

**THÈSE**  
PRÉSENTÉE À

**L'UNIVERSITE BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES ET SCIENCES DE  
L'ENVIRONNEMENT

Par **Melle Emmanuelle LEMAIRE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : BIOGÉOCHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

---

**Biomarqueurs pigmentaires dans les estuaires  
macrotidaux européens.**

---

Soutenue le: 18 juillet 2002

Après avis de:

MME. Emma Orive, Professeur, Université de Bilbao (Espagne)

M. Philippe Garrigues, Directeur de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1

Rapporteurs

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de:

M. Pierre Chardy, Professeur, Université Bordeaux 1

MME. Emma Orive, Professeur, Université de Bilbao (Espagne)

M. Philippe Garrigues, Directeur de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1

M. Luis-Alexandre Romaña, Ifremer, Centre de La Seyne/mer

M. Henri Etcheber, Chargé de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1

M. Rutger De Wit, Chargé de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1

Président

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse



# Remerciements



## Remerciements

Cette étude a été réalisée au Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon et au Département de Géologie et d'Océanographie de l'Université Bordeaux 1.

Je tiens donc à remercier ses directeurs Messieurs Pierre Chardy et Philippe Bertrand pour m'avoir donné les moyens d'effectuer ce travail de thèse dans les meilleures conditions qui soient. Je remercie également Pierre Chardy pour sa participation au jury en qualité de président.

Je souhaite exprimer tous mes remerciements à mes deux directeurs de thèse :

Henri Etcheber, qui a toujours montré une grande disponibilité et qui m'a encouragé tout au long de ces années, mais également de m'avoir donné l'occasion de toutes les rencontres internationales qui se sont montrées des plus passionnantes. Encore merci pour la confiance et l'aide précieuse que vous m'avez accordé.

Rutger De Wit, qui m'a donné l'occasion de me confronter à des challenges toujours passionnants (mise au point technologiques, missions de terrains, colloques internationaux...). Merci encore d'avoir accepté de m'accompagner dans ce travail.

Je souhaite également exprimer ma gratitude aux rapporteurs et aux membres du Jury :

Emma Orive, Profesora de Ecología de la Universidad del País Vasco (España), muchísimas gracias por haber aceptado ser referi de esta tesis y por haber aportado modificaciones importantes para la calidad de este manuscrito.

Mes sincères remerciements à Philippe Garrigues, directeur de recherche au Laboratoire de Physico Toxico Chimie des systèmes naturels à l'Université Bordeaux 1, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et de bien avoir voulu m'apporter son regard sur ce travail.

Je remercie très chaleureusement Louis-Alexandre Romaña, Chercheur à Ifremer, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse et de m'avoir apporté son aide pour les corrections.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Gwenaël Abril, chercheur au Département de Géologie et d'Océanographie de l'Université Bordeaux 1, pour avoir toujours été disponible aussi bien au niveau des expérimentations au laboratoire et sur le terrain qu'au niveau de la rédaction. Encore merci pour ton soutien.

Je tiens à remercier Benoît Sautour, Michèle Capdepuuy et Nathalie Raymond du Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon pour les discussions et conseils (nombreux) qu'ils m'ont apportés pendant ce travail.

Je ne saurais oublier toute ma petite équipe d'Arcachon et tout particulièrement Astid Massé et Evelyne Buffan-Dubau pour avoir été là systématiquement dans les bons et surtout les moments plus difficiles. Merci de tout cœur.

Je n'oublierai pas Dorothée, Aude, Stéphane, Thierry, Olivier et tutti quanti... pour les discussions et échanges de toutes sortes qui ont rendus ces années très agréables.

Enfin, le soutien de ma famille (nombreuse...) et mes amis (nombreux...) qui ont toujours montré une grande confiance en moi et une patience à toute épreuve malgré mon manque de disponibilités. Merci à vous tous.

Aussi et surtout Enrique, pour son soutien indéfectible, sa patience, merci d'avoir toujours été près de moi dans ce parcours.

# Sommaire





---

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
------------------------------	----------

---

**Chapitre 1 : Phytoplancton et marqueurs pigmentaires en milieu estuarien : synthèse bibliographique**

<b>1- Rappel des spécificités du milieu estuarien</b>	<b>5</b>
<b>1-1 Variabilité spatio-temporelle de l'hydrodynamique</b>	<b>6</b>
<b>1-2 Diversité des apports et des peuplements</b>	<b>8</b>
1-2-1 Apports en matières en suspension (MES).	
1-2-2 Apports en matière dissoutes	
1-2-3 Peuplements estuariens	
<b>1-3 Réactivité biogéochimique du milieu estuarien</b>	<b>10</b>
1-3-1 Nature de la fraction organique	
1-3-2 Réseau trophique estuarien	
<i>i) chaîne trophique assimilatrice</i>	
<i>ii) chaîne trophique dissimilatrice</i>	
<b>1-4 Rôle du phytoplancton dans le milieu estuarien</b>	<b>17</b>
<b>2- Problématique des pigments et du phytoplancton en milieu estuarien</b>	<b>18</b>
<b>2-1 Classification des pigments photosynthétiques</b>	<b>18</b>
2-1-1 Chlorophylles	
2-1-2 Caroténoïdes	
2-1-3 Biodégradation	
<b>2-2 Les pigments biomarqueurs du phytoplancton en milieu estuarien</b>	<b>22</b>
<b>3- Objectifs et démarche de l'étude</b>	<b>25</b>

---

**Chapitre 2 : Matériel et Méthodes**

<b>1-Aires d'étude et échantillonnage</b>	<b>27</b>
<b>1-1. Aires d'étude</b>	<b>27</b>
<b>1-2. Echantillonnage <i>in situ</i></b>	<b>31</b>
<b>1-3. Echantillonnage <i>in vitro</i> : mise en place des microcosmes d'incubation</b>	<b>33</b>
<b>2-Technique de Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP)</b>	<b>36</b>
<b>2-1. Apports de la technique de CLHP pour l'analyse des pigments</b>	<b>36</b>
<b>2-2. Aperçu bibliographique des appareillages et techniques utilisées.</b>	<b>37</b>
<b>2-3. Mise au point méthodologique du protocole choisi</b>	<b>40</b>
2-3-1. Introduction	
2-3-2. Extraction	
<i>a/ choix de la méthode de concentration des échantillons</i>	
<i>b/ choix du solvant d'extraction</i>	
<i>c/ choix du temps et du nombre d'extraction.</i>	
<i>d/ choix du type d'extraction :</i>	<i>*extraction à chaud</i>
	<i>*extraction par micro-ondes</i>

2-3-3. Pré-traitement et stockage des échantillons	
<i>a/ choix de la méthylation</i>	
<i>b/ choix du mode de conservation</i>	
2-3-4 Chromatographie en phase liquide	
<i>a/ choix de la phase mobile et du gradient d'éluion</i>	
<i>b/ Composition de l'extrait pour analyse.</i>	
<i>c/ choix de la température d'analyse</i>	
<i>d/ réglage du débit optimum : évaluation de la Hauteur</i>	
<i>Equivalente du Plateau Théorique (HEPT)</i>	
<i>e/ linéarité et reproductibilité des mesures</i>	
<b>2-4. Description de la méthode adoptée</b>	<b>56</b>
2-4-1. mode opératoire	
2-4-2. Identification et calcul des concentrations en pigments	
2-4-3. Sensibilité de la méthode	
2-4-4. Calcul de diversité pigmentaire	
<b>3- Autres techniques</b>	<b>61</b>
<b>3-1. Carbone organique</b>	<b>61</b>
<b>3-2. Comptage cellulaire</b>	<b>61</b>
<b>3-3. Dénombrement bactérien</b>	<b>62</b>
3-3-1. Désorption des bactéries des particules	
3-3-2. Principe de l'épifluorescence	
3-3-3. Dénombrement de la flore active	

---

### **Chapitre 3 : Distribution des concentrations pigmentaires des eaux dans divers estuaires européens**

<b>1- Introduction</b>	<b>65</b>
<b>2- Distribution des pigments et phéopigments dans 10 estuaires européens</b>	<b>67</b>
<b>2-1 Distribution des pigments dans les 10 estuaires étudiés</b>	<b>67</b>
2-1-1. Résultats	
2-1-2. Discussion	
<i>*Distribution des pigments le long du gradient de salinité estuarien.</i>	
<i>*Diversité pigmentaire et variabilité saisonnière.</i>	
<i>*Comparaison de la distribution des pigments basées sur la typologie estuarienne.</i>	
2-1-3. Conclusions apportées par l'études des teneurs pigmentaires le long des gradients de salinité des 10 estuaires étudiés.	
<b>2-2 Distribution des pheopigments dans 10 estuaires européens</b>	<b>83</b>
2-2-1. résultats	
2-2-2. discussion	
2-2-3. conclusions apportées par le suivi des phéopigments	

<b>3-Est-il possible de discerner la matière organique continentale grâce aux marqueurs pigmentaires ?</b>	<b>86</b>
<b>3-1 Introduction: utilisation d'index pigmentaires en milieu estuarien</b>	<b>86</b>
<b>3-2 Résultats</b>	<b>87</b>
<b>3-3 Distribution <i>in situ</i> du rapport chlorophylle <i>b</i> / lutéine</b>	<b>88</b>
<b>3-4 Conclusion: réponse apportée et intérêt de l'utilisation de l'index comme marqueur de la MO continentale?</b>	<b>93</b>
<b>3-4. Conclusion de l'étude de l'index chlorophylle <i>b</i>/lutéine</b>	<b>94</b>
<b>4- Conclusion générale</b>	<b>94</b>
<hr/>	
<b>Chapitre 4 : Evaluation des cinétiques et voies de dégradation des pigments.</b>	
<b>Introduction</b>	<b>97</b>
<b><u>Partie A</u> - Evaluation des cinétiques de dégradation</b>	<b>99</b>
<b>1- Introduction</b>	<b>99</b>
<b>2 - Influence des MES sur la cinétique de dégradation de la MO</b>	<b>100</b>
<b>2-1. Déroulement des expériences</b>	<b>100</b>
2-1-1. Influence de la concentration en MES	
2-1-2. Influence de l'oxygène	
2-1-3. Influence de la communauté bactérienne	
<b>2-2 Résultats</b>	<b>103</b>
2-2-1. Influence de la concentration en MES	
2-2-2. Influence de l'oxygène	
2-2-3. Influence de la communauté bactérienne	
<b>2-3 Discussion</b>	<b>108</b>
<b>3 -Influence de la température</b>	<b>110</b>
<b>3-1 Déroulement de l'expérience</b>	<b>110</b>
<b>3-2 Résultats</b>	<b>110</b>
3-2-1. Distribution des pigments.	
3-2-2. Respiration et contenu bactérien.	
3-2-3. Distribution du COP.	
<b>3-3 Discussion</b>	<b>114</b>
<b>4 -Influence du matériel végétal</b>	<b>115</b>
<b>4-1. Déroulement de l'expérience</b>	<b>115</b>
<b>4-2. Résultats</b>	<b>115</b>
<b>4-3. Discussion</b>	<b>119</b>
<b>5- Conclusion générale : synthèse</b>	<b>120</b>

<b>Partie B – Suivi des voies de dégradation du phytoplancton</b>	<b>123</b>
<b>1 – Introduction</b>	<b>123</b>
<b>2 – Méthodologie</b>	<b>127</b>
<b>2-1. Déroulement de l'expérience</b>	<b>127</b>
<b>2-2. Choix des protocoles expérimentaux</b>	<b>130</b>
2-2-1 contraintes d'ordre matériel	
2-2-2 contraintes d'ordre méthodologique	
2-2-3 contraintes d'ordre analytique	
<b>2-3. Analyse des données et expression des résultats</b>	<b>131</b>
2-3-1. analyse des données	
2-3-2 traitement statistique	
<b>3 – Résultats</b>	<b>132</b>
<b>3-1. Suivi des communautés de bactéries et de la population d'algues présentes dans les microcosmes au cours de l'incubation</b>	<b>132</b>
<b>3-2. Distribution des pigments dans les microcosmes au cours de l'incubation</b>	<b>135</b>
3-2-1. Suivi des pigments et produits de dégradation sur les 72 première heures de l'expérience.	
<i>*Distribution des caroténoïdes.</i>	
<i>*Distribution de la chlorophylle a et de ces produits de dégradation.</i>	
<i>*Distribution de la chlorophylle b et de ces produits de dégradation.</i>	
3-2-1. Suivi des pigments et produits de dégradation à plus long terme (15 jours).	
<i>*Distribution des caroténoïdes.</i>	
<i>*Distribution de la chlorophylle a et de ces produits de dégradation.</i>	
<i>*Distribution de la chlorophylle b et de ces produits de dégradation.</i>	
3-2-3. Evaluation des cinétiques de dégradation associées aux paramètres étudiés.	
<b>4 –Discussion</b>	<b>145</b>
<hr/>	
<b>Chapitre 5 : Pigments et biogéochimie dans les estuaires européens</b>	
<b>1 – Introduction</b>	<b>149</b>
<b>2 – Activité phytoplanctonique : pigments et Productivité Primaire</b>	<b>150</b>
<b>2-1. Introduction</b>	<b>150</b>
<b>2-2 Méthode</b>	<b>150</b>
<b>2-3 Variabilité de la Production primaire dans les estuaires étudiés</b>	<b>151</b>
2-3-1. Comparaisons inter-estuaires.	
2-3-2. Distridutions saisonnières.	
2-3-3. Distribution amont-aval.	
<b>2-4. Recherche de corrélations entre pigments et Productivité Primaire</b>	<b>153</b>
<b>2-5 Conclusion</b>	<b>154</b>
<b>3- Rôle du phytoplancton dans le bilan de carbone organique estuarien</b>	<b>155</b>
<b>3-1 Introduction</b>	<b>155</b>

---

3-2 Bilan du carbone organique des différents estuaires	155
3-3 Conclusion	157
4- Disparition du phytoplancton : pigments et respiration (pCO <sub>2</sub> )	158
4-1 Introduction	158
4-2 Méthode	158
4-3 Variabilité de la pCO <sub>2</sub> dans les estuaires	158
4-3-1. Comparaisons inter-estuaires.	
4-3-2. Distribution spatio-temporelle.	
4-4 Recherche de corrélations entre les pigments et la pCO <sub>2</sub>	160
4-5 Conclusion	163
5-Action du phytoplancton sur la chimie des gaz : pigments et concentrations de DMS et de composés organiques halogénés volatiles	163
A- Chimie du DMS et phytoplancton	163
5A-1 Introduction	163
5A-2 Méthode	164
5A-3 Distribution du DMS dans les estuaires	164
5A-3-1. Comparaisons inter-estuaires.	
5A-3-2. Distributions saisonnières.	
5A-3-3. Distribution amont-aval.	
5A-4 Recherche de corrélations entre les teneurs en DMS et les pigments	166
5A-5 Conclusion	167
B- Chimie de l'iode et du sélénium et phytoplancton	168
5B-1 Introduction	168
5B-2 Méthode	169
5B-3 Distribution des composés alkyl-iodiques et séléniques dans les estuaires	169
5B-3-1. Comparaisons inter-estuaires.	
5B-3-2. Variations saisonnières.	
5B-3-3. Distribution amont-aval.	
5B-4 Recherche de corrélations entre les pigments et les composés organiques halogénés volatiles	171
5B-5 Conclusion	173
6- Conclusion	174
<hr/>	
Conclusion générale	175
<hr/>	
Références bibliographiques	185
Annexes	



# Introduction générale





## Introduction générale

A l'échelle planétaire, le cycle du carbone est au cœur des préoccupations scientifiques actuelles, principalement du fait de l'effet de serre récemment mis en évidence : élévation de la température atmosphérique en relation avec l'augmentation des transferts de carbone vers l'atmosphère (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, etc...).

Il est donc primordial d'aboutir à des bilans de carbone corrects dans tous les compartiments environnementaux (océans, continents, atmosphère, zones d'interfaces) et de bien comprendre le comportement de cet élément en ces différents lieux si l'on veut un jour prendre des décisions pertinentes pour tenter de remédier à un scénario catastrophique annoncé de longue date.

Les estuaires, zones d'interfaces continent-océan, sont des aires particulièrement importantes pour la problématique carbone :

- les apports de matière organique (MO) y sont considérables, venant à la fois des bassins versants par les fleuves mais aussi de la zone côtière souvent très productive, budgets auxquels on doit ajouter la MO synthétisée dans les estuaires eux-mêmes ;
- ces milieux, du fait des très fortes variabilités des paramètres physico-chimiques et des populations biologiques en place, jouent un rôle fondamental dans les cycles biogéochimiques globaux (carbone, azote, phosphore, contaminants organiques et/ou métalliques, etc...) avec d'autant plus d'impact que les temps de résidence des eaux et des matières en suspension (MES) associées y sont longs ;

- enfin, la pression anthropique y est très forte, puisque les deux tiers de l'humanité vivent en zone côtière, où les développements économiques provoquent quasi irrémédiablement des détériorations prononcées de l'environnement.

Plus précisément, les estuaires peuvent, dans la majorité des cas, être assimilés à des zones de recyclage des sels nutritifs (Wollast, 1983 ; Billen *et al.*, 1985) et à des écosystèmes hétérotrophes où la respiration excède largement la production primaire (Gattuso *et al.*, 1998), ce qui en fait des zones sources de CO<sub>2</sub> vers l'atmosphère (Frankignoulle *et al.*, 1998).

Cette dernière spécificité a été la motivation centrale du programme européen BIOGEST (BIOGaz transfer in ESTuaries), sur lequel s'appuie une grande partie des recherches présentées ici, qui entend vérifier si les estuaires, à une échelle planétaire, peuvent être une source significative d'émission de gaz biogéniques (CO<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, hydrocarbures, N<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>S, Di-Méthyl Sulfure, COS, métaux et halogènes organiques volatiles). Les 4 objectifs de ce programme sont :

1/ déterminer la distribution des biogaz précités dans les eaux de surface des estuaires européens ;

2/ évaluer les flux de biogaz vers l'atmosphère dans ces estuaires et l'importance de ces émissions par rapport aux émissions anthropiques ;

3/ comprendre les processus biologiques majeurs, responsables de la distribution de ces biogaz ;

4/ développer un modèle biogéochimique prédictif permettant de relier les émissions de biogaz aux charges nutritives et organiques des eaux estuariennes.

Pour mener à bien ces recherches, ont été échantillonnés, sur tout le gradient de salinité, neuf estuaires européens : l'Escaut, la Gironde et le Rhin en quatre saisons ; le Douro, l'Elbe, l'Ems, la Loire, le Sado et la Tamise pour une saison à titre de comparaison.

C'est pour mieux cerner le rôle éventuel de la fraction phytoplanctonique dans les émissions de biogaz que nous nous sommes intéressés à ce paramètre qui n'était au départ qu'un paramètre d'accompagnement dans la problématique d'étude de BIOGEST.

Cependant devant les intérêts suscités :

- par la comparaison de données concernant cette composante organique sur tout un ensemble d'estuaires aux propriétés parfois contrastées,

- par la qualité des informations obtenues par l'outil analytique choisi (pigments mesurés par Chromatographie Liquide Haute Pression),

la problématique scientifique relative à la fraction phytoplanctonique a été poussée plus avant suite :

- à l'étude des variations saisonnières dans un estuaire à forte pression anthropique (la Seine), dans le cadre du programme SEINE-AVAL<sub>2</sub>,
- à l'étude des cinétiques de dégradation des pigments en faisant varier les paramètres tels que les teneurs en MES et en O<sub>2</sub>, la température et l'activité hétérotrophe, lors d'expériences *in vitro* ou en suivant les voies de dégradation par processus bactériens ou broutage zooplanctonique, dans le cadre des programmes LITEAU et GIS-ECOBAG.

L'ensemble de ces recherches est consigné dans ce mémoire ayant pour **objectifs** :

➤ **de vérifier si, dans la gamme de latitudes couvertes par les estuaires étudiés, aux caractéristiques parfois opposées, la fraction phytoplanctonique présentait les mêmes tendances dans les variations spatio-temporelles;**

➤ **de s'assurer que la mesure des pigments, rarement abordée dans des milieux aussi complexes que les systèmes estuariens, pouvait donner des résultats aussi convaincants que ceux obtenus en milieux océaniques ou lacustres et de préciser l'utilisation des pigments comme biomarqueurs de la matière organique phytoplanctonique dans ces milieux;**

➤ **enfin, de tenter de mieux cerner les impacts éventuels de cette fraction organique sur certains processus biogéochimiques tels que les émissions de CO<sub>2</sub>, de DMS ou de composés organiques halogénés volatiles et de savoir si, au niveau des bilans de carbone en milieu estuarien, le pool phytoplanctonique joue un rôle majeur ou pas.**

La présentation de ce travail sera faite en cinq chapitres :

Dans le **premier chapitre**, après un bref rappel des caractéristiques propres aux **milieux estuariens**, tant des points de vue physico-chimiques que biologiques, seront abordées les possibilités offertes par **l'étude des pigments**, sachant que celles-ci sont préférentiellement

développées dans des zones plus homogènes telles que les systèmes lacustres ou les eaux océaniques.

Dans le **second chapitre**, seront exposés la **stratégie d'échantillonnage** utilisée, le développement technologique de la mesure des **pigments par chromatographie liquide**, spécifique au milieu estuarien et la mise au point des incubations in vitro.

Dans le **troisième chapitre**, seront donnés les résultats relatifs aux **variations spatio-temporelles** des teneurs en pigments dans les divers estuaires en essayant de faire ressortir les points communs et les spécificités de chacun des systèmes estuariens.

Dans le **quatrième chapitre**, seront abordés les études de **cinétique de dégradation** des pigments en fonction de certains paramètres directeurs tels que les teneurs en MES et O<sub>2</sub>, température et activité hétérotrophe, mais aussi la **traçabilité de la dégradation** de la fraction organique phytoplanctonique par voie bactérienne ou de broutage zooplanctonique.

Enfin, dans le **cinquième chapitre**, les éventuelles relations liant la **productivité primaire**, les **émissions de CO<sub>2</sub>** et de **divers gaz biogéniques** (DMS, composés organiques halogénés volatiles) seront étudiés, de même qu'une tentative d'évaluation du rôle joué par la fraction phytoplanctonique dans les **bilans de carbone au sein de l'estuaire** sera esquissée.

*Chapitre 1* - Phytoplancton et marqueurs  
pigmentaires en milieu estuarien : synthèse  
bibliographique



## Chapitre 1 : Phytoplancton et marqueurs pigmentaires en milieu estuarien : synthèse bibliographique.

Le milieu estuarien, en tant que zone d'interface entre continent et océan, est soumis à des pressions naturelles multiples provenant à la fois du milieu côtier et des fleuves, mais également à une pression anthropique souvent très forte. Ce sont des zones de transition dans lesquelles s'installent de forts gradients et discontinuités dans la distribution de composés chimiques et en conséquence dans la distribution des organismes vivants. Cette variabilité implique une grande diversité dans les processus biogéochimiques intervenant en milieu estuarien.

Nous entendons, dans ce chapitre, après un bref rappel des spécificités du milieu estuarien, des points de vue hydro-sédimentologique, géochimique et biologique, préciser la place du phytoplancton dans la fraction organique estuarienne. Seront ensuite abordés, après une présentation succincte de la classification des pigments, leur rôle de biomarqueurs du phytoplancton et les difficultés associées à ce rôle en milieu estuarien. Enfin, les objectifs de l'étude et la démarche adoptée seront décrits.

### **1- Rappel des spécificités du milieu estuarien.**

Pritchard (1967) définit les estuaires comme des « coastal bodies in which mixing of fresh water and seawater produces density gradients which drive distinctive estuarine gravitational circulation. ». Cette proposition, assez consensuelle, n'empêche pas que les estuaires sont difficiles à définir de par la variabilité de leur géomorphologie, quand on

compare un estuaire à un autre, mais aussi de par les variations saisonnières affectant débits et marées, qui dirigent leur comportement hydro-sédimentologique. La classification la plus courante est faite selon la structure saline : sous les effets de la marée et des débits fluviaux, l'eau douce apportée par le fleuve se mélange plus ou moins avec l'eau de mer. La stratification des eaux est favorisée par le débit et atténuée par la marée : on la chiffre à l'aide du nombre de Carter-Cremer défini comme le rapport entre le prisme tidal (différence de volume d'eau contenu dans l'estuaire à marée haute et à marée basse) et le volume d'eau douce apporté par la rivière pendant un cycle de marée.

Type Estuaire	Marée	Débit fluvial	Caractéristiques	Nb Carter-Cremer
Très stratifié	Faible	Fort	- forte stratification ; - coin salé stationnaire ; - halocline ; - mélange difficile.	1
Partiellement stratifié	Forte	Moyen	- stratification moins marquée ; - turbulences ; - mélange vertical.	10-100
Bien mélangé	Forte	Faible	- pas de gradients verticaux ; - forte turbulence ; - très bon mélange.	> 1000

**Tableau 1-1.** Classification des estuaires selon la structure saline (Pritchard, 1967).

### 1-1. Variabilité spatio-temporelle de l'hydrodynamique :

La stratification des eaux estuariennes présente une variabilité spatiale et temporelle : les estuaires macrotidaux (à forte amplitude de marée) sont plus mélangés à l'amont qu'à l'embouchure et peuvent être bien mélangés en période d'étiage et partiellement stratifiés en période de crue. De plus, ils sont mieux mélangés en période de vives-eaux qu'en période de mortes-eaux.

