka 1948; Park and Deering 1982; Stokes 1860), are applicable for the estimation of optical properties. The classical theory of Kubelka and Munk has been tested successfully on green leaves and plant canopies (Allen et al. 1969; Jacquemoud and Baret 1990) and seems to be a versatile approach for MPB. The input data required for the radiative transfer model are the inherent reflectance R and transmittance T of the MPB biofilm. These data were derived from the reflectance measurements by varying biomass and background with both types of sample (filters and agarose). The aim was to provide the optical properties (absorption coefficient α and refractive index n) for biomass prediction.

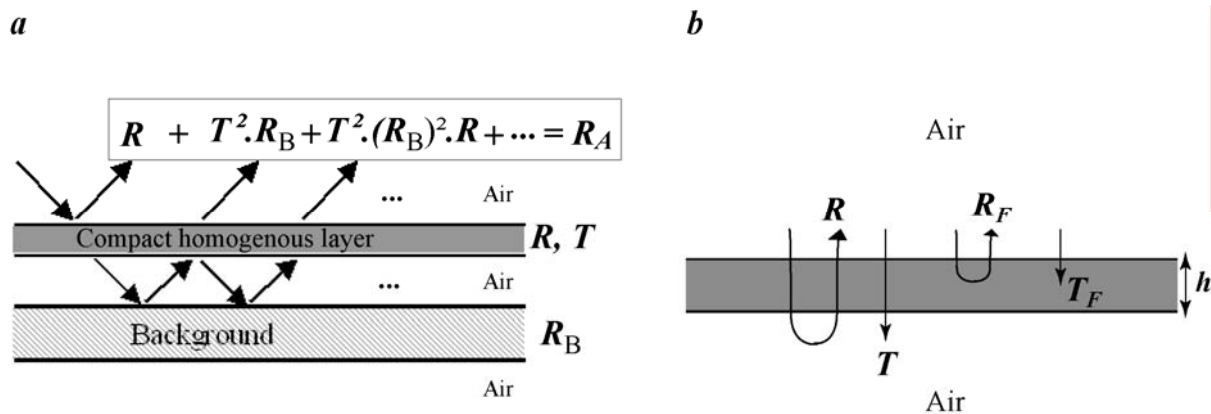


Figure IV.8 : (a) theoretical model of layer-background-light interaction. R_B is the background reflectance, R and T represent the reflectance and transmittance of the layer and R_A is the apparent reflectance, measured by hyperspectral instruments. (b) ray tracing showing how light is reflected and transmitted at the front and rear interfaces of the layer: h , geometrical thickness of the layer; R and T , the same as in (a); R_F and T_F , interface reflectance and transmittance of a single face. Samples are considered to be immersed in air.

IV.3.4.1. Biofilm reflectance and transmittance estimation

The reflectance and transmittance of a homogenous compact layer having two rough plane-parallel faces and with an assumption of similar adaxial and abaxial reflectance, deposited on a background, are depicted in Figure IV.8-a. According to Lillesaeter (1982) and Miller et al. (1992), the reflected radiation R_A can be considered to be made up of (1) the inherent layer reflectance R with an ideally black background and (2) the multiple background reflectance R_B , which is the radiation reflected from the actual non-black background, modified by the transmittance T of the overlying layer. Having the apparent reflectance for a layer overlying at least 2 different backgrounds of known reflectance, the inherent layer reflectance and transmittance could be estimated (Eqs. IV.1-IV.3).

The calculated inherent reflectance spectra of the agarose samples of three increasing biomasses are illustrated in Figure IV.9-a. In the VIS region, the inherent reflectance spectra are definitively independent of the biomass. A systematic increase in reflectance in the NIR region with increasing biomass is clearly observable while, inversely, the transmittance decreases with increasing biomass Figure IV.9-b, due to the internal structure of agarose samples (discussed in section IV.3.5).

$$R_{A(1,2)} = R + \frac{R_{B(1,2)} \cdot T^2}{1 - R \cdot R_{B(1,2)}} \quad \text{IV.1}$$

$$R = \frac{R_{A1}R_{B2} - R_{A2}R_{B1}}{R_{B2} - R_{B1} - R_{B1}R_{B2}(R_{A2} - R_{A1})} \quad \text{IV.2}$$

$$T^2 = \frac{(R_{A1} - R)(1 - R \cdot R_{B1})}{R_{B1}} = \frac{(R_{A2} - R)(1 - R \cdot R_{B2})}{R_{B2}} \quad \text{IV.3}$$

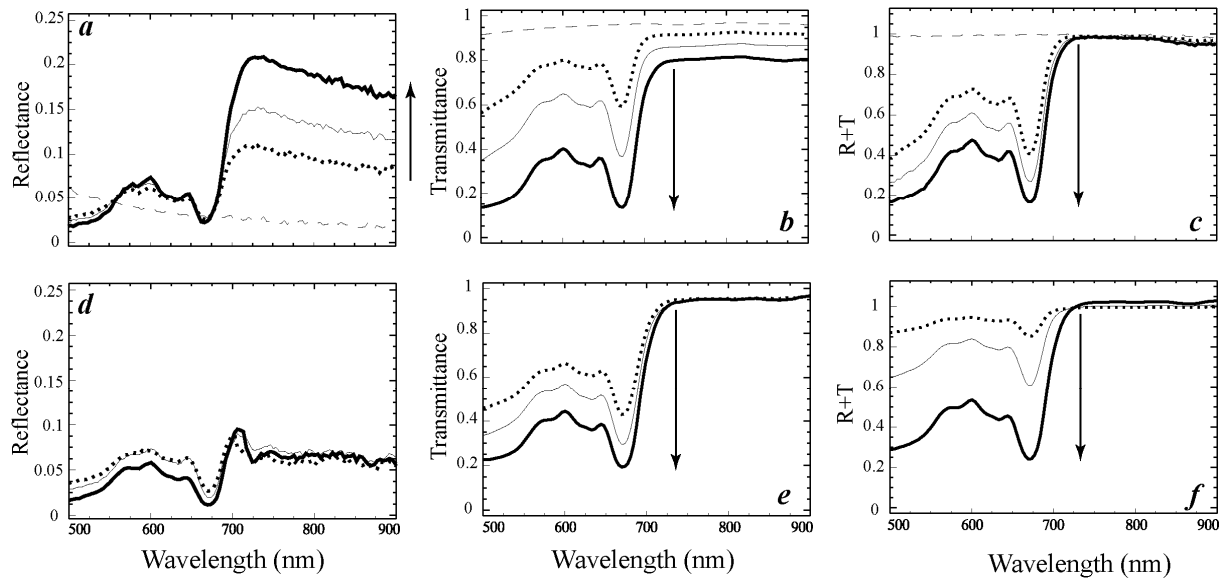


Figure IV.9 : Calculated values of (a) Reflectance, (b) Transmittance and (c) Reflectance + Transmittance for 3 different concentrations of gelatin samples starting with a pure gelatin one. (d), (e) and (f) the same for biofilms on PC filters. The arrows show the increasing cell concentration.

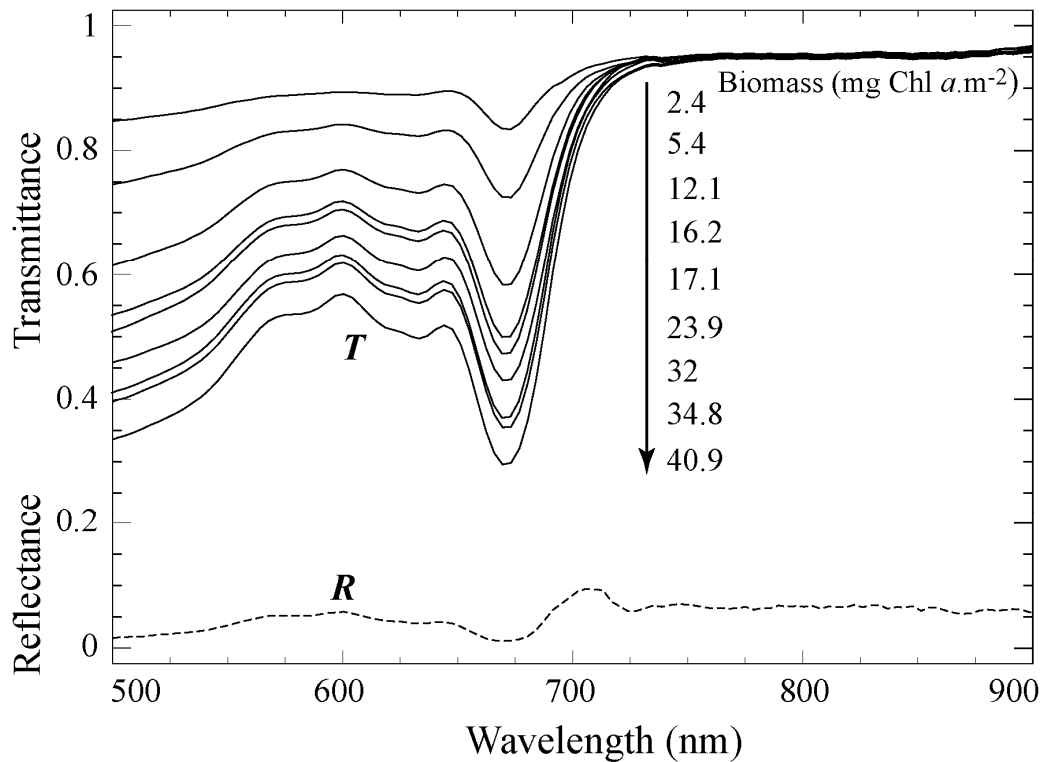


Figure IV.10 : Selected reflectance (dotted line) and calculated transmittance (solid lines) for increasing biomasses of filters for only one dataset.

Owing to the principal of energy conservation: **Absorption + Transmittance + Reflectance** is equal to 1. Summation of **R** and **T** spectra, for any biomass, reaches the maximum value of 1.0 in the NIR region (Figure IV.9-c) and confirms the absence of any absorption parameter in this region (**R+T=1; A=0**).

For the three increasing biomasses deposited on filters, the calculated inherent reflectance spectra are presented in Figure IV.9-d. They are very similar to each other. In the absence of the internal structure between cells spread on filters, without noticeable intercellular space contrary to agarose sample, the inherent reflectance spectra stay invariant in the VIS and NIR as biomass varies. The slight gap between calculated reflectance spectra in the VIS is attributed to the heterogeneity produced by cells scattered on filters while high biomass probably covers the filters more homogeneously. The reflectance calculated from this most homogeneous sample can therefore be considered as the best reflectance estimate of any biomass of MPB biofilm lying directly on a substrate.

The corresponding calculated transmittance spectra are shown in Figure IV.9-e and, interestingly, the transmittance spectra in the NIR are also independent of biomass variation. In any case, the summation of Reflectance and Transmittance reaches 1.0 (Figure IV.9-f) and shows again that the absorption is null in the NIR ($\mathbf{R}\sim 0$; $\mathbf{A}=0$; $\mathbf{T}\sim 1$). Finally, the transmittance spectra of all filters of one of the three data sets are calculated from the inherent reflectance of the highest biomass using Eq.3 (see this dataset in Figure IV.10). The inherent reflectance spectrum is illustrated on the same plot as the transmittance calculation to compare the low values of reflectance vs. the transmittance spectra.

IV.3.4.2. Optical properties of biofilm

An isolated biofilm of benthic cells, without any background effect, was considered as a partially absorbing layer with plane-parallel faces and immersed in air (Figure IV.8-b). The reflectance and transmittance of such an absorbing layer result from Fresnel reflection and transmittance of both faces (\mathbf{R}_F and \mathbf{T}_F), together with pigment absorption. According to the Fresnel formulae for an incidence angle of θ :

$$R_F = \frac{(\sqrt{n^2 - \sin^2(\theta)} - \cos(\theta))^2 + k^2}{(\sqrt{n^2 - \sin^2(\theta)} + \cos(\theta))^2 + k^2} \quad \text{IV.4}$$

$$T_F = \frac{4 \sqrt{n^2 - \sin^2(\theta) + k^2}}{(\sqrt{n^2 - \sin^2(\theta)} + \cos(\theta))^2 + k^2} \quad \text{IV.5}$$

where n is the refractive index, k is the extinction coefficient and \mathbf{R}_F and \mathbf{T}_F represent the interface reflectance and transmittance of the layer respectively.

In the inverse mode, scattering and absorption parameters can be derived from the reflectance and transmittance of the layer. An infinite summation over the multi-reflected contribution of the faces gives the reflectance and transmittance of the layer:

$$R = R_F + \frac{R_F T_F^2 \exp(-2\alpha.h)}{1 - R_F^2 \exp(-2\alpha.h)} \quad \text{IV.6}$$

$$T = \frac{T_F^2 \exp(-\alpha.h)}{1 - R_F^2 \exp(-2\alpha.h)} \quad \text{IV.7}$$

for a layer having a geometrical thickness, h , and an absorption coefficient α . According to Lambert's absorption law, the attenuation factor η is defined as:

$$\eta = \exp(-\alpha.h) \quad \text{IV.8}$$

By combining Eqs. 4, 5, 6, 7 and 8, we obtained (Khashan and El-Naggar 2000 and Nichelatti 2002):

$$R_F = \frac{R}{1 + \eta.T} \quad \text{IV.9}$$

$$T_F = \left[\frac{(1 - \eta^2 . R_F^2) . T}{\eta} \right]^{0.5} \quad \text{IV.10}$$

Khashan and El-Naggar (2000) proposed an iterative method to estimate the attenuation factor (η) from R and T . η is initialized to 1 to give, with Eqs. IV.9 and IV.10, a first estimation of R_F and T_F . As the sum of R_F and T_F gives a new estimation of η , the loop continues until the difference between 2 consecutive calculations of η becomes smaller than 0.001. The absorption coefficient α of the biofilm can be regarded as a superposition of m separate specific absorption coefficients K_i of m pigments in concentration C_i (Jacquemoud and Baret 1990):

$$\alpha = \sum_i^m K_i . C_i \quad \text{IV.11}$$

The thickness, h , is a function of concentration (the more concentrated the filter is, the thicker the biofilm will be). Thus, the h parameter is explicitly considered in absorption coefficient α (Jacquemoud and Baret 1190), and can be neglected giving:

$$\eta = \exp(-\alpha) \Rightarrow \alpha = -\ln(\eta) \quad \text{IV.12}$$

Finally, the refractive index n can be derived from interface reflectance and transmittance (Eqs. IV.4 and IV.5) as below:

$$n = \left[\cos^2(\theta) \cdot \left(\frac{1 + \sqrt{R_F}}{1 - \sqrt{R_F}} \right)^2 + \sin^2(\theta) \right]^{0.5} \quad \text{IV.13}$$

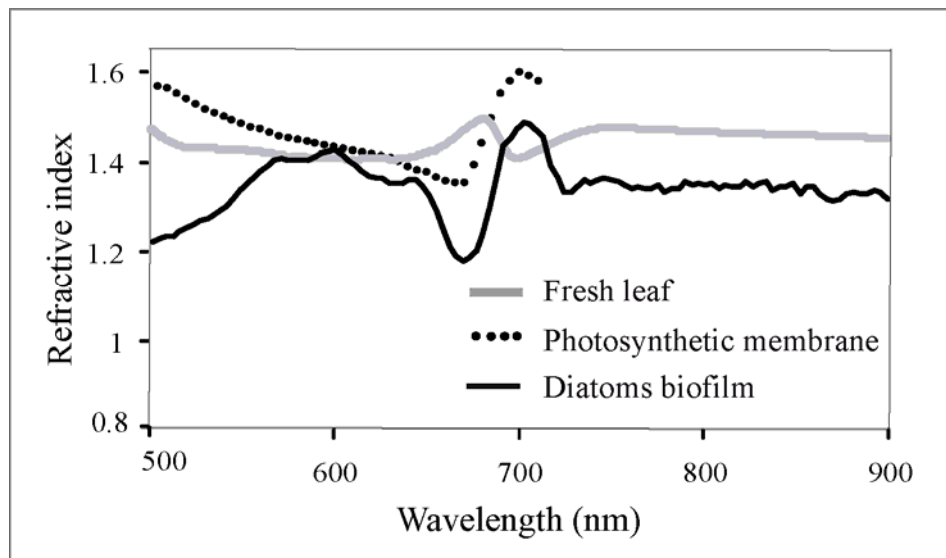


Figure IV.11: Calculated refractive index for a biofilm on a PC filter. Below, a comparison of these values with those used in PROSPECT-4 (the green leaf radiative transfer model of Jacquemoud and Baret (1990)) and the photosynthetic membrane of Paillotin et al. (1998).

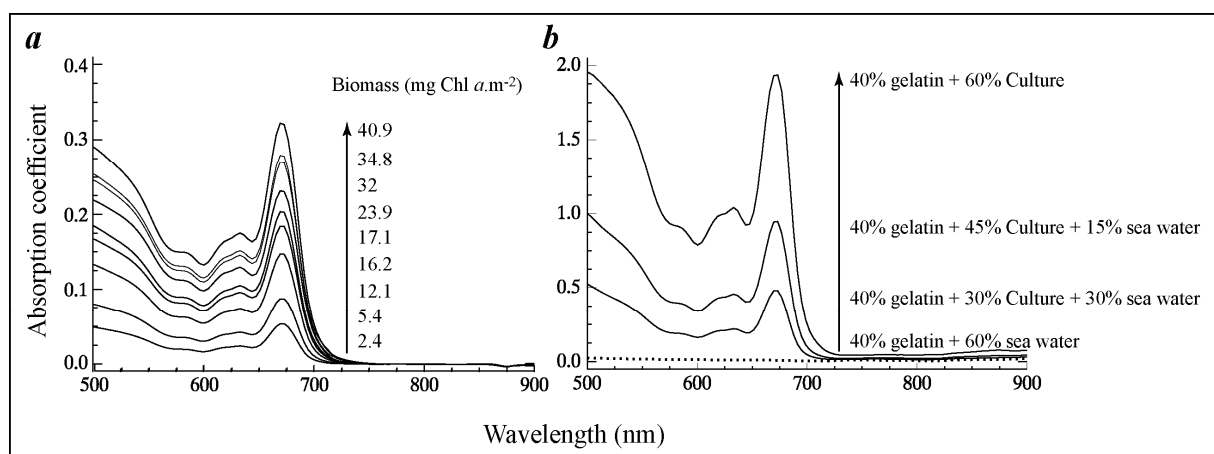


Figure IV.12 : Calculated absorption coefficient of: (a) biofilms on PC filters of one dataset, (b) agarose samples. Arrows show the increasing biomasses.

As this is the first refractive index ever calculated for MPB biofilm (Figure IV.11), it is compared with similar ones used in PROSPECT4 (the green leaf radiative transfer model of Jacquemoud and Baret (1990)), and for a photosynthetic membrane (Paillotin et al. 1998). These spectra are nearly identical in the 550-650 nm range but they all display different undulating spectra around the Chl *a* absorption feature.

The calculated absorption coefficients for 9 filter samples of the same dataset with increasing biomass are shown in Figure IV.12-a and the same for three agarose samples (starting with a pure agarose sample) in Figure IV.12-b. Absorption properties of all biofilms are null in the NIR as expected.

IV.3.4.3. Biomass estimation from absorption coefficient

Since Chl *a* seems to be the only absorbing pigment at 673 nm (as shown in section IV.3.3), a simple linear regression between the absorption value at this wavelength and the biomass given by HPLC gives the function of transformation. Figure IV.13 displays the absorption coefficient values of all three datasets (24 filters) versus their biomass values (mg Chl *a* .m⁻² measured by HPLC). Absorption coefficient values, performed for each sample on the same ROIs, were calculated for a mean and a standard deviation of each selected ROI. The latter were illustrated by horizontal error bars, representing the heterogeneity of samples. The regression line, passing through all points, between absorption peak at 673 nm of each sample ($\alpha_{673\text{nm}}$ and their corresponding Biomass in mg Chl *a* .m⁻² is:

$$\text{MPB Biomass} = 96.9 \alpha_{673\text{nm}} \text{ with } R^2 = 0.96 \text{ (p<0.001)}$$

IV.14

As the calculation of optical properties is based on some hypotheses and assumptions, the model was tested with the original data set. The apparent reflectance spectra were reproduced using the calculated absorption coefficient and refractive index and the results were compared with the original measured reflectance spectra for three samples of various cell content deposited on two different backgrounds (Figure IV.14). They all display a good match between the simulated and measured reflectance, which could justify the proposed hypothesis.

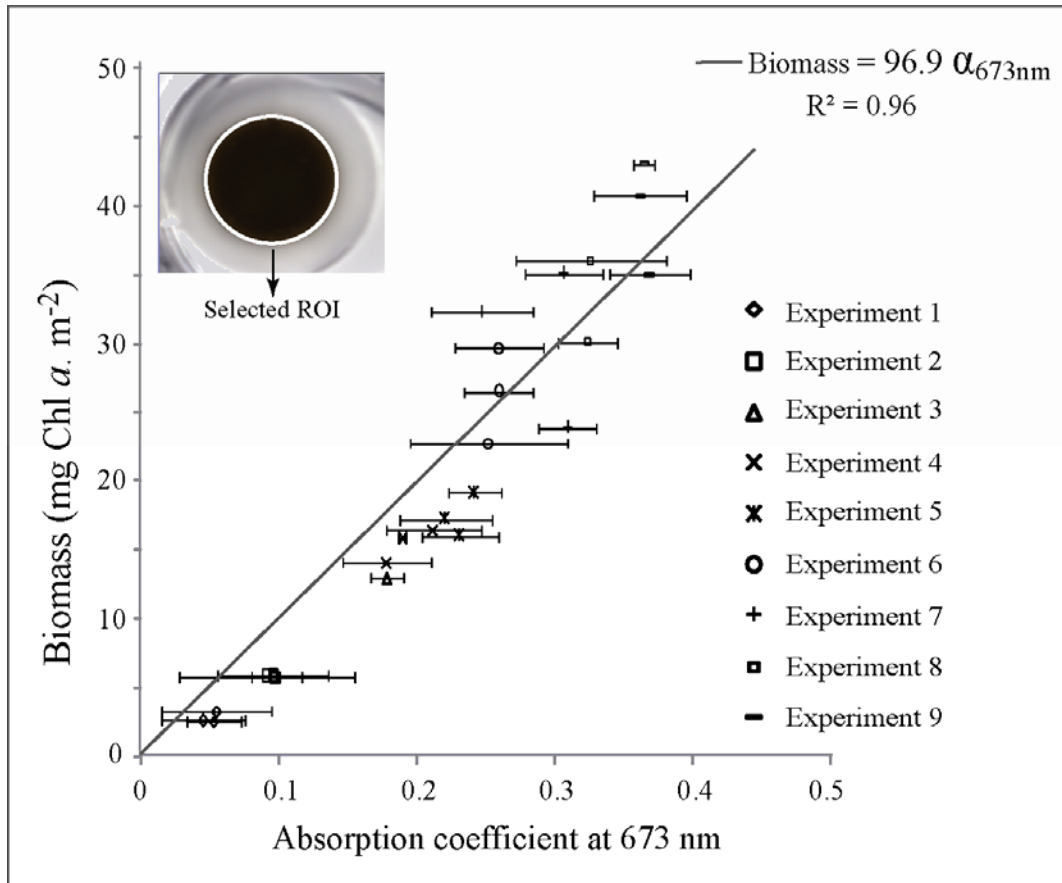


Figure IV.13 : Linear regression between absorption coefficients at 673nm derived from model versus measured biomasses by HPLC. Absorption coefficient ($\alpha_{673\text{nm}}$ has been calculated on a region of interest (ROI in ENVI tools) covering the overall surface covered by cells on the HySpex image The regression line between biomass and absorption coefficient was calculated from these mean values and the corresponding biomass measurements by HPLC. A few samples were damaged during the process which explains why some experiments present less than 3 samples.

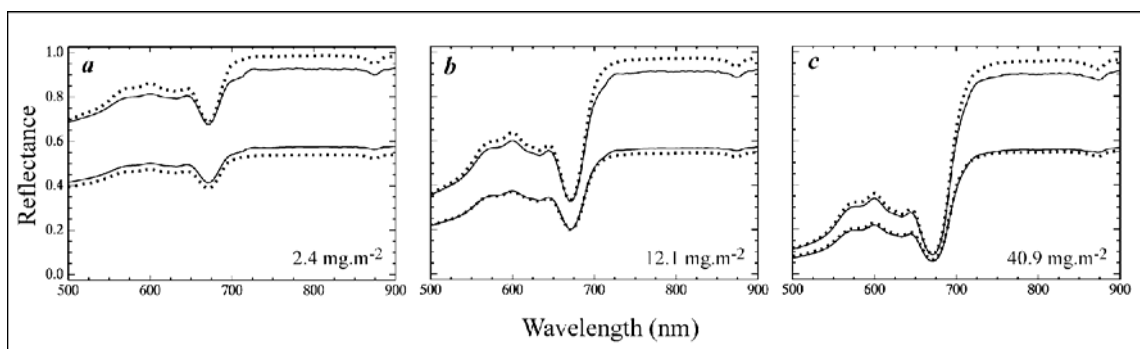


Figure IV.14 : Comparison of the measurements (solid line) and the calculations (dotted line) of apparent reflectance for three (a), (b) and (c), filters of varying cell content layered on 99% Spectralon® (higher level) and 50% Spectralon® (lower level).

IV.3.4.4. Validation of estimated biomass on a new data set

The new data set, including a wide range of biomass (1-40 mg.m⁻²), was used in order to validate the model. For each biomass, the apparent reflectance measured above each filter and the corresponding background reflectance together with the inherent reflectance of the biofilm calculated in section IV.3.3 were used as input data. The other inherent biofilm properties (transmittance and absorption coefficient) were estimated using the formalisms explained before. Finally, biomass values were estimated from the estimated absorption coefficient α at 673 nm using the linear regression Eq. IV.14. This validation is supported by the plot of estimated biomass values against measured biomass values, following the reference pattern (1:1) and achieves an R² of about 0.93 (Figure IV.15).

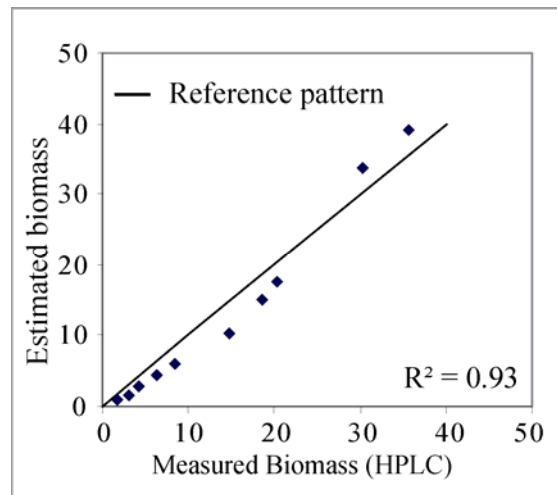


Figure IV.15 : Comparison of biomass derived from the model versus reference biomass measured by HPLC for the validation data set. Uncertainties are estimated by a determination coefficient from the straight line (1:1).

IV.3.5. Discussion-conclusion

To evaluate a model estimating spectral properties with the aim of predicting MPB biomass, MicroPhytoBenthos Optical Model (MPBOM), reflectance measurements of two kinds of laboratory simulated biofilm were performed under controlled conditions. The best sample, representing the most similarities with a natural biofilm during field studies, was selected and a physical model using the data provided in the laboratory from this type of

sample was established. The calculation was applied to both types of sample to explain, step by step, their properties and to confirm the choice of sample.

- **What does a biofilm look like?**

The radiometric results of this work point toward certain information about the physical and chemical properties of samples. For example: *i*) in pigment absorption regions (VIS), the deepening of the apparent reflectance with increasing biomass is due to the variation in transmittance and absorption while the low contribution of reflection parameters is almost independent of the cell concentration. When there are more cells in the biofilm, then more absorption occurs and thus there is less transmitted light; *ii*) in the NIR region, where there is no absorption, the observed spectral responses represent reflectance and transmittance parameters which seem to be sensitive to biofilm structures. After Guarini et al. (2000) and the application of electron microscopy (SEM) to analyze the superficial sediment microstructure (Paterson 1986; Paterson 1989), it is clear that benthic microalgae concentrate on top of the sediment during diurnal low tide in the form of a dense, continuous and uniform layer of stacked cells, 2 or 3 cells thick (Paterson 1986), leaving only a small number of cells below. Biologically, this phenomenon is the result of the vertical migration of cells to reach light for the photosynthetic process. In such a natural biofilm, *i*) cells are more or less packed down on the sediment surface and there is no space between them, like for the sample prepared by slow filtering on PC filters, *ii*) EPS occupy interstice and contribute to the cohesion of the biofilm without generating any noticeable diffusion of the light. These points have been mostly studied in the case of a green leaf (e.g. Galisman et al. (1970) and Gausman et al. (1974)). They concluded that the NIR reflectance and transmittance of a leaf are largely determined by the amount of intercellular space and therefore the apparent reflectance will change as these factors change. With no intercellular space and no absorption features in this wavelength range, MPB biofilm is transparent in the NIR.

In a gelatin medium, cells in suspension yield to an internal structure via the intercellular spaces. For such a sample with a constant thickness (2 mm), the intercellular space varies with cell content. The internal scattering increases with increasing biomass due to a larger number of cells leading to a higher reflectance of the sample in the NIR. Gelatin samples are therefore not suitable for intertidal mudflat MPB biofilm simulation.

- **Biomass reassessment**

The main part of this work was to provide a physically based model for estimating MPB photosynthetically active biomass ($\text{mg Chl } a \cdot \text{m}^{-2}$). Despite the fact that Chl *a* concentration per cell is physiologic and genetic dependant, numerous studies estimate biomass using this proxy (De jonge 1980; Gieskes 1991; Lucas and Holligan 1999; Méléder et al. 2007). Physiological effect on MPB pigment content becomes negligible along experiment by slow filtration ($< 10 \text{ mm Hg}$) to limit cell damages and no light variation during culture and biofilm preparation. Such good physiological state is confirmed by no variation in pigment content and attested by stable Fuco/Chl *a* and DD/(DT+DD) ratios expected to decrease in stressful light conditions. However cells at the bottom and at the top of a biofilm present different physiological conditions giving different proportions of pigments other than Chlorophylls. This effect is avoided by focusing the MPB Biomass estimation on the Chl *a* absorption at 673 nm only.

The first attempt of this work has been to calculate the whole specific absorption spectra for each pigment from the absorption coefficient spectra of different biomasses (e.g. PROSPECT, (Jacquemoud and Baret 1990)). This did not work, however, not only because of the high correlation between the pigment concentrations (e.g. Mackey et al. (1996)) which limited the inverting approach but also because of the biofilm structure. Thus, the second attempt was to impose the spectral shape of the *in-vitro* absorption spectra of each pigment to retrieve their specific absorption coefficient spectrum. However, the presence of narrow absorption bands of different pigments and high shifts between their *in-vivo* (whole living cells) and *in-vitro* (not in living cells, in solvent) absorption peaks, decreased the chance of finding the same *in-vivo* absorption spectrum shapes as the *in-vitro* ones. Nevertheless, the absorption coefficient was regarded as an additive function of all pigment specific absorption coefficients and their concentration. Therefore, each pigment concentration can be retrieved directly from the absorption coefficient at its specific wavelength where the absorption peak is completely isolated from that of other pigments. In this way, the pigment concentration is retrieved successfully for Chl *a*, because of a good fit between its absorption value at 673 nm ($\alpha_{673\text{nm}}$) and its concentration (biomass). This relationship leads to the estimation of intermediate values of MPB biomass from any reflectance measurement, which has been validated for a new data set by an acceptable R^2 between the estimated and measured biomass values.

Another use of the estimation of the absorption coefficient, α , is its contribution to a better estimation of the coefficient of light absorption, called the chlorophyll specific absorption cross-section (a^*) in $\text{m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$, necessary for primary production estimation (Genty et al. 1989). This parameter is not measurable in every case, especially within a benthic biofilm (Consalvey et al. 2005; Morris et al. 2008; Perkins et al. 2002). Indeed, a realistic biofilm associated with a non-invasive technique was used in some studies to estimate this chlorophyll specific absorption cross-section (e.g. Lefebvre et al. (2007) and Perkins et al. (2002)). Thus, this model supports a new methodology to assess MPB primary production.

Nevertheless, such a linear regression could typically cause bias in the predicted values. Due to a probable saturation effect, the calculated regression could become asymptotic at a higher biomass level. This problem tends to limit the predictive accuracy of the regression for biomass values above $40 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$, yet to be confirmed by further experiments. However, the field biomass does not exceed values of $100 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ (Mélédér et al. 2003a) for small surfaces ($\sim 100 \text{ cm}^2$) while for larger surfaces, the retrieved biomass values do not reach $50 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$. Therefore, the linear equation between biomass and absorption coefficient of Chl a can be applied to predict the biomass on natural surfaces from hyperspectral images that have a pixel size above 1 m^2 .

- **How could the refractive index be explained?**

In general, the refractive index spectrum represents physically the scattering properties of a layer. There have been some studies of the experimental and/or physical estimation of refractive index for green leaves, which are the most similar cases to MPB biofilms (Feret et al. 2008; Gausman et al. 1974; Jacquemoud and Baret 1990; Woolley 1975). They reported either the whole spectrum or only the average values for certain wavelengths as estimated refractive index. Overall, the estimated average values vary between 1.3 and 1.6 while the various estimated refractive index spectra, in different studies, oscillate in the same interval (1.3-1.6) but do not have the same shape. Thus, the mean value of ~ 1.3 for the estimated refractive index of an MPB biofilm, regardless of its spectral shape, follows those values estimated for similar materials.

Berthier (1993) mentions that the refractive index is related to absorption over all wavelengths and vice versa; Feret et al. (2008) tested this in the case of green leaves and

estimates a new refractive index spectrum for PROSPECT 5. However, having read through the formalism in section IV.3.4, the refractive index and absorption coefficient do not influence each other, mathematically, and the absorption coefficient is estimated independently of the refractive index values. Therefore, the estimated shape and values of the refractive index spectrum could not cause the inaccurate estimation of predicted biomass values.

Finally, this study is designed to be applied to MPB biomass mapping in intertidal mudflat zones. Previous studies (Combe et al. 2005; Méléder et al. 2003a), based on comparisons between a synthetic spectral library and the image pixels, could not tackle the problem of confusion between similar materials and the inaccurate estimation of biomass. Thus, it appears that the use of a physical model, as reported in this study, could lead to a better description of a benthic biofilm and, as a consequence, a more precise classification of the images and more realistic biomass maps.

IV.4. Récapitulatif des résultats et compléments de discussion

L'idée de base de cette publication était d'étudier les fractions de la lumière absorbée, réfléchié et transmise par un biofilm de microphytobenthos. Le problème majeur a été le fait de ne pas avoir la possibilité d'obtenir des mesures propres de la réflectance du biofilm. Étant toujours dépendant du filtre sur lequel les cellules sont déposées, les spectres obtenus sont fortement influencés par la réflectance du filtre support, en arrière plan ou « backgrounds » du biofilm. Afin d'étudier l'effet du substrat jouant le rôle de support dans un milieu naturel, nous avons besoin de préparer les échantillons sur des filtres de différentes couleurs. N'ayant pas le choix dans la couleur de filtres, nous avons décidé de prendre des filtres humides en polycarbonate qui laissent passer suffisamment la lumière pour que l'ensemble filtre + substrat plus ou moins gris ou coloré joue le rôle de support similaire, au premier ordre, à une vase ou un sable humide. Ces supports étant connus les calculs nous permettent alors de trouver la réflectance et la transmittance propre du biofilm. Les résultats montrent ainsi une très faible participation de la réflectance propre du biofilm dans sa réponse spectrale finale. La forme du spectre de réflectance du biofilm observé par les capteurs varie en fonction de ses propriétés de transmittance directement proportionnelle à l'absorbance, puisque la transmittance contient toute la partie qui n'a pas été absorbée. De plus, il a été montré que le biofilm est totalement transparent dans le domaine NIR, avant la bande d'absorption de l'eau, et donc qu'il ne présente aucune absorbance et ni réflectance dans ce domaine de longueurs d'ondes. Ces deux points constituent les propriétés spécifiques du biofilm. Accompagnées par le panel pigmentaire, elles nous permettent de distinguer le biofilm à diatomées de tout autre organisme végétal. Ces résultats sont en accord avec les observations en microscopie électronique à balayage (MEB) effectuées par D. Gouleau, Herlory et al. (2004) et Paterson (1986). Un biofilm est composé de cellules adjacentes les unes aux autres et très serrées, sans espaces inter-cellulaires. Ce sont ces espaces inter-cellulaires, provenant du mésophylle, (Galisan et al. 1970; Gausman et al. 1974; Jacquemoud et Baret 1990), qui sont responsables du saut entre l'absorption du rouge et le plateau IR chez la végétation supérieure, aussi connu sous le terme de « *red edge* ». C'est, a contrario, la raison pour la quelle le biofilm ne réfléchit pas dans NIR car l'organisation des cellules au sein du biofilm ne ressemble pas à l'organisation des cellules au sein du mésophylle. Les cellules n'étant pas non plus enveloppées entre des couches externes (pas d'équivalent de l'épiderme et sa cuticule des feuilles vertes) le biofilm ne présente pas une réflectance propre importante.

En résumé, en absence de structure interne et d'enveloppe, une couche unique telle que le biofilm ne présente qu'une réflectance mineure négligeable par rapport aux propriétés d'absorbance et de transmittance.

Les spectres estimés de la réflectance et de la transmittance du biofilm sont les données d'entrées des calculs du coefficient d'absorption. Ce dernier est ensuite utilisé pour la quantification de la biomasse. Une série de données de laboratoire a été utilisée pour établir une régression linéaire entre la biomasse (obtenue par CLHP) et la valeur du coefficient d'absorption de la Chl *a* (673 nm). L'utilisation de cette unique bande d'absorption est très avantageuse dans le cas particulier de l'estimation de la biomasse qualifiée de photosynthétique active, car :

- Elle présente une bande d'absorption isolée et l'absence d'interférence avec les autres pigments à cette longueur d'onde est vérifiable sur les spectres d'absorbance *in-vivo* aussi bien qu'*in-vitro* ;
- En se basant sur cette bande d'absorption, les variations du cortège pigmentaire qui sont fonctions de l'état physiologique des cellules et des conditions environnementales, ne vont pas influencer l'estimation de la biomasse photosynthétique active.

IV.4.1. Les incertitudes

Comme nous l'avons déjà détaillé dans l'article, tous les calculs de propriétés optiques d'un biofilms ont été effectués à partir de différentes mesures de réflectance obtenues par les images HySpex au laboratoire. Dans ces calculs nous avons employé des spectres de réflectance d'un biofilm simulé sur un filtre blanc. Le spectre de réflectance de chaque biofilm retenu pour les calculs des propriétés optiques était le spectre moyen d'une zone homogène, soigneusement sélectionnée sur le biofilm. Au contraire, pour établir la relation entre les mesures CLHP et les coefficients d'absorption, la surface totale du biofilm a été utilisée, car les biomasses mesurées par CLHP sont réalisées à partir du biofilm entier.

Nous allons ici détailler les incertitudes qui peuvent exister pour les mesures de réflectance et les mesures de biomasse.

IV.4.1.1. Données radiométriques

Comme cela a déjà été expliqué dans l'article, pour chaque filtre préparé il existe un spectre de réflectance. Ce dernier est le spectre de réflectance moyen d'un ROI, choisi attentivement pour chaque biofilm. Cependant, qu'elle est vraiment la réflectance correspondante à la biomasse mesurée? Les conditions de préparation, même avec toutes les précautions prises, peuvent être à l'origine de quelques imprécisions. Même en essayant de garder le rythme de la filtration douce, les filtres ne sont pas complètement homogènes.

En ce qui concerne l'homogénéité du ROI, nous pouvons la contrôler grâce au suivi des écart-types sur le ROI. Il existe en fait deux types de contraintes : i) choisir les ROIs les plus homogènes pour les calculs des propriétés optiques de biofilm et ii) choisir les ROIs les plus représentatives du biofilm qui a fait l'objet de mesures de biomasse par CLHP. La Figure IV.16 présente les différents choix de ROI et les spectres de réflectance avec leurs écart-types. Comme nous pouvons le voir sur les spectres présentés, les petites zones sélectionnées au milieu de chaque biofilm sont très homogènes pour un biofilm de biomasse faible aussi bien que pour un biofilm de biomasse forte alors que les ROIs contenant la totalité du biofilm présentent plus d'hétérogénéité. Cette dernière résulte de la filtration qui fait apparaître un anneau de faible biomasse autour du biofilm.

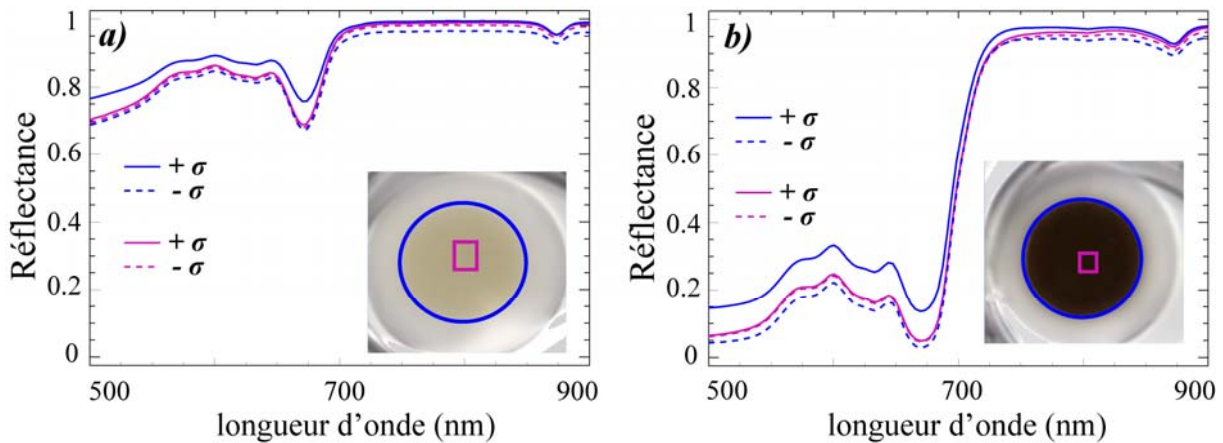


Figure IV.16: ROIs sélectionnées sur une zone homogène au milieu du biofilm (en magenta) et sur toute la surface du biofilm (en bleu). Pour chaque ROI, les spectres de réflectance de +écart-type (en pointillé) et -écart-type (trait plein) sont présentés pour (a) une faible biomasse et (b) une forte biomasse. Les spectres de ±écart-type pour le ROI au milieu du biofilm se superposent et nous ne pouvons pas les distinguer.

Nous avons considéré jusqu'à présent que le biofilm pouvait être pris comme étant une couche compacte, uniforme et infinie. Dans le détail, ce biofilm est en fait constitué de

cellules de 10 à 100 μm contenant elles-mêmes des plastes de taille finie. Dans l'absolue, un pixel d'image HySpex n'est donc pas couvert à 100% par les cellules. Celles-ci sont dispersées à la surface, en particulier lorsque la biomasse est faible (Figure IV.17). Dans ce cas, la réflectance observée par le capteur est une combinaison linéaire des réponses spectrales du biofilm et de son substrat, pondérée par le pourcentage de couverture spatiale de chacun d'eux. Soit un pixel couvert par le biofilm sur une fraction x de sa surface, le reste $(1-x)$ ne présente que le substrat. Selon la plus ou moins grande compactions des cellules de diatomées, ces fractions varient avec la biomasse (Figure IV.17). Le spectre de réflectance final pour ce biofilm sur différents supports devient donc :

$$\left. \begin{aligned} R_{AB} &= x \cdot \left(R + \frac{R_B \cdot T^2}{1 - R \cdot R_B} \right) + ((1-x) \cdot R_B) \\ R_{Ag_1} &= x \cdot \left(R + \frac{R_{g_1} \cdot T^2}{1 - R \cdot R_{g_1}} \right) + ((1-x) \cdot R_{g_1}) \\ R_{Ag_2} &= x \cdot \left(R + \frac{R_{g_2} \cdot T^2}{1 - R \cdot R_{g_2}} \right) + ((1-x) \cdot R_{g_2}) \end{aligned} \right\} R_B > R_{g_1} > R_{g_2} \quad \text{IV.15}$$

où R_{AB} , R_{Ag1} et R_{Ag2} , sont les spectres de réflectance apparente (mesurée par le capteur) du biofilm sur 3 supports (spectralons à 99%, 50% et 20%) ; R_B , R_{g1} et R_{g2} sont les spectres de réflectance propre des 3 supports ; R et T sont la réflectance et la transmittance propre du biofilm.

Cette hétérogénéité interne au biofilm n'étant pas prise en compte dans les calculs de réflectance propre à partir de deux séries différentes de substrat (99% - 50% et 50% - 20%), les spectres calculés ne sont pas identiques (Figure IV.18). C'est particulièrement le cas des réflectances propres qui présentent des valeurs négatives et des pics non significatifs (voir par exemple l'artefact au début du plateau NIR, Figure IV.18). La participation très faible de cette réflectance dans la réponse spectrale finale, par rapport à celle de la transmittance, laisse à penser que ce défaut n'altère pas trop la qualité des mesures. Cela est confirmé indirectement par les expériences sur agarose. La technique permettant de déposer directement le biofilm sur un substrat sans l'intermédiaire d'un filtre, les mesures sur fond noir ont permis de montrer que la réflectance propre des diatomées était en fait proche de zéro. On verra ainsi dans

l'application aux images aéroportées (Chapitre V) que ces spectres de réflectance propres calculées ne seront pas pris en compte et systématiquement négligées.

Un autre point qui peut jouer sur la qualité des résultats calculés est la possibilité de légères modifications des propriétés d'absorption des cellules durant les mesures. Les images des biofilms déposés sur différents supports ne sont pas acquises toutes d'un seul coup. C'est en particulier le cas des mesures sur spectralon à 99%, 50% et 20%. Ce sont trois acquisitions successives décalées de quelques minutes dans le temps. Sachant que les diatomées accommodent très rapidement leur cortège pigmentaire, il est possible que des cellules réagissent vis-à-vis de la lumière et que leurs propriétés se modifient, même très légèrement. En conséquence, le biofilm dont nous cherchons les propriétés spectrales peut ne pas rester rigoureusement dans le même état physiologique pendant toute la durée d'acquisition des images.

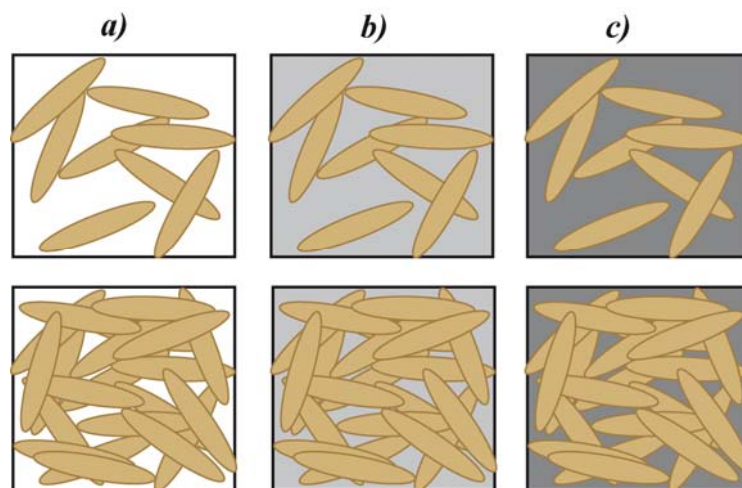


Figure IV.17 : Représentation schématique de deux pixels de différentes biomasses déposés sur les différents supports (a), (b) et (c). La réflectance apparente de chaque pixel est, R_{AB} , R_{Ag1} et R_{Ag2} pour les trois supports, respectivement. La réflectance de chaque support est : R_B , R_{g1} et R_{g2} , respectivement.

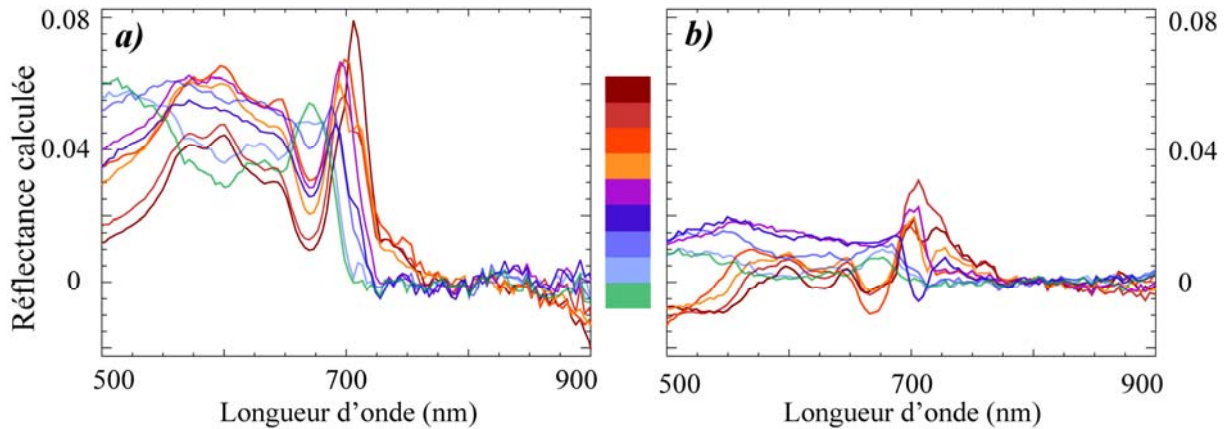


Figure IV.18 : Spectres de réflectance propre calculés à partir (a) des mesures sur les spectralons à 99% et à 50%, (b) des mesures sur les spectralons à 50% et à 20%. Le code couleur indique l'augmentation de la biomasse, la biomasse la plus faible est illustrée en vert et la biomasse la plus forte est illustrée en marron foncé.

IV.4.1.2. Données CLHP

L'incertitude de concentration pigmentaire dépend de la calibration de l'appareil. La calibration se fait régulièrement sur les pigments standards ayant une concentration connue. La droite de calibration est établie par la régression entre l'aire sous le pic d'absorption du pigment et sa concentration. Ces calibrations ne sont pas validées mais elles restent assez fiables car reproductibles. En effet, les coefficients de calibration peuvent varier dans le temps, en raison du compactage de la colonne, mais ils restent significativement identiques. Si une calibration engendre des coefficients trop différents des coefficients précédents, c'est souvent la colonne qui est incriminée ou la barrette de diode. Une critique peut être également apportée à la limite de détection d'un pigment par CLHP. La première des précautions est d'appliquer les coefficients de calibration à des concentrations appartenant à l'intervalle de concentrations utilisées pour la calibration. De plus, il existe des 'règles d'intégration' en chromatographie : pour qu'un pigment soit identifié, il faut que le ratio Signal / Bruit (en hauteur de pic) soit au moins égal à 3 et pour qu'il soit quantifié, le ratio doit être au moins égal à 10. Ces paramètres sont rentés dans la méthode automatisée d'intégration des pics de Millénuim.

IV.4.1.3. Résultats de la radiométrie vs CLHP

Établir une relation entre les mesures radiométrique (donc *in-vivo*) et de biologie (donc *in-vitro*) est délicat en raison de phénomènes liés aux cellules vivantes qui peuplent le

biofilm. Nous avons déjà parlé de l'effet d'auto ombrage des cellules dans une structure serrée telle que le biofilm (I.3.2).

La probabilité qu'un photon passe à travers un empilement épais des membranes sans être absorbé est petite par rapport à un empilement fin. En effet, en augmentant le nombre des cellules du biofilm, les cellules qui se trouvent dans les couches inférieures ont moins d'accès à la lumière et produisent plus de Chl *a* pour capter la quantité maximum de lumière pour la photosynthèse. Cette augmentation de quantité de la Chl *a* ne compense toutefois pas le manque de lumière et ces cellules ont une efficacité d'absorbance moindre par rapport aux cellules qui se trouvent à la surface du biofilm (Falkowski and Raven 2007). En conséquence, la relation linéaire entre la concentration de la Chl *a* et le pic de son coefficient d'absorption commence à décrocher à partir d'une certaine concentration. La Figure IV.19-a illustre les valeurs des concentrations des dilutions préparées à partir de la culture mère (230000 cellules. mL⁻¹), versus les valeurs de la Chl *a* mesurées par CLHP à partir des biofilms sur les filtres. Théoriquement, cette relation doit être linéaire. Toutefois, les cellules dans les cultures diluées ne présentent pas le 'package effect', ce qui n'est pas le cas du biofilm pour lesquels les concentrations les plus fortes produisent plus de pigments qu'attendu. Ce phénomène est visible sur le graphique Figure IV.19-a. Le 'package effect' est donc à l'origine d'une diminution de l'efficacité de l'absorbance des cellules : la relation entre le coefficient d'absorption de la Chl *a* et sa concentration n'est plus une droite (Figure IV.19-b). Toutefois, la relation entre les valeurs du coefficient d'absorption de la Chl *a* et celles de la concentration en dilution de la culture mère restent linéaires (Figure IV.19-c).

La relation que nous avons proposée pour estimer la biomasse est basée sur les biomasses inférieures à 40 mg.m⁻², la partie linéaire de la courbe. Sachant que la biomasse obtenue sur la surface du sédiment n'atteint pas les valeurs supérieures à 40 mg.m⁻², l'équation présentée peut effectivement être utilisée pour estimer la biomasse sur le terrain. L'utilisation de cette relation est également confortée par le fait que le biofilm n'est constitué, sur le terrain, que d'une ou deux, voire trois couches de cellules (Herlory et al. 2004; Paterson 1986), ce qui limite le phénomène d'auto ombrage.