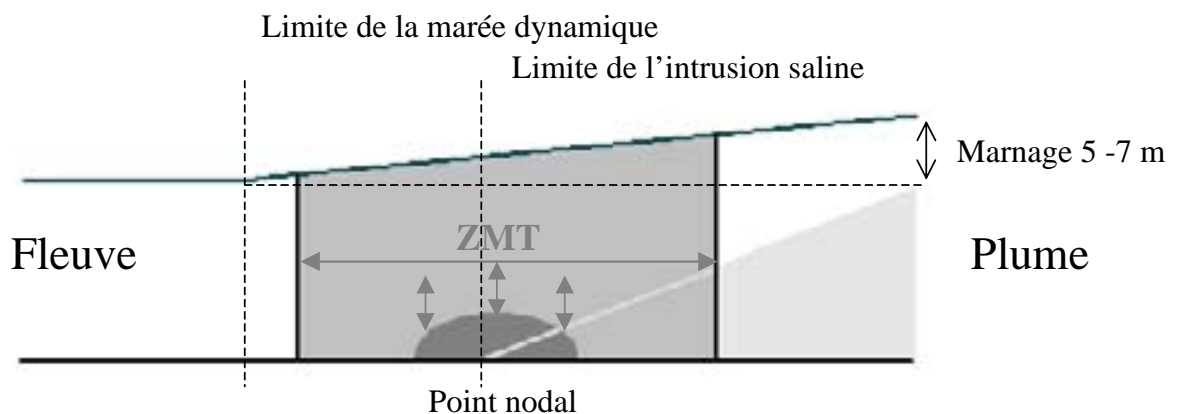
Du fait des différences de salinité amont-aval, il existe une circulation résultante dirigée de l'amont vers l'aval en surface et inversement au fond (Allen, 1972) : cette circulation « de densité » est favorisée par la stratification des eaux et se montre plus importante dans les estuaires microtidaux à fort débit d'eau douce.



Dans les estuaires macrotidaux, les courants de marée dominant largement l'hydrodynamique (vitesses de deux ordres de grandeurs supérieures à celles induites par le débit fluvial) et favorisent le mélange des eaux, limitant la circulation de densité.

Le comportement hydrodynamique des estuaires résulte donc de la superposition de deux phénomènes : le débit du fleuve en amont et la marée en aval.

Au niveau du fleuve, se succèdent, au cours de l'année, des périodes de crue et d'étiage rendant le facteur débit très variable. De la même façon, l'action de la marée est variable au cours du cycle lunaire (14 jours) ; le coefficient varie fortement alternant vives-eaux/mortes-eaux avec un marnage allant de 4 à 6 mètres à l'embouchure pour les estuaires macrotidaux. La conjonction de ces deux phénomènes induit une circulation résiduelle des eaux et la formation d'un point nodal, dans la zone amont de pénétration maximale de la salinité dans l'estuaire (figure 1-1).



**Figure 1-1.** Schéma d'un estuaire macrotidal

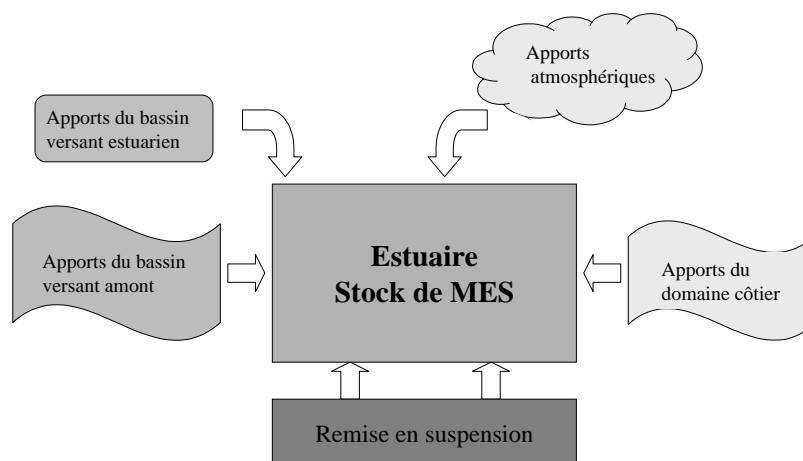
Le mode de circulation des eaux implique la notion de temps de résidence des eaux à l'intérieur de l'estuaire. Cette donnée est définie comme le temps nécessaire à remplacer l'ensemble d'un composé conservatif présent dans un volume donné : il est donc égal au rapport entre ce volume et le débit moyen sur un cycle de marée. Ce temps diminue lorsque le débit augmente de quelques heures dans les estuaires microtidaux à fort débit d'eau douce à plusieurs mois dans les estuaires macrotidaux à faible débit d'eau douce (Wollast et Duiker, 1982). La durée du temps de résidence est une donnée importante dans l'établissement de processus biologiques et chimiques au sein de l'estuaire (photosynthèse, spéciation des éléments chimiques par exemple).

En amont de l'intrusion saline, la circulation résiduelle provoque une accumulation en particules appelée bouchon vaseux (BV) ou zone de maximum de turbidité (ZMT) (Allen, 1972). Ce maximum de turbidité, dont la concentration en particules peut aller de 100 mg/l à 10 g/l, est la plupart du temps localisé dans les régions de faible salinité et est soumis à des migrations longitudinales et des cycles de dépôt et de remise en suspension, aux échelles de temps diurne, lunaire et saisonnière (Allen, 1972). Les particules déposées portent le nom de crème de vase et sont plus importantes en période de mortes-eaux. Lors de crues exceptionnelles, le bouchon vaseux se déplace vers l'aval et peut être en grande partie expulsé sur le plateau continental lors des marées de vives-eaux.

## 1-2. Diversité des apports et des peuplements

### 1-2-1 Apports en matières en suspension (MES).

Les particules en suspension (matériel  $> 0.45 \mu\text{m}$  par définition) sont le support de nombreux éléments (polluants chimiques, bactéries, etc...) et peuvent donc être considérées comme des éléments prédominants de la biogéochimie de l'estuaire. Les origines de ces MES présentes en milieu estuarien sont diverses (figure 1-2) et la qualité de celles-ci dépend bien évidemment de ces origines.



**Figure 1-1.** Schéma des apports en MES à l'estuaire.

Dans la zone européenne, au moins en ce qui concerne les estuaires macrotidaux, la majorité des MES vient des bassins versants amonts lors des périodes de crues et forme l'essentiel du matériel contenu dans les systèmes bouchon vaseux-crème de vase.

### 1-2-2 Les matières dissoutes.

Nous ne nous attarderons pas sur ce matériel (domaine  $< 0.45 \mu\text{m}$ ). Rappelons pour mémoire que sels nutritifs apportés des bassins amonts, MO dissoute et colloïdale de natures diverses, micro-polluants d'origine anthropique constituent une part essentielle qui peut affecter la qualité globale des eaux du milieu estuarien en fonction de leur toxicité ou de leur plus ou moins grande réactivité lors de leur transfert amont-aval.

### 1-2-3 Peuplements estuariens

Globalement, on peut classer les organismes présents en estuaire dans différentes catégories rassemblées dans le tableau 1-2 et synthétisées dans la figure 1-3.

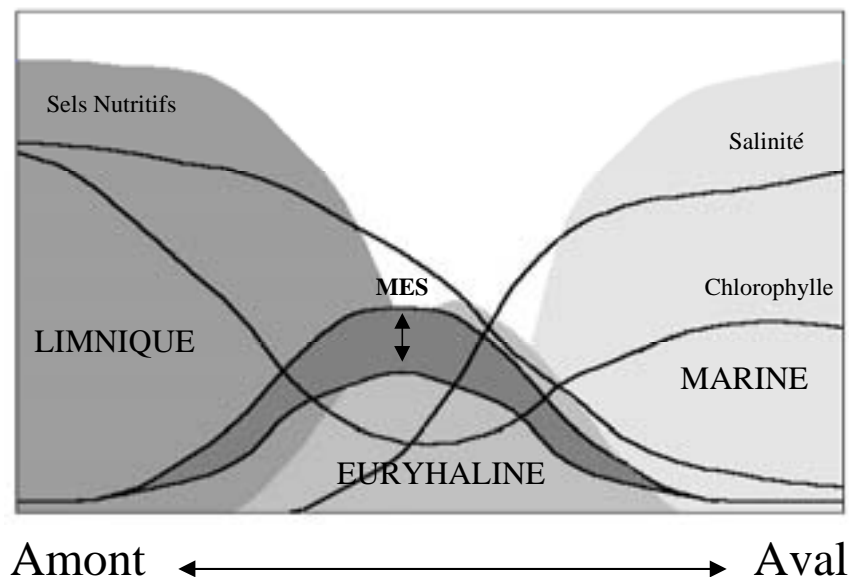
Zone de l'estuaire	Type d'organismes
$< 5 \text{ ‰}$	Oligohalins
partie centrale	Estuarien : organismes plutôt marins, mais vivant dans l'estuaire probablement pour des raisons de compétition entre espèces.
$> 18 \text{ ‰}$ (certains jusqu'à $5 \text{ ‰}$ )	Euryhalins : majorité des organismes vivant en milieu estuarien.
$> 25 \text{ ‰}$	Sténohalins : organismes vivant dans l'embouchure.
Tout l'estuaire	Migrateurs : ils utilisent l'estuaire comme zone de nourricerie ou bien comme route pour rejoindre les rivières, qui sont des lieux de ponte.

**Tableau 1-2.** Distribution selon la salinité des catégories d'organismes présents en estuaire.

Intéressons nous plus particulièrement au phytoplancton, sujet préférentiel de cette étude.

La turbidité des eaux au centre de l'estuaire, comme pour nos estuaires européens macrotidaux, limite la pénétration de la lumière et constitue donc un facteur limitant de la production primaire autochtone. Cependant, il existe, dans cette zone, une activité bactérienne intense à l'origine de la minéralisation de la MO continentale au sein même de l'estuaire. Cette activité hétérotrophe provoque un déficit en oxygène limitant pour les autres formes de vie dans l'estuaire (copépodes, protozoaires). La sous-oxygénation du bouchon vaseux et le gradient de salinité contrôlent la distribution des organismes planctoniques qui ne peuvent coloniser l'ensemble des milieux. On a donc une succession de groupements d'espèces le long de l'estuaire : du phytoplancton fluviatile plus ou moins abondant, une zone estuarienne

plus ou moins pauvre en espèces du fait des fortes turbidités, et de nouveau, dans l'embouchure, des populations phytoplanctoniques d'origine marine, différentes de celles de l'amont (figure 1-3). Le plancton ayant le même comportement hydrodynamique que les particules en suspension, il aura tendance à s'accumuler au niveau du bouchon vaseux où, en l'absence de lumière, il ne pourra se développer et au contraire se dégradera.



**Figure 1-3.** Distribution schématique des composants chimiques et biologiques le long d'un estuaire

Le nombre total d'espèces décroît lorsqu'on pénètre dans l'estuaire. Le nombre d'espèces typiquement estuariennes est maximal entre 5 et 18 %, mais il reste largement inférieur aux espèces oligohalines ou euryhalines marines. Inversement à cette diminution du nombre d'espèces, on remarque souvent une augmentation du nombre d'individus par espèce (abondance) (McLusky, 1981 ; Lally & Parson, 1993).

### 1-3 Réactivité biogéochimique du milieu estuarien

Du fait des temps de résidence plus ou moins longs des eaux et des particules en milieu estuarien, de la variabilité des caractéristiques physico-chimiques des eaux et des peuplements (allant du compartiment bactérien au zooplancton), il est évident que cet interface continent-océan est un lieu privilégié de réactions diverses transformant la majorité des constituants qui le traversent.

Dans le cadre de ce travail, nous allons nous intéresser plus spécifiquement à la fraction organique des eaux de ce milieu en précisant la double particularité qui caractérise la MO et rend son étude délicate : premièrement, une grande diversité des sources évoquées ci-avant et deuxièmement l'existence d'une activité biologique intense à travers les réseaux trophiques estuariens qui multiplient les produits issus des voies d'assimilation et de minéralisation de cette MO.

### 1-3-1 Nature de la fraction organique

La matière organique (MO) présente en milieu aqueux est expérimentalement scindée en 4 compartiments: la MO dissoute ( $< 0.10 \mu\text{m}$ ), la MO colloïdale (comprise entre  $0.10$  et  $0.45 \mu\text{m}$ ), la MO particulaire ( $>0.45 \mu\text{m}$ ) et la MO volatile, le plus souvent très faible pourcentage de l'ensemble de la MO et rarement prise en compte. En général, la quantité de MO présente dans un environnement est évaluée par l'intermédiaire de son élément majeur, le carbone organique (CO).

Le carbone organique particulaire présent est :

- soit **autochtone**, produit par photosynthèse en milieu aqueux dans le fleuve et l'estuaire;
- soit **allochtone**, résultant de l'érosion des bassins versants ou de rejets domestiques, industriels et agricoles.

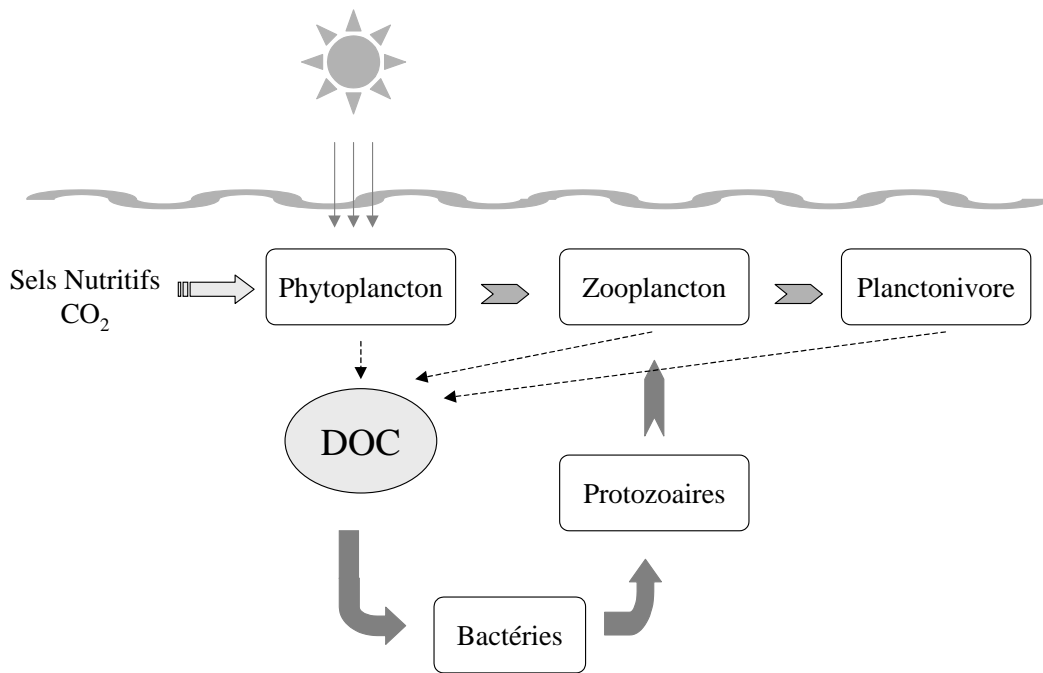
D'un site à l'autre, l'importance de ces sources est très variable en fonction de la turbidité, l'état d'eutrophisation, la nature du bassin versant, la pression démographique, etc.... Si l'on exclut les bassins versants très pollués, une tendance générale est observée dans les fleuves et rivières. Plus les eaux sont turbides, moins les MES sont riches en MO (Meybeck, 1982), du fait de deux phénomènes concomitants : en périodes de fortes pluviométries, l'érosion augmente la turbidité et les sols sont la source majoritaire de POC, tandis que la photosynthèse aquatique est limitée par manque de lumière ; inversement, en période de faible pluviométrie, la turbidité diminue et la production phytoplanctonique devient majoritaire. Une tendance similaire est observable dans les estuaires : les particules du bouchon vaseux sont généralement moins riches en matière organique que celles de la rivière ou de la zone euphotique aval (Laane 1982 ; Etcheber, 1983 ; Meybeck *et al.*, 1988 ; Abril, 1999). Une autre notion fondamentale pour appréhender le devenir de la matière organique

dans le milieu aquatique est la définition de son caractère **labile ou réfractaire** : cette notion est relativement subjective dépendant de l'échelle de temps considérée et des processus biologiques mis en jeu. Lors du programme BIOGEST, nous avons considéré comme labile la fraction de la MO « minéralisée en moins d'un an » selon la définition de Lin (1988). La MO particulaire issue de l'érosion des sols est alors en grande majorité réfractaire à l'activité hétérotrophe aquatique car elle a déjà subi de nombreuses transformations biologiques et géochimiques dans les sols ; cependant, en automne, le lessivage des litières apporte une fraction allochtone labile significative, dont la contribution diminue progressivement, au cours des crues successives (Veyssy *et al.*, 1999). Au contraire, la MO particulaire autochtone d'origine phytoplanctonique est fortement labile ; il en est de même d'une grande partie de la matière organique liée aux rejets domestiques qui peuvent être importants dans certains estuaires.

A l'échelle globale, Ittekkot (1988) a estimé sur la base de mesures d'acides aminés et de sucres, qu'environ 35% de la MO particulaire transportée par les fleuves était labile. Ceci signifie qu'elle sera minéralisée dans les estuaires macrotidaux où le temps de résidence des MES varie de plusieurs mois à 2 ans (Etcheber *et al.*, 1999). Dans les estuaires microtidaux, cette MO sera plus vraisemblablement minéralisée dans les sédiments côtiers (Keil *et al.*, 1996). Inversement, la fraction organique dissoute fluviale, dans sa grande majorité, traverse les estuaires de façon globalement conservative, une décroissance linéaire avec la salinité étant la tendance générale (Laane, 1980 ; Ittekkot *et al.*, 1982 ; Burton, 1983).

### 1-3-2 Réseau trophique estuarien

Le réseau trophique estuarien est dépendant de l'énergie lumineuse et des apports de matière organique par le fleuve et provenant de l'océan. Ce réseau trophique suit 2 voies, l'une assimilatrice caractérisée par la production et la croissance d'organismes, et l'autre dissimilatrice caractérisée par la décomposition et la minéralisation des molécules. Les bactéries présentes dans l'estuaire sont principalement considérées comme ayant une action de minéralisation de la matière organique, mais elles participent également au réseau trophique assimilateur par l'intermédiaire de la boucle microbienne.



**Figure 1-4.** Illustration schématique du couplage de la chaîne alimentaire pélagique (phytoplancton, poissons) et de la boucle microbienne (bactéries et protozoaires)

*i) Chaîne trophique assimilatrice : Production primaire et boucle microbienne*

La production primaire en milieu estuarien est effectuée par plusieurs groupes végétaux colonisant la colonne d'eau mais aussi les zones intertidales. On retrouve des plantes vasculaires confinées aux zones de prés salés (e.g. Salicorne) et dans les zones intertidales (e.g. Zostère) mais également du microphytobenthos dont la production est souvent équivalente à celle du phytoplancton (Irigoién et Castel, 1997) (cf. tableau 1-2).

	Production en g de C/m <sup>2</sup> /an	Situation
Phytoplancton	81.7	Lynther, UK
Microphytobenthos	143	Lynther, UK
Zostère	58-330	Danemark
Salicorne (présalé)	100-500	Pays-Bas

**Tableau 1-3.** Exemple de production primaire mesurée pour les principaux habitats estuariens (d'après McLusky, 1981).

La production phytoplanctonique en milieu estuarien est conditionnée par plusieurs facteurs. Même si la concentration en sels nutritifs est la plupart du temps suffisante, on atteint rarement une production maximale. Ceci est dû à la combinaison de trois facteurs : premièrement le niveau de turbidité, qui limite la pénétration lumineuse et par conséquent la photosynthèse ; deuxièmement, la profondeur de la colonne d'eau, très souvent insuffisante pour que des blooms puissent s'installer ; troisièmement, le taux de croissance du phytoplancton qui est souvent plus faible que le taux de renouvellement des eaux dans l'estuaire (Mc Lusky, 1981). On constate alors 2 régions de production préférentielle au sein des estuaires, une dans la partie fluviale en amont du BV et la seconde dans la partie plus marine en aval du BV. Malgré ce potentiel de production, les estuaires européens macrotidaux à forte concentration en MES apparaissent comme des systèmes globalement hétérotrophes (Heip *et al.*, 1995). On y observe d'ailleurs un flux net de CO<sub>2</sub> vers l'atmosphère (Frankignoulle *et al.*, 1998).

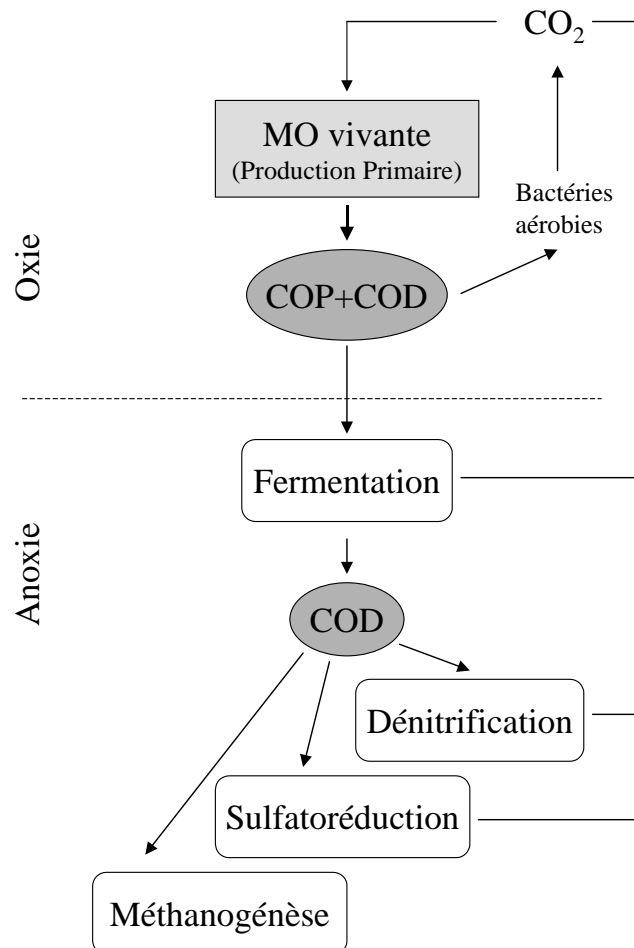
La production primaire et la production bactérienne interagissent à deux niveaux en milieu estuarien : elles répondent aux mêmes facteurs de l'environnement pour leur croissance (apports en sels nutritif, température,...) et se retrouvent donc en compétition. D'un autre côté, la population bactérienne utilise le phytoplancton mort ou moribond et les produits de son activité comme substrat pour son développement. Le carbone organique dissous (COD) produit par l'activité du phytoplancton et du reste de la chaîne trophique représente une excellente source de carbone pour le compartiment microbien (Valiela, 1995). La croissance de celui-ci est contrôlée par ses prédateurs directs, les protozoaires. Ceux-ci constituent un maillon important dans le transfert de l'énergie entre les bactéries et le zooplancton. Cette voie d'assimilation est appelée boucle microbienne (figure 1-4).

#### *ii) Chaîne trophique dissimilatrice : Bactéries et MES*

Les MES sont considérées comme des substrats favorables au développement des microorganismes. Le contexte hydrodynamique de l'estuaire contribue à la dominance des bactéries attachées aux particules par rapport aux bactéries dites « libres ». L'extension du temps de rétention des particules au sein de l'estuaire est sans doute une raison essentielle de cette situation, mais également par l'évacuation plus rapide des bactéries libres dans la colonne d'eau favorisant de ce fait la régulation de ces populations dans l'estuaire. Il a de plus été montré que l'activité métabolique des bactéries attachées aux particules est plus élevée



que celle observée chez les bactéries dites libres (Crump *et al.*, 1998). La plupart du temps l'activité de minéralisation est assurée par les bactéries de la colonne d'eau (attachées aux particules) en conditions oxygènes et par les bactéries du sédiment en conditions anoxiques. La matière organique est donc minéralisée par différents processus : par hydrolyse en conditions aérobies ou par fermentation en conditions anaérobies (figure 1-5).



**Figure 1-5.** représentation schématique de la dégradation du carbone organique des environnements oxygènes à anoxiques.

Au sein de l'estuaire on peut constater un certain équilibre entre la respiration rapportée à l'activité hétérotrophe et la production. Le bilan entre l'activité autotrophe et l'activité hétérotrophe dépend des conditions du milieu. Il peut se succéder au sein même de l'estuaire, des zones principalement productrices de carbone et des zones consommatrices, notamment dans le bouchon vaseux où la production primaire est limitée par la forte atténuation de la lumière.