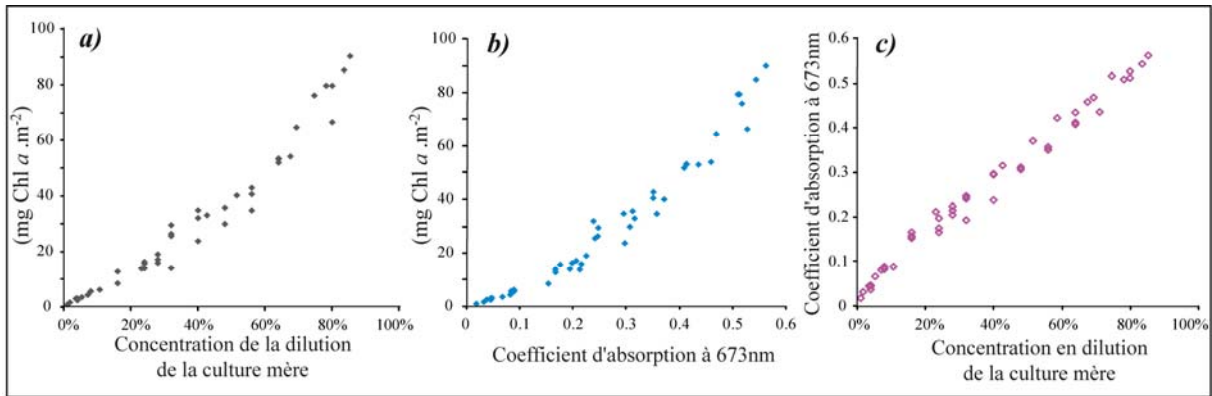


Figure IV.19 : (a) valeurs de la concentration de la Chl *a* mesurées pas CLHP vs les valeurs de concentration en dilution de la culture mère ayant le nombre de cellules de 230000 par mL. (b) valeurs de la concentration de la Chl *a* mesurées pas CLHP vs les valeurs du coefficient d'absorption de la Chl *a* à 673nm, (c) valeurs du coefficient d'absorption de la chlorophylle *a* à 673nm vs celles de concentrations en dilution de la même culture mère.

IV.4.2. Saturation et glissement spectral

L'apparence des bandes d'absorption dans le spectre de réflectance dépend de la concentration d'élément absorbant. Nous avons déjà parlé d'approfondissement de la bande d'absorption de la Chl *a* pour les biomasses plus fortes. Toutefois, à partir d'une certaine concentration la profondeur de la bande d'absorption varie moins lorsqu'elle est observée en réflectance, elle commence alors à s'élargir (Figure IV.20-a). Cet élargissement de la bande autour de 673 nm décale le saut entre cette forte absorption et le plateau NIR. La Figure IV.20-b illustre le décalage du point d'inflexion de ce saut à l'aide des spectres de dérivée première. Ce phénomène est connu dans le domaine de la végétation par le terme de 'glissement spectrale' ou '*red shift*'. Différentes études ont montré qu'il existait une relation directe entre la position en longueur d'onde du point d'inflexion de « *red edge* » et la concentration en chlorophylle de la feuille ainsi qu'avec sa structure interne (Gates et al. 1965; Guyot et Baret 1988).

L'effet de la concentration en chlorophylle sur la position du point d'inflexion du spectre du coefficient d'absorption est schématisé sur la Figure IV.20-c. Aucun décalage de ce point n'est observé entre les faibles et les fortes biomasses (Figure IV.20-d) des spectres de coefficient d'absorption, contrairement à ce qui a été observé pour les spectres de réflectance. Dans le cas des biofilms de diatomées, aucune saturation n'est atteinte. Seul l'écrasement des bandes d'absorption par leur représentation en réflectance produit un artefact. Il est donc ici impératif d'étudier les biofilms en coefficient d'absorption pour ne pas biaiser les résultats.

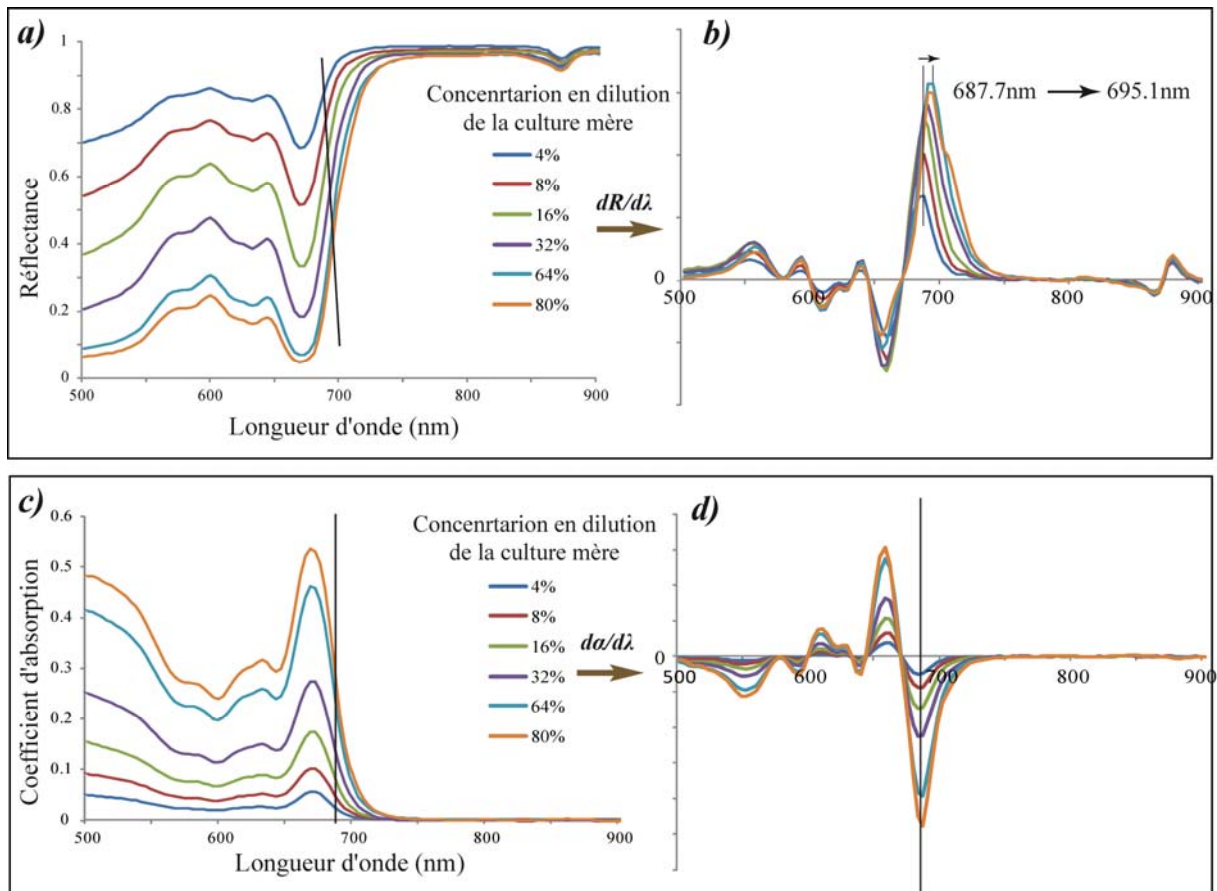


Figure IV.20 : (a) spectres de réflectance mesurés sur les biofilms préparés sur les filtres en polycarbonate. L'aplatissement de la bande d'absorption de la Chl a pour les biomasses plus fortes est remarquable. (b) dérivés premières des spectres de réflectance. Le décalage de l'emplacement (en longueur d'onde) du point d'inflexion du saut entre la plus forte et la plus faible biomasse est montré par une flèche, (c) spectres du coefficient d'absorption calculés à partir des spectres de réflectance. (d) dérivés premières des spectres du coefficient d'absorption. Il n'y a aucun décalage du point d'inflexion pour différentes biomasses.

IV.5. Conclusion partielle

La connaissance de la structure interne et des propriétés optiques d'un biofilm est primordiale pour l'extraction de toute information qualitative ou quantitative à partir des données de télédétection.

A la fin de ce chapitre, nous pouvons conclure qu'un biofilm est formé par l'empilement des cellules de diatomées sans introduire aucune structure particulière. Les parois cellulaires, en silice, sont transparentes et ne participent pas à la diffusion de la lumière dans le domaine 400-1000 nm. La substance extracellulaire (EPS) est aussi complètement transparente. Elle ne provoque pas de diffusion interne au sein du biofilm. Les seules composantes qui forment la réponse spectrale du biofilm sont donc les particules absorbantes, les pigments. Toute la

partie qui n'est pas absorbée et qui est réfléchiée par le substrat forme la réponse spectrale du biofilm. En raison de l'absence de toute réflexion propre, le biofilm n'est pas visible sur un substrat qui ne réfléchit pas la lumière. Si cette propriété a été employée avec succès dans plusieurs études en divisant le spectre obtenu par son substrat, c'est toutefois ce travail qui démontre pour la première fois qu'un biofilm résulte d'une double transmission et non d'une réflexion.

Les propriétés optiques du biofilm présentées dans cette partie sont la clé d'une nouvelle approche pour la cartographie de la biomasse à macro-échelle et à l'échelle des images aéroportées.

CHAPITRE V

CARTOGRAPHIE DE LA BIOMASSE DANS LA BAIE

DE BOURGNEUF

V.1. Introduction

L'objectif final de la mise au point du modèle des propriétés optiques du biofilm est l'application à des images hyperspectrales aéroportées pour une cartographie de la biomasse photosynthétique active du microphytobenthos de l'ensemble de la baie de Bourgneuf. L'application de tels modèles de transfert radiatif nécessite des méthodes d'inversion spécifiques, à condition que le modèle direct soit inversible. Dans le cas du modèle MPBOM, nous proposons une stratégie d'inversion simple qui ne requiert pas de passer par les modèles d'inversion complexes en nous basant sur les propriétés uniques et spécifiques des biofilms.

Dans ce chapitre sont détaillés les connaissances nécessaires pour l'initialisation du modèle afin d'aboutir à la production des cartes dont les étapes sont discutées. La méthodologie, les résultats et les validations sont présentés sous la forme d'un article soumis à Remote Sensing of Environment.

V.2. Initialisation

Le modèle des propriétés optiques du biofilm (MPBOM) a mis en relation les spectres de réflectance d'un biofilm et les biomasses par l'intermédiaire du coefficient d'absorption et de l'indice de réfraction. Les valeurs de biomasse sont ensuite estimées à partir du coefficient d'absorption obtenu sur une série de mesures faites au laboratoire.

Comme nous l'avons déjà présenté dans les chapitres précédents, le spectre de réflectance du biofilm de microphytobenthos varie principalement en fonction des variations d'albédo du substrat et de la biomasse. Il existe toutefois d'autres propriétés à estimer afin de pouvoir boucler la chaîne de calculs d'inversion. Pour cela, il faut soit proposer une méthode d'inversion classiquement utilisée pour des cas similaires (c.f. PROSPECT par Jacquemoud et Baret (1990)), soit utiliser des propriétés caractéristiques du biofilm pour fixer quelques paramètres et réduire le nombre de paramètres à estimer.

Les conditions des mesures au laboratoire sont connues et sous contrôle. De plus, nous connaissons parfaitement les substrats sur lesquels les biofilms sont déposés et nous avons accès aux réponses spectrales de ces substrats. En revanche ces caractéristiques ne sont pas

connues dans le cas des images des vasières : les conditions environnementales (éclairage, humidité, rugosité, effet directionnel, etc.) sont variables, le sédiment en tant que substrat n'est pas du même type sur toute la surface intertidale, et la connaissance *a priori* du substrat pour tous les pixels n'est pas disponible.

V.2.1. Propriétés spectrales du substrat

Le spectre de réflectance du substrat est un des paramètres d'entrée du modèle d'inversion pour le calcul de la biomasse. La surface du sédiment, sur laquelle se forme un biofilm de microphytobenthos a sa propre réponse spectrale. A cause de la forte atténuation de la lumière dans les sédiments, la surface qui interfère dans la réponse spectrale observée est la toute première couche du sédiment (de l'ordre du micron pour les longueurs d'ondes dans le VIS-NIR). Étant en contact direct et physique avec le substrat, le biofilm empêche d'obtenir le spectre de réflectance propre du substrat dans le visible. De plus, la formation du biofilm est susceptible de modifier les propriétés du sédiment en lissant sa surface. Il est donc nécessaire d'analyser la réponse spectrale du sédiment en fonction de ses propriétés naturelles, dans le domaine VIS-NIR.

La description des caractéristiques spectrales liées à la composition des sédiments peut être extraite par l'analyse des formes globales des spectres. Les absorptions liées à la minéralogie (argiles, oxydes de fer, carbonates, ...) sont principalement observées dans le domaine SWIR et NIR. L'eau n'absorbant qu'à partir de 900 nm, sa présence dans le sédiment n'induit également aucune absorption dans le domaine visible. Le domaine d'étude dans ce travail (500-900 nm) n'est donc concerné par aucune bande d'absorption qui pourrait être liée au sédiment. Ce sont donc principalement les phénomènes de diffusion qui contrôlent la forme et l'albedo du spectre de réflectance du sédiment dans ce domaine. L'aspect général du spectre de réflectance du sédiment et son albedo sont contrôlés par deux facteurs internes, l'humidité et la granulométrie, que nous allons étudier brièvement.

V.2.1.1. Présence de l'eau

Dans le sédiment l'eau altère considérablement l'albedo des sédiments et modifie les signatures spectrales propres aux minéraux, sur toute la gamme de longueur d'onde en favorisant la transmission de la lumière entre les grains.

L'eau en remplissant les pores entre les grains modifie la diffusion interne du sédiment et change ses propriétés surfaciques, plus particulièrement son indice de réfraction et sa rugosité de surface. Lindberg et Snyder (1972) ont expliqué le phénomène de diminution de l'albedo par l'humidité par le fait que la présence du film d'eau qui enrobe les particules a pour effet d'accroître le phénomène de réflexion interne. Pour cette raison, un sédiment partiellement humide et un sédiment saturé en eau ne présentent pas la même signature spectrale dans le visible. La forme du spectre du sédiment qui contient de l'eau est monotone du visible au NIR et son albedo varie, en partie, par la variation de l'humidité.

V.2.1.2. Granulométrie

La granulométrie ou l'étude de la taille et la forme des particules du sédiment a aussi une influence très importante sur la réponse spectrale du sédiment. Elle intervient dans la profondeur des bandes d'absorptions des minéraux ainsi dans l'albedo du spectre dans les régions de non-absorbance. Le rôle de la taille des particules dans la quantité de la lumière absorbée repose sur l'effet d'atténuation de la lumière. Le trajet optique à travers des grains est fonction de diffusions multiples et de la taille des particules (Adams et Filice 1967; Baumgardner et al. 1985). Un sédiment composé par des grains plus grands présente donc des bandes d'absorption plus profondes (Clark et al. 1993). De plus, la granulométrie a une influence fondamentale sur l'albedo en raison des effets de diffusion. Contrairement à l'absorption, la diffusion se fait par les facettes des particules. Les grains plus petits, qui présentent un nombre des facettes réfléchissantes plus grandes, se manifeste par un albedo plus fort que les grains plus grands.

La granulométrie définit un autre terme qui influence le niveau de réflectance d'un sédiment qui est la rugosité de surface. Cette rugosité de l'interface entre un sédiment et l'air est fonction de la taille, de la forme et de l'arrangement des grains à la surface. Les formes plus arrondies et les particules plus petites et plus compactes créent une surface plus lisse et donc une rugosité plus faible. La rugosité de surface contrôle le pouvoir réfléchissant du sédiment : plus la surface est lisse plus l'albedo diminue (Metternicht et Zinck 2003). Cette rugosité influence aussi la réflectance directionnelle et l'indice de réfraction. Dans le cas d'une rugosité forte à la surface, une partie de la lumière va retourner directement vers le capteur sans rencontrer d'autres couches. Sachant que les effets de la granulométrie et de la rugosité sont expliqués par les mêmes processus, Verpoorter (2009) a conclu à partir de

multiples mesures de laboratoire que ces effets sont similaires et ne peuvent pas être distingués par des mesures spectrales.

Les analyses granulométriques concernant la taille des particules (exprimée en diamètre équivalent sphérique, DES), les fractions volumiques de chaque classe de taille et aussi les textures des échantillons ont été analysés. Ces analyses conduisent à la connaissance des caractéristiques de différentes classes constitutives du sédiment (Tableau V.1). Le sédiment est un mélange de sable, d'argile et de silt. Selon le pourcentage de la présence de chacun de ces matériaux et leur dominance, le sédiment est classé selon le diagramme triangulaire de classification des textures de Blott et Pye (2001) (Figure V.1).

Tableau V.1 : Échelle sédimentaire d'après Blott et Pye (2001).

Taille des particules	Terminologie descriptive
1-2 mm	Sable très grossier
500 µm-1 mm	Sable grossier
250-500 µm	Sable moyen
125-250 µm	Sable fin
63-125 µm	Sable très fin
31-63 µm	Silt très grossier
16-31 µm	Silt grossier
8-16 µm	Silt moyen
4-8 µm	Silt fin
2-4 µm	Silt très fin
< 2µm	Argile

Des études récentes ont montré que le fond de la baie de Bourgneuf, terrain de notre étude, est actuellement principalement couvert d'un sédiment fin d'un diamètre inférieur de 2 mm (Mélédér et al. 2005; Verpoorter 2009). Les classes les plus abondantes dans la baie de Bourgneuf sont (d'après Mélédér et al. (2005) et Verpoorter (2009)) : la vase, la vase sableuse et le sable vaseux.

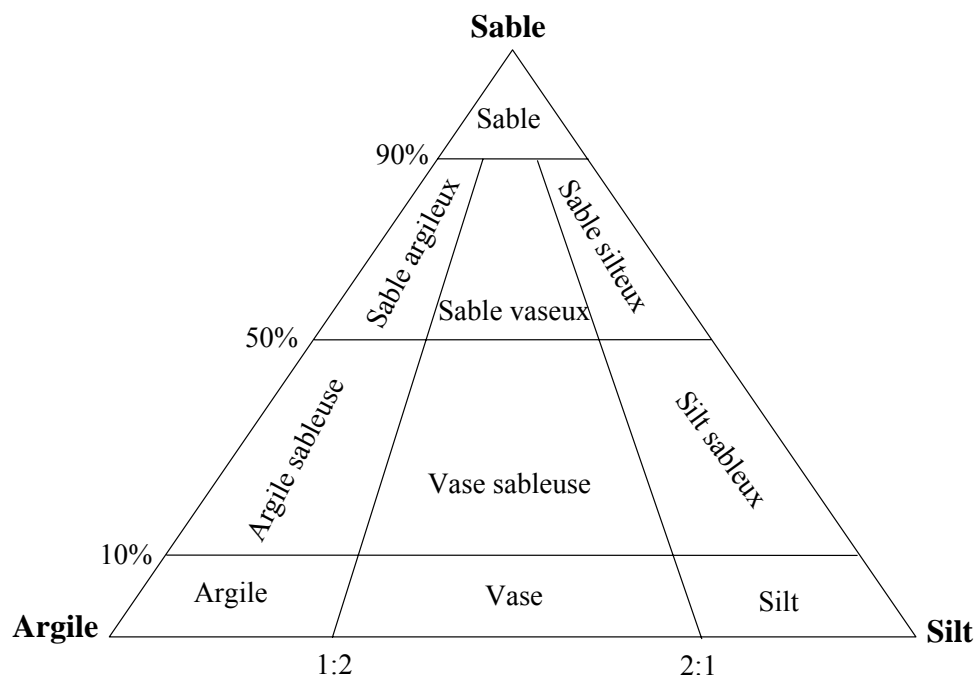


Figure V.1 : Diagramme triangulaire de classification des textures d'après Blott et Pye (2001).

La réponse spectrale du sédiment n'est pas seulement influencée par les variables étudiées précédemment. Les paramètres environnementaux peuvent aussi fortement modifier les propriétés de réflexion de la lumière. Nous pouvons, par exemple, parler de la microtopographie engendrée par la géométrie des rides de vagues. La forme parfois très prononcée de ces rides est à l'origine d'ombrages qui assombrissent le sédiment ou de réflexions spéculaires qui l'éclaircissent. Ces rides peuvent aussi retenir l'eau sur une épaisseur proportionnelle à leur amplitude de sorte qu'un même sédiment pourra apparaître clair ou sombre dans le NIR en fonction de son taux de couverture par cette pellicule d'eau.

Le spectre de réflectance d'un tel sédiment, souvent couvert par le biofilm, n'est plus le même : une bande d'absorption à 733 nm apparaît et la bande à 940 nm s'élargit pour former une bosse à 802 nm inexistante sur les sédiments, même lorsqu'ils sont gorgés d'eau (Figure V.2-a et c). Le plateau infrarouge est ainsi déformé et ne permet plus d'accéder à la seule information disponible sur la réflectance du substrat du microphytobenthos qui est transparent dans ce domaine.

Finalement, nous pouvons conclure que l'ensemble des effets mentionnés rend difficile, voire impossible, l'identification du type de substrat dans le domaine VIS-NIR.

Quoiqu'il en soit, l'objectif n'est pas d'identifier les différents types de sédiment, mais bien d'estimer la part du substrat dans la réflectance mesurée via sa forme globale. Le microphytobenthos soit épipélique et se développe sur des vases, ou épipsammique et se développe préférentiellement dans des sédiments sableux-vaseux, les spectres des deux sédiments étant proches l'un de l'autre, les calculs ne sont pas altéré par le choix de l'un ou l'autre substrat. Il s'avère qu'un simple ajustement sur le plateau NIR d'un spectre de substrat type (une vase neutre, sans chlorophylle) suffit à modéliser la réflectance de n'importe quel substrat de microphytobenthos.

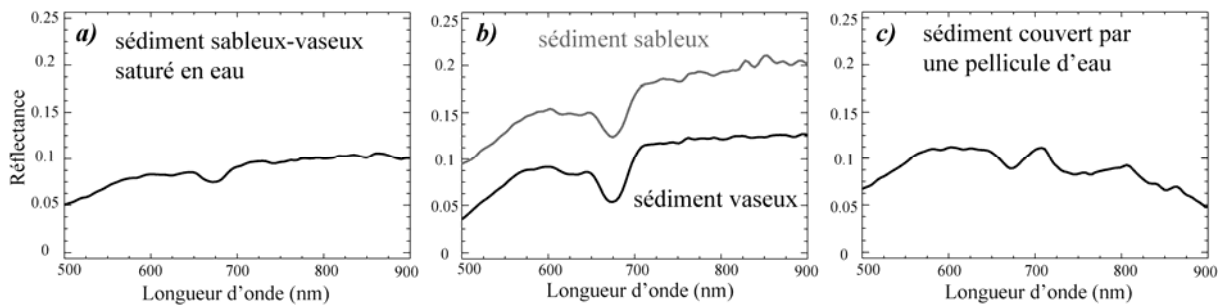


Figure V.2 : Variation de spectre de réflectance de différents types de sédiment en fonction de l'humidité et de la granulométrie, issues de l'image HySpex 2009.

V.3. Article

La nouvelle approche adaptée pour cartographier la distribution spatiale et les valeurs de biomasse des biofilm de diatomées est présentée en format d'une publication soumise dans le journal « Remote Sensing of Environment ».

New approach to microphytobenthos biomass mapping using the optical properties of benthic biofilms: Application to hyperspectral images of Bourgneuf Bay

Abstract

A new two-step mapping approach has been developed and applied to hyperspectral airborne ROSIS/ HySpex images of Bourgneuf Bay (French Atlantic coast). The final aim was to discriminate diatom biofilms (from the Bacillariophyceae class) and to estimate their photosynthetically active biomass (biomass, expressed in mg Chl *a* .m⁻²). The mapping procedure consists of: first, a combination of spectral indices for masking all other materials on the field image and second, the application of the simple optical model of diatom biofilm (MPBOM), established previously from laboratory data of simulated biofilms, to hyperspectral images. This approach involves the estimation of absorption coefficient spectra from image reflectance spectra. The inversion was performed by considering the particular properties of biofilm as the additional input data. Next, biomass values were determined from a linear relationship between Chl *a* concentration and its specific absorption coefficient, performed previously by MPBOM. This technique produced good estimates of biomass from laboratory HySpex images of synthetic biofilms compared to the pigment measurements by HPLC.

Keywords: Bourgneuf Bay, HySpex, ROSIS, Microphytobenthos, Biofilm, Diatom, Euglena

V.3.1. Introduction

Bourgneuf Bay (French Atlantic coast) is a macrotidal shellfish ecosystem of great importance in the economy and ecology of the north-western region of France. Microphytobenthos plays a significant role in such a turbid coastal ecosystem. It is a population of unicellular phototrophic microorganisms, mainly dominated by diatoms (~97%), inhabiting the first mm of sediment (MacIntyre and Cullen 1996). By producing extracellular polymeric substances (EPS), it acts not only as an agent of biogenic stabilization of sediment (Paterson 1989; Underwood and Smith 1998) but is also the major food source for benthic invertebrates (Decottignies et al. 2007b; Riera et al. 1999), such as cultivated oyster, and for higher vertebrates, such as the migratory bird *Calidris mauri* (Kuwae et al. 2008). This crucial role of microphytobenthos in the trophic chain of coastal ecosystems is due to its significant contribution to the total primary production (Colijn and DeJonge 1984; Underwood and Kromkamp 1999). This production, for every photosynthetic organism, results from photosynthetic pigments, mainly Chlorophyll *a* (Chl *a*). As a consequence, Chl *a* concentration expressed as mg Chl *a*.m⁻² has always been among the variables chosen to describe benthic microalgal assemblages and used as a proxy of the photosynthetically active biomass (PAB) (e.g. Kazemipour et al. (2011), Méléder et al. (2005) and Méléder et al. (2007)).

Despite the importance of knowing how such an ecosystem functions, only a few studies have dealt with microphytobenthic structures inhabiting the Bourgneuf Bay mudflats, using field samples at mesoscale (e.g. Méléder et al. (2005) and (2007)). These studies consist of *in-situ* measurements covering only a small fraction of the intertidal area (due to difficulties in accessing the mudflats) and should be extrapolated to the macro-scale with caution. Indeed, the extrapolation of samples representing only the taxonomic and spatial properties of the studied sites may yield an inaccurate representation at macro-scale. This is why imaging spectroscopy, with its large field of view, has become an important tool for macro-scale studies, as performed for Bourgneuf Bay (Barillé et al. 2007; Combe et al. 2005; Méléder et al. 2003b). The accurate determination of different components is possible due to the high spectral resolution and continuous spectral sampling (Richardson 1996; Richardson et al. 1994). However, mapping microphytobenthos biomass by remote sensing has often been hindered by problems in quantifying the image-derived information. Méléder et al. (2003b) tested NDVI and the microphytobenthos index in order to develop a quantitative estimation of

biomass from reflectance data (SPOT images). However, the empirical approaches based on the spectral absorption of plant pigments between 400-1000 nm have often led to confusion between macro- and microalgae.

Noticing that each biofilm thickness, and thus each biomass, gives a unique reflectance spectrum shape, Combe et al. (2005) proposed pairing each pixel reflectance of DAIS images with a combination of all possible mixtures of microphytobenthos and its natural substrates stored in a spectral library. They suggested an MGM²² continuum removal, in order to remove the contribution of lighting and roughness variations on the albedo of each pixel. However, the method is based on spectral distance (between image and library spectra) and does not explain the behaviour of microphytobenthos reflectance spectra with increasing thickness of biofilm. Moreover, the spectral distance, calculated along all wavelengths, is very sensitive to noise and similar surrounding effects which might cause some problems in identification and also an inaccurate estimation of biomass.

Therefore, in order to obtain a more accurate and exhaustive quantification, it became necessary to develop physical models, revealing the relationship between biofilm biomass and its spectral reflectance via optical properties. The assessment of microphytobenthos optical properties (MPBOM) was performed by Kazemipour et al. (2011) by considering a biofilm as a homogenous compact layer having two rough plane-parallel faces from which optical properties can be extracted and thus biomass values retrieved. In order to apply this model to images only on mudflat areas dominated by diatoms with a limited time calculation, a fast detection of pixels is used to build a mask in order to process only areas of interest.

The procedure is first tested on biofilms made in the laboratory for direct comparison between predicted and measured values of biomass. It is then applied to both ROSIS and HySpex images, to provide a real application to the natural mudflat of Bourgneuf Bay. Very high spectral resolution of these two images is required to obtain the correct results for identification and quantification.