	Paramètre mesuré	Indicateur	Avantages	Inconvénients	Références
sources	C/N/P	● Origine de la MO; Etat de maturation	Protocole aisé	Trop de sources de MO; Interférences sources/dégradation	Redfield, 63; Canuel et al., 95; Guo et al., 97.
	Isotopes ( $\delta^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ...)	★ Origine de la MO; Suivi du réseau trophique		Technique lourde; Amplitude importante des valeurs repères en milieu estuarien	Peterson et al., 85; Wada et al., 87; Canuel et al., 95; Guo et al., 97.
	Protéines, Glucides, Lipides	★ Etat de maturation de la MO	PGL / MO = MO labile/ MO complexe	Peu précis; protocole lourd	Laane, 82; Etcheber, 86.
	Chlorophylle <i>a</i>	★ Biomasse phytoplanktonique	Protocole aisé	Variations du rapport COP/chlo <i>a</i> pour la quantification du phyto	Relexans et al., 82 Canuel et al., 95.
	Pigments	★ Classes phytoplanktoniques	Spécifique des groupes végétaux	Protocole lourd	Mantoura et al., 83 Bianchi et al., 90.
	Lignine	★ Traceurs des débris végétaux	Spécifique	Protocole lourd	Etcheber, 86; Reeves et al., 89.
	Acides gras	★ Origine de la MO; production de MO	Efficace et spécifique	Protocole lourd	Laureillard et al., 93; Canuel et al., 95
devenir	C/N	● Origine de la MO; Etat de maturation	Protocole aisé	Confusion entre origine et niveau de dégradation	Redfield, 63.
	Pheopigments	★ Etat de maturation du phytoplankton	Spécifique du mode de dégradation	Protocole lourd	Mantoura et al., 83 Bianchi et al., 90.
	Acides gras sat./insat.	★ Etat de maturation de la MO	Efficace et spécifique	Protocole lourd	Denant, 88.

**Tableau 1-3.** Méthodes couramment utilisées pour déterminer les sources et le devenir de la matière organique en milieu aqueux (● difficilement applicable en milieu estuarien, ★ fonctionne bien en milieu estuarien).

En résumé, en environnement bien oxygéné, les processus qui affectent le taux de dégradation de la MO sont la dégradation microbienne et la consommation par les organismes hétérotrophes. La première étape de la dégradation microbienne s'effectue par hydrolyse enzymatique des polymères. Une partie de la MO ainsi « brisée » est utilisée pour la croissance des cellules et une partie est respirée. Les différences dans les taux de dégradation ne sont pas dues aux processus mis en œuvre mais à la composition chimique de la MO. Par exemple, des composés tels que la cellulose, les lignines et les cires présentes chez les plantes vasculaires sont moins facilement dégradées que les détritiques issus du phytoplancton par exemple.

En environnement anoxique, la dégradation microbienne fait intervenir des processus et des communautés différentes. On parlera ici de chémohétérotrophie. Le principe est la réduction de la MO par des réactions telles que la fermentation, la réduction des nitrates et la dénitrification, la réduction des sulfates et la méthanogénèse suivant le degré de l'anoxie.

#### **1-4. Rôle du phytoplancton dans le milieu estuarien.**

A double titre, la fraction phytoplanctonique joue un rôle important dans la biogéochimie globale du carbone organique en milieu estuarien :

- elle peut être une composante importante de la fraction organique particulaire ;
- elle est majoritairement labile, donc rapidement décomposable, et forme l'essentiel du pool organique qui va être minéralisé dans l'estuaire lui-même.

Enfin, le comportement du phytoplancton peut influencer directement la distribution de certains composants chimiques, comme par exemple les composés organiques halogénés volatiles ou les composés soufrés (DMS, COS...) étudiés dans le cadre du programme BIOGEST (Sciare et al.,2002 ; Tessier et al.,2002).

Du fait de la multiplicité des origines de la MO présente dans les systèmes estuariens et de la variabilité de ses degrés de maturation, suite aux long temps de résidence des eaux et des particules, il ressort que les approches techniques de l'étude de la MO pose toujours problème dans ces milieux : que l'on s'intéresse à déterminer ses sources ou à connaître son évolution, à travers des approches globales ou moléculaires, il existe beaucoup de difficultés à avoir des réponses claires en dépit des nombreuses approches existantes comme l'a signalé Lin (1988) et comme cela est succinctement montré dans le tableau 1-3 présenté ci-contre.

Les difficultés méthodologiques évoquées concernent aussi l'étude de la fraction phytoplanctonique qui sera l'objet central de notre étude. Les nombreuses recherches menées en milieu océanique, où l'utilisation des pigments s'est avérée très concluante, nous ont conduit à penser que ce genre d'approche pouvait être intéressant, en dépit du relativement faible nombre d'études pratiquées jusqu'à ce jour en milieu estuarien (cf. chapitre 1- paragraphe 2-2).

## **2- Problématique des pigments et du phytoplancton en milieu estuarien**

### **2-1 Classification des pigments photosynthétiques**

La photosynthèse est le processus d'absorption de l'énergie lumineuse par les pigments photosynthétiques des plantes, algues, ainsi que de certains groupes bactériens, pour sa transformation en énergie chimique. Une partie du spectre de la lumière est donc transmis, ce qui donne aux pigments leurs couleurs caractéristiques, et une partie des longueurs d'onde est absorbée et convertie en énergie chimique. En fait, les molécules de pigments ne sont pas directement utilisées seules pour la photosynthèse, elles sont associées avec des protéines spécifiques et forment des complexes.

Sous le terme de pigments photosynthétiques, on regroupe 4 grands ensembles: 1) les chlorophylles (a, b et c) qui sont localisées dans les chloroplastes des cellules végétales; elles interviennent dans la phase lumineuse de la photosynthèse en capturant l'énergie lumineuse et en créant une différence de potentiel dans la membrane des tylakoïdes ; 2) la catégorie des caroténoïdes (xanthophylles, carotènes) qui sont des pigments "accessoires" de la photosynthèse et ont parfois un rôle de photo-protection (diatoxanthine,  $\beta$ -carotène); 3) les phéopigments (chlorophyllide, phéophytine et phéophorbide), qui sont associés à ces chlorophylles et formés par différentes voies métaboliques ou chimiques ; les phicobili-protéines, bien que spécifiques de groupes taxonomiques tels que les Cyanobactéries et les cryptophytes n'ont pas été étudiées ici car leur caractère hydrophile nécessite la mise au point d'un protocole différent. De plus, les autres pigments analysés nous ont quand même permis d'obtenir des informations sur la présence de Cyanobactéries et de cryptophytes.

2-1-1 Chlorophylles

La biosynthèse des chlorophylles fait appel à une longue séquence de plus de 25 réactions enzymatiques (Porra et al.,1997). Les molécules de chlorophylles sont des complexes magnésium-porphyrine, di et tétra-hydroporphirine. L'atome de magnésium est entouré de 4 noyaux pyrroliques et d'une chaîne isocyclique (cf. figure 1-6).

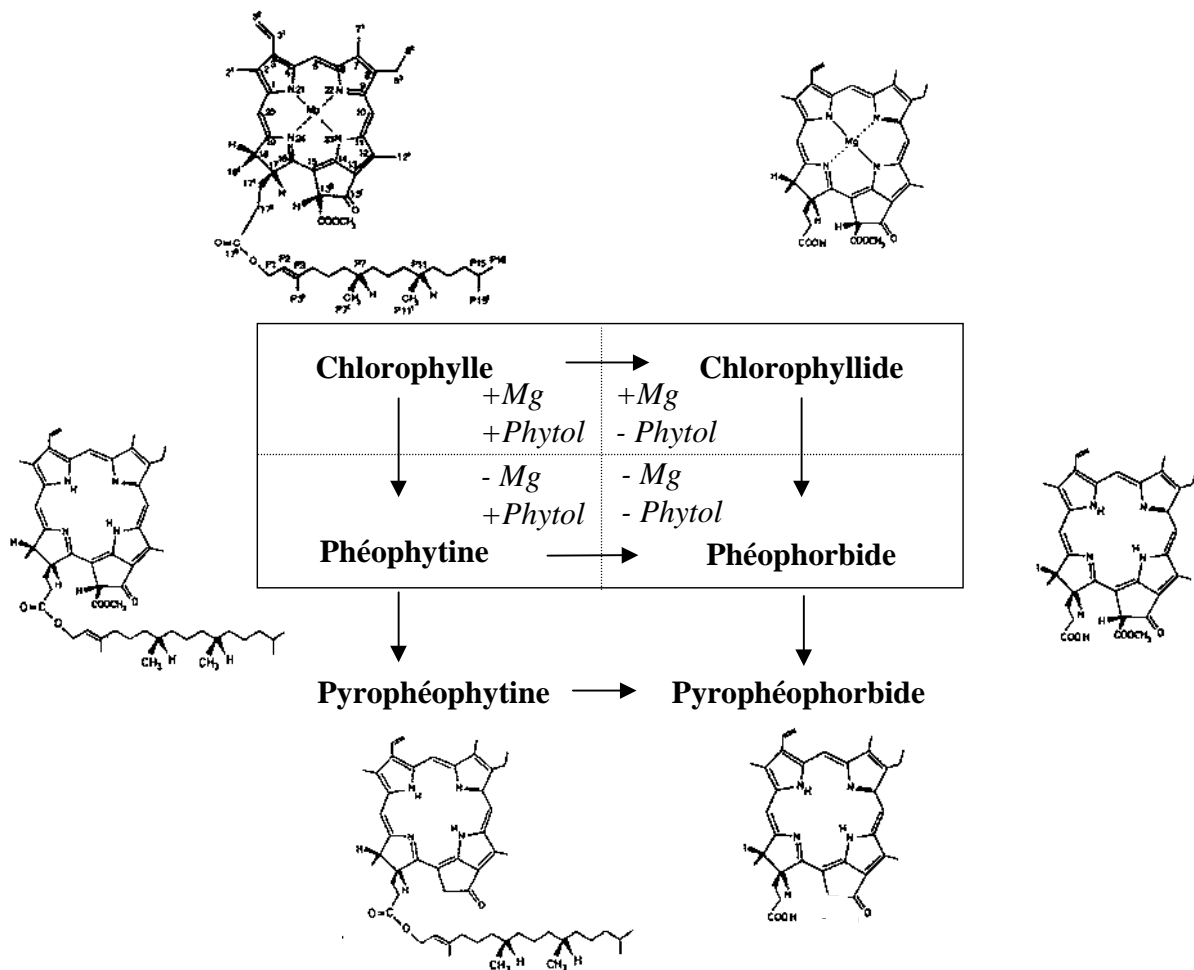
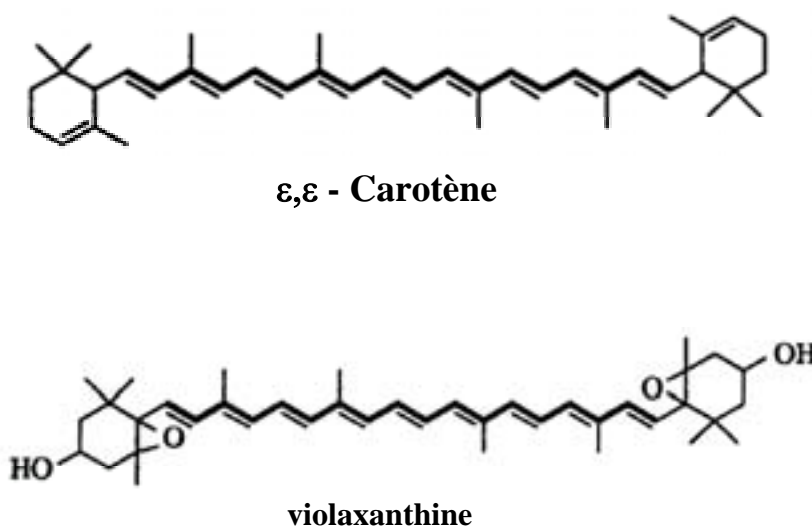


Figure 1-6. Schéma de dégradation de la chlorophylle.

La chlorophylle intervient dans la phase lumineuse de la photosynthèse. L'absorption de la lumière par les pigments amène les électrons dans la molécule à un niveau d'énergie supérieur. Cette énergie est transférée par une série de réactions pendant lesquelles l'ADP (adénosine diphosphate) est transformée en ATP (Adénosine triphosphate) et forme la molécule de NADPH<sub>2</sub> (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). Dans la phase sombre de la photosynthèse, le CO<sub>2</sub> est réduit par le NADPH<sub>2</sub> en utilisant l'énergie de l'ATP pour produire des molécules de carbohydrates (polysaccharides) et autres composés organiques (lipides, protéines,...).

### 2-1-2 Caroténoïdes

Il existe près de 600 caroténoïdes connus aussi bien chez les procaryotes, champignons, algues et plantes supérieures que chez les animaux où ils sont principalement dérivés de pigments ingérés (ex. Astaxanthine chez les copépodes dérivé du  $\beta$ -carotène). Ce sont des molécules complexes formées d'une chaîne de 40 atomes de carbone à partir de laquelle se forment de nombreux composés (figure 1-7). Le groupe des carotènes est le plus simple. Les molécules ne contiennent que des atomes de Carbone et d'Hydrogène. Le groupe des xanthophylles est lui plus complexe : ils sont produits par oxydation des molécules de carotènes et sont composés d'atomes de Carbone, d'Hydrogène et d'Oxygène. Ce sont des capteurs d'énergie organisés comme une antenne.



**Figure 1-7.** Formules développées de deux caroténoïdes types : un carotène et un xanthophylle (violaxanthine).

Les caroténoïdes se retrouvent principalement liés aux complexes pigments-protéines de l'appareil photosynthétique. Leur fonction est double, soit ils servent de capteurs d'énergie lumineuse en transmettant celle-ci aux chlorophylles, soit ils dissipent le trop plein d'énergie absorbée, c'est le rôle de photoprotection.

### 2-1-3 Biodégradation des pigments

L'étude des teneurs en pigments dans le milieu naturel implique de prendre en compte leurs produits de dégradation. Outre les dégradations abiotiques telles que la photo-oxydation, les pigments sont soumis à une pression biologique qui entraîne les mêmes effets. Ces pressions sont soit la sénescence naturelle des cellules, soit la consommation par les bactéries, soit encore le broutage par le zooplancton. De nombreuses études ont montré l'apparition de ces pigments de dégradation ou phéopigments essentiellement pour les produits chlorophylliens (Barlow *et al.*, 95 ; Cariou-LeGall *et al.*, 95 ; Head *et al.*, 92 ; Llewelyn *et al.*, 96). On observe 3 grands groupes de phéopigments (figure 1-6): la chlorophyllide formée sous l'action des chlorophyllases très actives lors de la sénescence des cellules et plus particulièrement chez certains groupes algaux (e.g. Diatomées); la phéophorbide et la phéophytine associées aux activités de consommation par les hétérotrophes (cf. Introduction-chapitre 4).

Les caroténoïdes se dégradent par les mêmes processus, mais les produits ne sont pas forcément identifiables. La plupart du temps la dégradation de ces composés donne des composés incolores ou des isomères de la molécule. Mais par exemple, les caroténoïdes possédant le groupement 5,6 epoxides (comme la fucoxanthine ou la diadinoxanthine) ont une voie de dégradation mieux connue et les produits sont bien identifiés (fucoxanthinol et loliolide) (Repeta, 1989).

Les études de dégradation de caroténoïdes sont scindées en deux groupes : les unes concernant les phénomènes de broutage (Klein *et al.*, 1986; Head et Harris, 1992; Bochdansky et Deibel, 1997), les autres s'intéressant à la dégradation des pigments dans le sédiment à court terme (Repeta, 1989; Bianchi *et al.*, 1991 et 1993) et à long terme (Watts et Maxwell, 1977; Furlong et Carpenter, 1988).

## 2-2 les pigments biomarqueurs du phytoplancton en milieu estuarien

L'ubiquité de la chlorophylle *a* dans les cellules végétales en fait un indicateur de la biomasse végétale globale. D'un autre côté, la spécificité des associations de pigments accessoires (chlorophylles *b* et *c* et caroténoïdes) permet de différencier les groupes taxonomiques du phytoplancton (Everitt et al., 1990) et des végétaux supérieurs (Bianchi et Findlay, 1990) (tableau 1-4). Cette détermination n'est pas possible au delà de la classe à cause des fortes variations intra-spécifiques des compositions pigmentaires et ne permet donc pas d'identifier des espèces.

L'utilisation des pigments ou de rapports de pigments comme la chlorophylle *a* / caroténoïdes permet de déterminer la part de chaque groupe taxonomique identifié dans le total de biomasse présent (évaluée par la concentration en chlorophylle *a*) (Letelier *et al.*, 93 ; Mackey *et al.*, 96). Ce type d'approche est couramment utilisé en océan ouvert où l'identification des espèces phytoplanctoniques et de leurs cycles saisonniers commencent à être bien connues, mais reste marginal en milieu estuarien du fait de la grande hétérogénéité du système en matière de dynamique des populations phytoplanctoniques (Bianchi et al., 1993; Ahel et al., 1996; Roy et al., 1996). L'utilisation des nouvelles techniques analytiques récentes telle que la chromatographie en phase liquide a étendu le champ d'investigation des pigments photosynthétiques en tant que biomarqueurs.

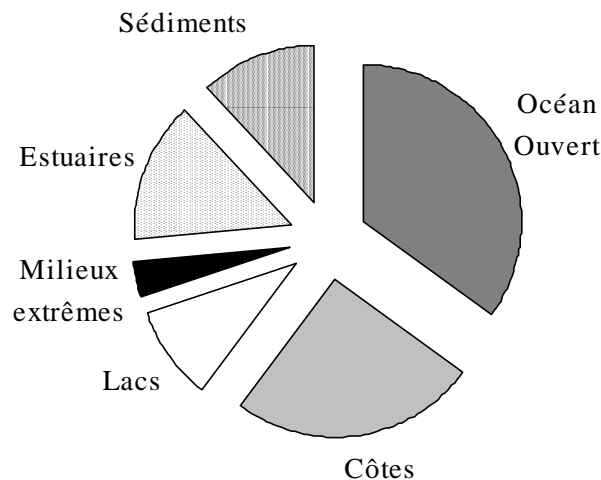
Ceci est une question qui sera débattue plus longuement dans le chapitre 2 (paragraphe 2-1), mais il est incontestable que le passage des méthodes spectroscopiques, puis fluorimétriques aux méthodes chromatographiques a permis d'aboutir à des conclusions scientifiques beaucoup plus performantes et ce dans tous les milieux aqueux.



PIGMENT	GROUPE ALGAL	REFERENCES
Alloxanthine **	cryptophytes	Pennington et al. (1985)
Carotènes *	Toutes algues	Stauber & Jeffrey (1988)
diadinoxanthine	<u>diatomées</u> , prymnesiophytes, chrysophytes, raphidophytes, dinoflagellés	Stauber & Jeffrey (1988)
Fucoxanthine	<u>diatomées</u> , prymnesiophytes, chrysophytes, raphidophytes, dinoflagellés	Stauber & Jeffrey (1988)
19'hexanoyloxyfucoxanthine	prymnesiophytes, certains dinoflagellés	Bjornland & Liaaen-Jensen (1989)
Luteine	<u>Algues vertes</u> : chlorophytes et prasinophytes	Stauber & Jeffrey (1988)
neoxanthine	<u>Algues vertes</u> : chlorophytes, prasinophytes, euglenophytes	Stauber & Jeffrey (1988)
Peridinine **	<u>dinoflagellés</u>	Johansen (1974); Jeffrey (1975)
Prasinoxanthine **	certains prasinophytes	Bjornland & Liaaen-Jensen (1989)
Violaxanthine	<u>Algues vertes</u> : chlorophytes et prasinophytes	Stauber & Jeffrey (1988)
Zeaxanthine	<u>cyanobacteries</u> , prochlorophytes, rhodophytes, chlorophytes	Grieskes (1988); Goericke (1992)
Chlorophylle-a *	Tous les végétaux (excepté les prochlorophytes)	Stauber & Jeffrey (1988)
Chlorophylle-b	<u>Algues vertes</u> : chlorophytes, prasinophytes, euglenophytes	Stauber & Jeffrey (1988)
Chlorophylle-c	<u>diatomées</u> , <u>dinoflagellés</u> , prymnesiophytes, chrysophytes, raphidophytes	Jeffrey (1989)

**Tableau 1-4.** Répartitions des pigments dans les groupes taxonomiques (\* pigment ubiquiste, \*\* pigment présent chez un seul groupe, le reste des pigments étant présent chez plusieurs groupes)

Afin de mieux situer le niveau d'étude des pigments en milieu estuarien, nous avons dressé un bilan sur les lieux d'études que nous avons trouvées des pigments en tant que biomarqueurs dans la littérature. Le résultat est donné dans la figure 1-8. Il montre qu'environ 10% des études seulement concernent les milieux estuariens. Ceci s'explique par le fait qu'il s'agit de milieux extrêmement variables induisant une diversité énorme des espèces phytoplanctoniques présentes (cf. chapitre 1-paragraphe 1-2). Les structures de population ne sont quasiment jamais stables dans le temps que cela concerne le nombre d'individus aussi bien que de la teneur en pigments des cellules soumises à des conditions d'éclairement très variables. La plupart des études effectuées en milieu estuarien ne considèrent que l'aspect qualitatif de l'information apportée par les teneurs en pigments. Les études plus poussées sur la distribution des populations introduisent d'autres techniques plus classiques comme le comptage direct par microscopie (Ansotegui *et al.*, 2001 ; Meyer-Harms & Von Bodungen, 1997, Roy *et al.*, 1996).



**Figure 1-8.** Répartition des études de pigments par rapport aux environnements étudiés (calculs effectués sur plus de 80 études recensées).

### 3- Objectifs et démarche de l'étude

Notre revue bibliographique souligne bien la complexité de l'étude de la matière organique d'origine phytoplanctonique en système estuarien. L'utilité de bio-indicateurs de la matière organique paraît évidente et nous avons vu que les pigments étaient, dans le cas de l'étude de la matière organique phytoplanctonique, des biomarqueurs potentiels intéressants : d'une part pour mieux cerner les origines du phytoplancton, mais aussi pour connaître son devenir si l'on arrive à mesurer des cinétiques de dégradation de certains pigments et si on peut repérer les voies par lesquelles ces pigments ont été dégradés.

Dans cette recherche, nous nous sommes donc fixés 2 objectifs majeurs :

- établir le bilan des **distributions *in situ* des teneurs en pigments** d'un large éventail d'environnements estuariens européens aux propriétés morphologiques, hydro-sédimentologiques et biogéochimiques très contrastées;
- préciser ***in vitro*** le devenir des pigments en mesurant leurs **cinétiques de minéralisation** dans des conditions similaires à celles rencontrées dans les estuaires en faisant varier les paramètres forçant tels que **la concentration en MES, la teneur en oxygène, la température et la présence de communautés bactérienne.**

La préoccupation première du travail, dont les résultats sont présentés dans le chapitre 3, est de suivre les teneurs en pigments dans 10 estuaires étudiés et de caractériser les assemblages phytoplanctoniques. Ce travail nous permet de décrire les variations des communautés phytoplanctoniques en fonction des données physico-chimiques propres à chaque estuaire. L'ensemble de ces derniers concerne un vaste champ géographique sur près de 20 degrés de latitude (38.5° à 54° de latitude nord) couvrant une grande partie de la zone tempérée européenne.

L'autre but de ce travail, présenté au chapitre 4, consiste à mesurer les cinétiques de dégradation des pigments caractéristiques des estuaires, lors d'incubations *in vitro* permettant de suivre leur dégradation en fonction de paramètres choisis, traduisant les conditions réelles des milieux estuariens. En sus, nous avons étudié les différentes voies de dégradation de ces pigments (effet de la sénescence, du broutage et de la dégradation bactérienne).



## *Chapitre 2* – Matériel et méthodes



## Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre seront décrites les principales caractéristiques des zones estuariennes étudiées et toutes les méthodes d'échantillonnage et d'analyse utilisées au cours cette thèse. La mise en œuvre et la description de la technique de Chromatographie Liquide Haute Pression sera plus longuement détaillée puisqu'elle a servi à fournir des résultats intéressant tous les chapitres de ce mémoire.

### **1-Aires d'étude et échantillonnage**

#### **1-1 Aires d'étude.**

Ce sont 10 estuaires de la façade ouest-européenne qui ont été étudiés (figure 2-1), dont les caractéristiques hydro-sédimentaires sont rassemblées dans le tableau 2-1.