V.3.2. Site description and image characteristics

²² Modified Gaussian Model by Sunshine et al. 1990.

V.3.2.1. Bourgneuf Bay

Bourgneuf Bay is a macrotidal bay of the French Atlantic coast located south of the Loire estuary (46-47° N, 1-2° W; Figure V.3). 100 km² of this surface is an intertidal area with a large mudflat partly occupied (about 10%) by oyster farming sites. More details have been reported by Barillé et al. (2007) and Méléder et al. (2005). Two life-forms of diatoms constitute the microphytobenthos: epipsammic (sand-dwelling) and epipellic (mud-dwelling), depending on sediment type (Hamels et al. 1998; Jesus et al. 2009; Paterson and Hagerthey 2001). The epipellic diatoms form a brown biofilm on the surface of muddy sediment and represent the largest biomass proportion (MacIntyre and Cullen 1996; Méléder et al. 2005; Pinckney and Zingmark 1991; Round and Palmer 1996). This biofilm, a few hundredths of millimetres thick, appears at the mudflat surface during the diurnal low tide as brown patches (see Combe et al. (2005), Kazemipour et al. (2011) and Méléder et al. (2010)). The epipsammic diatoms are mixed with sandy or sandy-muddy sediment and are only visible by means of a spectrometer.

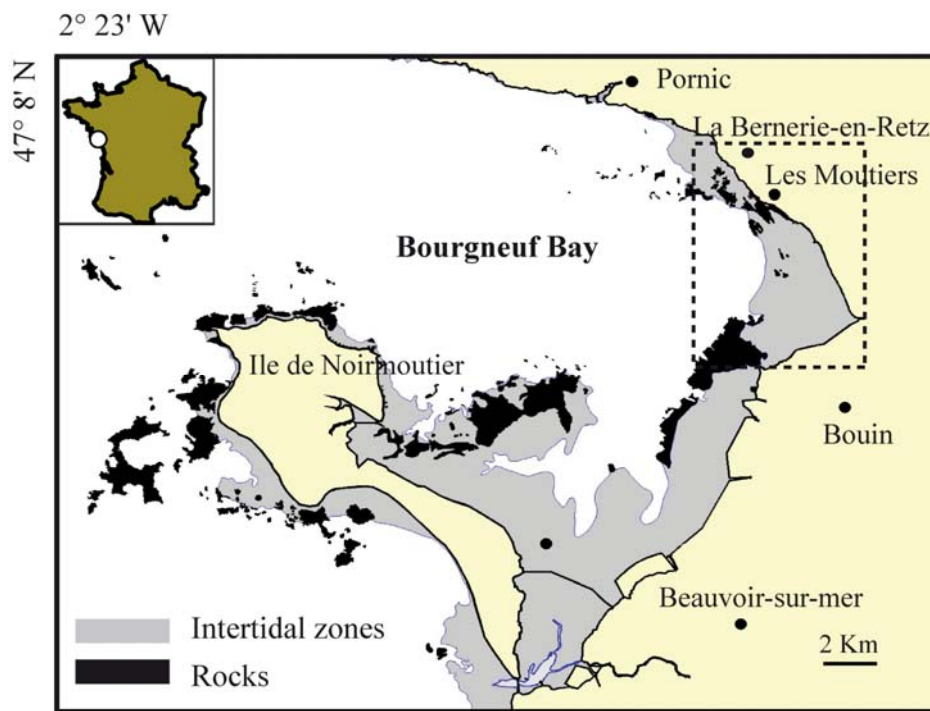


Figure V.3 : Geographic position of Bourgneuf Bay. Studied site is the north-eastern mudflat (dotted box).

V.3.2.2. ROSIS images

The whole mudflat was imaged by ROSIS (Reflective Optics System Imaging Spectrometer) on August 22nd 2002 during a HySens aerial campaign. This instrument images the scene in 3 paths using a pushbroom scanning mode for a spatial ground resolution of about 2 m. The campaign was carried out by DLR (Deutsche Zentrum für Luft-und Raumfahrt), under suitable atmospheric conditions. The instrument has 115 channels covering the spectral range of 430-860 nm with a spectral resolution of about 4 nm (Table V.2). Atmospheric corrections were provided by DLR, using the ATCOR 4 algorithm (Richter 1996). A set of *in-situ* reflectance spectra were taken, concurrently with the overpass of the area, by a GER 3700 field spectrometer to adjust the image spectra on field measurements (Combe et al. 2005). Figure V.4-a displays the mosaic of ROSIS images of the bay and some examples of pixel spectra of different materials such as sandy-muddy sediment mixed with diatom cells, diatom biofilms, euglena biofilms and macroalgae (fucus).

Table V.2 : Characteristics of ROSIS and HySpex images

Characteristic	HySpex	ROSI
Flight altitude	2600 m	3400 m
View angle	17°	16°
Spatial resolution	1 m	2 m
Image number	10	3
Spectral covering	400-1000 nm	430-860 nm
Spectral resolution	4.5 nm	4 nm
Spectral sampling	3.7 nm	
Spectral polishing	9 nm	-
Spectral band number	160	115

V.3.2.3. HySpex images

LPGNantes²³ provided the HySpex VNIR 1600 camera, having a spectral resolution of 4.5 nm in 160 channels between 400 and 1000 nm. ActiMar²⁴ was in charge of the airborne operations of the HySpex campaign on September 21st and 22nd 2009. Flight conditions were

²³ Laboratoire de Planétologie de Géodynamique de Nantes

²⁴ ActiMar, L'OCÉANOGRAPHIE OPÉRATIONELLE au sévice de la mer, Brest-France.

chosen for a spatial resolution of around 1m per pixel and the total surveyed area covers a surface of about 30 km² (Table V.2).

The flight plan was specially programmed to have enough time to cover all the intertidal zones during low tide, by having 10 paths with a consecutive time shift of around 8 min. Figure V.4-b illustrates the mosaic of HySpex images and the photographs of two different habitats of microphytobenthos: a sandy-muddy sediment mixed with epipsammic cells and epipellic biofilms formed at the muddy sediment surface.

A set of ground control points of various neutral surfaces was also collected, simultaneously with the overpass, for a final image adjustment. To provide the atmospheric corrections on HySpex images, FLAASH was used (Fast Line-of-sight Atmospheric Analysis of Spectral Hypercubes), available in ENVI as a spectral tool incorporating the MODTRAN4 radiative transfer codes (Matthew et al. 2000). The spectrally homogenous, flat and spectrally featureless targets (Clark et al. 2002) were employed to remove the residual errors. The reflectance measurements for each calibration target were achieved by using an ASD FieldSpec3 spectrometer, (300-2500 nm, sampling: 1 nm, spectral resolution: 4-10 nm). The average spectrum of each target was paired with corrected image reflectance spectra, extracted by averaging the values of 1-3 pixels associated with each calibrated target (Figure V.5).

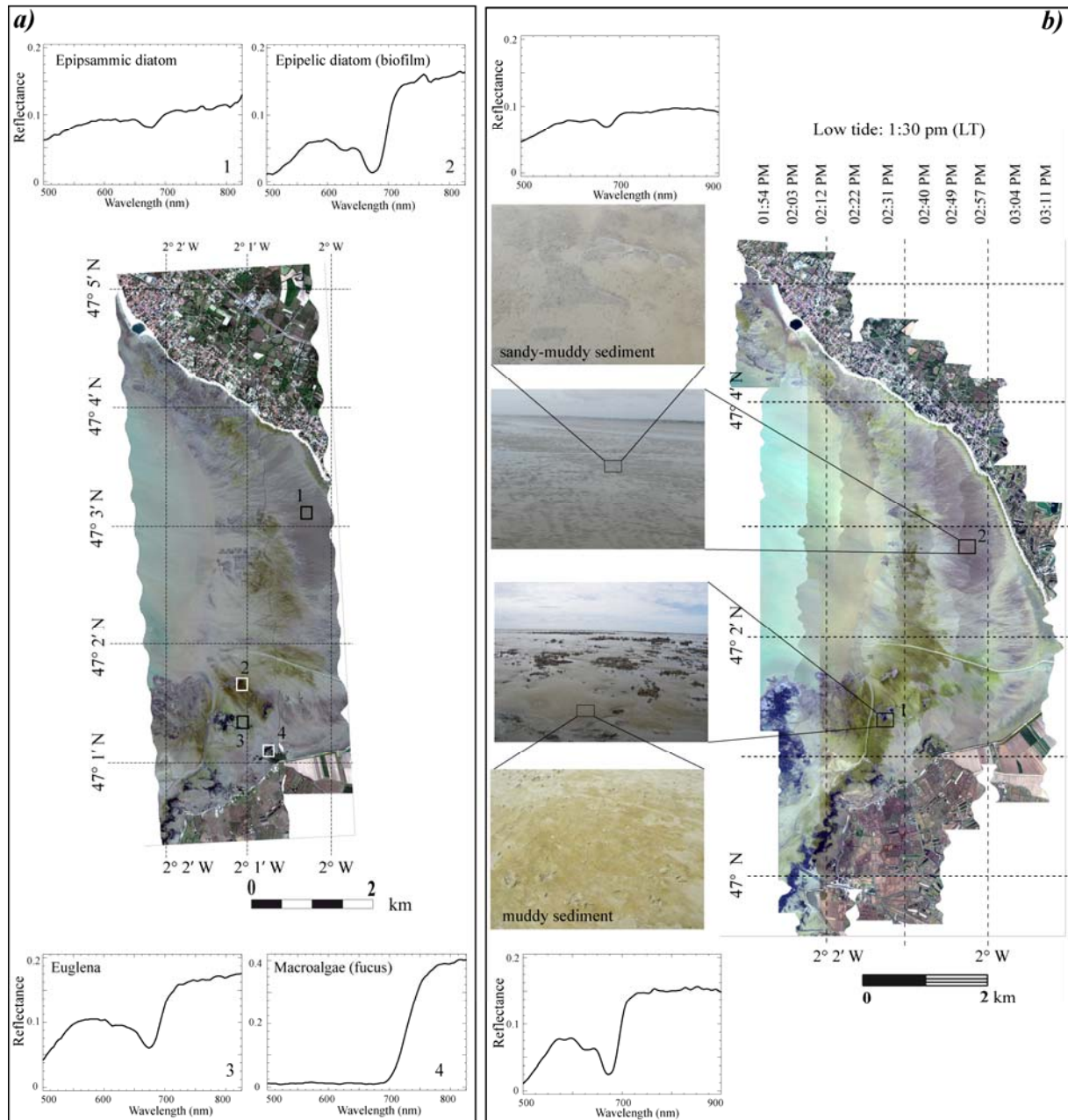


Figure V.4 : (a) mosaic of 3 ROSIS images of Bourgneuf Bay (RGB colours correspond to channels at 638, 550 and 498 nm, respectively). Some important materials and their corresponding reflectance spectra such as a mixture of muddy-sandy sediment and diatom cells (1), diatom biofilm (2), euglena biofilm (3) and macroalgae (4) are illustrated. (b) illustration of HySpex image of Bourgneuf Bay (RGB colours associated with channels at 609, 558 and 452 nm, respectively). The mosaic was composed from ten paths having a time shift of about 8 min. The variation in illumination for each path is due to some cirrus and also the water ebbing with the tide. Two different zones of microphytobenthos are presented: (1) "Coupelasse" near the oyster farming sites, the very cohesive muddy sediment covered by epipellic biofilms; (2) "Lyarne" the sandy-muddy sediment mixed with epipsammic cells (no biofilm) and saturated with water. Below each zone, an example of an obtained reflectance spectrum is shown.

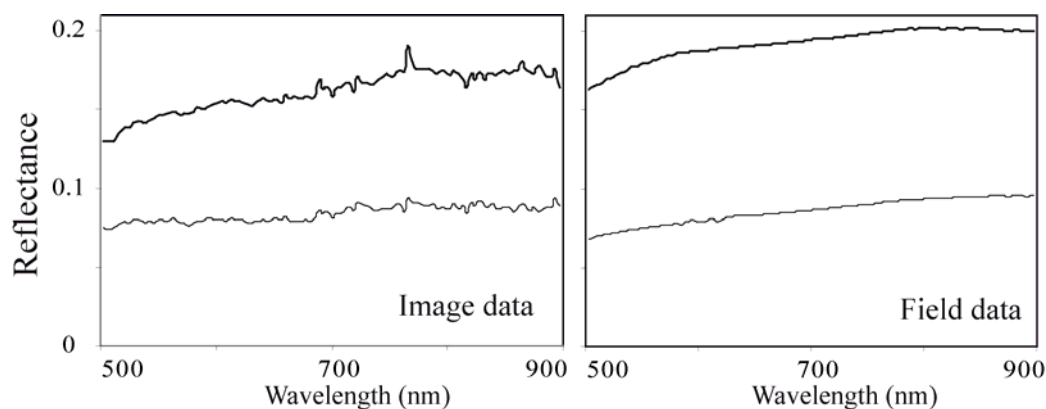


Figure V.5 : Image and field reflectance spectra of two asphalt targets.

V.3.3. Laboratory and field experiments and sampling

V.3.3.1. Laboratory preparation for radiometric and biological measurements

A set of laboratory spectral and biological data was provided for validation purposes. The biofilms of diatom *Entomoneis paludosa* (NCC 18 from the Nantes Culture Collection, MMS Laboratory, Nantes, France) and euglena *Euglena gracilis* (CCAP 1224/5 from the Culture Collection of Algae and Protozoa, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, UK) were prepared by slow filtering of different dilutions from monospecific cultures on polycarbonate filters (Kazemipour et al. 2011; Méléder et al. 2003a). The spectral measurements were performed immediately after the cells had been deposited on filters with a nadir looking VNIR-1600 HySpex camera. The camera is set in the laboratory to scan samples with square pixels providing a spatial resolution of about 0.2 mm per pixel with spectral sampling of about 3.7 nm in VIS. The reflectance is given by dividing each column of the image by the mean intensity of the Spectralon® (~99% reflectance) taken in the same scene.

Samples were kept frozen until pigment analysis by HPLC (High Performance Liquid Chromatography), in order to separate, identify and quantify all pigments. The protocol for pigment extraction, HPLC equipment and the elution program were adapted from Mantoura and Llewellyn (1983) and are detailed in Méléder et al. (2003a). Chlorophylls and carotenoids were detected and characterized by their absorption spectra in the visible range of wavelength. The concentration values were extracted from absorption at 440 nm (Brotas and Plante-Cuny 1996) following an external calibration using pigment standards produced at the MMS laboratory. These values were reported in relation to surface area and expressed by surface unit, in mg.m^{-2} .

V.3.3.2. ASD field reflectance spectra of different components

Reflectance spectra of the most abundant materials that could be found at the image pixel, measured with an ASD FieldSpec3 spectrometer, are presented in Figure V.6. Diatoms, euglenas, dry sand, mud and macroalgae might be combined in a pixel. The sediment of the bay has an almost featureless spectral response in the visible near infrared (VNIR) range because mineralogical absorptions do not occur in this range. The grain size just changes their overall albedo (compare dry sand and mud in Figure V.6). As shown by Kazemipour et al. (2011) and Méléder et al. (2003a), diatoms and euglenas do not absorb or reflect light in the NIR and thus display the spectra of their background. On the contrary, macroalgae display a strong NIR reflectance plateau (the *red edge*), due to their internal structure (Galisman et al. 1970; Gausman et al. 1970; Jacquemoud and Baret 1990).

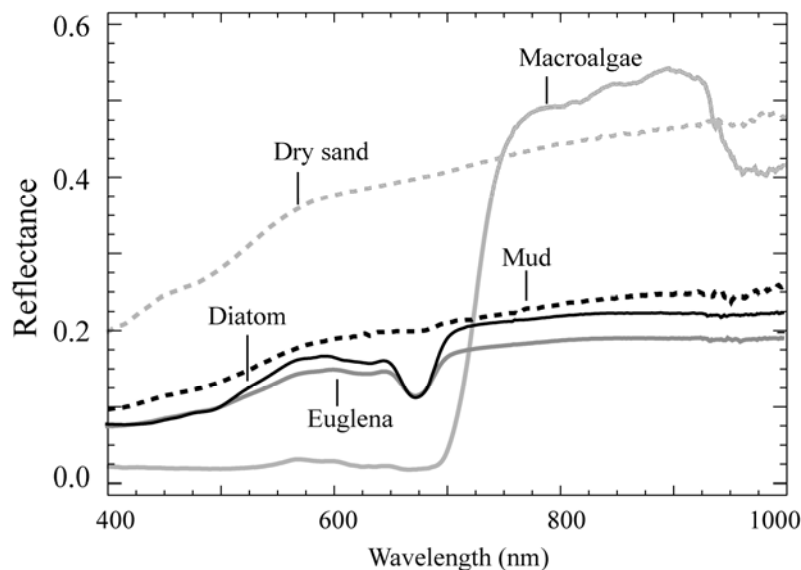


Figure V.6 : ASD reflectance spectra of different materials in the field.

In the VIS, diatoms and euglenas can be identified by their characteristic pigment assemblage. Indeed, absorption bands of diatoms at 500 nm, 550 nm and 630 nm are due to diadinoxanthin (DD) + diatoxanthine (DT), fucoxanthin (fuco) and chlorophyll *c* (Chl *c*) respectively whereas absorption bands of euglenas at 500 nm and 654 nm are due to DD and chlorophyll *b* (Chl *b*) (Bidigare et al. 1990; Lutz et al. 2001; Méléder et al. 2003a; Olaizola and Yamamoto 1994; Porra et al. 1997). Both microalgal classes, like all photosynthetic organisms, show an absorption band at 673 nm, due to Chl *a*.

V.3.4. Mapping procedure

V.3.4.1. Biomass retrieval from reflectance spectra

The optical properties of a biofilm simulated in the laboratory, incorporating *E. paludosa* cells, were calculated by MPBOM (Kazemipour et al. 2011). The biofilm is considered as a homogenous compact layer having two rough plane-parallel faces, deposited on a background (Figure V.7-a and b). The MPBOM model relies on a set of experiments presented in Kazemipour et al. (2011) revealing that the reflectance decreases regularly in the VIS range with increasing cell concentration whatever the NIR plateau whose reflectance level is the same as that of the background.

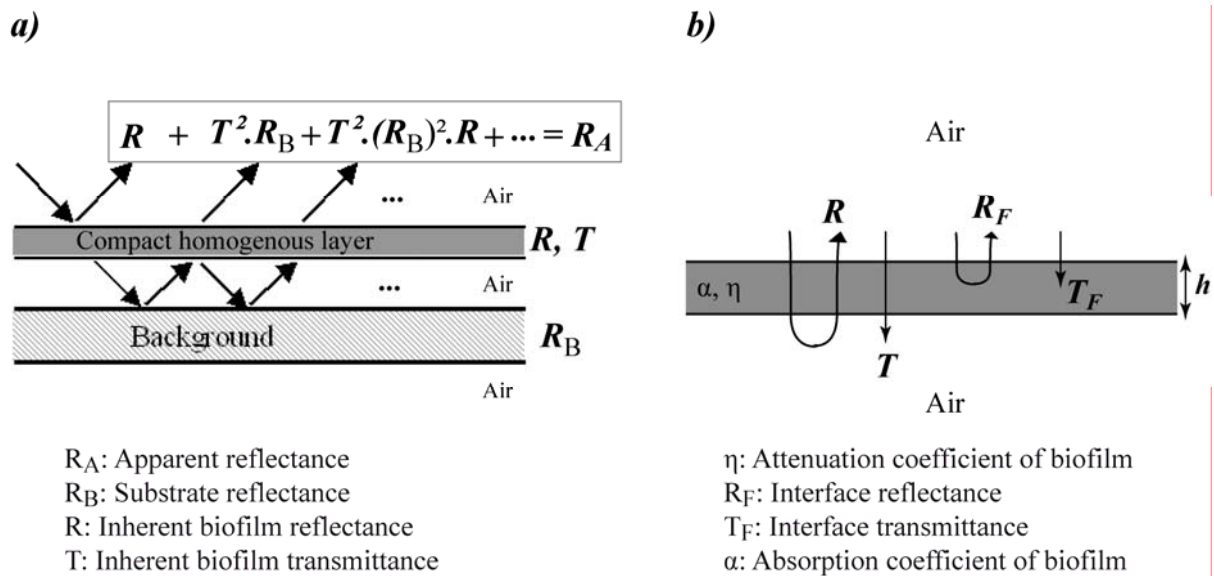


Figure V.7 : (a) theoretical presentation of a homogeneous layer immersed in air and deposited on a background having its own spectral response. (b) interaction of incident light with the homogeneous compact layer, at the interface level and also within the layer, after Kazemipour et al. (2011), Khashan and El-Naggar (2000) and Nichelatti (2002).

According to Lillesaeter (1982) and Miller et al. (1992, Kazemipour et al. (2011) state that the apparent reflected radiation R_A can be considered to be made up of (1) the inherent (biofilm) layer reflectance R with an ideally black background and (2) the multiple background reflectance R_B , which is the radiation reflected from the actual non-black background, modified by the transmittance T of the overlying layer (Figure V.7-a). Having the apparent reflectance for a layer overlying at least 2 different backgrounds (1, 2) of known

reflectance in Eq. V.1, the inherent layer reflectance R and transmittance T are given by Eqs. V.2 and V.3, respectively.

$$R_{A(1,2)} = R + \frac{R_{B(1,2)} \cdot T^2}{1 - R \cdot R_{B(1,2)}} \quad \text{V.1}$$

$$R = \frac{R_{A1}R_{B2} - R_{A2}R_{B1}}{R_{B2} - R_{B1} - R_{B1}R_{B2}(R_{A2} - R_{A1})} \quad \text{V.2}$$

$$T^2 = \frac{(R_{A1} - R)(1 - R \cdot R_{B1})}{R_{B1}} = \frac{(R_{A2} - R)(1 - R \cdot R_{B2})}{R_{B2}} \quad \text{V.3}$$

The optical properties of the biofilm, the refractive index n and the extinction coefficient k can be derived from the Fresnel formalisms relating the interface reflectance R_F and transmittance T_F (Figure V.7-b) with Eqs. V.4 and V.5 respectively.

$$R_F = \frac{(n-1)^2 + k^2}{(n+1)^2 + k^2} \quad \text{V.4}$$

$$T_F = \frac{4 \sqrt{n^2 + k^2}}{(n+1)^2 + k^2} \quad \text{V.5}$$

Considering, in an inverse mode, an infinite summation over the multi-reflected contribution of the parallel faces (Figure V.7-a), R and T are simple functions of η with R_F and T_F by Eqs. 6 and 7 respectively (Kazemipour et al. 2011; Khashan and El-Naggar 2000):

$$R = R_F + \frac{R_F T_F^2 \eta^2}{1 - R_F^2 \eta^2} \quad \text{V.6}$$

$$T = \frac{T_F^2 \eta}{1 - R_F^2 \eta^2} \quad \text{V.7}$$

By combining Eqs. V.4 to V.7 and using Eqs. V.8 and V.9 , an iterative procedure is next set up to calculate R , T , R_F , T_F and η .

$$R_F = \frac{R}{1 + \eta.T} \quad \text{V.8}$$

$$T_F = \sqrt{\frac{(1 - \eta^2 . R_F^2).T}{\eta}} \quad \text{V.9}$$

According to Lambert's absorption law, the attenuation factor η is defined as:

$$\eta = \exp(-\alpha) \quad \text{V.10}$$

where α is known as the absorption coefficient:

$$\alpha = -\ln(\eta) \quad \text{V.11}$$

Since α is a linear function of both the absorbing component concentration C_i and the specific absorption coefficient K_i (Jacquemoud and Baret 1990), it could be defined as the sum of all absorbing components considered by their concentration (Eq.V.12)

$$\alpha = \sum_i^n K_i . C_i \quad \text{V.12}$$

Noticing that the Chl *a* absorption coefficient α is maximal at 673 nm and mostly free of other pigment contributions at this wavelength, Kazemipour et al. (2011) suggested Eq. V.13, a linear regression between these values and the HPLC measurements of Chl *a* concentration,

arguing that both procedures rely on the same physical process measurement, the absorption coefficient α :

$$\text{biomass} = 96.9 \alpha_{673\text{nm}} \quad \text{V.13}$$

The prediction of biomass values is therefore possible on any sediment surface if, however, it can be given at the beginning of the procedure as R_B .

V.3.5. Application to image data

The reason for establishing MPBOM was to predict the diatom biomass in Bourgneuf Bay from hyperspectral data. The inversion was done step by step by taking into account the specific properties of diatom biofilms in order to reduce the output data and simplify the inversion procedure.

Kazemipour et al. (2011) pointed out that the inherent reflectance R of a biofilm makes a weak contribution to the observed reflectance R_A and that it does not vary with biomass. It also contains a very small fraction of energy, compared to the transmittance properties, which is equivalent to the usual level of noise in airborne images. Therefore, this term can be neglected in the MPBOM calculation chain, as follows:

- 1- The transmittance (T) is estimated from (Eq. V.3) and:
 - a. the reflectance spectrum of the pixel (R_A),
 - b. the *a priori* information about the substrate (R_B)

$$T = \left(\frac{R_A}{R_B}\right)^{0.5} \quad \text{V.14}$$

- 1- The interface transmittance (T_F) is calculated from (T) and via (Eqs. V.7 and V.8)

$$T_F = \left(\frac{T}{\eta}\right)^{0.5} \text{ and } \eta = T_F \Rightarrow T_F = \eta = \sqrt[3]{T} \quad \text{V.15}$$

- 1- Absorption coefficient is calculated from attenuation factor via (Eq.V.11);
- 2- Biomass values are estimated from absorption coefficient at 673 nm (Eq.V.13).

These formulas are the simplified forms of (Eqs. V.1-V.11) by assuming $R=R_F=0$.

V.3.5.1. Image classification and diatom maps

In order to focus the analysis on areas of interest, mainly covered by diatoms, we developed a fast parallelepipedic classification algorithm based on spectral features and band ratio listed in Eqs. 16 to 19. Since microphytobenthos contains chlorophyll, it presents the absorption characteristics of Chl *a*, the ubiquitous pigment of all photosynthetic organisms. Méléder et al. (2003b) tested a hyperspectral NDVI (calculated on narrow bands) in order to develop a quantitative estimation of biomass from reflectance data. However, NDVI cannot distinguish perfectly a macroalgae from a microphytobenthos biofilm which leads to confusion, particularly in areas of high concentration of microphytobenthos. It is therefore useful to combine it with new indices using the dissimilarities between pigment assemblages to discriminate diatoms and euglenas quickly, another possible source of confusion (Figure V.8) by the fact that:

- Chl *b* enlarges the absorption feature at 673 nm for euglenas;
- Chl *c* deepens the absorption band at 633 nm for diatoms;
- the Fuco absorption feature drives the slope of the reflectance into the range of 500-550 nm and makes diatoms brown while euglenas are green.

A combination of the following indices, together with the NDVI, can determine by multiple thresholds whether a pixel is covered by diatoms or not.

$$NDVI = \frac{R_{800} - R_{673}}{R_{800} + R_{673}} \quad V-16$$

$$I_{MPB} = \frac{2.R_{586}}{R_{495} + R_{673}} - 1 \quad V-17$$

$$I_{Euglena} = \frac{2.R_{553}}{R_{600} + R_{495}} - 1 \quad V-18$$

$$I_{Diatom} = \frac{2.R_{600}}{R_{549} + R_{673}} - 1$$

V-19

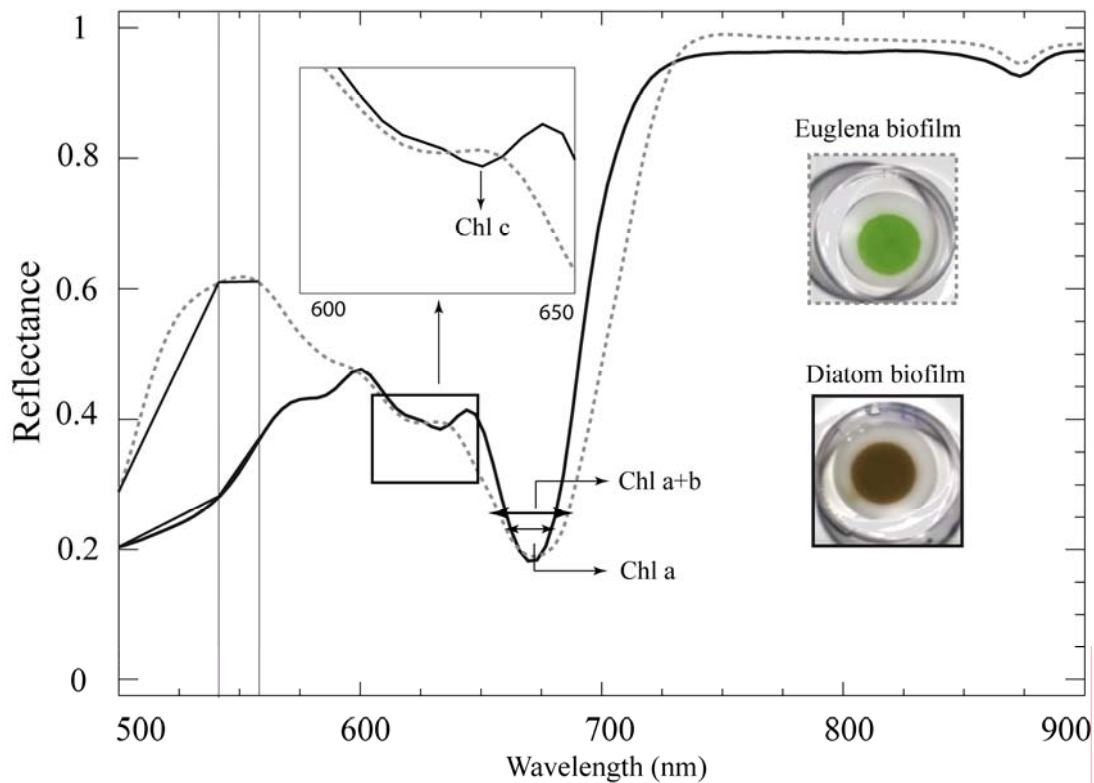


Figure V.8 : Reflectance spectra of euglena (dotted line) and diatom (solid line) biofilms.

V.3.6. Biomass quantification from images

The final goal was to quantify the total biomass (Kazempour et al. 2011) through a mask focusing the analysis on the pixel homogeneously covered by diatom cells. The model was applied to laboratory images with HPLC control of the biomass values for validation. It was then applied to two real cases, one in 2002 with ROSIS data and one in 2009 with HySpex data.

V.3.6.1. Laboratory images

In the laboratory, diatoms are layered on a polycarbonate humidified filter and the reflectance spectrum of such a substrate could be influenced by environmental effects and acquisition conditions (Figure V.9-a). The mean intensity of the reflectance rises or falls with surface orientation and position (compare spectra 1 and 3 with 2 in Figure V.9-a) like may occur on mudflats because of superficial ripple marks. Homogeneous biofilms may therefore display large variations in their mean reflectance level (Figure V.9-b). Instead of removing this kind of effect with a complex BRDF algorithm (Martonchik et al. 1998; Wanner et al. 1997) necessitating an elevation model of the ripple marks out of the scope of this publication, we chose to adjust the spectra of a pixel to the intensity of a standard background in the NIR range (Figure V.9-c). The latter provides the inherent properties of a diatom biofilm, such as its calculated attenuation factor, independent of substrate and environmental effects (Figure V.9-d), essential for the next calculation steps.

A laboratory HySpex image of a biofilm data set is depicted in Figure V.10-a. This image includes the artificial biofilms of varying concentrations, a blank wet polycarbonate filter and a euglena biofilm. Pixels covered by diatoms are presented in Figure V.10-b and, as expected, only diatom biofilms have been classified while all other materials free of diatoms, such as substrate, holders and euglena biofilm, are perfectly masked. The final biomass map is presented in Figure V.10-c estimating the biomass values at between 0 and 35 mg.m⁻². The mean biomass values of diatom biofilms measured by HPLC are shown beside the corresponding samples. The comparison between the estimated and measured values shows a good match and thus can be used to validate the model.

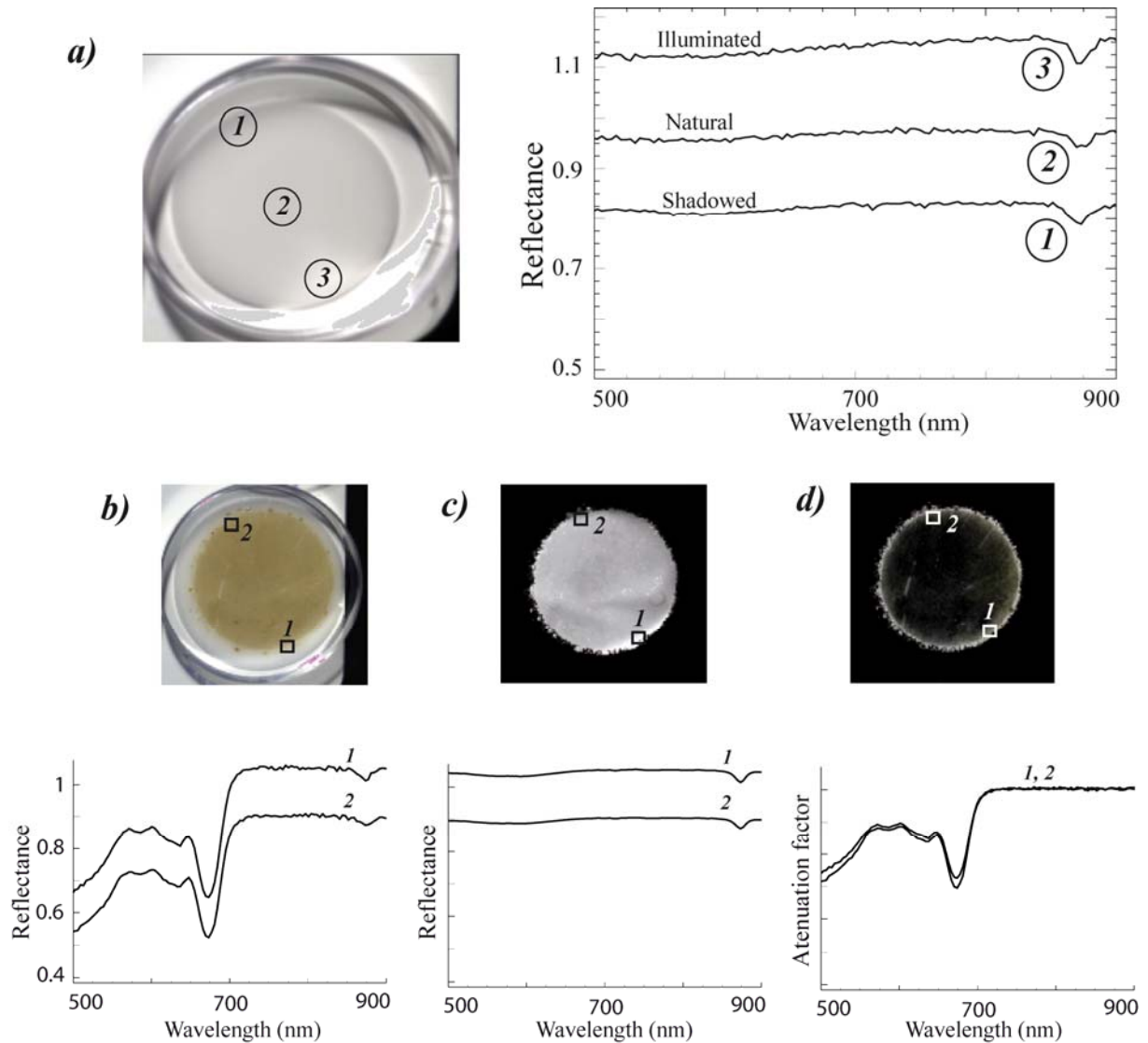


Figure V.9 : (a) image of blank polycarbonate filter on the left. Three different regions, specified by the illumination conditions, and their respective measured reflectance spectra on the right. (b) diatom cells deposited on a polycarbonate filter, with the same observation of (shadowing/ illuminating) parameters. The reflectance spectra of these zones are illustrated below. (c) substrate reflectance image, calculated from (a). The same illuminated and shadowed pixels are clearly observable and their reflectance spectra are presented below. Little folds at the surface of the filter are clearly visible. (d) calculated image of attenuation factor of diatom biofilm from (b) and (c). The attenuation factor spectra of the same illuminated and shadowed area are illustrated below and are identical in the NIR.

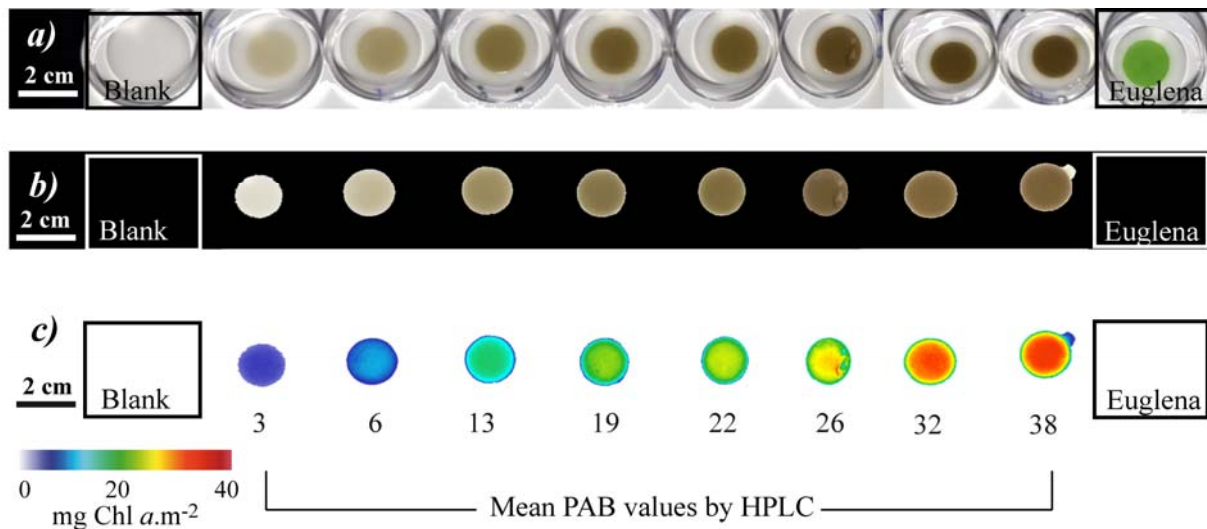


Figure V.10 : (a) HySpex image of a biofilm data set, starting with a blank filter (at top left) and ending with a euglena biofilm (bottom right). (b) diatom map calculated from (1). All other materials are masked and do not appear. (c) biomass map of diatom biofilms. HPLC mean biomass values are reported for each sample in order to compare the measured and estimated values.

V.3.6.2. Field images: from micro- to macro-scale for a real case study

The same approach as for laboratory images was applied to the ROSIS and HySpex images of Bourgneuf Bay (Figure V.4). We set new multiple thresholds to select only the pixels dominated by diatoms. A mixture of both diatom and euglena biofilms within a pixel is rare (one group always dominates the other at any mudflat location) and usually masked during the process.

The field reflectance spectrum of sediment in Bourgneuf Bay was taken into account as the substrate reflectance. The latter was adjusted to each pixel covered by diatoms in order to remove the environmental effects and to reproduce the required substrate reflectance as one of the input data. Featureless in the VIS-NIR range, both mud and wet sand substrates display similar shapes of reflectance (from Figure V.6). Biomass maps were calculated taking into account the muddy sediment reflectance spectrum as the initial input background reflectance. Furthermore, the adjustment was performed over the interval 800 to 900 nm in order to avoid the water absorption feature at 940 nm (Figure V.11).

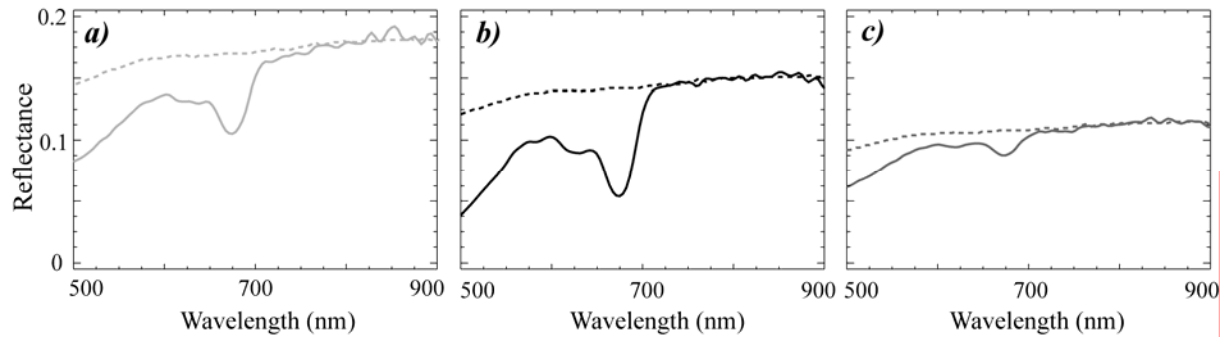


Figure V.11 : Image reflectance spectra of diatom pixels (solid lines) and the corresponding simulated reflectance spectra of the substrate (dotted lines) for (a) epipellic biofilm on sandy-muddy sediment, (b) epipellic biofilm on muddy sediment and (c) epipsammic cells mixed with sandy-muddy saturated sediment.

The biomass maps of both ROSIS and HySpex images are illustrated in Figure V.12- a and b, respectively. The maximum estimated biomass values per pixel do not exceed 35 mg.m^{-2} , in accordance with those reported in Méléder (2003). A window of the ROSIS image including different materials, such as diatom biofilm, euglena biofilm and macroalgae, is zoomed below (Figure V.12-a) to illustrate the ability of the approach to mask all material other than diatoms. Three HySpex zooms are also displayed in Figure V.12-b for the same purpose. In addition, the highest biomass values are located on the same spot in 2002 on the ROSIS image and in 2009 on the HySpex image. Similarly, the lowest biomass values are found in the same eastern part of the bay, seven years apart, on muddy-sandy sediments for epipsammic diatoms.

The biomass maps resulting from two different substrates, mud and sand, were compared and the maximum observed values did not exceed 1.8 mg.m^{-2} . The initial consideration about substrate reflectance is therefore validated and appropriate for our case study.

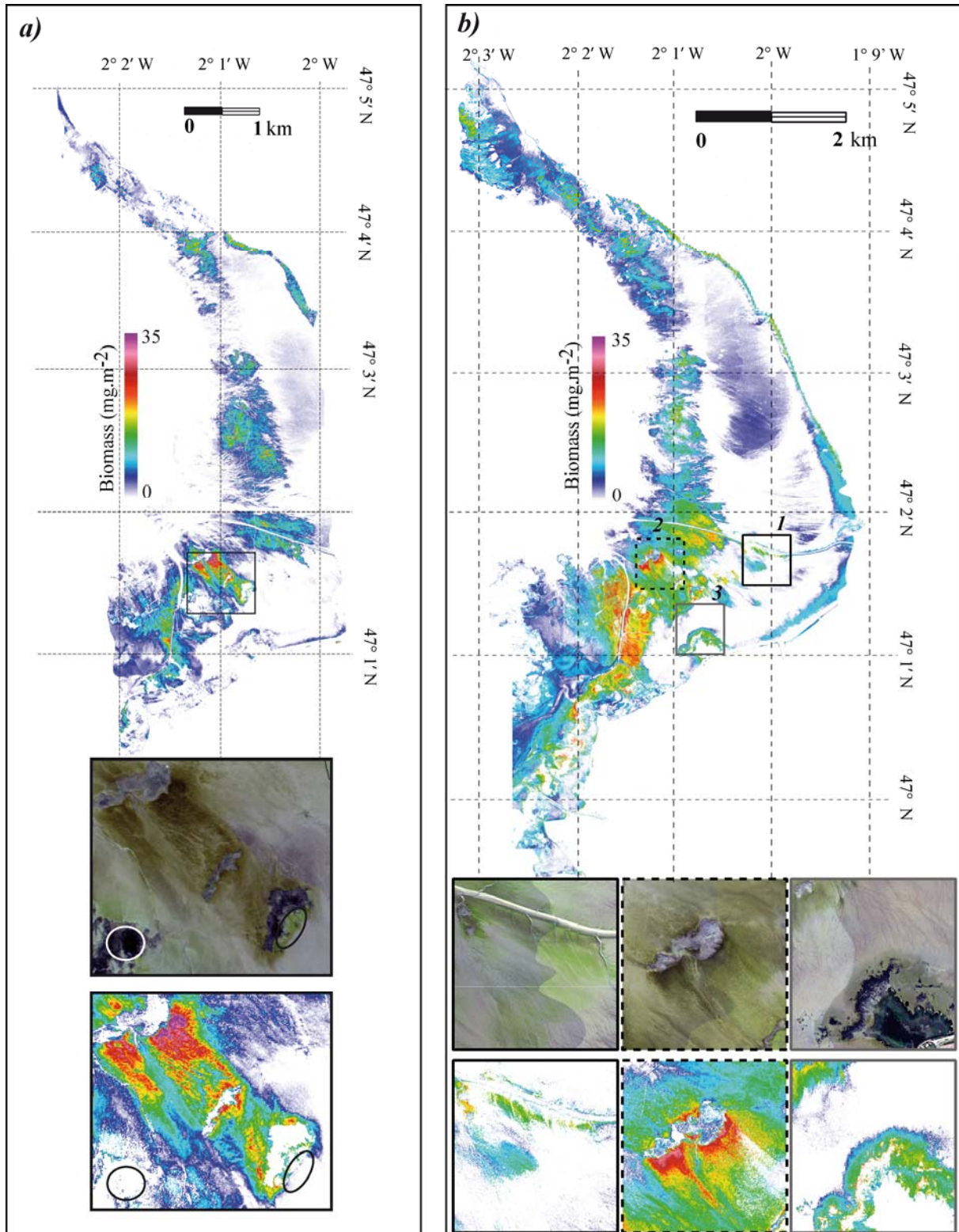


Figure V.12 : (a) biomass map from the ROSIS mosaic. A zone covered by different materials such as euglenas, macroalgae and a high concentration of diatom biofilms is outlined by a zoom. Different materials are circled on the image and on the map on which all materials other than diatom biofilms are correctly masked. (b) biomass map from the HySpex mosaic. Three regions of the HySpex image are selected to illustrate different materials: 1- an area covered partly by euglena biofilms which are visible on the image by their green colour and correctly masked on the map; 2- the zone of highest biomass is correctly mapped; 3- the area covered partly by the macroalgae and higher plants is definitely masked on the map.

V.3.7. Discussion and perspectives

For the first time, the distinction between the most spectrally similar materials, diatoms and euglenas (Figure V.13), has been provided in this work. The selection of pixels covered by diatoms based on a simple parallelepipedic classification of indices characteristic of diatoms and euglenas together with an NDVI calculated at high spectral resolution is quite efficient on both ROSIS and HySpex images. This identification is based on the spectral response of materials which dominate within a pixel. In comparison with the previous studies and biomass maps of Bourgneuf Bay (Combe et al. 2005; Méléder et al. 2003b), this strategy offers better results in terms of a greater sensitivity of identification. Both ROSIS and HySpex images have a relatively high spectral resolution (~ 4 nm) and offer the possibility of discriminating between very similar materials, evaluated for the first time.

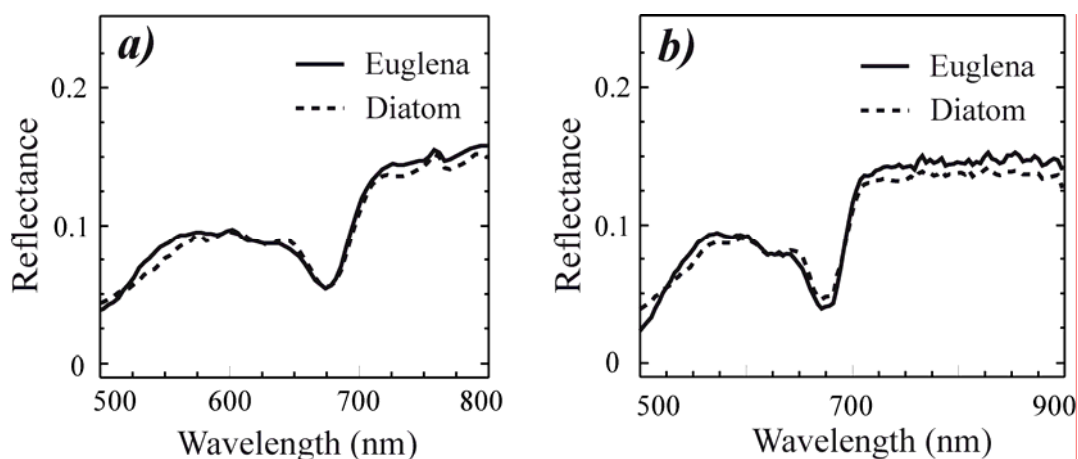


Figure V.13 : Comparison between image-extracted spectra of diatom biofilm (dotted lines) and euglena biofilm (solid lines) of (a) ROSIS image and (b) HySpex image.

The optical properties of microphytobenthos biofilm evaluated by Kazemipour et al. (2011) show that its reflectance spectrum results from a double transmission over a background in the wavelength interval 450-800 nm and that it is equal to the background in the interval 800-1000 nm due to the total transparency of biofilm in this range. In the present work, we restricted the last interval to 900 nm to avoid contributions from water, both inside sediments and at the surface forming a drainage network along ripple marks. Moreover, the very small inherent reflectance, which is independent of biomass and the absorption properties, presents less information than the calibration sensitivity of the image. Therefore, the term of inherent reflectance can be ignored in comparison with transmittance and

absorption properties during the inversion procedure for biomass retrieval. By extracting the true absorption coefficient of the biofilm, the method is in closer agreement with the principle of HPLC measurements, relying on similar physical properties (absorption).

Moreover, the quantification based on the absorption properties of Chl *a* at its corresponding absorption band is the key point to avoid the influence of physiological parameters which can change the distribution of pigments other than Chl *a*. Using an absorption intensity at 673 nm with a 9 nm effective spectral resolution (after spectral polishing) at the maximum of the Chl *a* absorption peak yields high quality biomass results. The full range of pigments could have been used to identify diatom genera or classes better but this is not yet possible since those pigment assemblages can also change with physiological status. Further studies are necessary to distinguish pigment variations due to physiology from those dependent on the type of diatom.

Although the biomass estimation in Bourgneuf Bay is mostly based on biological tools, it is very closely related to sediment characteristics. In fact, the moving cells (epipelon) colonize the muddy sediment and migrate to the surface in order to trap the light required for photosynthesis. In contrast, the sand-fixed (epipsammon) cells are found as a mixture with sand grains and can be resuspended in the water column more rapidly than epipellic cells (DeJonge 1985). These classes present similar spectral properties and cannot be distinguished directly. However, they can be identified indirectly by means of their appropriate substrate and also their average regional biomass. The biomass estimation, associated with the inherent absorbance of biofilm, and the distinction between the main assemblages of microphytobenthos at the ecosystem level were the essential goals of this work in order to take up a new challenge: productivity mapping by hyperspectral remote sensing.

V.4. Récapitulatif des résultats et discussions complémentaires

Les valeurs de biomasse photosynthétique active (PAB) ont été estimées à partir des images ROSIS et HySpex avec 7 ans d'écart. Les connaissances acquises par le modèle MPBOM sur les propriétés optiques du biofilm ont eu un intérêt primordial pour effectuer la boucle de calcul et fournir des données d'entrées essentielles. Ces propriétés, portant les informations sur le biofilm ainsi que sur son substrat, sont spécifiques du biofilm microphytobenthique.

Les biomasses prédites pour une image au laboratoire qui sont en accord avec les valeurs mesurées par CLHP peuvent être considérées comme une validation du modèle. En raison de la particularité des propriétés optiques du biofilm, l'ensemble des effets environnementaux, d'éclairage, de rugosité et des effets liés au substrat est éliminé en se basant sur la transparence du biofilm dans NIR. Ces propriétés avantageuses ont pu fournir une sorte de retrait de continuum, utile seulement pour la cartographie des biofilms du microphytobenthos des vasières intertidales.

Par ailleurs, la qualité des cartes de biomasse est remarquable pour une approche de cartographie en deux étapes : identification des surfaces couvertes par les biofilms de diatomées puis quantification de la biomasse. Par cette méthodologie, le risque de confusion entre les matériaux similaires - tels que les biofilms de diatomées et d'euglènes - est quasiment nul grâce à l'application du masque. D'ailleurs, cette étude présente pour la première fois la possibilité de distinguer les biofilms de diatomées et des biofilms d'euglènes. Un des paramètres n'ayant pas été traité dans cette étude est le problème de mélange dans un pixel de l'image ; nous allons le détailler dans le prochain paragraphe.

V.4.1. Passage de la micro à la macro échelle

Un des sujets à traiter dans toutes les études d'imagerie et de télédétection est l'hétérogénéité au sein d'un pixel. Partant du théorème d'échantillonnage de Shannon (1948), un objet est détectable et, par conséquent, identifiable si la couverture spatiale dans le pixel et son signal font ressortir ces caractéristiques dans la réponse finale. Si c'est le cas, l'analyse des mélanges spectraux à l'échelle sous-pixellaire peut être utile pour une détection plus fine. Les fractions de la lumière réfléchie par plusieurs types de surface sont intégrées sans distinction

par le capteur dans la réponse spectrale finale. Ce phénomène est connu sous le terme de ‘mélange linéaire’. Le spectre d’un pixel de mélange est la somme des spectres de réflectance de tous les matériaux, pondérés par leur couverture spatiale :

$$R = \sum_1^n R_i \cdot p_i \quad \text{V.20}$$

où R est la réflectance mesurée d’un pixel contenant n surfaces différentes, R_i est la réflectance de la surface i et p_i est sa fraction de couverture avec $p_1+p_2+\dots+p_n=1$. Résoudre le problème du mélange linéaire et extraire la couverture spatiale des surfaces qui occupent le pixel font l’objet d’un grand nombre de recherche dans le domaine de la télédétection hyperspectrale. Ce problème est le plus souvent appelé : « spectral unmixing » (Gross et Schott 1998; Richards et Jia 1998). C’est aussi le nom d’une méthode d’identification des mélanges à partir des spectres de réflectance qui permet d’attribuer à chaque pixel de l’image un pourcentage de composants élémentaires, à condition de connaître les spectres de réflectance de chaque élément. Par exemple pour le cas d’un pixel couvert par un biofilm de diatomée et de la vase, il faut connaître les spectres de la vase et du biofilm.