Il ressort de ces caractéristiques, en tenant compte du débit fluvial, du volume oscillant de la marée et de la surface des estuaires, que ces derniers peuvent être regroupés en trois sous-ensembles :

- un type d'estuaire à forts temps de résidence des eaux, qui se chiffrent en unités « mois » ; ceci a pour conséquence un temps de résidence très élevé des particules et la formation d'une ZMT marquée où les concentrations en MES sont fortes ; **la Gironde** est un parfait exemple de ce genre d'estuaire, où les temps de résidence des particules varient de 12 à 18 mois et **l'Ems** est, dans notre liste, celui qui se rapproche le plus de ce modèle ;

- un type d'estuaire à temps de résidence des eaux moyens, qui se chiffrent en unités « semaines » ; les particules séjournent moins longtemps dans l'estuaire que précédemment ; le BV est alors moins turbide avec des échelles de teneurs en MES variables en liaison directe avec la morphologie de l'estuaire et des débits fluviaux des fleuves ; ainsi, du plus turbide au moins turbide, peut-on classer : **la Loire, puis la Tamise et le Sado enfin l'Escaut, la Seine et l'Elbe ;**

- un troisième groupe d'estuaires rassemble **le Rhin et le Sado**, à faible temps de résidence des eaux, où la ZMT n'est qu'épisodiquement et faiblement marquée.

Estuaire	Surface (km <sup>2</sup> )	Bassin versant (km <sup>2</sup> )	Débit (m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup> )	Marnage (m)	Temps de résidence (j)	MES (mg.l <sup>-1</sup> )
Douro	2	115 320	1700	3	2	5
Elbe	327	145 800	715	3	15-30	50
Ems	162	9 000	160	4	30-70	250
Escaut	268	21 600	120	4	30-70	50
Gironde	442	71 000	1 000	4	60-90	350
Loire	102	115 000	830	4	15-30	150
Rhin	71	224 000	1100	2.5	5	7
Sado	102	7 600	100	3	30	100
Seine	50	79 000	410	5	30	30
Tamise	215	14 000	350	4	30	100

**Tableau 2-1.** Caractéristiques hydrosédimentaires des estuaires étudiés (Abril, 1999, modifié)



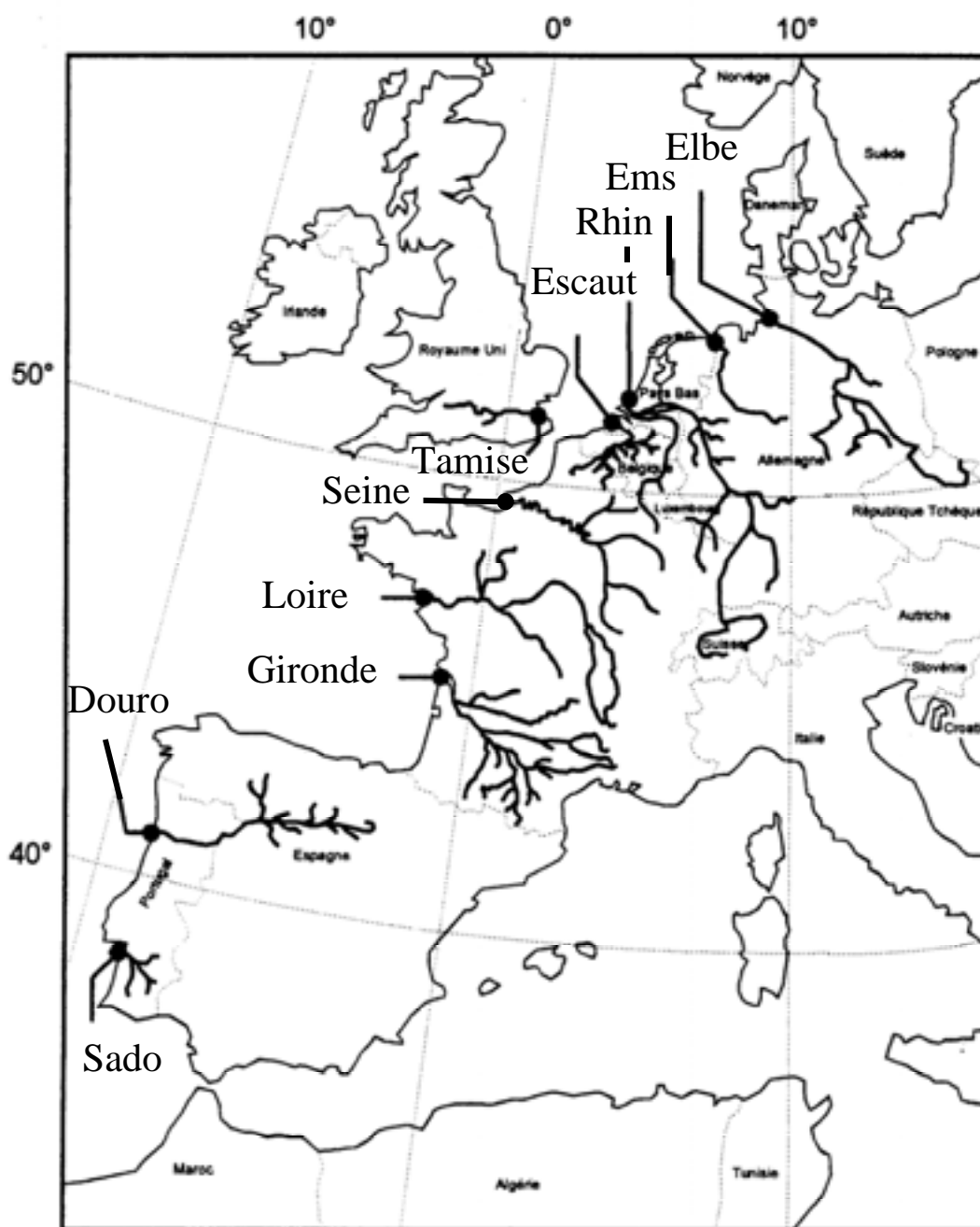
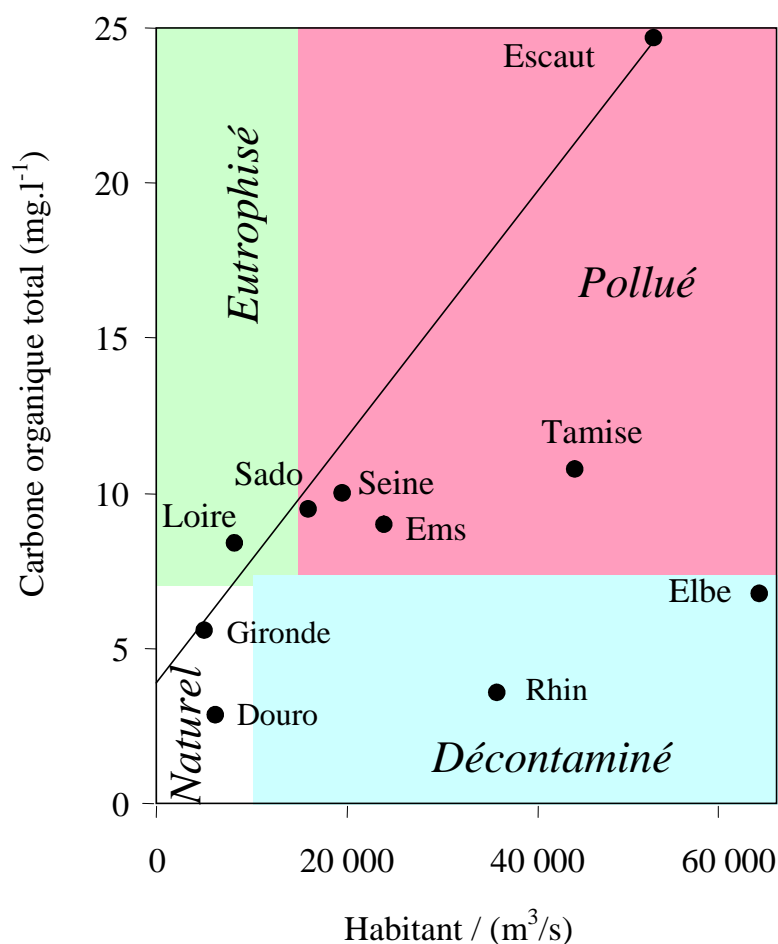


Figure 2-1. Domaine géographique des estuaires étudiés

Au-delà de ces considérations hydro-sédimentologiques, nous avons cherché à classer ces estuaires en fonction de l'impact anthropique probablement perçu. Pour cela, nous avons évalué la charge organique entrante dans l'estuaire exprimée en mg/l de Carbone Organique Total (TOC=POC+DOC) en fonction de la densité d'habitants ramenée au débit (correction de l'effet de dilution) (Abril *et al.*, 2002).



**Figure 2-2.** Classification des estuaires étudiés dans un diagramme TOC par rapport au nombre d'habitant normalisé (Abril *et al.*, 2002, modifié).

Nous avons individualisé dans la figure 2-2 :

- la Gironde et le Douro, classés comme des estuaires « naturels », faiblement anthropisés ;
- la Loire et le Sado, estuaires où les développements algaux importants sont reconnus, « estuaires eutrophisés » ;
- le Rhin et l'Elbe, fortement anthropisés, mais où des efforts considérables de dépollution ont été récemment faits ce qui les classes dans un ensemble d'estuaires « décontaminés » ;

- enfin, la Seine, l'Ems, la Tamise et l'Escaut, assimilés à des milieux fortement anthropisés identifiés comme des estuaires « pollués ».

### **1-2. Echantillonnage *in situ*.**

Les campagnes de terrain ont été réalisées lors de plusieurs programmes axés sur l'étude des estuaires. Le projet européen BIOGEST (1996-1999) nous a permis d'acquérir la majeure partie de nos données *in situ*. Ces principaux objectifs étaient de déterminer la distribution des gaz biogéniques dans les estuaires, d'en mesurer les émissions afin de développer un modèle prédictif d'émission de biogaz en fonction des apports en MO et sels nutritifs. Notre rôle au sein de ce programme a été le suivi du compartiment phytoplanctonique en relation avec les flux de biogaz. Ces prélèvements ont été complétés par : un échantillonnage de l'estuaire de la Seine lors des campagnes du programme national SEINE-AVAL<sub>2</sub> (2000-2001) et un échantillonnage complémentaire lors de campagnes faites durant les programmes LITEAU et ECOBAG menés en Gironde. Le programme SEINE-AVAL<sub>2</sub> est un programme d'étude de l'estuaire de la Seine et de ces zones de vasières, dans lequel nous avons effectué un suivi du fonctionnement biogéochimique du bouchon vaseux concernant la MO. Les programmes LITEAU et GIS-ECOBAG visent à mieux comprendre le fonctionnement global de l'estuaire de la Gironde en cherchant à connaître le rôle de la dynamique des masses d'eau et des sédiments dans les transferts chimiques et biologiques.

Les prélèvements dans les eaux de surface ont été effectués à l'aide d'une bouteille Niskin. Tout un ensemble de paramètres physico-chimiques de la masse d'eau ont été également mesurés à l'aide de sondes classiques : Salinité, Température, Oxygène, de même que les teneurs en MES (filtrations, paragraphe 3-1 de ce chapitre).

Les pêches à copépodes ont été réalisées, aux points considérés, sur des traits horizontaux de 2 minutes, à l'aide d'un filet de type WP<sub>2</sub> avec un vide maille de 200µm.

Les dates et situation des campagnes effectuées sont résumées dans le tableau suivant:

<b>Estuaire</b>	<b>dates</b>	<b>Type d'échantillonnage</b>	<b>Etude réalisée</b>
Escaut (B/NL)	Juillet 1996 Décembre 1996 Mars 1998 Octobre 1998	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Rhin (NL)	Octobre 1996 Juillet 1997 Décembre 1997 Avril 1998	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Gironde (F)	Novembre 1996 Juin 1997 Septembre 1997 Février 1998 Mars 2000/Mars 2001	Eaux de surface / Gradient de salinité  3 points fixes dans le gradient de salinité	Contenu pigmentaire  Contenu pigmentaire et pêche à plancton
Elbe (D)	Avril 1997	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Ems (NL)	Juillet 1997	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Sado (P)	Septembre 1997	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Douro (P)	Septembre 1997	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Loire (F)	Septembre 1998	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Tamise (GB)	Février 1999	Eaux de surface / Gradient de salinité	Contenu pigmentaire
Seine (F)	Janvier /Juillet 2001 Août 2001	Eaux de surface / Gradient de salinité Eaux de surface et fond/ Gradient de salinité	Contenu pigmentaire Contenu pigmentaire

**Tableau 2-2.** Planning des campagnes de prélèvement.

### 1-3. Echantillonnage *in vitro* : Mise en place des microcosmes d'incubation au laboratoire.

Nous allons simplement décrire ici le schéma général des manipulations dont le déroulement spécifique de chaque expérience sera donné au chapitre 4, avec leurs résultats détaillés.

Dans ces expérimentations, l'effet de paramètres biogéochimiques tels que les teneurs en MES, en oxygène, la température et l'action des organismes hétérotrophes est testé sur de la MO végétale (phytoplancton ou végétaux supérieurs). Pour ce faire, nous avons monté au laboratoire des incubateurs dans lesquels nous avons appliqué des conditions d'entrée variables à des échantillons d'eau provenant du bouchon vaseux de l'estuaire de la Gironde, choisi ici comme site atelier.

Les réacteurs utilisés sont des bouteilles autoclavables de 5 litres dont certaines sont munies d'un système d'aération stérile.



**Photo 2-1.** Réacteurs d'incubation utilisés dans les expérimentations *in vitro*.

Le matériel végétal utilisé provient soit d'une souche algale préalablement cultivée au laboratoire jusqu'à sa phase exponentielle de croissance, soit de végétaux supérieurs récoltés sur les berges.

Les souches utilisées pour ces expériences sont:

\* Diatomées (photo 2-2):

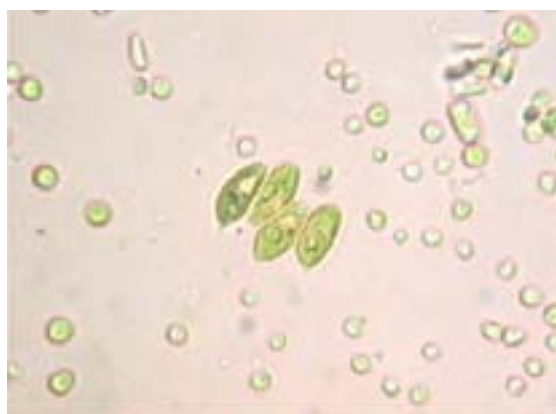
- *Asterionella formosa* (collection du LEESA, Arcachon), une Diatomée d'eau douce bien représentée dans la Garonne (Etcheber, 1983), cultivées sur milieu Dauta (Inza, 1996), enrichi en silice jusqu'à leurs phases exponentielles de croissance.



**Photo 2-2.** *Asterionella formosa* : cellules formant des colonies en forme d'étoile, de taille individuelle allant de 50 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre.

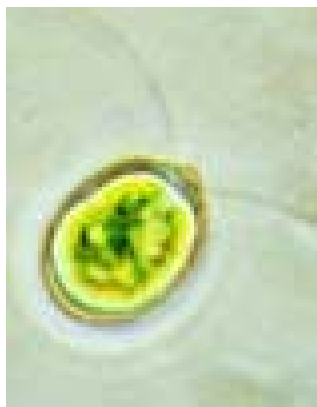
\* Chlorophycées (photos 2-3 et -4):

- *Scenedesmus suspicatus*, Chaudat (collection du LEESA, Arcachon), une Chlorophyte d'eau douce bien représentée dans la Garonne (Etcheber, 1983). Elle a été cultivée pendant 8 jours sur milieu Dauta (Inza, 1996) jusqu'à sa phase exponentielle de croissance.



**Photo 2-3.** *Scenedesmus suspicatus* : cellule formant fréquemment des colonies de 4 à 8 individus, sa taille individuelle allant de 10 à 15  $\mu\text{m}$ .

- Une souche de *Chlamydomonas sp.*, axénique (fournisseur : Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), UK), une Chlorophycée d'eau douce bien représentée dans la Garonne, et cultivée sur un milieu de Jaworsky (manuel CCAP).



**Photo 2-4.** *Chlamydomonas sp.* (axénique) : Cellule solitaire, libre, de forme régulière de taille allant de 10 à 20  $\mu\text{m}$  et portant 2 fouets égaux.

Etant donné que la pénétration lumineuse est faible dans le bouchon vaseux de la Gironde (coefficient d'atténuation  $K_d = 0.05 \text{ MES en mg.l}^{-1}$ ) (Irigoyen & Castel, 1997), et de manière à éviter tout processus photochimique, les trois réacteurs de 5 litres ont été incubés à l'obscurité.

Enfin, la température a été contrôlée par des thermostats au degré près, les réacteurs étant plongés dans des bac d'eau thermostatée.

Une agitation en continue a été maintenue grâce à des agitateurs permettant le maintien d'une vitesse d'agitation modérée 24h sur 24h.

## 2- Technique de Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP)

### 2-1. Apports de la technique de CLHP à l'analyse des pigments.

L'étude de la concentration en chlorophylle *a* du phytoplancton, prise en tant que marqueur de biomasse, n'a pu être possible qu'à partir des années 50, lorsque les premières équations de la détermination spectroscopique ont été publiées par Richards et Thompson. Cette méthode était alors relativement peu sensible et ne permettait pas la discrimination entre la chlorophylle, ses isomères et ses produits de dégradation.

Avec l'utilisation de la méthode fluorimétrique par Holm-Handsen et al. (1965) puis Lorenzen (1966), la sensibilité a été considérablement accrue ainsi que le pouvoir de discrimination entre chlorophylle et phéopigments grâce à l'acidification des extraits. Cette technique reste encore aujourd'hui la méthode de référence du dosage de la chlorophylle en océanographie.

Cependant la séparation des chlorophylles ainsi que des caroténoïdes n'a pu être achevée que grâce aux méthodes chromatographiques. En commençant par la chromatographie sur papier (Jeffrey, 1961), avec laquelle on obtenait une bonne séparation des composés mais une très faible sensibilité. Puis l'utilisation de la chromatographie sur couche minces (Thin Layer Chromatography) par Jeffrey (1968) a permis un accroissement de la sensibilité jusqu'au micro gramme. Cependant, principalement à cause de la lourdeur des manipulations, cette méthode a progressivement été remplacée par la Chromatographie Liquide Haute Pression. Actuellement, la CLHP est donc aujourd'hui la méthode la plus utilisée car elle permet une plus grande résolution sur un grand nombre de composés et sa sensibilité est extrême puisque de l'ordre du nano-gramme : cela permet donc de repérer les pigments existants à l'état de trace, avec une gamme très étendue, même au niveau des formes très polaires ; on peut de plus différencier les pigments sains de ceux qui sont dégradés.

Il n'en reste pas moins que toutes les techniques sont encore utilisées, des comptages aux méthodes fluorimétriques et chromatographiques et que l'on cherche encore à préciser les avantages et inconvénients des unes et des autres. L'utilisation d'une méthode classique de comptage cellulaire en microscopie ou bien de fluorimétrie ou de chromatographie correspond évidemment au degré de précision requis dans l'analyse taxonomique. Une étude comparative effectuée par Roy et al. (1996) a montré que les données apportées par la microscopie permettent d'aller plus loin dans la détermination spécifique mais qu'il reste des problèmes au niveau de l'identification des petites cellules. De plus, les méthodes de microscopie (électronique ou épifluorescence) sont souvent des méthodes lourdes et nécessitent une



parfaite connaissance des organismes phytoplanctoniques. D'autre part, les méthodes de comptage cellulaire, par exemple la méthode classique d'Utermöhl (Lund *et al.*, 1958), sont particulièrement délicates lorsqu'on travaille en milieu très turbide comme les estuaires, car les particules de même taille que le phytoplancton (ex. pelotes fécales, débris,...) influencent la précision du comptage (Meyer-Harms *et al.*, 1997). Wiltshire *et al.* (1998) trouvent de bonnes corrélations entre les méthodes chromatographiques et les méthodes fluorimétriques (prompt or delayed fluorimetry).

L'intérêt de la CLHP réside donc dans sa capacité à traiter tout type d'échantillon dans la mesure où l'extrait est convenablement fait. Sa résolution et sa grande sensibilité permettent également une analyse fine de quasiment tous les pigments présents. On a donc rapidement une réponse taxonomique claire, même si celle-ci s'arrête au niveau de la **détermination des groupes et non des espèces**.

## **2-2. Aperçu bibliographique des appareillages et techniques utilisées.**

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux moyens techniques mis en place dans les études faites sur les pigments. Les tableaux suivants (2-1 et 2-2) décrivent les protocoles majeurs relevés dans la littérature, avec une attention particulière portée aux types d'appareils utilisés.

L'extraction des de la phase organique pigmentaire dans des échantillons à matrice minérale très importante reste la principale difficulté rencontrée dans notre étude. Aussi, avons-nous, dans un second temps, fait le bilan des principales méthodes d'extraction s'appliquant à différents types d'échantillons.

Sous l'impulsion de l'UNESCO (Scor-Workshop), les chercheurs ont essayé de standardiser la méthodologie et ont débouché sur un protocole référence (Jeffrey *et al.*, 1997). Néanmoins, en pratique, on a pu constater que les auteurs préfèrent optimiser les méthodes en tenant compte des particularités de leurs échantillons. En conséquence, une grande variété de méthodes est actuellement employée, au détriment d'une standardisation très rigoureuse des protocoles opératoires. Nous avons donc, dans cette étude, cherché à appliquer la méthode convenant à des échantillons de milieu estuarien macrotidal, et ce sont les étapes permettant d'aboutir à cette méthodologie qui sont décrites dans le paragraphe suivant.

gradient	eluants	colonne	détecteur	temps de séparation	références-auteurs
système binaire et linéaire de 100% de A à 100% de B	A:ion-pairing/eau/méthanol (1/1/8) B:acétone/méthanol (2/8)	25cm x 0,5cm en silice greffée (5µm)	fluorimètre associé à un spectrophotomètre multilongueur d'onde	15 à 20 min	MANTOURA et al. (1983)
système ternaire et linéaire par portions	A:méthanol/acétate d'ammonium (8/2) B:acétonitrile/eau (9/1) C:éthyl acétate	25cm x 0,46cm en silice greffée C18 (5µm)	spectrophotomètre à barrette de diodes	20 à 25 min	WRIGHT et al. (1991)
système binaire et linéaire	A:méthanol/acétate d'ammonium (8/2) B:méthanol/acétone (8/2)	25cm x 0,46cm en silice greffée C18 (5µm)	spectrophotomètre à barrette de diodes	20 min à 60°C 25 min à 30°C	VAN HEUKELEM et al. (1994)
système binaire et linéaire	A:ion-pairing/eau/méthanol (1/1/8) B:méthanol	10cm x 0,8cm en silice greffée C18 (10µm)	spectrofluorimètre	15 min	BIDIGARE et al. (1985)
système binaire et curviligne	A:méthanol/acétate d'ammonium/acétonitrile (8/1/1) B:éthyl acétate	25cm x 0,5cm en silice greffée RP-18 (5µm)	spectrophotomètre multilongueur d'onde	40 min	BUFFAN-DUBAU et al. (1996)

**Tableau 2-3.** Aspects techniques classiques utilisés dans le littérature.

type d'échantillon	solvant	mode d'extraction	temps d'extraction	remarques	références-auteurs
sédiments fluviaux (Hudson)	100% acétone	sonication pendant 5 min	toute une nuit à 4°C et à l'obscurité	résolution suffisante sauf pour: zéaxanthine, lutéine, carotène et phaeophytine	BIANCHI et al. (1993)
colonne d'eau estuarienne (Newport)	100% acétone	sonication	toute la nuit à 4°C et à l'obscurité		TESTER et al. (1995)
culture pure et colonne d'eau océanique	eau/acétone (1/9)	sonication sous azote et faible lumière	temps de repos réduit au temps de manipulations	ajout d'un agent "ion-pairing"	MANTOURA et al. (1983)
colonne d'eau océanique	100% acétone	sonication à 0°C et à l'obscurité	24 heures à -20°C et à l'obscurité		ANDERSEN et al. (1996)
culture pure et colonne d'eau océanique	acétone ou méthanol	sonication 30 secondes		dilution avant injection avec eau distillée pour obtenir 80% MeOH et 66% Ac	WRIGHT et al. (1991)
culture pure	100% acétone	broyage	20 minutes à 4°C		VAN HEUKELEM et al. (1994)
cultures pures	acétone/méthanol (7/3)	sonication		lyophilisation ( il est conseillé parfois de faire une extraction à chaud)	YOUNG et al. (1993)

**Tableau 2-4.** Protocoles d'extraction couramment utilisés.

### **2-3. Mise au point méthodologique du protocole choisi.**

L'intérêt de la mise au point d'une méthode bien adaptée au milieu étudié est d'obtenir une image la plus complète possible du contenu pigmentaire de nos échantillons, ceci afin de caractériser le plus précisément possible la matière organique (source, état de maturation...) dans les échantillons récoltés.

Le problème majeur tient à la nature même des échantillons. Dans notre cas il s'agit principalement d'échantillons estuariens, particulièrement complexes à étudier pour au moins trois raisons : d'une part, la présence quasi permanente de MO d'origines et d'âges divers (voir chapitre 1) ; d'autre part, les teneurs en MES souvent très élevées qui peuvent induire un artefact dans les mesures ; enfin, du fait que l'on a affaire à des masses d'eau différentes, sous l'influence des débits fluviaux et des marées.