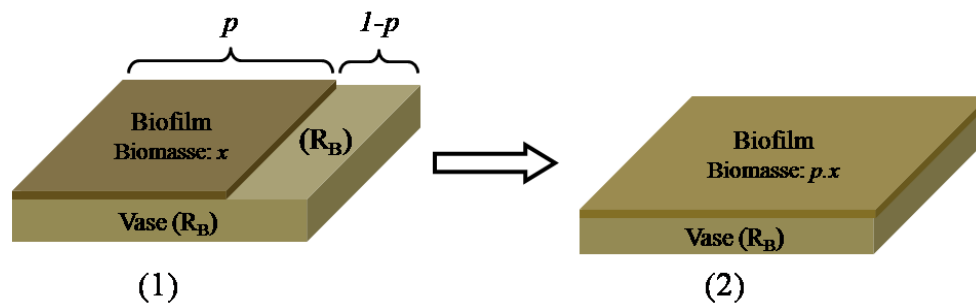


Figure V.14 : Représentation schématique d’un pixel hétérogène, couvert en partie par un biofilm (p) de biomasse x et la vase ($1-p$). Conservant la biomasse surfacique, le pixel hétérogène peut être considéré comme un pixel homogène couvert à 100% par un biofilm d’une biomasse de $p.x$.

Considérons un pixel couvert en partie par un biofilm homogène d’une biomasse x , le reste de la surface du pixel étant couvert par le substrat (la vase ou le sable). La fraction de couverture du biofilm est p et celle du substrat set $1-p$. La biomasse estimée pour un tel pixel est équivalente à celle d’un pixel couvert à 100% par un biofilm ayant une biomasse de $p \times x$, sachant que la biomasse est exprimée par unité de surface (voir Figure V.14). Considérant la biomasse comme une fonction directe de l’absorbance, ces deux pixels doivent présenter le

même coefficient d'absorption. Ces coefficients d'absorption sont calculés à partir des spectres de réflectance (R_{A1} pour le pixel réel et R_{A2} pour le pixel théorique) que nous proposons de comparer :

$$R_{A1} = p.(R_1) + (1 - p).R_B \quad \text{V.21}$$

où R_A est le spectre de réflectance observé, R_I est la réflectance du biofilm et R_B la réflectance du substrat, la vase. D'après les Eqs. V.14 et V.21 nous allons obtenir :

$$\xrightarrow{R_A=R_B.T^2} R_{A1} = p.(R_B.T^2) + (1 - p).R_B \quad \text{V.22}$$

où T_1 est la transmittance du biofilm du pixel (1)

De même pour le pixel (2), nous avons :

$$R_{A2} = R_B.T^2 \quad \text{V.23}$$

où T_2 est la transmittance du biofilm du pixel (2).

Pour trouver la relation entre T_1 et T_2 nous devons commencer par calculer le coefficient d'absorption de ces deux biofilms. Étant en relation directe avec la biomasse, le coefficient d'absorption des biofilms (1) et (2) sont définissent comme suivant :

$$\alpha_2 = p.\alpha_1 \Rightarrow \exp(\alpha_2) = (\exp(\alpha_1))^p \quad \text{V.24}$$

D'après l'Eq V.11, nous avons :

$$\frac{1}{\eta_2} = \frac{1}{\eta_1^p} \Rightarrow \eta_2 = \eta_1^p \quad \text{V.25}$$

où η désigne le facteur d'atténuation du biofilm qui est fonction de la transmittance du biofilm d'après l'Eq V.15 :

$$T = \eta^3 \Rightarrow T_2 = T_1^{3p} \quad \text{V.26}$$

D'après les Eqs. V.14 et V.26 nous obtenons :

$$T = \eta^3 \Rightarrow R_{A2} = R_B \cdot T_1^{2p} \quad \text{V.27}$$

Cette dernière peut être interprétée comme il suit : pour conserver les propriétés d'absorbance d'un pixel expliqué précédemment, la réflectance totale du pixel doit être calculé par l'Eq. V.27. Bien que la réflectance observée d'un tel pixel par le capteur est défini par l'Eq.V.28 , la biomasse estimée pour un pixel non homogène ne correspond pas à la biomasse surfacique qui doit couvrir la totalité du pixel.

$$R_{A1} = p \cdot (R_B \cdot T^2) + (1 - p) \cdot R_B \quad \text{V.28}$$

La Figure V.15 illustre un exemple de pixel de vase couvert par des biofilms de 58 mg m⁻² et 30mg.m⁻². La réflectance du pixel synthétique couvert par 50% de biomasse du biofilm de 58 mg.m⁻² devrait être (à 1% près) égale à celle du pixel couvert par 100% d'un biofilm de biomasse de 30 mg.m⁻². Ce n'est clairement pas le cas. La réflectance du pixel de mélange ne présente pas la réflectance attendue.

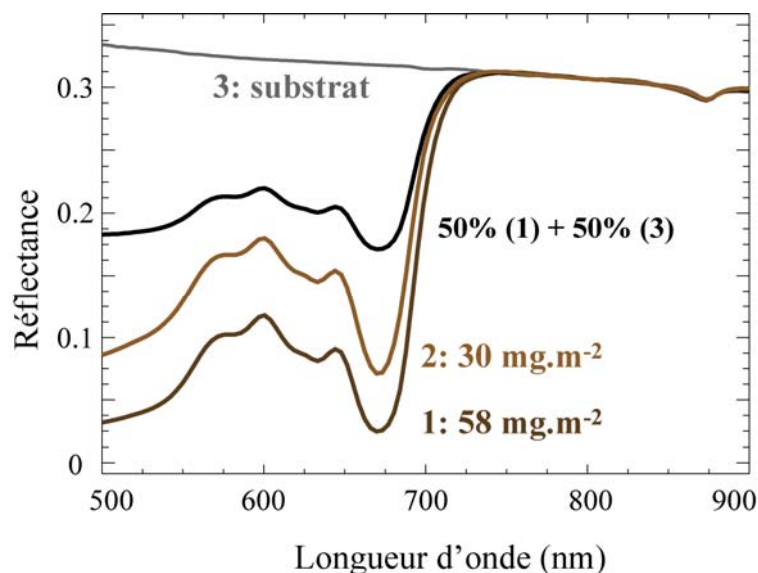


Figure V.15 : Exemples d'un mélange linéaire d'un pixel couvert à 50% par un biofilm de biomasse 58 mg. m⁻² et le substrat.

La déconvolution du spectre mesuré par les méthodes classiques d'unmixing n'est donc pas possible. Combe et al. (2005) ont proposé une librairie spectrale contenant les mélanges de différentes biomasses en considérant les fractions de couverture surfacique variées. De façon intéressante, les zones couvertes par les biofilms sont majoritairement classées par une couverture de 100%. De plus, en faisant l'hypothèse que les pixels sont homogènes, les cartes obtenues par notre étude sont comparables avec celles de Combe et al. (2005), pour les quelles une hétérogénéité sous-pixellaire est prise en compte.

V.4.2. Eau superficielle

La présence de l'eau superficielle sur le sédiment et sur le biofilm a déjà été évoquée. Toutefois, ce point n'est pas considéré dans la procédure de la cartographie. En effet, cette couche d'eau modifie le plateau NIR sur lequel est basé l'ajustement du spectre de réflectance du substrat (Figure V.16). En conséquence, les calculs basés sur l'extraction de la réflectance du substrat à partir du plateau NIR conduisent à une sous estimation de la biomasse. Ce point doit être considéré prochainement, afin d'améliorer le modèle existant en ajoutant un modèle de l'eau libre à la surface pour estimer plus précisément les valeurs de la biomasse, y compris dans les quelques zones où le drainage de surface n'a pas été complet.

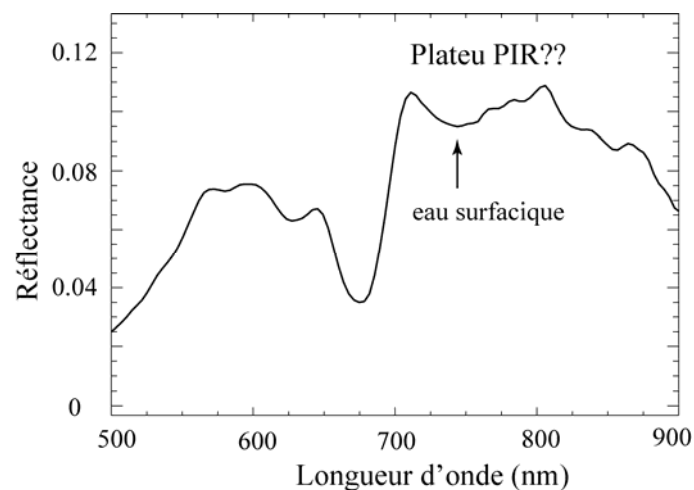


Figure V.16 : Spectre de réflectance d'un biofilm de diatomées couvert par une pellicule d'eau. La bande d'absorption de l'eau claire autour de 730 nm modifie grandement le plateau NIR et son niveau.

La modélisation de l'eau superficielle et sa relation avec le biofilm porte une autre information à l'échelle de la vasière. Comme nous l'avons déjà montré (II.3.2), les biofilms

de microphytobenthos se forment sur des endroits précis de la surface des vasières. Cela veut dire que les apparitions de microphytobenthos et la formation du biofilm ne sont pas aléatoires et dépendent de paramètres, peut être plus profonds, tels que les eaux sous terraines. L'image de drainage (Figure V.17) indique en effet très clairement que la limite principale du microphytobenthos est associée à l'émergence d'une nappe phréatique qu'il conviendrait d'étudier en détail.

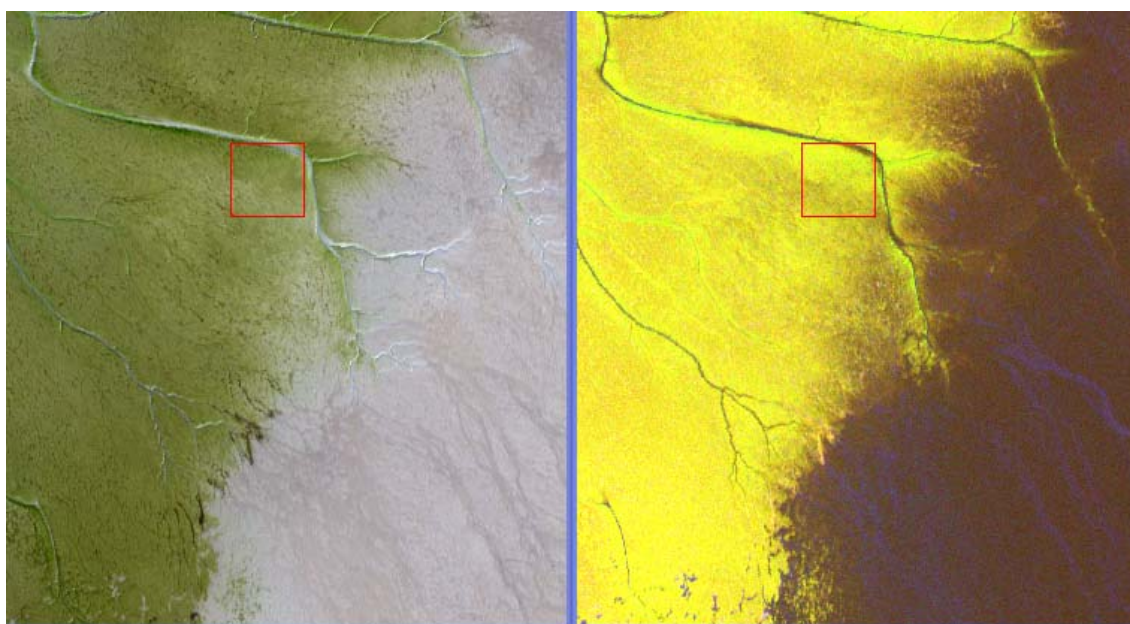


Figure V.17 : À gauche, zoom d'une zone de limite d'apparition du biofilm de microphytobenthos. À droite, composition colorée mettant en évidence l'eau claire de surface en bleu, les euglènes en vert et, les diatomées en jaune orangé. On voit très bien aussi que le réseau de drainage change à la frontière du microphytobenthos.

V.5. Conclusion partielle

La stratégie appliquée pour simplifier le modèle d'inversion et la réduction des données de sortie semble être pertinente pour la cartographie de la biomasse à macro-échelle. Les connaissances obtenues sur la structure interne du biofilm et sur ses propriétés optiques sont indispensables pour extraire des valeurs de biomasse à partir des images. La transparence du biofilm de microphytobenthos dans le NIR offre la possibilité d'extraire l'albedo de son substrat, tel qu'il est influencé par les conditions environnementales. Ce substrat ne présentant pas de forme spectrale particulière, connaissant son albédo nous sommes donc capables de simuler son spectre de réflectance à partir d'une connaissance *a priori*. Cette dernière est basée sur un spectre de vase retournée, mesuré sur le terrain et suffisant pour caractériser les sédiments sur lesquels les biofilms de diatomées se développent.

L'identification des zones couvertes par le biofilm de microphytobenthos à l'aide du masque basé sur les indices spectraux fonctionne parfaitement bien. Les confusions classiques entre les biofilms de diatomées et d'euglènes ainsi que les macroalgues sont évitées. En effet, les cartes obtenues ne présentent pas la biomasse totale de tous les microphytobenthos car nous n'avons cartographié que les biofilms de diatomées. Nous avons masqué les biofilms d'euglènes pour la simple raison que la relation entre la biomasse et le coefficient d'absorption est établie seulement pour les biofilms de diatomées et que nous ne disposons pas d'espèces d'euglènes marines cultivables pour en déterminer toutes les caractéristiques.

La validation a seulement été effectuée sur les images de laboratoire. Dans le cas des images de la baie, la validation est soumise à la forte contrainte de l'échantillonnage, qui nous a fait choisir la télédétection comme méthode de cartographie. En effet, une validation robuste nécessite l'échantillonnage d'un pixel entier (1-4 m²) sur la base d'un sous échantillonnage pour des mesures en CLHP couvrant chacun une superficie de 25 cm² maximum. En d'autres termes, il faut mettre en place un échantillonnage systématique tels ceux mis en place pour un krigeage, à l'échelle d'un pixel. La validation des cartes reste un challenge à relever à la suite de ce travail. Le problème du mélange linéaire dans un pixel doit être aussi étudié ultérieurement afin d'obtenir des cartes de biomasse plus précises. Ces deux questions ne pourront être résolues que par un retour vers l'échantillonnage de terrain.

Discussion et perspectives

L'objectif principal de cette thèse était la caractérisation hyperspectrale du biofilm de microphytobenthos, avec pour but final de cartographier la biomasse photosynthétique active à l'échelle d'un écosystème côtier. Malgré la complexité du processus, un modèle simple de transfert radiatif de la lumière à travers le biofilm est mis en place et validé pour la première fois. Ce modèle de propriétés optiques du biofilm, le MPBOM, décrit sa réponse spectrale en fonction de sa structure et de ses propriétés d'absorption et de diffusion. La relation établie entre la concentration de la Chl *a* (classiquement reliée à la biomasse) et le coefficient d'absorption de cette chlorophylle est utilisée pour estimer les valeurs de biomasse, qualifiée de photosynthétique active à partir d'une image hyperspectrale de la baie de Bourgneuf.

La modélisation des propriétés optiques du biofilm a donc été établie à partir de mesures de réflectance précises faites au laboratoire en conditions contrôlées. Nous avons démontré que le spectre de réflectance du biofilm varie seulement en fonction de l'absorbance de ce biofilm et de la réflectance de son substrat dans l'intervalle de longueur d'onde 400-1000 nm. Les expériences menées sur des suspensions de diatomées dans l'agarose montrent que la distribution des cellules dans un tel milieu joue un rôle très important dans les propriétés de diffusion et que la modification de la structure interne d'un biofilm peut grandement modifier sa réponse spectrale. La modélisation la plus proche d'un biofilm naturel de microphytobenthos, complètement transparent dans le domaine NIR, est donnée par la filtration douce de diatomées sur un filtre. Ce biofilm présente un plateau NIR qui ne dépend que du spectre de réflectance de son substrat. Absorbant en VIS et transparent en NIR, un biofilm de microphytobenthos ne serait pas visible si son substrat ne réfléchissait pas la lumière. Il a ainsi été intéressant de comparer le cas du biofilm avec celui d'une feuille, en raison des fortes similarités liées notamment à la présence des pigments. Les études portant sur les feuilles vertes, beaucoup plus nombreuses que celles portant sur le biofilm, nous ont permis de présenter une synthèse robuste. Les résultats de comparaison montrent que le biofilm est un modèle simplifié d'une feuille. L'absence de structure interne ne permet pas de générer de fortes réflectances dans le domaine NIR comme dans le cas d'une feuille.

L'approche proposée pour la cartographie de la biomasse microphytobenthique de la baie de Bourgneuf a nécessité l'utilisation de l'intégralité des données de haute résolution spectrale que ce soit pour l'identification ou la quantification.

Pour l'identification, afin d'éviter les confusions entre les biofilms de diatomées et les biofilms d'euglènes d'aspect très similaire sur le terrain, nous utilisons la finesse de la résolution hyperspectrale pour accéder à la forme exacte de la bande d'absorption étroite de la Chl *a*, puis distinguer la présence de la Chl *c* de celle de la Chl *b* ainsi que d'autres pigments pour construire un jeu de masques spécifiques à chaque biofilm par combinaison d'indices spectraux mesurant la forme des absorptions caractéristiques de ces pigments.

La quantification s'effectue dans une deuxième étape par une inversion simplifiée du modèle MPBOM à travers le masque de sélection du biofilm de diatomées. La simplification de l'inversion est permise par le fait que la réflectance propre des biofilms de diatomées peut être négligée.

L'ensemble de la procédure a été validé sur un jeu d'images de biofilms sur différents supports au laboratoire ; les biomasses prédites sont en bon accord avec celles mesurées par CLHP. Toutefois, cette validation n'est pour le moment réalisée que pour des biofilms en laboratoire. L'échantillonnage du sédiment à l'échelle d'un pixel (1-4 m²), nécessitant un important travail de terrain, doit être mise en place pour une validation à l'échelle de l'écosystème.

La distinction entre la chlorophylle de diatomées participant à la photosynthèse et la chlorophylle photosynthétique compétente devra également être validée. Dans l'idéal il faudrait avoir une estimation de l'accessibilité de la lumière par les cellules. Guarini et al. (2000) ainsi que Herlory et al. (2004) ont défini la « couche photique » ou plus exactement la biomasse photosynthétique active pour les diatomées benthiques à la surface du sédiment, c'est-à-dire le biofilm. Cette couche a une épaisseur du même ordre de grandeur que la taille des diatomées (au maximum 200 µm selon Herlory et al. (2004)) à cause de la forte atténuation de la lumière dans le sédiment. Ceci est très petit par rapport aux variations microtopographiques du sédiment (de l'ordre du centimètre). En conséquence, une quantification précise du taux d'atténuation à l'échelle de l'écosystème n'est pas envisageable d'un point de vue pratique. Il faut donc actuellement considérer, à l'instar de Guarini et al. (2000) et de Herlory et al. (2004) que les cellules sont soit à la lumière, soit à l'obscurité, c'est-à-dire qu'un environnement photique est discrétisé dans le sédiment. Les cellules

migrent à la surface pour avoir accès à la lumière pour la photosynthèse et seules les cellules à la surface ont la possibilité de participer à la photosynthèse. En conséquence, la biomasse photosynthétique active est la concentration de la Chl *a* de cette couche surfacique, les cellules restant en dessous, dans le sédiment, étant alors considérées comme biomasse photosynthétique compétente. Comme c'est cette même couche de surface qui est observée par les méthodes spectroscopiques et de télédétection ces méthodes ne permettent pas de détecter les biomasses ne participant pas à la photosynthèse au moment de la mesure, contrairement aux méthodes CLHP. Celles-ci tirent partie de la séparation des pigments pour détecter toute la Chl *a* d'un échantillon, qu'elle ait été active ou non dans le sédiment. Cette épaisseur de sédiment contenant la photosynthèse active du biofilm a été estimée par Jesus et al. (2006) à 125 μm . Bien que la lumière ne pénètre pas jusqu'à 2000 μm , cet auteur a montré que la concentration en Chl *a* des couches profondes non actives restait proportionnelle à la biomasse mesurée en surface, suggérant ainsi qu'il pouvait exister un échange entre ces niveaux, seul capable d'expliquer cette proportionnalité. Cette concentration en Chl *a* non détectable en surface reste donc importante à déterminer pour estimer toute l'activité potentielle d'un biofilm.

Nous pouvons donc conclure que la télédétection VIS-NIR est un outil capable de distinguer la biomasse photosynthétique active plus sûrement que l'échantillonnage sur le terrain, à condition d'avoir une méthode de cartographie robuste reposant sur des données hyperspectrales de résolution spectrale suffisante. Idéalement, nous devrions pouvoir proposer l'affichage de biomasses effectives à partir de la conversion des densités de biofilm détectées par spectrométrie VIS-NIR en volume ou en masse de biofilm. La variabilité des tailles des cellules au sein du biofilm constitué d'espèces différentes entre le terrain et les cultures monospécifiques de laboratoire ne permet pas cette conversion. Même s'il était possible de reconstituer des mélanges d'espèces au laboratoire, pour reproduire un peuplement, il serait très difficile d'arriver à des conditions de cultures, notamment en lumière, reproduisant exactement les conditions de terrain. Les rapports entre la teneur en carbone et celle de la Chl *a* seront toujours différents. Une des réponses à cette problématique, comme la validation à l'échelle de l'écosystème, est un retour au terrain. En effet, cette variabilité du ratio C / Chl *a* est connue, mais quelle est son réel poids sur des peuplements homogènes couvrant plusieurs hectares ? N'y aurait-il pas un coefficient moyen, applicable sur toute l'image, pour transformer la Chl *a* en Carbone ?

Cette possibilité de passer à la biomasse vraie à l'échelle de l'écosystème n'est pas la seule perspective offerte par ce travail. En effet le fait que l'extraction de l'absorbance propre au biofilm soit rendue possible ouvre de nouvelles possibilités pour l'étude du microphytobenthos et plus particulièrement de sa physiologie. Cette perspective n'était absolument pas envisagée au début de ce travail de thèse, mais les résultats obtenus permettent aujourd'hui de proposer la télédétection VIS-NIR comme technique d'étude non invasive de la physiologie du microphytobenthos, à l'instar de la fluorescence, comme cela a déjà été évoqué par Jesus et al. (2008). Une nouvelle stratégie d'étude peut être mise en place à partir de la détermination directe des masses mises en jeu à l'échelle de supports en polycarbonates sur lesquels sont simulés des biofilms. Il est alors possible de savoir quelle est la part réellement absorbée de la lumière incidente, choses qui n'avait jamais été estimée sur un biofilm, mais toujours sur des cellules remises en suspension, ce qui était une réelle contrainte pour les études physiologiques (Consalvey et al. 2005). Cette fraction absorbée peut alors être mise en relation directe avec la photosynthèse si la capacité photosynthétique du biofilm détecté est connue. Or, cette dernière peut être estimée par télédétection VIS-NIR via la composition pigmentaire, en l'occurrence certains caroténoïdes : les xanthophylles (Jesus et al. 2008). Un travail complémentaire pourra donc être fait sur l'acquisition des spectres de référence sur un panel d'espèces représentatives des peuplements microphytobenthiques cultivées à différentes intensité de lumières. Cette acquisition à partir de caméras hyperspectrales permet d'accéder à une finesse jusque là inconnue des points de mesure (à 0,2 mm) nous donnant accès à un traitement statistique d'évaluation de la qualité des mesures. Les outils et la méthodologie sont donc maintenant disponibles pour aller au-delà de l'estimation de la biomasse totale du microphytobenthos à diatomées en proposant des études sélectives sur certaines classes tout en prenant en compte les variations d'état physiologique, afin de proposer une carte de productivité du microphytobenthos, voire de production.

Une étude plus approfondie du sédiment de la baie, comme un paramètre d'entrée du modèle, est nécessaire pour étendre la validation des résultats sur des terrains non encore pris en compte. En effet, l'ajustement du spectre de la vase sur le plateau NIR du spectre du biofilm de diatomées est valable pour l'intervalle de 550-900 nm pour la vase la plus commune rencontrée sur la baie de Bourgneuf. En deçà de cette longueur d'onde, les spectres de différents types de substrat, tels le sable plus ou moins humide, présentent des pentes légèrement différentes. Si cela n'a pas de conséquence sur l'estimation de la biomasse dans

l'intervalle de longueurs d'onde indiqué, cela devient gênant pour l'étude des autres pigments dans l'intervalle de 400-550 nm, domaine d'absorbance des xanthophylles. Or ce domaine est crucial pour l'étude de la physiologie des cellules et donc pour pouvoir passer à la cartographie de la production.

Plusieurs perspectives complémentaires peuvent être proposées :

- Une perspective multidisciplinaire porte sur la sédimentologie de la baie de Bourgneuf. La cartographie de la distribution spatiale et de la biomasse du microphytobenthos peut être très utile pour la connaissance de la granulométrie du sédiment superficiel puisque nous avons constaté que celui-ci se développait préférentiellement sur des vases lorsqu'ils sont épipélicaux et sur des sédiments vaseux lorsqu'ils sont épipsammiques.
- La prévision de l'évolution du littoral est réalisable grâce à des campagnes aéroportées régulières. Le modèle de prédiction de la biomasse photosynthétique active, accompagné par des modèles d'hydrologie, pourrait fournir des informations fondamentales pour la compréhension du fonctionnement de la baie de Bourgneuf. Un suivi saisonnier et à long terme est envisageable afin de modéliser le fonctionnement de cet écosystème dans le temps.
- Le modèle établi peut être appliqué à des écosystèmes côtiers turbides similaires. Nous pouvons parler notamment la baie du Mont Saint-Michel ou de Marennes Oléron qui ont des caractéristiques proches de celles de la baie de Bourgneuf.

Annexe 1

Développement des formules

A.1. Calcul de la réflectance et de la transmittance d'une couche

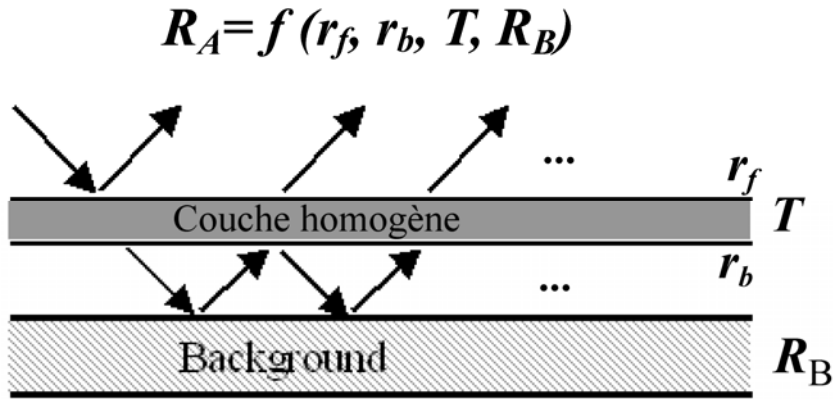


Figure A.1 : Représentation schématique de la réflectance mesurée d'une couche homogène sur un support.

D'après la Figure A.1, la réflectance apparente d'une couche homogène sur un support obtenue par un capteur est une fonction des propriétés de la couche et de la réflectance du support :

$$R_A = r_f + T \cdot R_B \cdot T + T \cdot R_B \cdot r_b \cdot R_B \cdot T + T \cdot R_B \cdot r_b \cdot R_B \cdot r_b \cdot R_B \cdot T + \dots \quad A.1$$

où r_f est la réflectance de la face supérieure de la couche, T est la transmittance de la couche, r_b est la réflectance de la face inférieure de la couche, R_B est la réflectance du support. Les propriétés de la couche restent identiques et les seuls paramètres variants sont la réflectance apparente et la réflectance du support. L'équation A.1 est complètement développée et peut s'écrire de façon plus compacte selon l'équation A.2 :

$$R_A = r_f + T^2 \cdot R_B + T^2 \cdot R_B^2 \cdot r_b + T^2 \cdot R_B^3 \cdot r_b^2 + \dots$$

$$\Rightarrow R_A = r_f + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R_B \cdot (R_B \cdot r_b)^n \quad A.2$$

En appliquant le théorème de la somme d'une série infinie pour calculer la réflectance apparente de la couche sur 3 supports différents de réflectances R_{B1} , R_{B2} et R_{B3} , nous obtenons :

$$R_{A1} = r_f + \frac{R_{B1} \cdot T^2}{1 - (r_b \cdot R_{B1})} \quad A.3$$

$$R_{A2} = r_f + \frac{R_{B2} \cdot T^2}{1 - (r_b \cdot R_{B2})} \quad \text{A.4}$$

$$R_{A3} = r_f + \frac{R_{B3} \cdot T^2}{1 - (r_b \cdot R_{B3})} \quad \text{A.5}$$

Les équations A.6 à A.11 ont pour but de résoudre le système des équations A.3-A.5 afin de calculer les propriétés inconnues de la couche r_b , t et r_f . Par combinaison de A.3 à A.5 nous obtenons :

$$R_{A2} - R_{A1} = T^2 \cdot \left(\frac{R_{B2}}{1 - (r_b \cdot R_{B2})} - \frac{R_{B1}}{1 - (r_b \cdot R_{B1})} \right) \quad \text{A.6}$$

et

$$R_{A3} - R_{A2} = T^2 \cdot \left(\frac{R_{B3}}{1 - (r_b \cdot R_{B3})} - \frac{R_{B2}}{1 - (r_b \cdot R_{B2})} \right) \quad \text{A.7}$$

Le rapport de A.7 sur A.6

$$\frac{R_{A3} - R_{A2}}{R_{A2} - R_{A1}} = \frac{(R_{B3} - R_{B2}) \cdot (1 - (r_b \cdot R_{B1}))}{(R_{B2} - R_{B1}) \cdot (1 - (r_b \cdot R_{B3}))} \quad \text{A.8}$$

permet d'extraire r_b la réflectance de la face inférieure

$$r_b = \frac{\left[\left((R_{A2} - R_{A1}) (R_{B3} - R_{B2}) \right) - \left((R_{app3} - R_{app2}) (R_{B2} - R_{B1}) \right) \right]}{\left[\left((R_{A2} - R_{A1}) (R_{B1} \cdot (R_{B3} - R_{B2})) \right) - \left((R_{A3} - R_{A2}) (R_{B3} \cdot (R_{B2} - R_{B1})) \right) \right]} \quad \text{A.9}$$

pour calculer T la transmittance de la couche

$$T^2 = \frac{(R_{A2} - R_{A1}) \cdot (1 - (r_b \cdot R_{B2})) \cdot (1 - (r_b \cdot R_{B1}))}{(R_{B2} - R_{B1})} = \frac{(R_{A3} - R_{A2}) \cdot (1 - (r_b \cdot R_{B3})) \cdot (1 - (r_b \cdot R_{B2}))}{(R_{B3} - R_{B2})} \quad \text{A.10}$$

puis r_f la réflectance de la face supérieure

$$r_f = R_{A1} - \left(\frac{R_{B1} \cdot T^2}{1 - (r_b \cdot R_{B1})} \right) \quad \text{A.11}$$

Simplification 1 Comme la réflectance surfacique de chaque face de la couche est identique et égale à R ($r_f = r_b = R$), le nombre des inconnues se réduit à 2 et les équations A.3 et A.4 se simplifient en équations A.12 et A.13 :

$$R_{A1} = R + \frac{T^2 \cdot R_{B1}}{1 - R_{B1} R} \quad \text{A.12}$$

$$R_{A2} = R + \frac{T^2 \cdot R_{B2}}{1 - R_{B2}R} \quad \text{A.13}$$

Leur recombinaison permet de calculer R :

$$\begin{aligned} \frac{R_{A2} - R}{R_{A1} - R} &= \frac{R_{B2} \cdot T^2}{1 - R \cdot R_{B2}} \cdot \frac{1 - R \cdot R_{B1}}{R_{B1} \cdot T^2} = \frac{R_{B2} - R \cdot R_{B1} \cdot R_{B2}}{R_{B1} - R \cdot R_{B1} \cdot R_{B2}} \\ \Rightarrow R_{A1} \cdot R_{B2} - R_{A1} \cdot R \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} - R \cdot R_{B2} + R^2 \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} \\ &= R_{A2} \cdot R_{B1} - R_{A2} \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} \cdot R - R \cdot R_{B1} + R^2 \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} \end{aligned} \quad \text{A.14}$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow R_{A1}R_{B2} - R_{A2}R_{B1} &= R \cdot R_{A1} \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} + R \cdot R_{B2} - R_{A2} \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} \cdot R - R \cdot R_{B1} \\ &= R \cdot (R_{A1} \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} + R_{B2} - R_{A2} \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} - R_{B1}) \end{aligned} \quad \text{A.15}$$

$$R = \frac{R_{A1}R_{B2} - R_{A2}R_{B1}}{(R_{A1} \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} + R_{B2} - R_{A2} \cdot R_{B1} \cdot R_{B2} - R_{B1})} = \frac{R_{A1}R_{B2} - R_{A2}R_{B1}}{R_{B2} - R_{B1} - R_{B1} \cdot R_{B2} \cdot (R_{A2} - R_{A1})} \quad \text{A.16}$$

puis T :

$$T = \left(\frac{(R_{A1} - R)(1 - R \cdot R_{B1})}{R_{B1}} \right)^{0.5} = \left(\frac{(R_{A2} - R)(1 - R \cdot R_{B2})}{R_{B2}} \right)^{0.5} \quad \text{A.17}$$

Simplification 2 La réflectance de la couche intervient comme une réflectance produite immédiatement à la surface sans participation aux allers-retours de la lumière. Les équation A.12 et A.13 se simplifient alors en équations A.18 et A.19 :

$$R_{A1} = R + T^2 \cdot R_{B1} \quad \text{A.18}$$

$$R_{A2} = R + T^2 \cdot R_{B2} \quad \text{A.19}$$

La soustraction de A.19 à A.18 :

$$R_{A2} - R_{A1} = T^2 \cdot (R_{B2} - R_{B1}) \quad \text{A.20}$$

et la transmittance de la couche est calculées à l'aide d'équations A.21 :

$$T = \left(\frac{(R_{A2} - R_{A1})}{(R_{B2} - R_{B1})} \right)^{0.5} \quad \text{A.21}$$

en remplaçant la transmittance calculée dans une des équations A.18 ou A.19, la réflectance de la couche est calculée par l'équation A.22

$$R = R_{A1} - T^2 \cdot R_{B1} = R_{A2} - T^2 \cdot R_{B2} \quad \text{A.22}$$

Simplification 3 Si la réflectance de la couche est négligeable et ne participe pas dans la réflectance apparente alors la seule inconnue n'est plus que la transmittance de la couche et une seule mesure suffit pour calculer ce paramètre (équations A.22 et A.23).

$$R_A = R_B * T^2 \quad \text{A.23}$$

$$T = \sqrt{\frac{R_{A1}}{R_{B1}}} = \sqrt{\frac{R_{A2}}{R_{B2}}} \quad \text{A.24}$$

A.2. Calcul du coefficient d'absorption à partir des valeurs de R et T

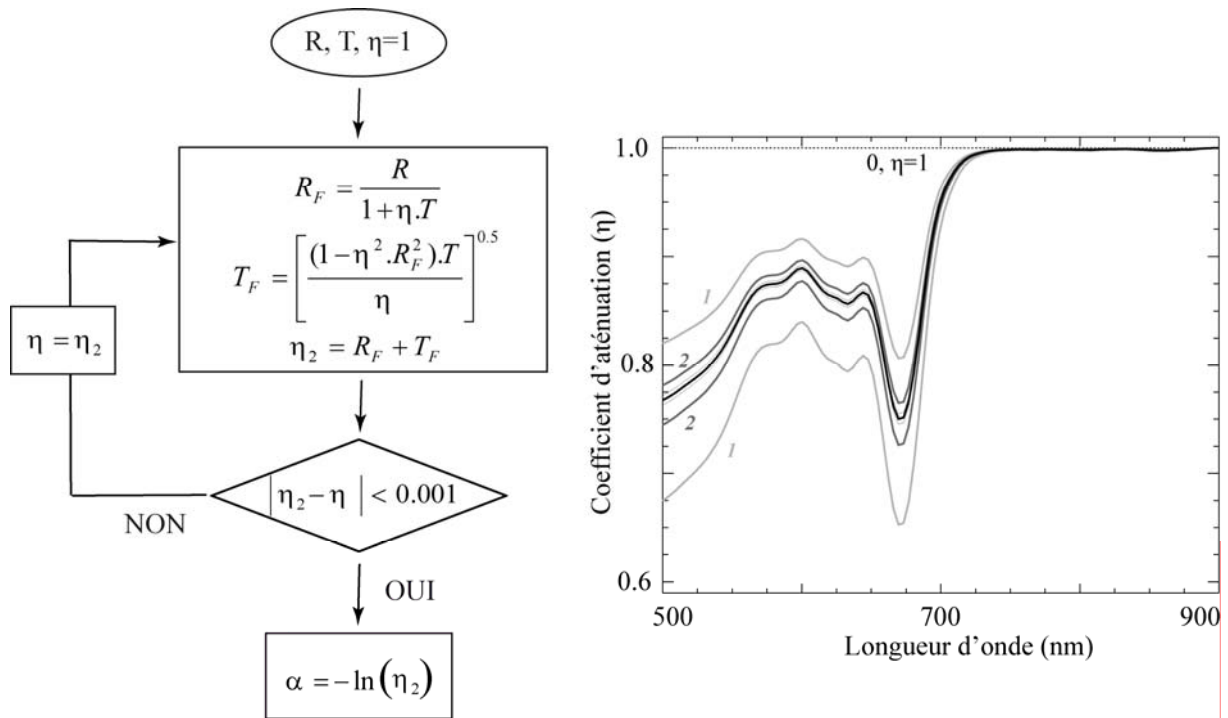


Figure A.2 : Représentation schématique du calcul itératif du coefficient d'atténuation et exemples des spectres obtenus à chaque étape.

Bibliographie

ACORN (2001). Atmospheric correction now. In, *Analytical imaging and geophysics LLC*: Boulder, CO

Adams, J.B. (1974). Visible and near-infrared diffuse reflectance spectra of pyroxenes as applied to remote sensing of solid objects in the solar system. *Journal of Geophysical Research*, 79, 4829-4836

Adams, J.B., & Filice, A.L. (1967). Spectral reflectance 0.4 to 2.0 microns of silicate rock powders. *Journal of Geophysical Research*, 72, 5705-5715

Adler-Golden, S.M., Berk, A., Bernstein, L.S., & Richtsmeier, S.C. (1998). FLAASH, A MODTRAN4 atmospheric correction package for hyperspectral data retrievals and simulations. In, *Summaries of the seventh JPL airborne earth science workshop* (pp. 1-9). Pasadena, CA: JPL

Admiraal, W. (1984). The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. In F.E. Round & D.J. Chapman (Eds.), *Progress in Phycological Research* (pp. 269-322). Bristol: Biopress

Allen, W.A., Gausman, H.W., Richardson, A.J., & Thomas, J.R. (1969). Interaction of Isotropic Light with a Compact Plant Leaf. *J. Opt. Soc. Am.*, 59, 1376-1379

Allen, W.A., & Richardson, A.J. (1968). Interaction of light with a plant canopy. *Journal of the Optical Society of America*, 58

Baillie, P.W., & Welsh, B.L. (1980). The effect of tidal resuspension on the distribution of intertidal epipelagic algae in an estuary. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 10, 165-180

Barillé-Boyer, A.-L., Haure, J., & Baud, J.-P. (1997). *L'ostréiculture en baie de Bourgneuf. Relation entre la croissance des huîtres Crassostrea gigas et le milieu naturel : synthèse de 1986 à 1995*: IFREMER

Barillé, L., Méléder, V., Combe, J.-P., Launeau, P., Rincé, Y., Carrère, V., & Morançais, M. (2007). Comparative analysis of field and laboratory spectral reflectances of benthic diatoms with a modified Gaussian model approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 343, 197-209

Baud, J.-P., Haure, J., Marion, A., & Robert, J.-M. (1990). Caractérisation hydrologiques de quatre secteurs ostréicoles de la baie de Bourgneuf en octobre 1987. In, *Rapport interne IFREMER* (p. 66). Bouin: Ifremer

Baumgardner, M., Silva, L., Biehl, L., & Stoner, E. (1985). Reflectance properties of soils. *Advanced in Agronomy*, 38, 1-44

Berk, A., Andersen, G.P., Bernstein, L.S., Acharya, P.K., Dothe, H., Matthew, M.W., Adler-Golden, S.M., Chetwynd, J.H., Richtsmeier, S.C., Pukall, B., Allred, C.L., Jeong, L.S., & Hoke, M.L. (1999). MODTRAN4 radiative transfer modeling for atmospheric correction. In, *Optical spectroscopic techniques and instrumentation for atmospheric and space research III* (pp. 348-353). Denver, Co

Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., & Falkowski, P.G. (1989). Photoadaptation and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25, 70-78

Berthier, S. (1993). *Optique des milieux composites*: Polytechnica

Bidigare, M.E., Ondrusek, J.H., Morrow, D.A., & Kiefer, D.A. (1990). In-vivo absorption properties of algal pigments. In, *SPIE* (pp. 290-302)

Blott, S., & Pye, K. (2001). GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth surf. Processes Landforms*, 26, 1237-1248

Boardman, J.W. (1998). Post-ATREM polishing of AVIRIS apparent reflectance data using EFFORT: a lesson in accuracy versus precision. In R.O. Green (Ed.), *7th JPL airborne earth science* (p. 53). Pasadena, Ca: JPL

Bricaud, A., Mejia, C., Blondeau-Patissier, D., Claustre, H., Crepon, M., & Thiria, S. (2007). Retrieval of pigment concentrations and size structure of algal populations from their absorption spectra using multilayered perceptrons. *Appl. Opt.*, 46, 1251-1260

Bricaud, A., & Stramiski, D. (1990). Spectral absorption coefficients of living phytoplankton and nonalgal biogenous matter: A comparison between the Peru upwelling area and the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 562-582

Brotas, V., Cabrita, T., Portugal, A., Serôdio, J., & Catarino, F. (1995). Spatio-temporal distribution of the microphytobenthic biomass in intertidal flats of Tagus Estuary (Portugal). *Hydrobiologia*, 300-301, 93-104

Brotas, V., & Plante-Cuny, M.R. (1996). Identification et quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes des sédiments marins: un protocole d'analyse par HPLC. *Oceanol. Acta*, 19, 623-634

Brotas, V., & Plante-Cuny, M.R. (1998). Spatial and temporal patterns of microphytobenthic taxa of estuarine tidal flats in the Tagus Estuary (Portugal) using pigment analysis by HPLC. *Marine Ecology Progress Series*, 171, 43-57

Cabrita, M.T., & Brotas, V. (2000). Seasonal variation in denitrification and dissolved nitrogen fluxes in intertidal sediments of the Tagus estuary, Portugal. *Marine Ecology Progress Series*, 202, 51-65

Cariou-Le Gall, V., & Blanchard, G. (1995). Monthly measurements of pigment concentration from an intertidal muddy sediment of Marennes-Oleron, France. *Marine Ecology Progress Series*, 121, 171-179

Carrère, V., Splitmont, N., & Davoult, D. (2002). Comparison of simple techniques for estimating chlorophyll a concentration in the intertidal zone using high spectral-resolution spectrometer data. *Marine Ecology Progress Series*, 274, 31-40

Clark, R.N., Swayze, G.A., Gallagher, A.J., King, T.V.V., & Calvin, W.M. (1993). The U.S. Geological Survey, Digital Spectral Library: Version 1: 0.2 to 3.0 microns. In, *U.S. Geological Survey Open File Report* (p. 1340)

Clark, R.N., Swayze, G.A., Livi, K.E., Kokaly, R.F., King, T.V.V., Dalton, J.B., Vance, J.S., Rockwell, B.W., Hoefen, T., & McDougal, R.R. (2002). Surface reflectance calibration of terrestrial imaging spectroscopy data: a tutorial using AVIRIS. In R.O. Green (Ed.), *10th Airborne Earth Science Workshop*. Pasadena, CA: Jet Propulsion laboratory: JPL Publication 02-1

- Cloutis, E.A., Gaffey, M.J., Jackowski, T.L., & Reed, K.L. (1986). Calibration of phase abundance, composition and particle size distribution for olivine-orthopyroxene mixtures from reflectance spectra. *Journal of Geophysical Research*, *91*, 11641-11653
- Cognie, B., Haure, J., & Barillé, L. (2006). Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild tock of the farmed oyster *Crassostrea* (Thunberg). *Aquaculture*, *259*, 249-259
- Colijn, F., & DeJonge, V., N. (1984). Primary production of microphytobenthos in the Ems-Dollard estuary. *Marine Ecology Progress Series*, *14*, 185-196
- Combe, J.-P. (2005). Etude des surfaces planétaires par télédétection visible-infrarouge hyperspectrale. In, *Université de Nantes*. Nantes: Université de Nantes
- Combe, J.-P., Launeau, P., Carrère, V., Despan, D., Méléder, V., Barillé, L., & Sotin, C. (2005). Mapping microphytobenthos biomass by non-linear inversion of visible-infrared hyperspectral images. *remote sensing of environment*, *98*, 371-387
- Conel, J.F., Green, R.O., Vane, G., Bruegge, C.J., & Alley, R.E. (1987). Ais-2 radiometry and a comparison of methods for the recovery of ground reflectance. In G. Vane (Ed.), *3rd airborne imaging spectrometer data analysis* (pp. 18-47). Pasadena: JPL
- Consalvey, M., Perkins, R.G., & Paterson, D.M. (2005). PAM fluorescence: a beginners guide for benthic diatomists. *Diatom Res.*, *20*, 1-22
- Dajoz, R. (1985). *Précis d'écologie*. Paris: Bordas
- Davis, M.W., & McIntire, C.D. (1983). Effects of physical gradients on the production dynamics of sediment-associated populations. *Marine Ecology Progress Series*, *13*, 103-114
- De jonge, V.N. (1980). Fluctuations in the organic carbon to chlorophyll a ratios for estuarine benthic diatom populations. *Marine Ecology Progress Series*, *2*, 345-353
- Decottignies, P., Benninger, P.G., Rincé, Y., & Riera, P. (2007a). Importance of seasonal effects and qualitative selection capacity in the stable isotope study of trophic interactions between suspension-feeders: the oyster *Crassostrea gigas* and the slipper snail *Crepidula fornicata*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, *342*, 231-241
- Decottignies, P., Benninger, P.G., Rincé, Y., Robbins, R.J., & Riera, P. (2007b). Exploitation of natural food sources by two sympatric, invasive suspension- feeders: *Crassostrea gigas* and *Crepidula fornicata*. *Marine Ecology Progress Series*, *334*, 179-192
- DeJonge, V., N., & Colijn, F. (1994). Dynamics of microphytobenthos in the Ems estuary. *Marine Ecology Progress Series*, *104*, 185-186
- DeJonge, V., N., & VanBeusekom, J.E., E. (1992). *Contribution of resuspended microphytobenthos to total phytoplankton in the Ems estuary and its possible role for grazers*. Den Helder, PAYS-BAS: Netherlands Institute for Sea Research
- DeJonge, V.N. (1985). The occurrence of 'epipsammic' diatom populations: a result of interaction between physical sorting of sediment and certain properties of diatom species. *Estuar Coast Shelf Sci*, *21*, 607-622
- DeJonge, V.N., & VanBeusekom, J.E.E. (1995). Wind-and Tide-Induced Resuspension of Sediment and Microphytobenthos from Tidal Flats in the Ems Estuary. *Limnology and Oceanography*, *40*, 766-778

- Denis, L., Grenz, C., & Plante-Cuny, M.R. (1996). Etude expérimentale de la remise en suspension du microphytobenthos. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Life Sciences*, 319, 529-535
- Dubinsky, Z., Falkowski, P.G., & Wyman, K. (1986). Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiology*, 27, 1335-1349
- Dubois, S., Barillé, L., Barillé, A.L., & Gruet, Y. (2003). Conditions de préservation des formations récifales à *Sabellaria alveolata* (L.) en baie de Bourgneuf. *Natura 2000*
- Duntley, S.Q. (1942). The Optical Properties of Diffusing Materials. *J. Opt. Soc. Am.*, 32, 61
- Duxbury, A.C., Duxbury, A.B., & Sverdrup, K.A. (2000). *An Introduction to the World's Oceans*. Boston: McGraw Hill
- Eaton, J.W., & Moss, B. (1966). The estimation of numbers and pigment content in epipelagic algal populations. *Limnol. Oceanogr*, 11, 584-595
- Falkowski, P.G., & Raven, J.A. (2007). *Aquatic photosynthesis*. Princeton: Princeton university press
- Feret, J.-B., François, C., Asner, G.P., Gitelson, A.A., Martin, R.E., Bidet, L.P.R., Ustin, S.L., le Maire, G., & Jacquemoud, S. (2008). PROSPECT-4 and 5: Advances in the leaf optical properties model separating photosynthetic pigments. *remote sensing of environment*, 112, 3030-3043
- Ferrier, G. (1995). Evaluation of apparent surface reflectance estimation methodologies. *International Journal of Remote Sensing*, 16, 2291-2297
- Froidefond, J.-M., Gardel, L., Guiral, D., Parra, M., & TERNON, J.-F. (2002). Spectral remote sensing reflectances of coastal waters in French Guiana under the Amazon influence. *remote sensing of environment*, 80, 225-232
- Galisan, H.W., Allen, W.A., Myers, V.I., Cardenas, R., & Leamer, R.W. (1970). Reflectance of single leaves and field plots of cycocel-treated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in relation to leaf structure. *remote sensing of environment*, 1, 103-107
- Gao, B.-C., Heidebrecht, K.H., & Goetz, A.F.H. (1993). Derivation of scaled surface from AVIRIS data. *remote sensing of environment*, 44, 165-178
- Gao, B.-C., Montes, M.J., Ahmad, Z., & Davis, C.O. (2000). Atmospheric correction algorithm for hyperspectral remote sensing of ocean color from space. *Applied Optics*, 39, 887-896
- Gao, B.-C., Montes, M.J., Davis, C.O., & Goetz, A.F.H. (2009). Atmospheric correction algorithms for hyperspectral remote sensing data of land and ocean. *remote sensing of environment*, 113, S17-S24
- Gates, D.M., Keegan, H.J., Schleter, J.C., & Weidner, V.R. (1965). Spectral Properties of Plants. *Appl. Opt.*, 4, 11-20
- Gausman, H.W., & Allen, W.A. (1973). Optical Parameters of Leaves of 30 Plant Species. *Plant Physiol.*, 52, 57-62
- Gausman, H.W., Allen, W.A., Cardenas, R., & Richardson, A.J. (1970). Relation of light reflectance to histological and physical evaluations of cotton leaf maturity. *Appl. Opt.*, 9, 545-552

Gausman, H.W., Allen, W.A., & Escobar, D.E. (1974). Refractive Index of Plant Cell Walls. *Appl. Opt.*, 13, 109-111

Genty, B., Briantais, J.M., & Baker, N.R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.*, 990, 87-92

Gieskes, W.W.C. (1991). Algal pigment fingerprints: clue to taxon-specific abundance, productivity and degradation of phytoplankton in seas and oceans. In S. Demers (Ed.), *Particle Analysis in Oceanography* (pp. 61-99). Berlin: Heidelberg: Springer Verlag

Gitelson, A.A., Gritz, Y., & Merzlyak, M.N. (2003). Relationship between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160, 271-282

Goetz, A.F.H., Boardman, J.W., Kindel, B., & Heidebrecht, K.B. (1997). Atmospheric corrections: on deriving surface reflectance from hyperspectral imagers. In *SPIE* (pp. 14-22)

Goetz, A.F.H., Heidebrecht, K.B., Kindel, B., & Boardman, J.W. (1998). Using ground spectral irradiance for model correction of AVIRIS data. In R.O. Green (Ed.), *7th JPL airborne earth science* (pp. 159-168). Pasadena, Ca: JPL

Gohin, F., Druon, J.N., & Lampert, L. (2002). *A five channel chlorophyll concentration algorithm applied to SeaWiFS data processed by SeaDAS in coastal waters*. Abingdon, ROYAUME-UNI: Taylor and Francis

Gons, H.J. (1999). Optical Teledetection of Chlorophyll a in Turbid Inland Waters. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1127-1132

Gordon, H.R., Clark, D.K., Brown, J.W., Brown, O.B., Evans, R.H., & Broenkow, W.W. (1983). Phytoplankton pigment concentrations in the Middle Atlantic Bight: comparison of ship determinations and CZCS estimates. *Appl. Opt.*, 22, 20

Gordon, H.R., & McCluney, W.R. (1975). Estimation of the Depth of Sunlight Penetration in the Sea for Remote Sensing. *Appl. Opt.*, 14, 413-416

Gouleau, D. (1975). Les premiers stades de la sédimentation sur les vasières littorales atlantiques. Rôle de l'émersion. In, *Université de Nantes* (p. 365). Nantes: Université de Nantes

Grant, L. (1987). Diffuse and specular characteristics of leaf reflectance. *remote sensing of environment*, 22, 309-322

Green, R.O., Berman, M., Switzer, P., & Craig, M.D. (1998). A transformation for ordering multispectral data in terms of image quality with implications for noise removal. *IEEE Transaction on Geoscience and Remote Sensing*, 26, 65-74

Gross, H.N., & Schott, J.R. (1998). Application of spectral mixture analysis and image fusion techniques for image sharpening. *remote sensing of environment*, 63, 85-94

Grossel, H., Aujoulat, V., & L'Yavanc, J. (2001). "Pesca-Jalons-Pornic" Etude sédimentaire de l'estran conchylicole en baie de Bourgneuf. In, *Ifremer rapport* (p. 158)

Guarini, J.-M., Blanchard, G., Bacher, C., Gros, P., Riera, P., Richard, P., Gouleau, D., Galois, R., Prou, J., & Sauriau, P.-G. (1998). Dynamics of spatial patterns of microphytobenthic biomass: inferences from a geostatistical analysis of two

comprehensive surveys in Marennes-Oléron Bay (France). *Marine Ecology Progress Series*, 166, 131-141

Guarini, J.M. (1998). Modélisation de la dynamique du microphytobenthos des vasières intrtidales du bassin de Marennes- Oléron. In: Paris: Université Pierre et Marie CURIE (Paris 6)

Guarini, J.M., Blanchard, G.F., Gros, P.H., Gouleau, D., & Bacher, C. (2000). Dynamic model of the short-term variability of microphytobenthic biomass on temperate intertidal mudflats. *Marine Ecology Progress Series*, 195, 291-303

Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In W.L. Smith & M.H. Chanly (Eds.), *Culture of marine invertebrate animals* (pp. 108-132). New York: Plenum

Guillaumont, B., Gentien, P., & Viollier, M. (1988). Mesures radiométriques haute résolution du microphytobenthos intertidal. In, *Proceeding of the 4th International Colloquium on Spectral Signature of Objects in Remote Sensing* (pp. 333-336). Aussios, France

Guyot, G., & Baret, F. (1988). Utilisation de la haute résolution spectrale pour suivre l'état des couverts végétaux. In ESA (Ed.), *4th International Colloquium on Spectral Signatures of Objects in Remote Sensing* (pp. 279-286). Aussois, France

Hamels, I., Sabbe, K., Muyleart, K., Barranguet, C., Lucas, C.H., Herman, P.M.J., & Vyerman, W. (1998). Organisation of microbenthic-communities in intertidal estuarine flats, a case study from the Molenplaat (Westerschelde setuary, The Netherlands) *European Journal of Protistology*, 34, 308-320

Haure, J., Sauriau, P.-G., & Baud, J.-P. (1996). Effets du vent sur la remise en suspension particulaire en baie de Bourgneuf: Conséquences sur la croissance de *Crassostrea gigas*. *Journal de la Recherche Océanographique*, 11, 21-30

Hay, S.I., Maitland, T.C., & Paterson, D.M. (1993). The speed of diatom migration through natural and artificial substrata. *Diatom Res.*, 8, 371-384

Héral, M., Bacher, C., & Deslous-Paoli, J.-M. (1989). La capacité biotique des bassins ostréicoles. In J.-P. Troadec (Ed.), *L'homme et les ressources halieutiques : essai sur l'usage d'une ressource renouvelable* (pp. 225-259). Paris: IFREMER

Herlory, O., Guarini, J.M., Richard, P., & Blanchard, G.F. (2004). Microstructure of microphytobenthic biofilm and its spatio-temporal dynamics in an intertidal mudflat (Aiguillon Bay, France). *Marine Ecology Progress Series*, 282, 33-44

Hoek, C., Van Den, D.G., & Jahns, H.M. (1995). *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University Press

Jacquemoud, S., & Baret, F. (1990). PROSPECT: A model of leaf optical properties spectra. *remote sensing of environment*, 34, 75-91

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., & Bjorland, T. (1997a). Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. In S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura & S.W. Wright (Eds.), *Phytoplankton pigments in oceanography: Monographs on oceanographic methodology* (pp. 449-559). Paris: UNESCO

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., & Wright, S.W. (1997b). *Phytoplankton pigments in oceanography*. Paris: UNESCO

Jeffrey, S.W., & Vesk, M. (1997). Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In R.F.C.M.a.S.W.W. S. W. Jeffrey (Ed.), *Phytoplankton pigments in oceanography. Monographs on oceanographic methodology* (pp. 37-84). Paris: UNESCO

Jesus, B., Brotas, V., Ribeiro, L., Mendes, C.R., Cartaxana, P., & Paterson, D.M. (2009). Adaptations of microphytobenthos assemblages to sediment type and tidal position. *Continental Shelf Research*, 29, 1624-1634

Jesus, B., Mendes, C.R., Brotas, V., & Paterson, D.M. (2006). Effect of sediment type on microphytobenthos vertical distribution: modelling the productive biomass and improving ground truth measurements. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 332, 60-74

Jesus, B., Mouget, J.-L., & Perkins, R.G. (2008). Detection of diatom xanthophyll cycle using spectral reflectance. *Journal of Phycology*, 44, 1349-1359

Jobson, D.J., Zingmark, R.G., & Katzberg, S.J. (1980). Remote sensing of benthic microalgal biomass with a tower-mounted multispectral scanner. *remote sensing of environment*, 9, 351-362

Kazemipour, F., Méléder, V., & Launeau, P. (2011). Optical properties of microphytobenthic biofilms (MPBOM): Biomass retrieval implication. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 112, 131-142

Kelly, J.A., Honeywill, C., & Paterson, D.M. (2001). Microscale analysis of chlorophyll-a in cohesive, intertidal sediments: implication of microphytobenthos distribution *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81, 151-162

Khashan, M.A., & El-Naggar, A.M. (2000). A new method of finding the optical constants of a solid from the reflectance and transmittance spectrograms of its slab. *Optics Communications*, 174, 445-453

Kiefer, D.A., & SooHoo, J.B. (1982). Spectral Absorption by Marine Particles of Coastal Waters of Baja California. *Limnology and Oceanography*, 27, 492-499

Kirk, J.T.O. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge, UK: Cambridge University Press

Klebs, G.A. (1883). Über die Organisation einiger Flagellatengruppen und ihre Beziehungen zu Algen und Infusorien. *Untersuchungen aus dem Botanischen Institut zu Tübingen I* (pp. 233-362)

Kokke, J.M.M. (1995). Mapping of intertidal surface sediments using high resolution remote sensing (a study in the Westerscheldt area, the Netherlands). In EARSel (Ed.), *Advance in Remote Sensing* (pp. 35-44)

Kruse, F.A. (1988). Use of airborne imaging spectrometer to map minerals associated with hydrothermally altered in the northern Grapevine Mountains, Nevada and California. *remote sensing of environment*, 24, 31-51

Kubelka, P. (1948). New Contributions to the Optics of Intensity Light-Scattering Materials. Part 1. *Journal of the Optical Society of America*, 38, 448-458

Kubelka, P., & Munk, F. (1931). Ein beitrage zur optik der frabanstriche. *Zeitschrift fur Technische Physik*, 12, 593-601

Kuwae, T., Beninger, P.G., Decottignies, P., Mathot, K.J., Loud, D., & Elner, R.W. (2008). Biofilm grazing in a higher vertebrate : the Western Sandpiper Caliders mauri. *Ecology*, 89, 599-606

- Lavaud, J. (2007). Fast regulation of photosynthesis in diatoms: Evolution, regulation and ecophysiology. *Functional Plant Science and Biotechnology*, *1*, 267-287
- Lee, Z., & Carder, K.L. (2004). Absorption spectrum of phytoplankton pigments derived from hyperspectral remote-sensing reflectance. *remote sensing of environment*, *89*, 361-368
- Lee, Z., Carder, K.L., Mobley, C.D., Steward, R.G., & Patch, J.S. (1998). Hyperspectral Remote Sensing for Shallow Waters. I. A Semianalytical Model. *Appl. Opt.*, *37*, 6329-6338
- Lefebvre, S., Mouget, J.L., Poret, P., Rosa, P., & Tremblin, G. (2007). Comparison between fluorimetry and oximetry techniques to measure photosynthesis in the diatom *Skeletonema costatum* cultivated under simulated seasonal conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *86*, 131-139
- Lillesaeter, O. (1982). Spectral Reflectance of Partly Transmitting leaves: Laboratory Measurements and Mathematical Modeling. *remote sensing of environment*, *12*, 247-254
- Lindberg, J.D., & Snyder, D.G. (1972). Diffuse reflectance spectra of several clay minerals. *American Mineralogist*, *57*, 485-493
- Liu, C.-C., Woods, J.D., & Mobley, C.D. (1999). Optical model for use in oceanic ecosystem models. *Appl. Opt.*, *38*, 4475-4485
- Lucas, C.H., & Holligan, P.M. (1999). Nature and ecological implications of algal pigment diversity on the Molenplaat tidal flat (Westerschelde estuary, SW Netherlands). *Marine Ecology Progress Series*, *180*, 51-64
- Lucas, C.H., Widdows, J., Brinsley, M.D., Salkeld, P.N., & Herman, P.M.J. (2000). Benthic-pelagic exchanges of microalgae at a tidal flat. 1. Pigment analysis. *Marine Ecology Progress Series*, *196*, 59-73
- Lutz, V.A., Sathyendranath, S., Head, E.J.H., & Li, W.K.W. (2001). Changes in the in vivo absorption and fluorescence excitation spectra with growth irradiance in three species of phytoplankton. *Journal of Phytoplankton research*, *23*, 555-569
- MacArthur, A., MacLellan, C., & Malthus, T.J. (2006). What does a spectroradiometer see? . In, *Annual Conference of the Remote Sensing and Photogrammetry Society*. Cambridge, UK: Remote sensing and Phorogrammetry Society
- MacIntyre, H., Geider, R., & Miller, D. (1995). Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries and Coasts*, *19*, 186-201
- MacIntyre, H.L., & Cullen, J.J. (1996). Primary production by suspended and benthic microalgae in a turbid estuary: time-scales of variability in San Antonio Bay, Texas. *Marine Ecology Progress Series*, *145*, 245-268
- Mackey, M.D., Mackey, D.J., Higgins, H.W., & Wright, S.W. (1996). CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, *144*, 256-283
- Mantoura, R.F.C., & 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. *Analytica Chimica Acta*, *151*, 297-314

Marion, A. (1985). Détermination au moyen de tests biologiques, des facteurs nutritifs intervenant dans la composition spécifique des peuplements planctoniques printaniers de la baie de Bourgneuf. In, *Université de Nantes*. Nantes: Université de Nantes

Martonchik, J.V., Diner, D.J., Pinty, B., Verstraete, M.M., Myneni, R.B., Knjazikhin, Y., & Gordon, H.R. (1998). Determination of land and ocean reflective, radiative and biophysical properties using multiangle imaging. *IEEE Transaction on Geoscience and Remote Sensing*, 36, 1266-1281

Matthew, M.W., Adler-Golden, S.M., Berk, A., Richtsmeier, S.C., Levine, M.P., Bernstein, L.S., Acharya, P.K., Anderson, G.P., Felde, G.W., Hoke, M.P., Ratkowski, A., Burke, H.-H., Kaiser, R.D., & Miller, D.P. (2000). Status of atmospheric correction using a MODTRAN4-based algorithm. In, *SPIE Proceedings, Algorithms for Multispectral, Hyperspectral, and Ultraspectral Imagery VI*

Méléder, V. (2003). Étude de la structure des peuplements intertidaux du microphytobenthos : apport de la télédétection visible-infrarouge. In (p. 196). Nantes: Université de Nantes

Méléder, V., Barillé, L., Launeau, P., Carrère, V., & Rincé, Y. (2003a). Spectrometric constraint in analysis of benthic diatom biomass using monospecific cultures. *remote sensing of environment*, 88, 386-400

Méléder, V., Barillé, L., Rincé, Y., Morancais, M., Rosa, P., & Gaudin, P. (2005). Spatio-temporal changes in microphytobenthos structure analysed by pigment composition in a macrotidal flat (Bourgneuf Bay, France). *Marine Ecology Progress Series*, 297, 83-99

Méléder, V., Launeau, P., Barillé, L., Combe, J.-P., Carrère, V., Jesus, B., & Verpoorter, C. (2010). Hyperspectral imaging for mapping microphytobenthos in coastal areas. In M.M.a.R. M. (Ed.), *Geomatic solutions for Coastal Environments*: Nova Science Publishers

Méléder, V., Launeau, P., Barillé, L., & Rincé, Y. (2003b). Cartographie des peuplements du microphytobenthos par télédétection spatiale visible-infrarouge dans un écosystème conchylicole. Microphytobenthos assemblage mapping by spatial visible-infrared remote sensing in a shellfish ecosystem. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 377-389

Méléder, V., Rince, Y., Barille, L., Gaudin, P., & Rosa, P. (2007). Spatiotemporal changes in microphytobenthos assemblages in a macrotidal flat (Bourgneuf Bay, France). *Journal of Phycology*, 43, 1177-1190

Metternicht, G.I., & Zinck, J.A. (2003). Remote sensing of soil salinity: potentials and constraints. *remote sensing of environment*, 85, 1-20

Middleburg, J.J., Barranguet, C., Boschker, H.T.S., Herman, P.M.J., Moens, T., & Heip, C.H.R. (2000). The Fate of Intertidal Microphytobenthos Carbon: An In situ ¹³C-Labeling Study. *Limnology and Oceanography*, 45, 1224-1234

Miller, J.R., Steven, M.D., & Demetriades-Shah, T.H. (1992). Reflection of layered bean leaves over different soil backgrounds: measured and simulated spectra. *International Journal of Remote Sensing*, 13, 3273-3286

Millie, D.F., Pearl, H.W., & Hurley, J.P. (1993). Microalgal Pigment Assessments Using High-Performance Liquid Chromatography: A Synopsis of Organismal and Ecological Application. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50, 2513-2527

Morris, E.P., Forster, R., Peene, J., & Kromkamp, J.C. (2008). Coupling between Photosystem II electron transport and carbon fixation in microphytobenthos. *Aquatic Microbial Ecology*, 50, 301-311

Murphy, R. J., Tolhurst, T. J., Chapman, M. G., Underwood, & A. J. (2005). *Estimation of surface chlorophyll-a on an emersed mudflat using field spectrometry : accuracy of ratios and derivative-based approaches*. Abingdon, ROYAUME-UNI: Taylor and Francis

Nichelatti, E. (2002). Complex refractive index of a slab from reflectance and transmittance: analytical solution. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 400

Olaizola, M., & Yamamoto, H.Y. (1994). Short-term response of diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 30, 606-612

Pailotin, G., Leibl, W., Gapinski, J., Breton, J., & Dobek, A. (1998). Light Gradients in Spherical Photosynthetic Vesicles. *Biophysical Journal*, 75, 124-133

Park, J.K., & Deering, D.W. (1982). Simple radiative transfer model for relationships between canopy biomass and reflectance. *Appl. Opt.*, 21, 303

Paterson, D.M. (1986). The migratory behaviour of diatom assemblage in a laboratory tidal micro-ecosystem examined by low temperature scanning electron microscopy. *Diatom Res.*, 1, 227-239

Paterson, D.M. (1989). Short-Term Changes in the Erodibility of Intertidal Cohesive Sediments Related to the Migratory Behavior of Epipelagic Diatoms. *Limnology and Oceanography*, 34, 223-234

Paterson, D.M., & Hagerthey, S.E. (2001). Microphytobenthos in contrasting coastal ecosystems: Biology and Dynamics. In K. Reise (Ed.), *Ecological Comparisons of sedimentary Shores* (pp. 105-125). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag

Paterson, D.M., Wiltshire, K.H., Miles, A., Blackburn, J., Davidson, I., Yates, M.G., McGrorty, S., & Eastwood, J.A. (1998). Microbiological mediation of spectral reflectance from intertidal cohesive sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 43, 1207-1221

Peñuelas, J., Filella, I., Gamon, J.A., & Field, C. (1997). Assessing photosynthetic radiation-use efficiency of emergent aquatic vegetation from spectral reflectance. *Aquatic Botany*, 58, 307-315

Perkins, R.G., Oxborough, K., Hanlon, A., Underwood, G.J.C., & Baker, N.R. (2002). Can chlorophyll fluorescence be used to estimate the rate of photosynthetic electron transport within microphytobenthic biofilm? *Marine Ecology Progress Series*, 228

Perkins, R.G., Underwood, G.J.C., Brotas, V., Snow, G.C., Jesus, B., & Ribeiro, L. (2001). Responses of microphytobenthos to light primary production and carbohydrate allocation over an emersion period. *Marine Ecology Progress Series*, 223, 101-112

Pinckney, J., Papa, R., & Zingmark, R.G. (1994). Comparison of high-performance liquid chromatographic, spectrophotometric, and fluorometric methods for determining

chlorophyll a concentrations in estuarine sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 19, 59-66

Pinckney, J., & Zingmark, R.G. (1991). Effects of tidal stage and sun angles on intertidal benthic microalgal productivity. *Marine Ecology Progress Series*, 76, 81-89

Porra, R.J., Pfundel, E.E., & Engel, N. (1997). Metabolism and function of photosynthetic pigments. In R.F.C.M. S. W. Jeffrey, et S. W. Wright (Ed.), *Phytoplankton pigments in oceanography. Monographs on oceanographic methodology*. Paris: UNESCO publishing

Post, A.F., Dubinzyk, Z., Wyman, K., & Falkowski, P.G. (1984). Kinetics of light-intensity adaptation in a marine planktonic diatom. *Marine biology*, 83, 231-238

Pritchard, D.W. (1967). What is an estuary: physical viewpoint. In L. G.H. (Ed.), *Estuaries*. (pp. 3-5). Washington: American Association for Advancement of Science

Qu, Z., Goetz, A.F.H., & Heidebrecht, K.B. (2000). High accuracy atmospheric correction for hyperspectral data (HATCH). In, *Ninth JPL airborne earth science workshop* (pp. 373-381). Pasadena, CA: JPL

Reimer, R., & Patrick, C.W. (1975). The diatoms of the United States II, part 1. *Academy of Natural Sciences of Philadelphia* (p. 213)

Reviere, B. (2003). *Biologie et Physiologie des algues. Tome 1 et 2*. Paris: Editions Belin

Riaux-Gobin, C. (1987). Microphytobenthos from 2 subtidal sediments from North-Brittany. II. Variations of pigment composition and concentrations determined by HPLC and conventional techniques. *Marine Ecology Progress Series*, 40, 275-283

Riaux, C. (1982). La chlorophylle a dans un sédiment estuarien de Bretagne Nord. *Annales de l'Institut d'Océanographie - Paris*, 58, 185-203

Richard, P., Fizzala, X., Guarini, J.M., & Blanchard, G. (2006). In situ quantification of microphytobenthos grazing by the grey mullet (*Liza ramada*) on an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay (France). *Cah. Biol. Mar.*, 47, 121-122

Richards, L.A., & Jia, X. (1998). *Remote Sensing Digital Image Analysis: An Introduction*. Heidelberg, New York: Springer- Verlag Berlin

Richardson, A.D., Duigan, S.P., & Berlyn, G.P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185-194

Richardson, L.L. (1996). Remote sensing of Algal Bloom Dynamics; New research fuses remote sensing of aquatic ecosystem with algal accessory pigment analysis. *BioSciences*, 46, 492-501

Richardson, L.L., Buisson, D., Liu, C.J., & Ambrosia, V. (1994). The detection of algal photosynthetic accessory pigments using Airborne Visible-Infrared Imaging Spectrometer (AVIRIS) Spectral Data. *MTS Journal*, 28, 10-21

Richter, R. (1996). A spatially adaptive fast atmospheric correction algorithm. *International Journal of Remote Sensing*, 17, 1201-1214

Riera, P., Stal, L.J., Nieuwenhuize, J., Richard, P., Blanchard, G., & Gentien, F. (1999). Determination of food sources for benthic invertebrates in a salt marsh (Aiguillon

Bay, France) by carbon and nitrogen stable isotopes: importance of locally produced sources. *Marine Ecology Progress Series*, 187, 301-307

Riethmuller, R., Heineke, M., Kuhl, H., & Keuker-Rudiger, R. (2000). Chlorophyll a concentration as an index of sediment surface stabilisation by microphytobenthos ? *Continental Shelf Research*, 20, 1351-1372

Roberts, D.A., Yamaguchi, Y., & Lyon, R. (1986). Comparison of various techniques for calibration of AIS data In G. Vane & A.F.H. Goetz (Eds.), *2nd Airborne Imaging Spectrometer Data Analysis* (pp. 21-30). Pasadena, Ca: JPL

Round, F.E. (1971). Marine benthic diatoms. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 9, 83-139

Round, F.E., & Palmer, J.D. (1996). Persistent vertical-migration rhythms in benthic microflora *J. mar. Ass. UK*, 46, 191-214

Roy, R., Launeau, P., Carrère, V., Pinet, P., Ceuleneer, G., Clénet, H., Daydou, Y., Girardeau, J., & Amri, I. (2009). Geological mapping strategy using VNIR hyperspectral remote sensing: Application to the Oman ophiolite (Sumail Massif). *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 10

Ruiz-Verdú, A., Simis, S.G.H., de Hoyos, C., Gons, H.J., & Peña-Martínez, R. (2008). An evaluation of algorithms for the remote sensing of cyanobacterial biomass. *remote sensing of environment*, 112, 3996-4008

Sabbe, K. (1997). Systematics and ecology of intrtidal benthic diatoms of Westerschelde estuary (The Netherlands). In *University of Gent: University of Gent*

Saburova, M.A., Polikarpov, I.G., & Burkovsky, I.V. (1995). Spatial structure of an intertidal sandflat microphytobenthic community as related to different spatial scales. *Marine Ecology Progress Series*, 129, 229-239

Schlüter, L., Mohlenberg, F., Havskum, H., & Larsen, S. (2000). The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton group in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/ chlorophyll a ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 192, 49-63

Serodio, J., Silva, J.M.D., & Catarino, F. (1997). Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae in vivo using chlorophyll a fluorescence. *Journal of Phycology*, 33, 542-553

Shannon, C.E. (1948). A mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423, 623-656

Shibata, K., Benson, A.A., & Calvin, M. (1954). The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 15, 461-470

Simis, S.G.H., Ruiz-Verdú, A., Domínguez-Gómez, J.A., Peña-Martínez, R., Peters, S.W.M., & Gons, H.J. (2007). Influence of phytoplankton pigment composition on remote sensing of cyanobacterial biomass. *remote sensing of environment*, 106, 414-427

Sinclair, T.R., Schreiber, M.M., & Hoffer, R.M. (1973). Diffuse reflectance hypothesis for the pathway of solar radiation through leaves. *Agron J*, 65, 276-283

Smith, G.M., & Milton, E.J. (1999). The use of the empirical line method to calibrate remotely sensed data to reflectance. *International Journal of Remote Sensing*, 20, 2653-2662

Stokes, G.G. (1860). On the Intensity of the Light Reflected from or Transmitted through a Pile of Plates. *Proceedings of the Royal Society of London (1854-1905)*, 11, 545-556

Sunshine, J., Pieters, C.M., & Pratt, S.F. (1990). Deconvolution of mineral absorption bands: An improved approach. *Journal of Geophysical Research*, 93, 6955-6966

Underwood, G.J.C., & Barnett, M. (2006). What determines species composition in microphytobenthic biofilms? Functioning of microphytobenthos in estuaries. In J. Kromkamp (Ed.), *Microphytobenthos symposium* (pp. 121-138). Amsterdam, The Netherlands: Royal netherlands academy of arts and sciences

Underwood, G.J.C., & Kromkamp, J. (1999). Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Advances in Ecological Research*, 29, 93-153

Underwood, G.J.C., & Smith, D.J. (1998). Predicting epipellic diatom exopolymer concentration in intertidal sediments from sediment chlorophyll a. *Microbiological Ecology*, 35, 116-125

Uno, S., & Gotoh, K. (1992). Some examples of environmental monitoring in coastal areas by remote sensing techniques. In, *Proceedings of the First Thematic Conference of Remote Sensing for Marine and Coastal Environments* (pp. 835-841). New Orleans, LA, USA

Ustin, S., Gitelson, A.A., Jacquemoud, S., Schaepman, M., Asner, G.P., Gamon, J.A., & Zarco-Tejada, P. (2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *remote sensing of environment*, 113, S67-S68

Vermote, E.F., Saleous, N.E., Justice, C.O., Kaufman, Y.J., Privette, J.L., Remer, L., Roger, J.C., & Tanré, D. (1997). Atmospheric correction of visible to middle-infrared EOS-MODIS data over land surfaces: Background, operational algorithm and validation. *Journal of Geophysical Research*, 102, 131-141

Verpoorter, C. (2009). Télédétection hyperspectrale et cartographie des faciès sédimentaires en zone intertidale : application à la Baie de Bourgneuf. In (p. 423). Nantes: Université de Nantes

Walker, H.J., & Mossa, J. (1982). Effects of artificial structures on coastal lagoon processes and forms. *Oceanol. Acta*, 5, 191-198

Wanner, W., Strahler, A.H., Hu, B., Lewis, P., Muller, J.-P., Li, X., Barker Schaaf, C.L., & Barnsley, M.J. (1997). Global retrieval of bidirectional reflectance and albedo over land from EOS MODIS and MIRS data: theory and algorithm. *Journal of Geophysical Research*, 102, 17143-17162

Wiltshire, K.H. (2000). Algal and associated pigments of intertidal sediments, new observation and methods. *Limnologica*, 30, 205-214

Woolley, J.T. (1975). Refractive Index of Soybean Leaf Cell Walls. *Plant Physiol.*, 55, 172-174

Zbinden, R.M. (1985). Les réflectances de sédiments d'estran : résultats de mesures in-situ et d'une simulation SPOT en Baie de Mont Saint Michel. In, *Proceedings of the 3rd International Colloquium on Spectral Signatures of Objects in Remote Sensing* (pp. 257-263). Les Arcs, France

Caractérisation hyperspectrale des biofilms microphytobenthiques : cartographie de la biomasse de la micro à la macro échelle

Le suivi temporel du fonctionnement des écosystèmes côtiers en termes de production et de ressources nécessite des outils adéquats comprenant des routines efficaces, rapides et précises. La télédétection hyperspectrale est le choix idéal pour ce type d'études car elle offre une vue synoptique et des données de qualité en grande quantité. La distribution spatiale et les cartes de la biomasse photosynthétique (mg Chl *a.* m⁻²) du microphytobenthos de la classe de diatomée ont été calculées pour la baie de Bourgneuf, écosystème côtier turbide situé à l'embouchure de la Loire. Les images hyperspectrale de ROSIS (2002) et de HySpex (2009) ont été utilisées pour une cartographie de la biomasse basée sur un modèle de propriétés optiques (modèle MPBOM). Les propriétés optiques du biofilm de microphytobenthos ont été calculées à partir d'une série de mesures de réflectance portant sur des biofilms reconstitués au laboratoire. Ces mesures ont permis d'obtenir des résultats inédits sur la structure interne du biofilm et les facteurs effectuant sa réponse spectrale. La stratégie utilisée était basée sur deux étapes principales : *i*) identifier des biofilms de diatomées à l'aide des indices spectraux ; *ii*) estimer des valeurs de la biomasse par le modèle MPBOM. Cette méthodologie offre la possibilité de suivre à l'avenir le fonctionnement d'écosystèmes similaires et à terme d'estimer la productivité à l'échelle de l'écosystème.

Mots-clés : Télédétection hyperspectrale, biofilm, microphytobenthos, propriétés optiques, transfert radiatif, baie de Bourgneuf.

Hyperspectral characterization of microphytobenthic biofilm: biomasse mapping from micro to macro scale

Temporal and seasonal tracking of coastal ecosystems, in term of primary production and resources assessment, requires the appropriate tools and efficient materials and methods. By its synoptic view and high quality provided data, hyperspectral remote sensing is considered one of the most suitable tools for this aim. The spatial distribution and biomass (mg Chl *a.* m⁻²) maps of diatom class of microphytobenthos are performed for the Bourgneuf bay, a turbid coastal ecosystem located on north western of France at French Atlantic coast. ROSIS (2002) and HySpex (2009) hyperspectral images were used for biomass mapping based on the optical properties of microphytobenthos biofilm performed in laboratory. The optical properties of microphytobenthos biofilm were calculated from a set of laboratory reflectance measurements on simulated laboratory biofilms. The results of this model (MPBOM) revealed important information, never been dealt, about the internal structure of biofilm and the factors effecting its final spectral feature. Our mapping strategy was based on two main steps: *i*) diatom biofilm identification by applying the defined spectral indices; *ii*) estimation of biomass values from MPBOM model. Such a robust modeling approach is suitable for tracking and temporal monitoring of the similar ecosystems functioning. Moreover, we can investigate an enlarged perspective: productivity assessment at ecosystem scale.

Key-words: Hyperspectral remote sensing, biofilm, microphytobenthos, Optical properties, radiative transfer, Bourgneuf bay

Discipline : Sciences de la Terre