#### 2-3-1. Introduction

Comme nous l'avons montré dans les tableaux du paragraphe précédent, il existe bon nombre de méthodes HPLC de détermination des pigments du phytoplancton, lesquelles ont des degrés variables de précision de la mesure elle-même et de l'éventail des pigments identifiés. En fait, aucune méthode n'est idéale pour tous les pigments. Certaines sont performantes dans la séparation des chlorophylles et de leurs produits de dégradation (Mantoura et Llewellyn, 1983; Bidigare et al., 1985) alors que d'autres ont une meilleure résolution dans l'analyse des caroténoïdes (Wright et Shearer, 1984). Pour nos études de suivi en milieu naturel, nous avons recherché une méthode unique permettant d'identifier au mieux l'ensemble des chlorophylles, leurs produits de dégradation et les caroténoïdes indispensables à la détermination taxonomique du phytoplancton. Le bilan établi par le SCOR (Scientific Committee on Oceanic Research) en 1997 donne une idée des méthodes adaptées aux différentes problématiques posées par l'analyse des pigments en océanographie. Les différentes étapes qui nous ont amené au choix final de la méthode vont être développées ici.

Nous avons procédé à des mises au point sur trois phases essentielles de l'analyse des pigments:

- l'extraction des échantillons ;
- le prétraitement et le stockage des échantillons ;
- l'analyse des échantillons.

Pour cette mise au point technologique, nous avons utilisé le matériel photographié et décrit ci-dessous:



**Photo 2-2.** (1)-dégazeur (TSP); (2)-pompe (TSP); (3)-passeur automatique (TSP-AS100) et colonne (Lichrospher 100RP18-5 $\mu$ -250x4mm); (4) -détecteur (TSP-UV6000LP); (5)-intégrateur (logiciel TSP-PC1000).

### 2-3-2. Extraction

Le choix du type d'extraction est délicat puisque de lui vont dépendre les représentativités de l'extrait et du chromatogramme. L'extraction consiste à mettre en solution dans un solvant servant à l'analyse les pigments contenus dans l'échantillon, d'où l'importance du choix du solvant, du temps et du mode d'extraction nécessaires pour un résultat optimal dans nos conditions d'analyse.

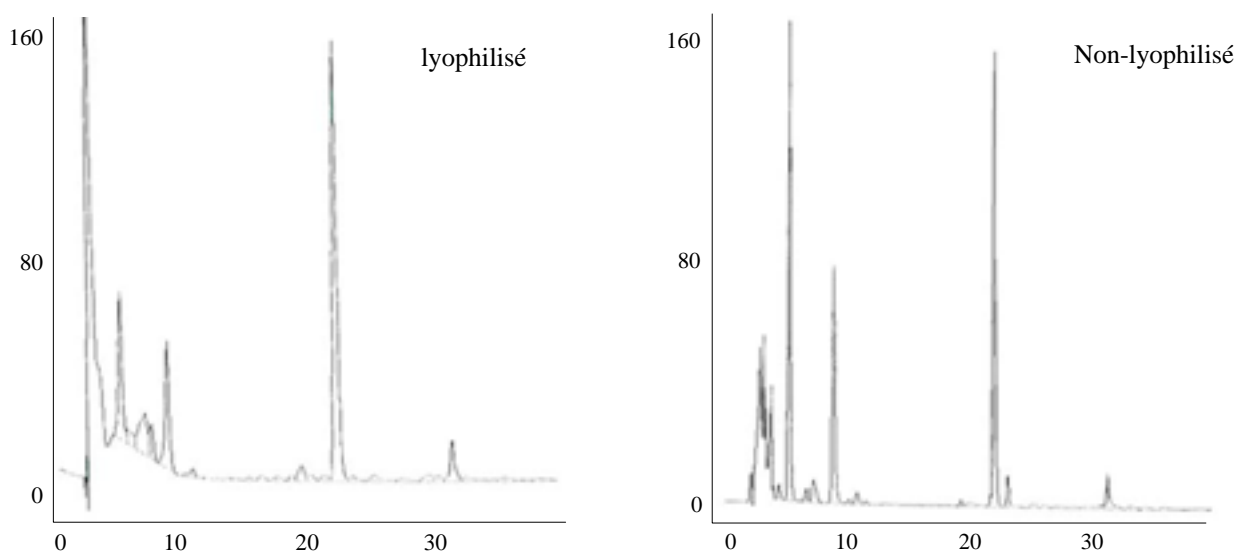
#### *a/ choix de la méthode de concentration des échantillons*

L'idée poursuivie ici est d'avoir un extrait le plus concentré possible tout en conservant un volume de solvant suffisant pendant l'extraction afin d'éviter la saturation : le procédé consiste à assécher complètement l'extrait et à le reprendre dans un faible volume au moment de l'injection dans l'analyseur.

Pour ce faire, nous avons utilisé deux techniques dont l'impact sur les échantillons n'a pas les mêmes conséquences. La première est la lyophilisation des échantillons avant leur extraction suivi d'une extraction anhydre et d'une concentration sous azote. Nous avons pu constater que

les effets néfastes de la lyophilisation visent essentiellement les caroténoïdes : ceux-ci sont mal extraits ou détruits. Cet effet peut être dû au fait que l'extraction se passe en absence d'eau ; or nos échantillons sont souvent argileux et les pigments s'adsorbent sur les particules. Le fait d'humidifier les particules faciliterait l'extraction des pigments de celles-ci. De plus, la concentration des échantillons sous vide est une opération longue, de l'ordre de plusieurs heures.

La seconde méthode testée consiste à concentrer l'extrait contenant de l'eau sous vide à l'aide d'un speedvac (concentrateur sous vide).



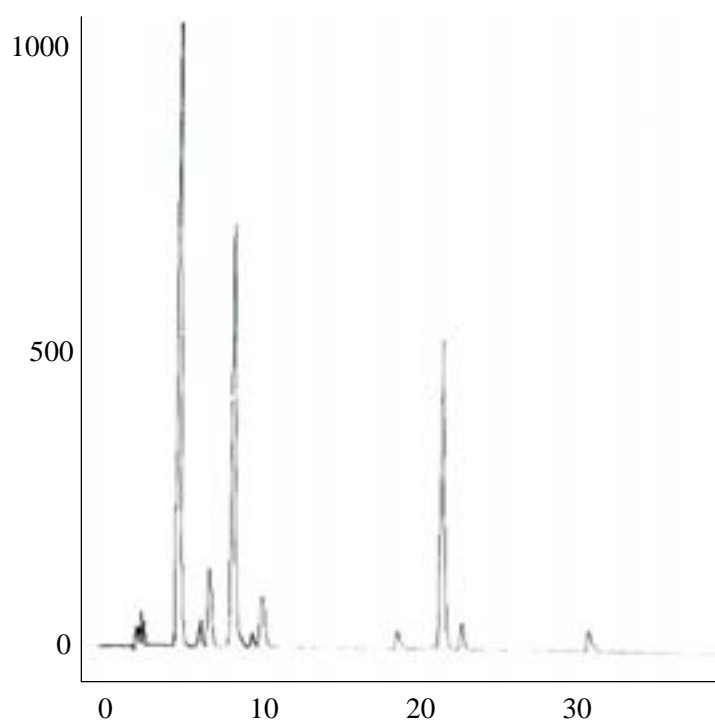
**Figure 2-1.** Comparaison des chromatogrammes d'échantillons lyophilisé et non-lyophilisé (en abscisse est noté le temps d'éluion en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)

Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode de concentration sous vide puisque l'échantillon est extrait avec un certain pourcentage d'eau favorisant ainsi l'extraction des pigments contenus dans des échantillons naturels argileux.

#### *b/ choix du solvant d'extraction*

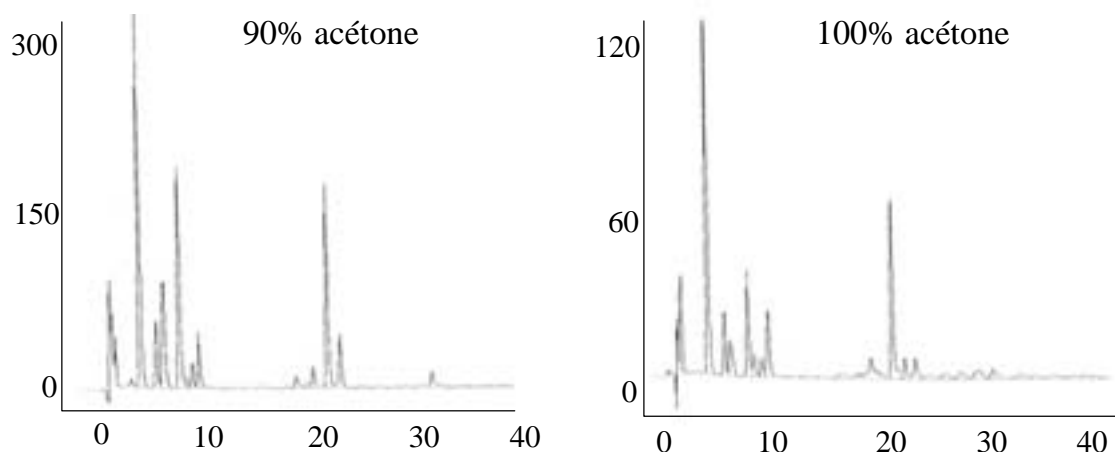
De nombreux solvants ont été utilisés pour l'extraction des pigments des plantes mais l'acétone et le méthanol semblent être les plus favorables pour les algues (Mantoura et Llewelyn, 1983). Par ailleurs, nous savons que l'acétone est un agent déshydratant des tissus vivants. Pour des échantillons lyophilisés, un solvant comme le diéthyl-ether semble suffisant. Nous avons donc fait l'essai sur un échantillon de culture pure (dont le contenu pigmentaire est bien connu) en suivant le même protocole d'extraction que lorsqu'on utilise de l'acétone.

Le chromatogramme montre qu'il y a eu effectivement une bonne extraction des pigments, mais l'éther n'est pas miscible avec l'acétone et les solvants de la phase mobile ; l'extrait est resté trouble et risque à terme de boucher la colonne.



**Figure 2-2.** chromatogramme d'un échantillon de culture de *Pheodactylum tricornerutum* extrait au diéthyl éther (en abscisse est noté le temps d'éluion en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)

Le méthanol, quoique bon extractant (Jeffrey *et al.*, 1997), semble avoir une action de méthylation sur les pigments mis trop longtemps en contact avec celui-ci (Keely *et al.*, ). L'acétone reste donc le solvant le plus adéquat dans notre système d'analyse. Il a fallu également tester le mélange acétone-eau idéal pour nos échantillons. Le premier essai a été fait avec le mélange 90:10 conseillé par Mantoura et Llewellyn (1983) et le second avec 100% d'acétone. Les chromatogrammes montrent que lorsqu'on ajoute de l'eau les pigments sont mieux séparés et la ligne de base est plus nette. Pour les échantillons non lyophilisés, l'extraction se fait également avec 100% d'acétone sachant qu'un filtre type GF/F contient en moyenne  $0.78 (\pm 0.02)$  ml d'eau, ce qui pour un ajout de 10ml d'acétone pure revient à un pourcentage final de 92.7% en solvant.



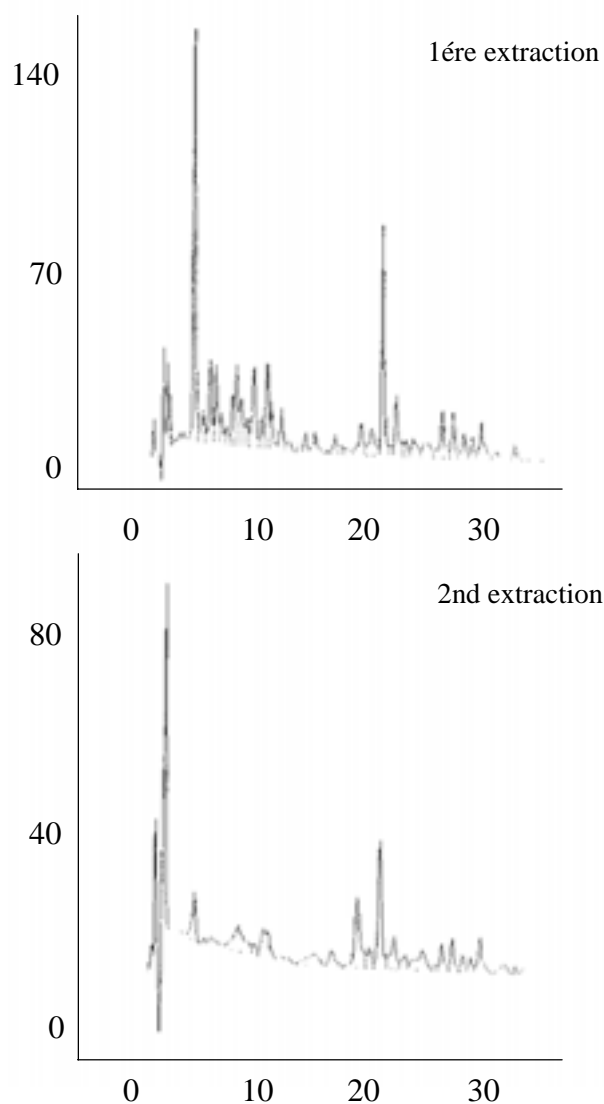
**Figure 2-3.** chromatogrammes de test du solvant d'extraction (en abscisse est noté le temps d'élution en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)

La meilleure résolution observée pour l'extraction est celle effectuée avec un mélange acétone-eau. Lorsque les échantillons ne sont pas lyophilisés, du fait de l'eau contenu dans les filtres, ce pourcentage est naturellement obtenu et il facilite l'extraction.

*c/ choix du temps et du nombre d'extractions.*

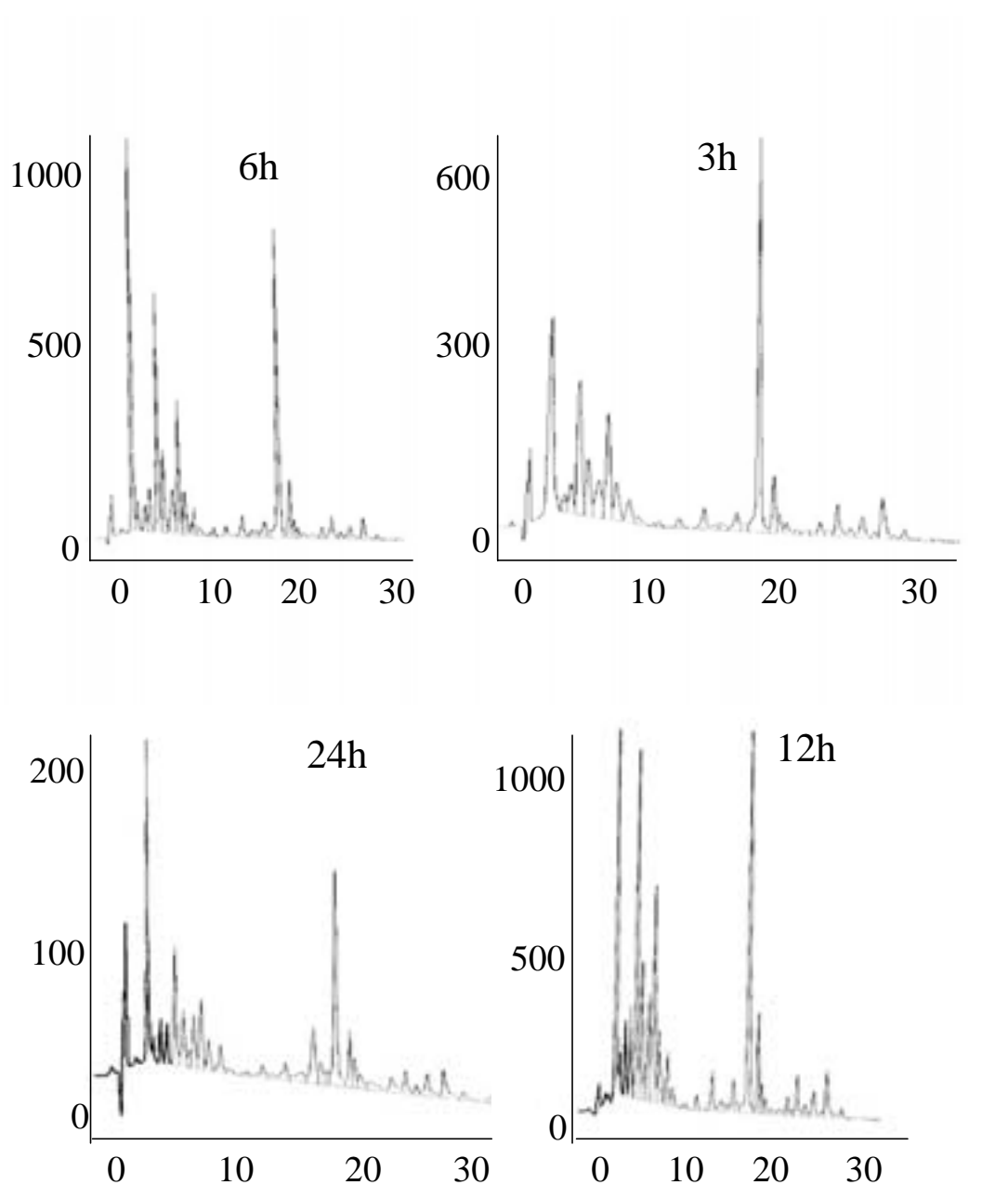
Le problème du temps d'extraction est double puisqu'il faut trouver la durée optimale de l'extraction mais également le nombre d'extractions successives nécessaires pour obtenir le meilleur rendement d'extraction possible. Nous avons donc effectué deux tests, cette fois-ci sur des échantillons naturels provenant de l'estuaire de la Gironde, le but étant ici d'obtenir une réponse optimale sur des échantillons complexes, puisque à matrice minérale argileuse prépondérante. Certains auteurs procèdent à des extractions de quelques minutes jusqu'à 24 heures (cf. tableau 2-2). Cariou-Le Gall et Blanchard (1995) proposent un cycle de 24 heures pendant lesquelles les échantillons sont agités tout en étant protégés de la chaleur et de la lumière. Nous avons procédé à la même manipulation en mettant, en plus, les échantillons sous atmosphère inerte ( $N_2$ ). Après 24 heures, les échantillons ont été centrifugés, l'extrait récupéré et le culot repris une seconde fois dans l'acétone pour être ré-extrait. Les analyses de ces extraits ont montré que dans le cas d'échantillons naturels au moins deux extractions étaient nécessaires pour obtenir plus de 85% des pigments contenus dans l'échantillon.





**Figure 2-3.** chromatogrammes de deux extraits successifs d'un même échantillon (en abscisse est noté le temps d'éluion en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)

Dans un second temps, nous avons mis au point une série de tests sur la cinétique d'extraction, dans le but de connaître la durée optimale nécessaire dans le cas d'extractions multiples. Nous avons testé des durées de 1, 3, 6, 12, 24 heures. On remarque que les chromatogrammes après 6 et 12 heures sont à peu près équivalents. Avant 6 heures certains pigments, en particulier les caroténoïdes, ne sont pas extraits. Après 12 heures, la chlorophylle et certains caroténoïdes sont en partie détruits.

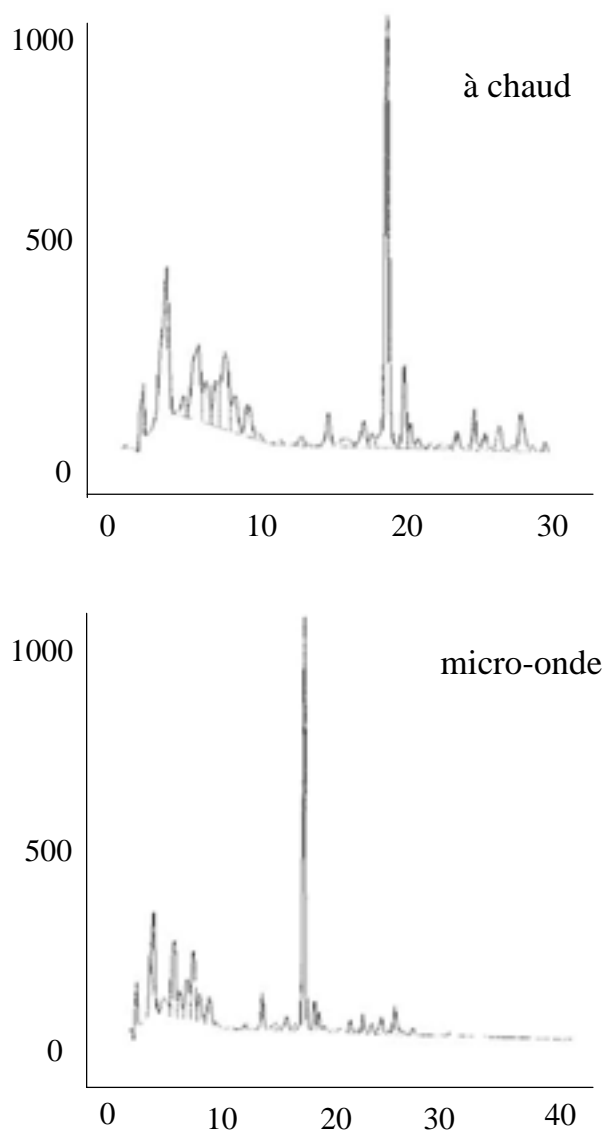


**Figure 2-4.** chromatogrammes tests de la durée d'extraction des pigments (en abscisse est noté le temps d'élution en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU).

On en conclut qu'en règle générale, les extractions multiples par cycle de 6 heures sont les plus efficaces et les moins destructives pour le genre d'échantillons estuariens étudiés .

*d/ choix du type d'extraction**extraction à chaud:*

Chez beaucoup d'algues unicellulaires, l'extraction complète des pigments peut être difficile à obtenir en utilisant des solvants froids. Dans ce cas, une extraction rapide avec des solvants à ébullition présente une meilleure efficacité qu'une extraction longue à froid (Young et Britton, 1993). Nous avons réalisé l'expérience sur un échantillon de l'estuaire de la Gironde extrait au bain-marie à 56.2°C (température d'ébullition de l'acétone) pendant 10 minutes. L'analyse montre une destruction des caroténoïdes alors que les chlorophylles ne semblent pas souffrir du traitement. Cette technique ne convient donc pas à nos échantillons.



**Figure 2-5.** chromatogrammes tests des extractions dans du solvant à ébullition et au micro-ondes (en abscisse est noté le temps d'élution en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)

*extraction par micro-ondes:*

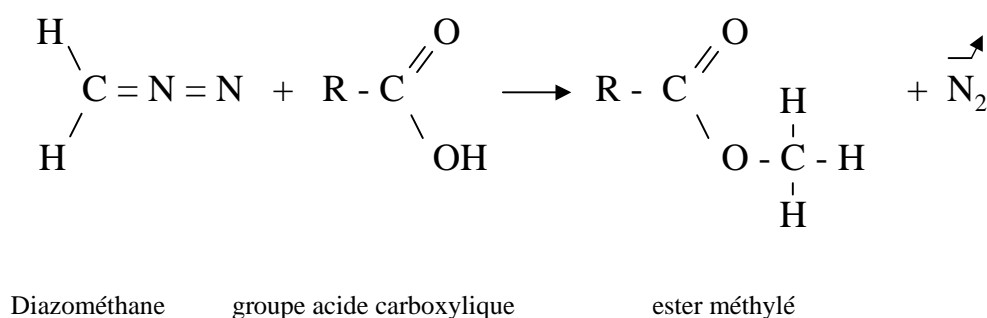
L'extraction des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) des sédiments par micro-ondes est une méthode très employée qui fait apparaître à certains stades la présence de pigments (H. Budzinsky, communication personnelle). Il nous a donc paru intéressant de tester ces techniques sur nos échantillons d'autant plus que cette méthode est très rapide (de l'ordre de 2 minutes par échantillons). L'expérience a été réalisée sur les mêmes échantillons que pour l'extraction à chaud. La puissance utilisée est de 30 Watts (10% de la puissance maximale) sur des périodes de 2 minutes. Le problème majeur est que le point d'ébullition de l'acétone est atteint au bout de 2 minutes environ. Cette méthode s'est révélée, comme la précédente, trop énergique pour nos échantillons et destructive pour une partie de nos pigments.

Nous avons écarté également des extractions mécaniques (broyage au mortier,...) utilisées, dans certains cas, qui ne semblaient pas être assez énergiques pour nos échantillons (Van Heukelem *et al.*, 1994 ; Wright *et al.*, 1991). En conclusion, notre choix s'est porté sur une extraction par ultrason qui avait déjà fait ces preuves lors de l'analyse des pigments chlorophylliens par fluorimétrie (Irigoyen *et al.*, 97).

### 2-3-3. Pré-traitement et stockage des échantillons

#### *a/ choix d'une phase de méthylation*

L'intérêt de cette méthylation est équivalent à celui de la solution P, mélange d'acétate d'ammonium et de tetrabutyl-ammonium (Mantoura et Llewelyn, 1983), utilisée dans certains systèmes d'éluants, toutefois elle se révèle beaucoup plus efficace. Il s'agit, en fait, d'isoler les groupements acides présents chez certains pigments comme la phaeophorbide ou la phaeophytine. Ce système oblige les pigments à groupe acide à s'arrêter dans la colonne, notamment lorsque les solvants sont organiques comme ici (méthanol, acétate d'éthyle et acétonitrile). Pour effectuer cette méthylation, on utilise le diazométhane ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) qui, à température ambiante, se trouve à l'état gazeux et ne se liquéfie qu'à  $-23^\circ\text{C}$ . Après sa fabrication, il ne se conserve qu'une quinzaine de jours au congélateur. Quelques gouttes de ce réactif sont introduites dans l'extrait avant que celui-ci ne soit filtré et concentré.



**Figure 2-7.** processus de méthylation

#### *b/ choix du mode de conservation*

Pour que, lors du stockage, les pigments ne soient pas détruits, il est nécessaire de les protéger contre l'oxygène, la lumière et la chaleur. L'idée est donc d'assécher complètement l'extrait afin de limiter les réactions avec les radicaux de l'oxygène en solution. Les extraits sont conservés à sec, sous une atmosphère inerte (azote) et au congélateur (-23°C). Ce mode de conservation a, en outre, été testé et les résultats sont décrits dans le rapport du SCOR (Jeffrey *et al.*, 1997), confirme l'efficacité de ce protocole.

#### 2-3-4 Chromatographie en phase liquide

##### *a/ choix de la phase mobile et du gradient d'élution*

Le système utilisé ici est binaire (la pompe utilisée ne permettant le mélange que de deux solvants simultanément) et le gradient de solvants est linéaire du plus polaire A au moins polaire B. Les tests de gradient des solvants ont pour but d'améliorer la séparation des pigments très polaires en début d'analyse.

Nous avons, dans un premier temps, diminué la polarité du solvant le plus polaire A en augmentant la proportion d'acétonitrile (MeCN, moins polaire) par rapport au méthanol (MeOH, plus polaire), la quantité d'eau restant égale à 5% (déjà testée).

Quatre mélanges de solvants ont été comparés:

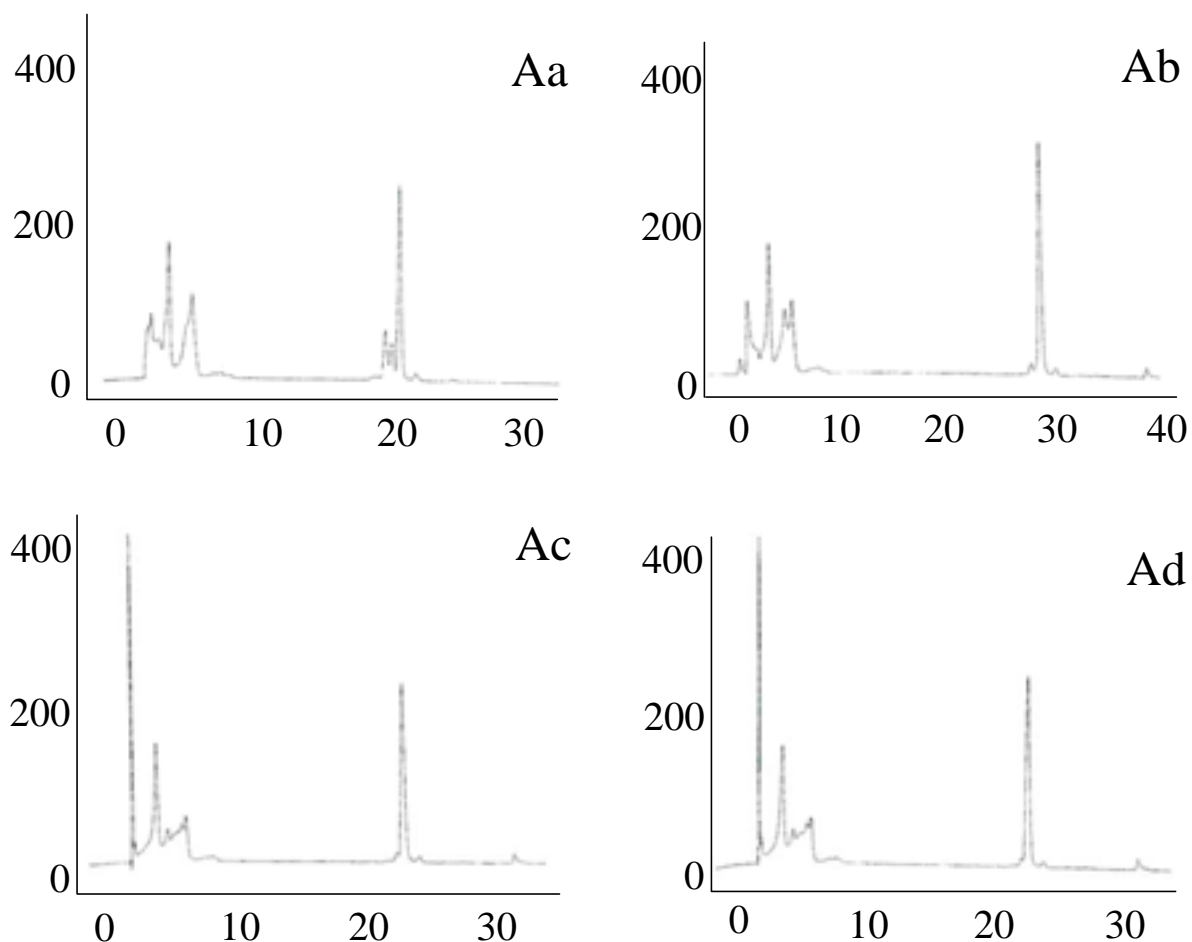
Aa = 80% MeOH + 15% MeCN + 5% H<sub>2</sub>O tamponnée

Ab = 50% MeOH + 45% MeCN + 5% H<sub>2</sub>O tamponnée

Ac = 20% MeOH + 75% MeCN + 5% H<sub>2</sub>O tamponnée

Ad = 95% MeOH + 5% H<sub>2</sub>O tamponnée

Le test a été effectué sur un échantillon de culture pure de diatomées (*Phaeodactylum tricornutum*) car elles ont la particularité de posséder des pigments très polaires en grande quantité (chlorophylle *c* et fucoxanthine).



**Figure 2-8.** chromatogramme des tests de composition du solvant de la phase mobile (en abscisse est noté le temps d'élution en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)

Le choix du solvant Ab est recommandé ici. Il montre une meilleure séparation des pigments notamment dans les premières minutes de l'analyse.

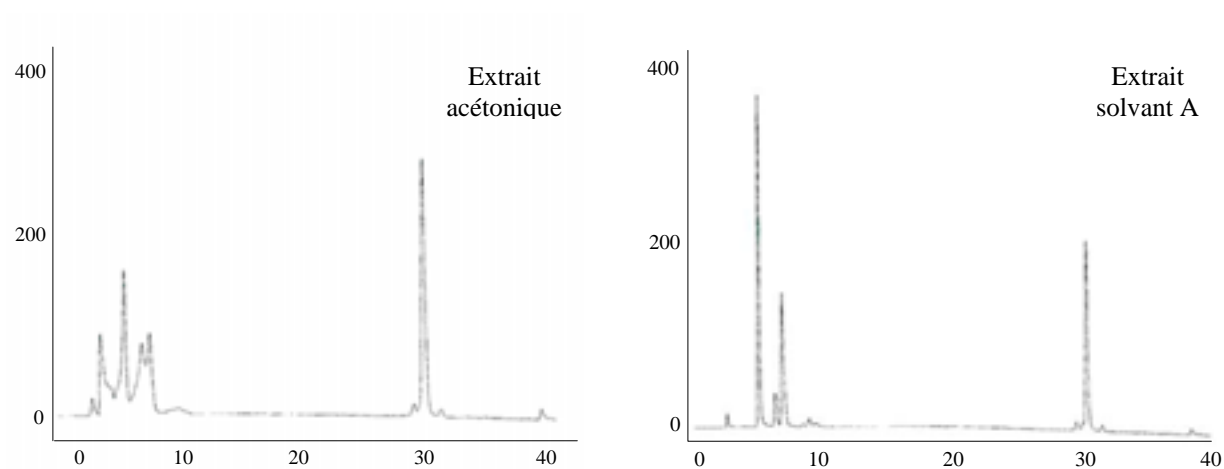
Lors d'une deuxième expérience, nous avons modifié la forme du gradient en allongeant le temps de passage de la phase isocratique à 100% de A en début d'analyse. La séparation est ainsi nettement améliorée dans les premiers moments de l'élution où sont séparés les pigments les plus polaires. Le gradient utilisé dans le reste de ce travail sera alors le suivant:

étape	temps (min)	%A	courbe
0	5	100	isocratique
1	10	100	isocratique
2	40	0	linéaire
3	5	0	isocratique
4	5	100	linéaire

*b/ Composition de l'extrait pour analyse.*

Nous avons vu que les échantillons étaient concentrés à sec après extraction. Puis ils sont dissous dans 1 à 2 ml de solvant avant injection dans la colonne.

Le principe décrit ici est basé sur la redissolution de l'extrait dans le même solvant que l'éluant A afin d'éviter les différences de pression au moment de l'injection et faciliter le mélange (Wright et al., 1991).

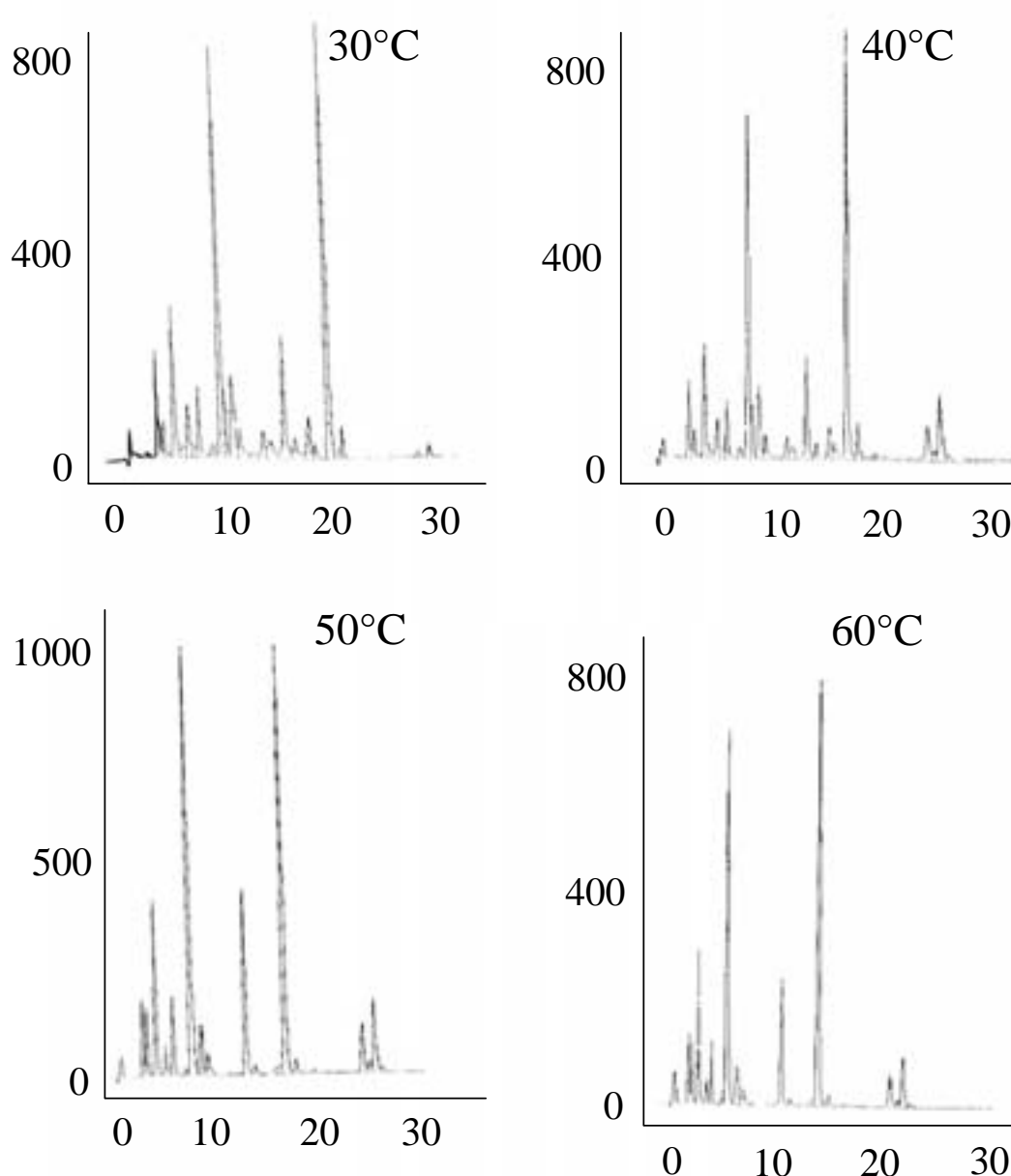


**Figure 2-9.** Chromatogrammes comparatifs d'un extrait de culture de *Pheodactylum tricornutum* analysé dans de l'acétone et dans du solvant A d'analyse (en abscisse est noté le temps d'éluion en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)

On observe ainsi une amélioration au niveau du pic du système et de la ligne de base en début d'analyse. L'utilisation du solvant A dans l'extrait accroît l'affinité des pigments pour la colonne lors de l'étape de chargement.

*c/ choix de la température d'analyse*

L'importance de maintenir des conditions isothermes pour optimiser la précision en CLHP est maintenant reconnue, alors que le rôle de la température dans la séparation des pigments n'est que peu évaluée. Une étude de Van Heukelem et al. (1994) montre que les caroténoïdes seraient mieux séparés à haute température (60°C) tandis que la séparation des chlorophylles serait optimale entre 10 et 30°C.



**Figure 2-10.** chromatogrammes de tests de la température de la colonne (en abscisse est noté le temps d'élution en minutes et en ordonnée la valeur de l'absorbance en mAU)



Nous avons testé plusieurs températures sur un même échantillon de culture pure et on constate qu'à 50°C on obtient une réponse optimale en 30 minutes seulement : en dessous les pigments ne sont pas séparés complètement ; au dessus, certains sont détruits. En outre, une température supérieure à 60°C n'est pas recommandée pour la maintenance de la colonne.

*d/ réglage du débit optimum : évaluation de la Hauteur Equivalente du Plateau Théorique (HEPT)*

Nous avons choisi d'étudier l'efficacité de la colonne sur deux pigments représentatifs, l'un très polaire (fucoxanthine), l'autre moins (chlorophylle *a*). L'efficacité est évaluée par rapport au nombre de plateaux théoriques pour chaque pic : celui-ci doit être le plus grand possible et la hauteur entre ces plateaux la plus faible possible. En fonction de l'équation de Van Deemter ( $HEPT = E + B/u + C.u$ ), où (E) est le coefficient de diffusion de Eddy, (B) la diffusion moléculaire longitudinale, (C) la résistance au transfert de masse du soluté entre les 2 phases et (u) le débit de la phase mobile, il est possible d'optimiser cette efficacité en faisant varier le débit de la phase mobile (tableau 2-3).

Pour la fucoxanthine:

Débit (ml/min)	Temps de rétention (min)	$\omega_{0.5}$ (min)	Nb de plateaux	HEPT (mm)
0.6	6.073	0.162	7785	0.032
0.7	4.536	0.133	6444	0.038
0.8	4.213	0.121	6716	0.037
0.9	3.928	0.118	6139	0.040
1	3.445	0.104	6079	0.041
1.1	3.115	0.098	5597	0.045
1.2	2.894	0.093	5365	0.047

Pour la chlorophylle *a*:

Débit (ml/min)	Temps de rétention (min)	$\omega_{0.5}$ (min)	Nb de plateaux	HEPT (mm)
0.6	32.427	0.199	146648	0.0017
0.7	29.576	0.210	109938	0.0023
0.8	27.867	0.204	103821	0.0024
0.9	26.917	0.205	95734	0.0026
1	25.424	0.210	81347	0.0031
1.1	24.421	0.221	67956	0.0037
1.2	23.552	0.225	60815	0.0041

**Tableau 2-3** : Résultats de l'évaluation de l'HEPT pour la chlorophylle *a* et la fucoxanthine.

En dessous de 0.6 ml par minute, le débit est trop faible pour la pompe et on perd la stabilité au cours du temps. Le débit optimum choisi sera: 0.6 ml/min puisque l'HEPT est alors le plus faible et le nombre de plateaux plus important, ce qui permet une séparation théorique plus fine.

*e/ linéarité et reproductibilité des mesures*

Afin d'évaluer la **linéarité** des mesures sur la chaîne CLHP, nous avons utilisé des standards de pigments. Des volumes croissants ont été injectés et, pour chaque pic obtenu, l'aire a été mesurée à 440nm (maximum d'absorption moyen conventionnel). Prenons l'exemple de la chlorophylle *a* et de la fucoxanthine (tableau 2-4).

Pour la fucoxanthine:

	aire ( $\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ )	poids ( $\mu\text{g}$ )
<b>dilution 1</b>	321022	4.31E-03
	320808	4.31E-03
	316298	4.31E-03
<b>dilution 2</b>	168491	2.16E-03
	169087	2.16E-03
	169503	2.16E-03
<b>dilution 3</b>	88062	1.08E-03
	86669	1.08E-03
	86526	1.08E-03
<b>dilution 4</b>	39340	5.39E-4
	40836	5.39E-4
	40465	5.39E-4

Pour la chlorophylle *a*:

	aire ( $\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ )	poids ( $\mu\text{g}$ )
<b>dilution 1</b>	246014	1.06E-02
	256701	1.06E-02
	248764	1.06E-02
<b>dilution 2</b>	143306	5.29E-03
	136817	5.29E-03
	149142	5.29E-03
<b>dilution 3</b>	74171	2.65E-03
	77811	2.65E-03
	75475	2.65E-03
<b>dilution 4</b>	33662	1.32E-3
	37776	1.32E-3
	34909	1.32E-3

**Tableau 2-4.** Résultats des mesures de linéarité des valeurs issues de l'analyse HPLC.

Les mesures sont dans ces deux cas linéaires ( $R^2 > 0.9$ ). On observe néanmoins que la linéarité baisse lorsqu'on a affaire à des pigments moins concentrés dans l'échantillon.

Pour évaluer la **reproductibilité**, nous avons utilisé un standard de chlorophylle *a* dont un volume de 40  $\mu\text{l}$  a été injecté 10 fois de suite. Les aires (à 440 et 666nm) des pics ont été repérées à chaque fois, ainsi que les temps de rétention. Les résultats sont repris dans le tableau 2-5:

aire à 440 nm	aire à 666 nm	temps de rétention (min)
148940	183111	22.738
148905	182020	22.739
151209	184811	22.765
159085	184245	22.781
142641	192096	22.761
151743	184107	22.794
151864	196879	22.798
162535	195458	22.830
166576	197417	22.817
168360	202031	22.854

<b>Moyenne</b>	<b>155186</b>	<b>190218</b>	<b>22.79</b>
<b>Ecart type</b>	<b>8479</b>	<b>7353</b>	<b>0.038</b>
<b>Coeff. de var. %</b>	<b>5.46</b>	<b>3.87</b>	<b>0.17</b>

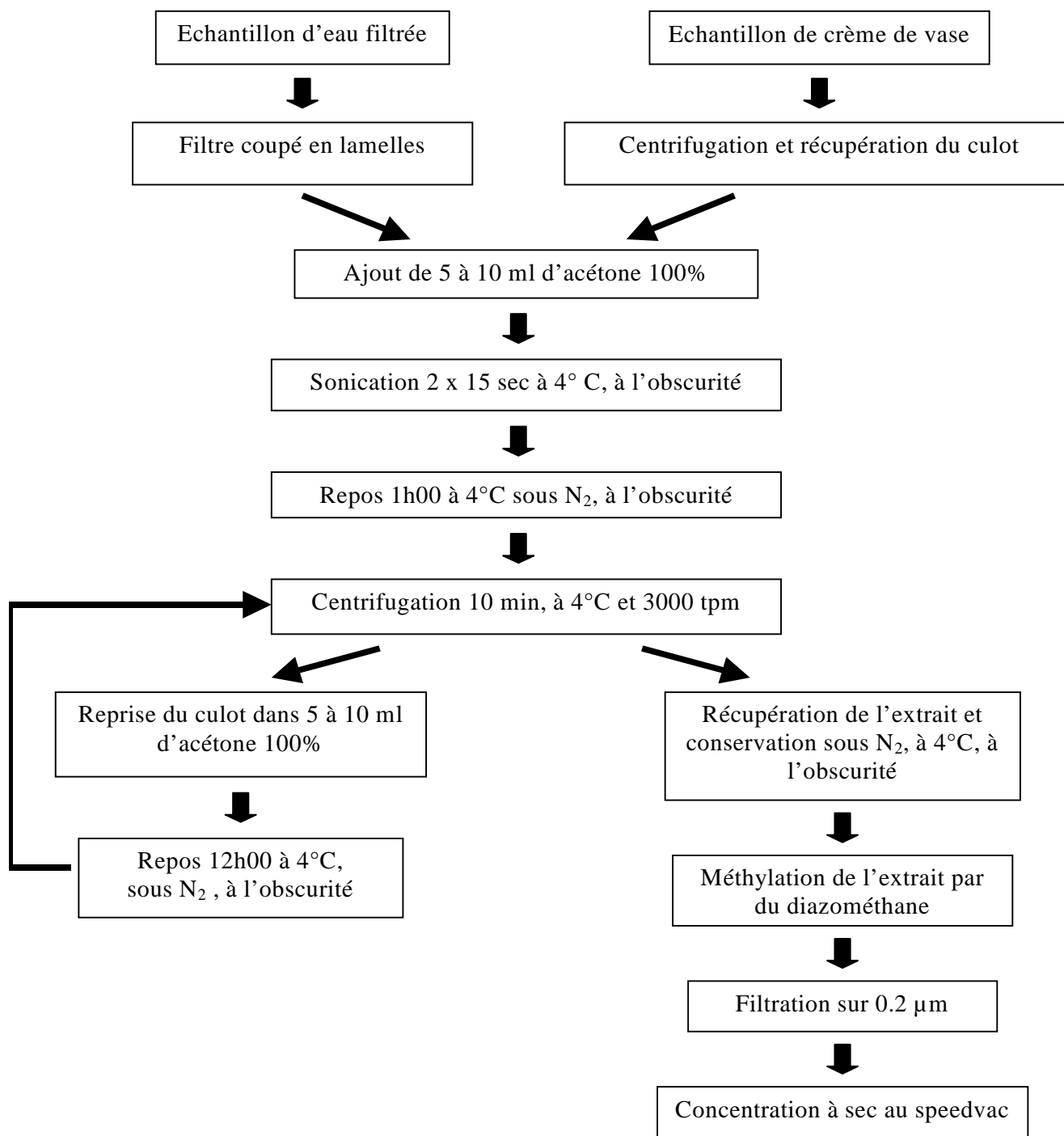
**Tableau 2-5.** Résultats des mesures de reproductibilité des valeurs issues de l'analyse HPLC.

Le temps de rétention montre une très faible variation entre les analyses. La variation dans les valeurs des aires à 440 et 666 nm est un peu plus élevée, mais reste tout de même largement satisfaisante.

## 2-4. description de la méthode adoptée

### 2-4-1. mode opératoire

Le mode opératoire finalement adopté, tenant compte de toute la série de tests préalablement effectués, est résumé dans l'organigramme suivant.



### 2-4-2. Identification et calcul des concentrations en pigments

L'identification des pigments (ex. fucoxanthine, Lutéine,...) est effectuée en utilisant des standards (International Agency for  $^{14}\text{C}$  Détermination) en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres d'absorption UV-Visible avec ceux des fractions éluées de l'extrait.

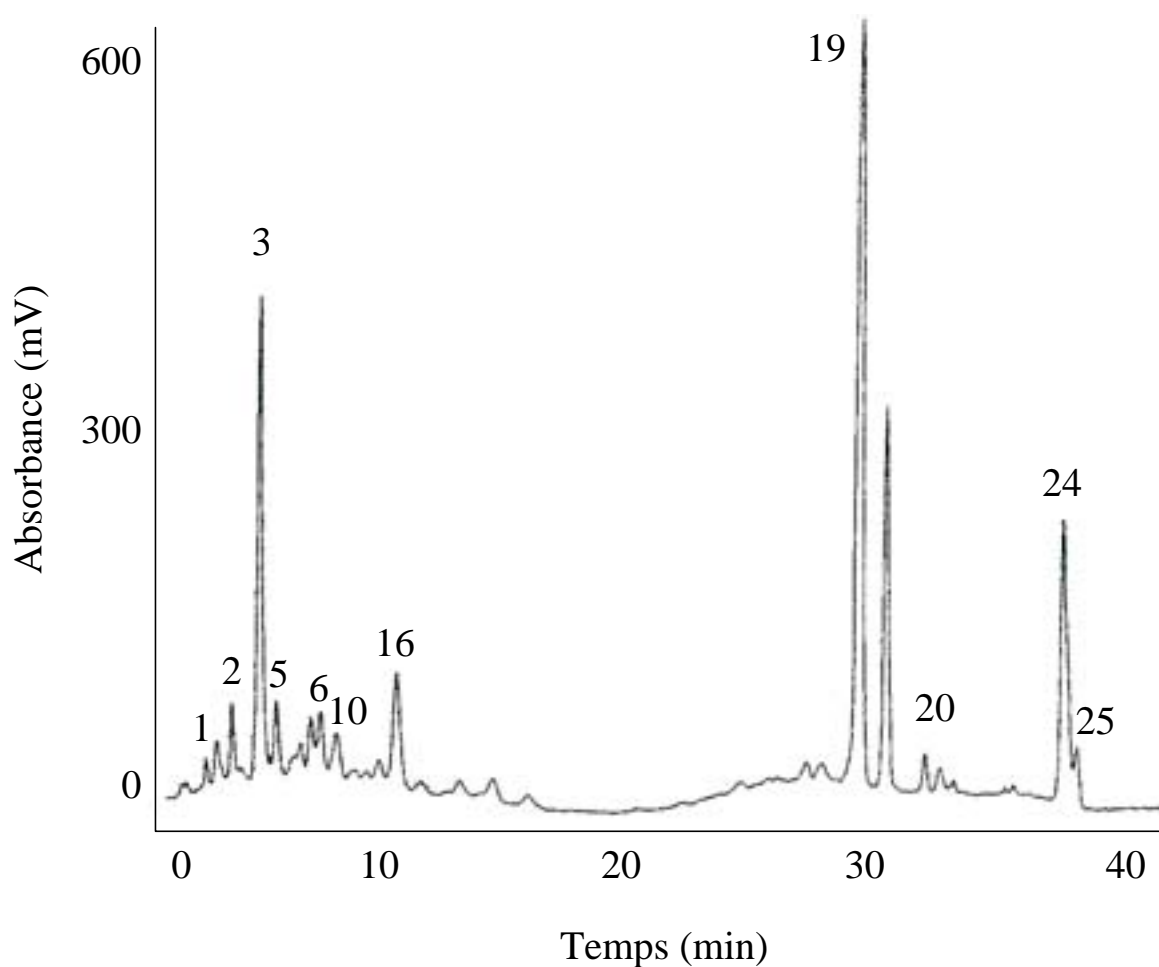
Les phaeophytines (produits de dégradation des pigments chlorophylliens) sont identifiés en utilisant des standards fabriqués au laboratoire suivant la technique de Bianchi (1991).

Certains pigments (ex. diatoxanthine), dont nous ne possédons pas de standards, sont identifiés par comparaison avec les données de la littérature (Jeffrey et al., 1997).

Ci-dessous est donné le tableau synthétisant l'ordre d'élution des pigments déterminés pour le protocole choisi:

ordre	Pigment	Temps de rétention (min)
0	(front de solvant)	4.2
1	péridinine	4.4
2	Chlorophyllide <i>a</i>	4.7
3	fucoxanthine	5.1
4	neoxanthine	5.3
5	19'hexanoyoxyfucoxanthine	5.4
6	Chlorophylle <i>c1</i>	5.4
7	prasinoxanthine	5.6
8	violaxanthine	5.7
9	Chlorophylle <i>c2</i>	6.3
10	diadinoxanthine	6.5
11	alloxanthine	7.6
12	Pheophorbide <i>a</i>	8.2
13	diatoxanthine	8.3
14	Pheophorbide <i>a</i> like1	8.5
15	luteine	9.1
16	zeaxanthine	9.2
17	Pheophorbide <i>a</i> like2	13-15
18	Chlorophylle <i>b</i>	26.2
19	Chlorophylle <i>a</i> (+allomère)	29-32
20	Pheophytine <i>a</i>	34
21	Pheophytine <i>b</i>	37
22	Pheophytine <i>a</i> like	38
23	$\alpha$ -carotène	39.2
24	$\beta$ -carotène	39.7
25	Pyropheophytine <i>a</i>	40.2

**Tableau 2-6.** Liste des pigments séparés et identifiables par notre méthode



**Figure 2-11.** chromatogramme exemple issu de la mise au point de la méthode

Le calcul des concentrations est effectué grâce à une calibration externe de la méthode pour les pigments majeurs. Le poids de pigment analysé correspond donc à l'aire du pic correspondant divisée par le facteur de calibration ( $f$ ). L'intervalle de confiance pour la quantification des pigments va de 0.8 % (fucoxanthine) à 2.2 % (chlorophylle *a*) suivant les pigments.

<b>pigment</b>	<b>f: facteur de calibration</b>
Alloxanthine	1.103 E+08
$\alpha$ -carotène	1.154 E+08
$\beta$ -carotène	1.367 E+08
Chlorophylle <i>a</i>	1.784 E+07
Chlorophylle <i>b</i>	2.147 E+07
Chlorophylle <i>c</i>	2.844 E+07
Diadinoxanthine	1.196 E+08
Fucoxanthine	1.034 E+08
19'hex.fucox.	1.100 E+08
Lutéine	1.691 E+08
Myxoxanthophylle	7.686 E+07
Neoxanthine	1.250 E+08
Péridinine	6.508 E+07
Pheophytine <i>a</i>	3.386 E+06
Pheophytine <i>b</i>	4.876 E+07
Prasinoxanthine	1.034 E+08
Violaxanthine	1.375 E+08
zeaxanthine	8.298 E+07

**Tableau 2-7.** Liste des facteurs de calibration des pigments.

Le calcul des concentrations (exprimées en  $\mu\text{g/l}$ ) en pigments de l'échantillon analysé à l'aide de la méthode précédemment décrite, est effectué à l'aide la formule suivante:

$$W = (V_e / V_i) * W_0$$

Avec:  $W_0$  = poids de pigment injecté dans la colonne (microgramme)

$W$  = poids total du pigment dans l'échantillon (microgramme)

$V_e$  = volume d'extraction

$V_i$  = volume d'injection

Aire = aire intégrée à 440 nm (microAbsorptionUnits\*seconds)

$W_0$  = Aire / f (microgramme)

### 2-4-3. Sensibilité de la méthode

Nous avons pu constater que, sur notre appareillage, la limite de détection pour le protocole mis en place est déterminée à 0.5 ng pour les caroténoïdes et à 1.3 ng pour les chlorophylles, après réglage optimum des énergies des lampes UV et Visible.

#### 2-4-4. Calcul de diversité pigmentaire

En écologie, l'index de Shannon-Weaver est utilisé pour la distribution des espèces (e.g., Muylart & Sabbe, 1999) mais récemment cette approche a été appliquée sur des données de pigments analysés par CLHP (Nübel *et al.*, 1999). La diversité pigmentaire peut être ainsi représentée par une seule valeur pour chaque échantillon. Cet index, nommé  $H'$ , est issue de la théorie de l'information (Shannon & Weaver, 1949). Il est calculé en utilisant la formule suivante:

$$H' = -\sum a_i \log_2 a_i$$

Avec  $a_i$  égal au poids de la fraction de pigment  $i$  du poids total de pigment. On utilise ici un calcul logarithmique en base 2; De ce fait les unités de l'index sont exprimées en bits. Dans notre étude l'index est calculé sur 6 pigments de diagnostic. L'index de diversité varie donc de 0 bits (seulement 1 pigment représenté) à 2.58 (tous les pigments représentés dans les mêmes proportions). Les groupes phytoplanctoniques repérés dans les différentes campagnes sont identifiés grâce à des pigments dits de diagnostic.



### **3- Autres techniques :**

Seront seulement décrites ici les techniques utilisées lors des incubations et se limitant à la mesure des teneurs en CO, aux comptage cellulaires du phytoplancton et aux dénombrement bactériens. Toutes les techniques ayant trait aux paramètres corrélés aux teneurs en pigments (chapitre 5) et mesurés par d'autres laboratoires ayant participé au programme BIOGEST, seront très brièvement exposés dans chacun des paragraphes concernant ces composants.

#### **3-1. Carbone organique**

Les échantillons d'eau sont filtrés sur des filtres GF/F : filtres en fibre de verre de porosité nominative 0.45µm préalablement pyrolysés et pesés. La différence faite entre le poids du filtre, après séchage, et du filtre vide permet, connaissant le volume filtré, d'avoir la teneur en MES, exprimée en mg/l.

En vue de l'élimination du carbone inorganique, les échantillons subissent une étape de décarbonatation à l'acide chlorhydrique 2N avant analyse.

L'analyse est faite ensuite sur un analyseur LECO CS 125 ; elle est basée sur la détermination du CO<sub>2</sub> sur une cellule I.R (infra-rouge) constitué d'un filament porté à une température de 850°C.

La calibration est faite sur des anneaux d'acier de teneur en carbone connue.

Un creuset contenant l'échantillon à analyser, auquel on a ajouté 2 accélérateurs favorisant la combustion dans un four à induction, est brûlé à 1500°C dans un courant d'oxygène. Il se forme alors du carbone organique (CO), lequel au contact d'un catalyseur à 350°C, est transformé en CO<sub>2</sub>.

Le gaz de combustion est purifié avant analyse par passage au travers de pièges à humidité (anhydride de magnésium) et à halogènes (produits LECO France).

Les teneurs en carbone sont alors évaluées par spectrophotométrie I.R, l'intensité du rayonnement obtenu étant proportionnelle à la concentration en carbone.

Les résultats sont exprimés en pourcentage ou en mg/l avec une précision de l'ordre de 3%.

#### **3-2. Comptage cellulaire**

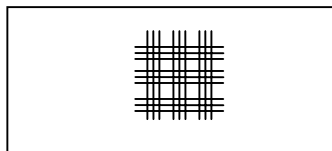
Sur les cultures d'algues phytoplanctoniques nécessaires à la mise au point de la technique d'analyse des pigments par CLHP mais aussi aux suivis de la dégradation de la matière organique *in vitro*, nous avons contrôlé les concentrations de cellules algales utilisées au départ et leur évolution dans le temps

La détermination de la concentration algale est effectuée sur une cellule de Malassez. Cette cellule permet de visualiser le nombre d'algues présentes dans exactement 1 ml d'échantillon.

Dimensions (mm): 76 x 33 x 5

Grille (mm<sup>2</sup>): 5

Profondeur (mm): 0.2



### 3-3. Dénombrement bactérien

#### 3-3-1. Désorption des bactéries des particules

Le suivi des communautés bactériennes dans les écosystèmes riches en MES est difficile à réaliser. En effet, la majorité des bactéries sont adsorbées sur les particules et celles-ci ont tendance à masquer la présence de bactéries dans le cas d'un comptage direct. La nécessité de séparer les bactéries des particules avant de les compter devient donc évidente. La combinaison de pré-traitements chimique et mécanique s'est révélée être le choix le plus efficace (Andouche, 2001). Les échantillons sont mis en présence de Tween 80 (surfactant non ionique, polysorbate de concentration 30 ml.l<sup>-1</sup>) puis passé au vortex pendant 5 minutes. La mixture ainsi récoltée est filtrée sur une membrane de porosité 8µm afin d'en retirer les particules et de ne conserver que le reliquat contenant les bactéries à dénombrer.

#### 3-3-2. Principe de l'épifluorescence

Le fluorochrome présent à l'intérieur des cellules est excité par un faisceau lumineux ( $\lambda = 455-490$  nm). La lumière fluorescente émise en retour est transmise à l'objectif (x100) où l'observation directe des cellules peut alors être effectuée.

#### 3-3-3. Dénombrement de la flore active

Les bactéries présentes sur le filtre, permettant leur concentration, sont mises en contact avec un précurseur de la fluorescéine. Cette dernière est libérée dans le microorganisme sous l'action des estérases ; excitée sous l'action d'un faisceau lumineux de 480 nm, elle émet un rayonnement de 515 nm de longueur d'onde faisant apparaître la cellule en vert fluorescent. Si la bactérie n'est pas métaboliquement active (ne contient pas d'estérase), le fluorochrome n'est pas libéré et aucune fluorescence n'est émise.

Le comptage de cinquante champs est nécessaire pour que la mesure soit statistiquement valable. Le dénombrement est alors effectué selon la formule suivante :

$$C = \frac{SF \times NT}{SM \times VE \times NC}$$

Avec: C: Nombre d'unités cellulaires / ml

SF: surface utile de la membrane de filtration

NT: nombre total d'unités cellulaires dénombrées sur NC champs examinés

SM: surface du champ analysé au microscope

VE: volume filtré d'échantillon.



*Chapitre 3* – Distribution des concentrations pigmentaires des eaux dans divers estuaires européens



## Chapitre 3 : Distribution des concentrations pigmentaires des eaux dans divers estuaires européens

### 1- Introduction

Généralement, dans les environnements estuariens, le phytoplancton est, de manière quantitative, la deuxième source de matière organique après les apports terrestres dus à l'érosion des sols (Abril *et al.* 2001). Le phytoplancton étant une source de nourriture de meilleure qualité, il constitue la base du réseau trophique estuarien, et est fondamental dans la biologie de ces écosystèmes (Heip *et al.* 1995; Gasparini *et al.* 1999; Burdloff *et al.* 2000). L'action du phytoplancton joue un rôle à d'autres niveaux, ainsi, l'assimilation de nutriments et de CO<sub>2</sub> par la photosynthèse affecte considérablement la chimie de l'estuaire (Kromkamp *et al.* 1995; Rendell *et al.* 1997; Borges & Frankignoulle 1999).

Il est donc essentiel de pouvoir suivre la distribution et l'activité du phytoplancton. Le contenu pigmentaire des eaux est un paramètre révélateur de la présence des groupes phytoplanctoniques et de leur état de dégradation. Plusieurs études se sont focalisées sur la relation entre l'abondance des biomasses des différentes classes phytoplanctoniques et la concentration en pigments de diagnostic caractéristiques de ces classes (Everit *et al.* 1990; Mackey *et al.* 1996; Roy *et al.*, 1996; Bianchi & Argyrou 1997). Les algorithmes proposés sont souvent efficaces et offrent une approximation satisfaisante pour un écosystème donné mais peuvent rarement être extrapolés à d'autres environnements. Ceci est dû aux fortes variations du contenu pigmentaire des cellules en fonction à la fois des espèces et des conditions du milieu telles que la lumière (Bianchi & Argyrou 1997; Schlüter *et al.* 2000; Llewelyn & Gibbs 2000). Dans les estuaires, les assemblages pigmentaires sont

particulièrement complexes car interviennent les apports continentaux de végétaux supérieurs mais aussi des phénomènes de dégradation plus importants. Ainsi, Bianchi *et al.* (1993) proposent l'utilisation de rapports pigmentaires, e.g., le rapport chlorophylle *b*/lutéine, comme un index traçant les sources de la matière organique. Les processus de dégradation peuvent également être suivis en mesurant les produits de dégradation colorés principalement issus des chlorophylles (Barlow *et al.* 1993 ; Head *et al.* 1994). Jusqu'ici, les études détaillées des pigments par CLHP ne sont pas très fréquentes en milieu estuarien et la plupart des publications concernent des estuaires Nord-Américains, tempérés, macrotidaux et soumis à une forte influence humaine comme les estuaires européens (Bianchi *et al.*, 1993; Tester *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1996). Ces études ont montré l'utilité de l'analyse des pigments dans la caractérisation des communautés phytoplanctoniques et du suivi des sources de la matière organique.

Dans ce chapitre, deux approches seront décrites :

- la première est l'utilisation des teneurs en pigments mesurés *in situ*, afin de comprendre la distribution des communautés phytoplanctoniques par rapport à la variabilité des milieux étudiés (10 estuaires macrotidaux aux caractéristiques hydrosédimentaires très contrastées) ;

- la seconde approche est l'utilisation des teneurs pigmentaires appliquée à la question plus spécifique de la séparation du matériel pigmentaire en deux pools, l'un allochtone, constitué par la MO végétale issue des bassins versants, l'autre autochtone biosynthétisée dans les fleuves ou les rivières et l'estuaire lui-même.



## 2- Distribution des pigments et phéopigments dans 10 estuaires européens

Dans le cadre de programmes d'étude des estuaires européens (EC-BIOGEST et SEINE-AVAL<sub>2</sub>), 10 estuaires ont pu être étudiés. L'analyse des pigments par CLHP a été choisie pour réaliser le suivi de la matière organique d'origine photosynthétique. Dans ce paragraphe, nous présenterons les données obtenues de l'échantillonnage des 10 estuaires investigués : Gironde, Escaut, Rhin, Seine, Elbe, Ems, Loire, Tamise, Douro et Sado. Cette étude nous permet de décrire de manière homogène les variations de teneurs en pigments sur une aire géographique couvrant la quasi totalité des régions tempérées de l'ouest européen. Nous avons utilisé les données pigmentaires obtenues afin de caractériser les assemblages phytoplanctoniques présents lors de l'échantillonnage en terme de groupes taxonomiques majeurs (cf. tableau 3-1) et de montrer l'importance des processus de dégradation. De plus, les données pigmentaires ont pu être combinées avec des données physico-chimiques et hydro-sédimentologiques mesurées lors des campagnes permettant de dégager des types de systèmes estuariens différents bien qu'appartenant à la même zone géographique ouest-européenne.

<b>pigments</b>	<b>Groupe algal</b>
Fucoxanthine	Diatomées (1)
Lutéine	Chlorophytes (1); végétaux supérieurs (1,2)
Chlorophylle <i>b</i>	Chlorophytes (1); végétaux supérieurs (1,2)
Alloxanthine	Cryptophytes (3)
Peridinine	Dinoflagellés (4)
19'Hexanoyloxyfucoxanthine	Prymnesiophytes (5)

*références:* 1, Jeffrey (1974); 2, Bianchi & Findlay (1990); 3, Pennington et al. (1985); 4, Jeffrey et al. (1975); 5, Bjornland & Liaaen-Jensen (1989).

**Tableau 3-1** . correspondances entre les pigments de diagnostic et les différents groupes algaux

### 2-1 Distribution des pigments dans les 10 estuaires étudiés

#### 2-1-1. Résultats

Les prélèvements ont été effectués dans les eaux de surface le long du gradient de salinité. Les échantillons ont été filtrés sur GF/F et immédiatement congelés dans l'azote liquide. La technique d'analyse par C.L.H.P. utilisée est décrite dans le chapitre 2.

La distribution des pigments le long du gradient de salinité dans les 10 estuaires suivis est représentée sur les figures 3-1a, -1b, -1c, -1d et -1e pour les différentes campagnes. Les concentrations des pigments correspondants aux groupes

phytoplanctoniques majeurs sont données sous forme d'histogrammes et la concentration en chlorophylle *a* est donnée par une courbe superposée.

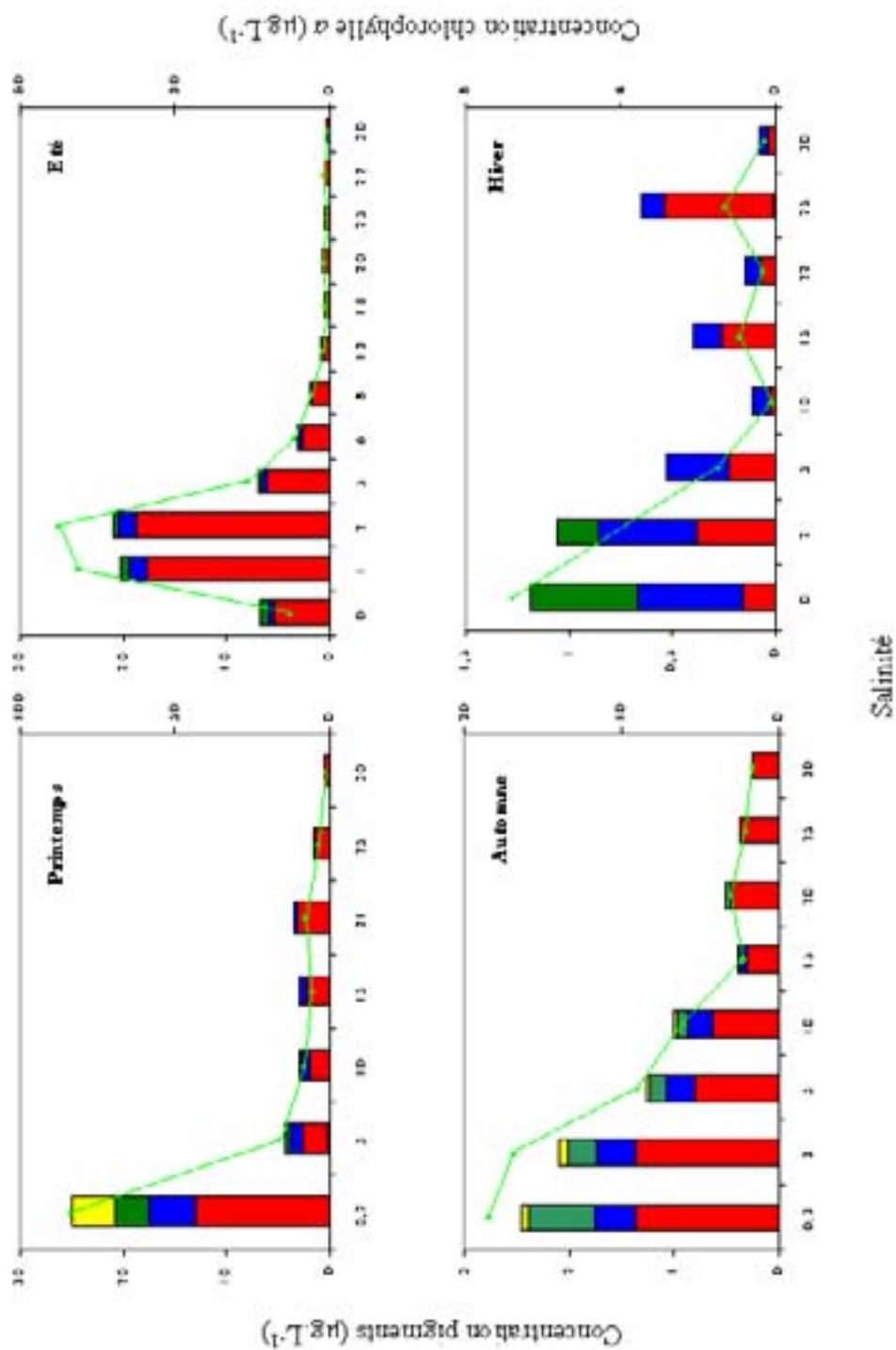
La première remarque est que les concentrations en chlorophylle *a* varient d'un ordre 3 entre toutes les campagnes. On retrouve les concentrations les plus basses ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) dans les estuaires de la Gironde, de la Seine et du Rhin pendant les périodes automnale et hivernale: les plus fortes teneurs, variant de 70 à  $220 \mu\text{g.L}^{-1}$ , ont été observées lors de l'échantillonnage estival sur la Loire, la Seine et l'Escaut. Dans la plupart des autres estuaires (Gironde, Rhin, Ems, Douro, Elbe, Sado et Tamise) les teneurs en chlorophylle *a* varient entre 0.2 et  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ . On peut donc, dès à présent, constituer d'estuaires très eutrophisés (concentration en chlorophylle *a* atteignant  $220 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) avec les estuaires de l'Escaut, de la Loire et de la Seine, les autres estuaires montrant des teneurs en chlorophylle *a* faibles à moyennes (de 0.1 à environ  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ ).

La fucoxanthine est présente dans tous les échantillons et il constitue le plus souvent le caroténoïde prédominant. La fucoxanthine est le pigment accessoire majeur des Diatomées (Bacillariophytes), mais est également présente chez les Prymnesiophytes et Chrysophytes. Les Prymnesiophytes ont été occasionnellement détectés en faible quantité dans la partie avale de l'estuaire du Rhin par la présence de 19'-hexanoyloxyfucoxanthine (Figure 1c). D'un autre côté, la 19'-butanoyoxyfucoxanthine était toujours en dessous des limites de détection, indiquant une contribution des Chrysophytes marines très faible voire nulles. De plus, plusieurs études par comptage en microscopie ont révélé que les formes d'eau douce des Chrysophytes n'avaient pas été détectées en quantité significative (Etcheber, 1986; Muylaert & Sabbe, 1999). Ainsi, le pool de fucoxanthine dans les estuaires est attribué essentiellement aux Diatomées. Ces Diatomées sont présentes tout au long du gradient de salinité dans les 10 estuaires étudiés et persistent toute l'année. Les concentrations en fucoxanthine dans la colonne d'eau varient de plus de 2 ordres de grandeur; La concentration la plus basse est de  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  dans la Gironde, la Seine et le Rhin et les plus élevées sont de 10-15  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans les régions les plus amonts des estuaires de l'Escaut, de la Seine et de la Loire. Les concentrations dans la Gironde, le Rhin, l'Ems, le Douro et la Tamise varient entre 0.1 et  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , ce qui correspond aux valeurs les plus basses rapportées pour les estuaires de l'Hudson, de Newport, du Krka et du St Laurent (Bianchi *et al.* 1993; Tester *et al.* 1995; Ahel *et al.* 1996; Roy *et al.* 1996). Le modèle de distribution de la fucoxanthine est très similaire à celui de la chlorophylle *a*.

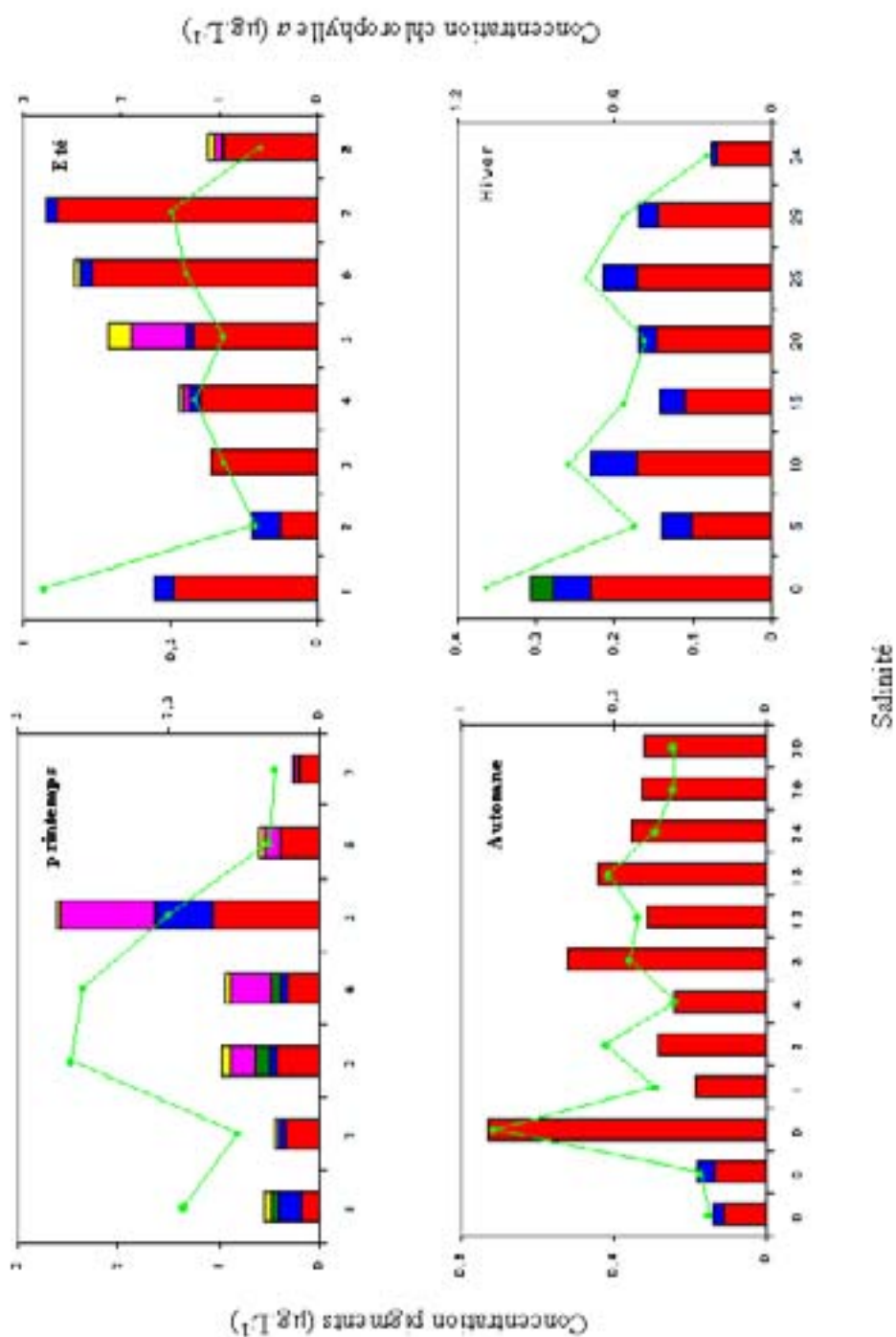
D'autres pigments de diagnostic (voir Table 1, Figures 3-1) incluant la lutéine et la chlorophylle *b* (dans la partie amont de la plupart des estuaires), l'alloxanthine (dans le

Rhin, l'Escaut, la Seine, la Loire et la Gironde), péridinine (dans la Loire, la Gironde, le Douro et le Sado), la prasinoxanthine (dans la Seine en juin et juillet) et la 19'-hexanoyloxyfucoxanthine (dans le Rhin en juillet en aval (salinité 30) et dans le Douro pour des salinité supérieures à 15) ont été mesurés. On peut donc penser que les Chlorophytes, Cryptophytes et/ou Dinoflagellés constituent une part significative des assemblages phytoplanctonique des estuaires ouest-européens avec occasionnellement une plus faible contribution des Prasinophytes et des Prymnésophytes. D'un autre côté, la zéaxanthine, l'échinénone et la myxoxanthophylle n'ont jamais pu être détectés ce qui signifierait que peu ou pas de Cyanobactéries (Jeffrey, 1997) étaient présentes durant nos échantillonnages.

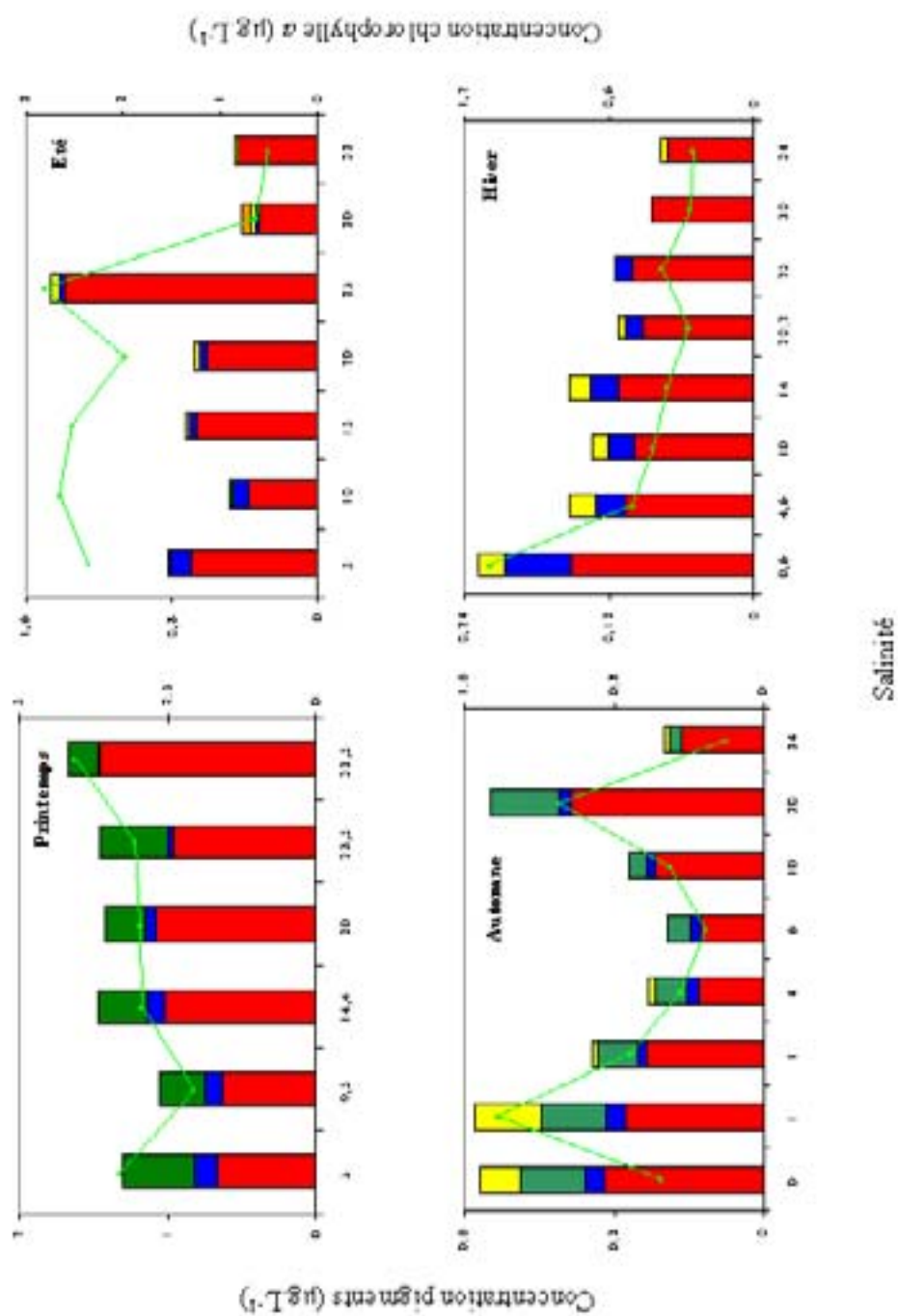
Au niveau des estuaires de la Gironde, du Rhin, de la Seine et de l'Escaut nous avons pu comparer plusieurs campagnes distribuées le long de l'année, permettant de suivre des variations saisonnières. Trois observations peuvent être détachées. Premièrement, la localisation du maximum de chlorophylle *a* se déplace au cours de l'année dans le Rhin et la Gironde, où on le trouve en amont lors des prélèvements hivernaux et en aval lors des prélèvements estivaux. Deuxièmement, la diversité pigmentaire est souvent minimale pendant l'hiver et maximale pendant l'été, comme on peut l'observer en particulier sur la Gironde. Troisièmement, de très fortes variations dans les concentrations pigmentaires sont observées sur l'Escaut en amont et sur la Seine, où les concentrations en chlorophylle *a* et en fucoxanthine durant l'été sont supérieures à celles observées en hiver d'un ordre 1 au minimum.



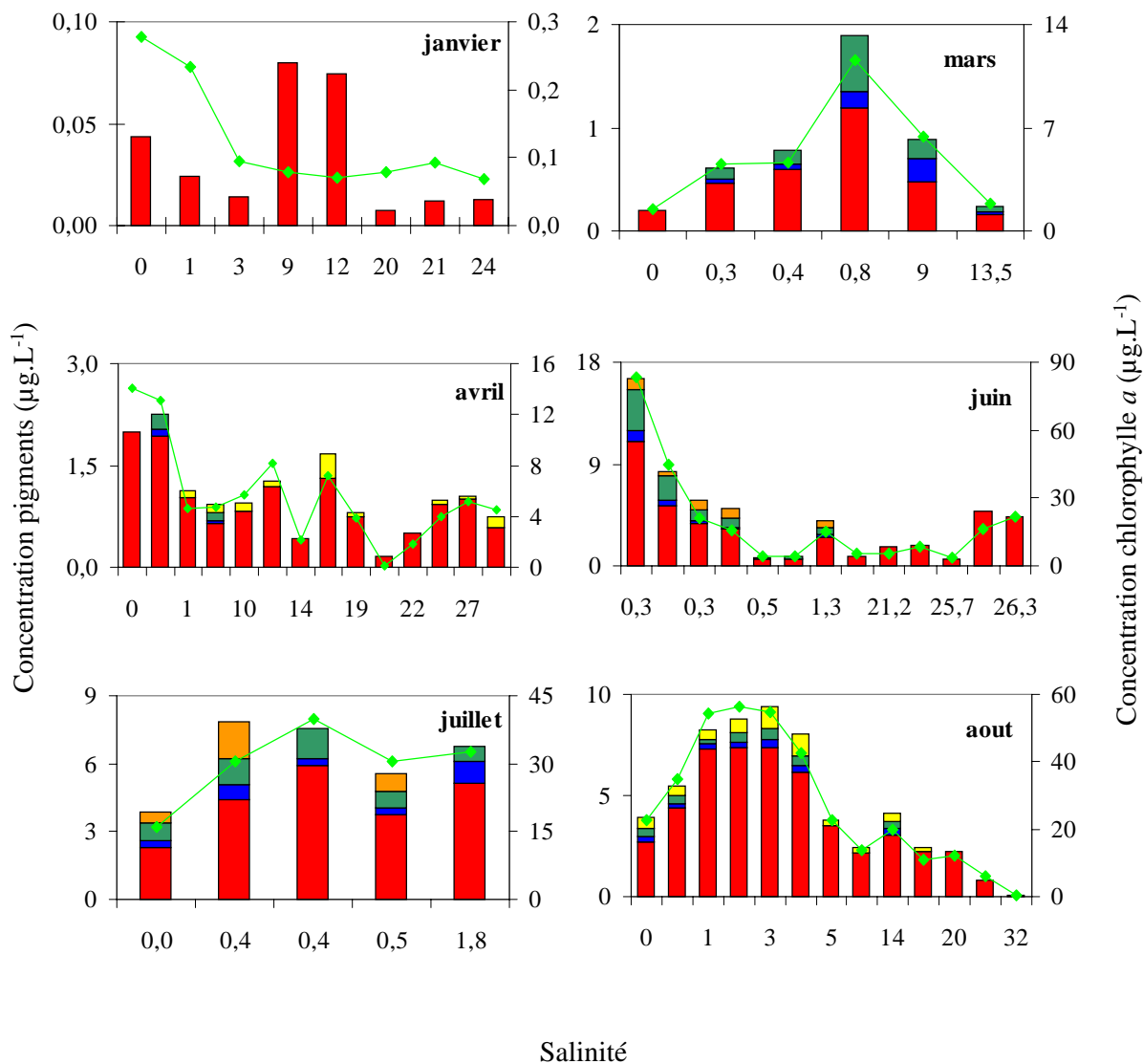
**Figure 3-1a.** Distribution des pigments le long de gradient de salinité dans l'estuaire de l'Escaut ( ligne continue : chlorophylle *a*, fucoxanthine, lutéine, chlorophylle *b*, alloxanthine, périidine, prasinoxanthine).



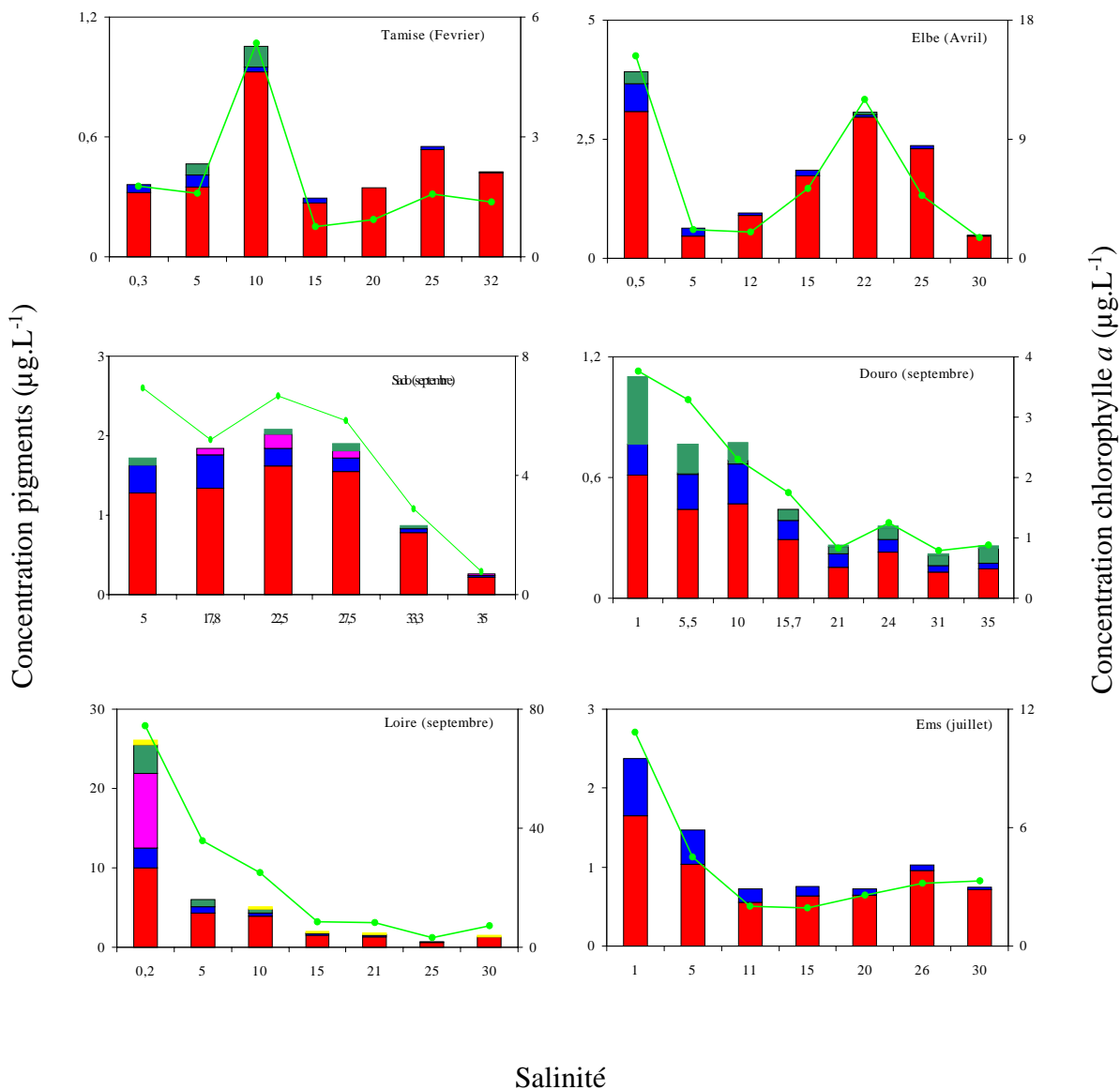
**Figure 3-1b.** Distribution des pigments le long de gradient de salinité dans l'estuaire de la Gironde ( ligne continue : chlorophylle *a*, fucoxanthine, lutéine, chlorophylle *b*, alloxanthine, périodine, prasinoxanthine).



**Figure 3-1c.** Distribution des pigments le long de gradient de salinité dans l'estuaire du Rhin (ligne continue : chlorophylle *a*, fucoxanthine, lutéine, chlorophylle *b*, alloxanthine, périidine, prasinoxanthine).



**Figure 3-1d.** Distribution des pigments le long de gradient de salinité dans l'estuaire de la Seine  
 ( ligne continue : chlorophylle *a*, fucoxanthine, lutéine, chlorophylle *b*, alloxanthine, périodinine, prasinoxanthine).



**Figure 3-1e.** Distribution des pigments le long de gradient de salinité dans les estuaires de la Tamise, de l’Elbe, du Sado, du Douro, de la Loire et de l’Ems ( ligne continue : chlorophylle *a*, fucoxanthine, lutéine, chlorophylle *b*, alloxanthine, péricidine, prasinoxanthine).



### 2-1-2. Discussion

Pour la première fois, 10 estuaires européens de la façade atlantique ont été suivis pour leur contenu en pigments photosynthétiques en utilisant à la fois les mêmes procédures d'échantillonnage et le même protocole analytique. Même si la fréquence d'échantillonnage utilisée pour cette étude ne permet pas de décrire précisément partout le type de distribution temporelle du phytoplancton dans ces environnements estuariens très dynamiques, notre base de données apporte des caractéristiques essentielles pour la description des assemblages phytoplanctoniques durant les campagnes de prélèvements, et offre également une première opportunité de comparer la distribution du phytoplancton sur une large fourchette de latitudes (de 38.5° à 54.0° N) correspondant aux 10 estuaires choisis.

Les Diatomées dominent les communautés phytoplanctoniques des 10 estuaires étudiés. Ces algues sont présentes tout au long du gradient de salinité et semblent persister toute l'année. Ceci reste en accord avec des études effectuées sur le même type d'écosystème en Amérique du nord et en Méditerranée (Bianchi *et al.* 1993; Tester *et al.* 1995 ; Roy *et al.* 1996; Ahel *et al.* 1996). De plus, les Chlorophytes, les Cryptophytes et/ou les Dinoflagellés constituent fréquemment une part significative des assemblages phytoplanctoniques des estuaires étudiés ici avec occasionnellement la contribution plus faible des Prymnésophytes et Prasinophytes. Ces constatations sont cohérentes avec des études antérieures montrant que les Diatomées, les Chlorophytes, et les Dinoflagellés constituent une association caractéristique d'algues phytoplanctoniques des systèmes estuariens macrotidaux en zone tempérée et que les Prymnésiophytes (estuaire du Krka: Ahel *et al.* 1996; estuaire du Newport: Tester *et al.* 1995), les Cryptophytes (estuaire du Newport: Tester *et al.* 1995), les Chrysophytes, les Prasinophytes (estuaire du St Lawrence: Roy *et al.* 1996) et les Cyanobactéries (estuaire de l'Hudson: Bianchi *et al.* 1993) constituent des blooms temporaires.

#### *Distribution des pigments le long du gradient de salinité estuarien.*

Il est généralement décrit dans la littérature deux régions de production phytoplanctonique dans les environnements estuariens. La première dans la région fluviale pour des salinités n'excédant pas 5, où les espèces d'eau douce dominent (Ahel *et al.* 1996). Une deuxième zone où on a des salinités supérieures à 15 et où se développent des espèces typiquement marines. Au contraire, entre les salinités 5 et 15, la production phytoplanctonique est en général faible, malgré l'existence d'espèces ayant une large

tolérance aux variations de salinités (Mc Lusky 1989). La plupart du temps, cette partie de l'estuaire correspond à la zone de maximum de turbidité (ZMT), au sein de laquelle la production phytoplanctonique est inhibée par la faible pénétration lumineuse (Kromkamp *et al.* 1995; Irigoien & Castel 1997).

Dans les 10 estuaires présentés dans cette étude, la distribution pigmentaire le long du gradient de salinité peut être décrite suivant différents modèles. Le premier modèle montre une production essentiellement située en amont suivie par une décroissance du contenu pigmentaire le long du gradient de salinité vers la mer. Un exemple clair est le Douro pour des salinités entre 1 et 21, alors que pour des salinités supérieures à 21 la composition et la concentration pigmentaire sont pratiquement constantes. Le même système est observé dans l'Ems, la Seine et la Loire et occasionnellement dans l'Escaut (octobre) et le Rhin (novembre).

Un second modèle de distribution peut être observé. Il montre une production estuarienne autochtone caractérisée par une augmentation de la concentration pigmentaire localisée après la zone de turbidité maximum pour des salinités supérieures à 15. Ce système est observé très nettement dans l'Elbe échantillonnée au printemps, où les Diatomées montrent un pic à une salinité de 22 (figure 1e). Cette distribution est aussi visible en Gironde pendant le printemps et l'été, entre les salinités 15 et 25, où la biomasse phytoplanctonique comprend à la fois des Diatomées et des Dinoflagellés mais aussi une plus faible contribution des Chlorophytes et des Cryptophytes. La Seine montre des pics de concentration pour des salinités de 15 (avril) avec la participation de Cryptophytes. Mais également sur l'Escaut où un pic de production phytoplanctonique, essentiellement composé de Diatomées, a été observé en mai à une salinité de 21 (Wollast *et al.* 2002). Le Sado, lui, est fortement influencé par sa géomorphologie. Pour des salinités allant de 18 à 28, la largeur de l'estuaire associée à de très faibles débits font de cet environnement un aspect de lagune comportant de larges zones intertidales, lesquelles peuvent contribuer à la biomasse pélagique par la remise en suspension du microphytobenthos. Cette partie de l'estuaire est d'ailleurs caractérisée par un maximum des concentrations pigmentaires révélant la présence de Diatomées, de Dinoflagellés et de Chlorophytes.

Un troisième modèle de distribution montre que le maximum de concentration pigmentaire se trouve à la salinité 10 et entre 0 et 5 dans la Tamise et l'Escaut (mai et juillet). Dans les 2 cas, ces régions correspondent au maximum de turbidité où les concentrations en particules solides dépassent  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . Parce qu'aucune production primaire n'a été observée dans la zone de maximum de turbidité de la Tamise (Wollast *et*

*al.* 2002), nous supposons que les particules phytoplanctoniques de l'amont sont retenues dans la ZMT de la Tamise. L'Escaut montre également un pic de biomasse (principalement chlorophylle *a* et fucoxanthine) dans la ZMT. Mais au contraire de la Tamise, dans l'Escaut le pic de biomasse est associé à un pic de production primaire (Kromkamp *et al.* 1995; Wollast *et al.* 2002). Ce phénomène est plutôt surprenant car dans cette zone la pénétration lumineuse est très faible et la productivité doit être limitée malgré les fortes teneurs en éléments nutritifs. Kromkamp *et al.* (1995) et Muylaert & Sabbe (1999) ont suggéré que dans la ZTM les faibles taux de croissance du phytoplancton étaient compensés par une importante réduction du broutage due aux faibles teneurs en oxygène (< 15% de la saturation). En d'autres mots, la réduction de la pression de broutage permettrait l'accumulation de biomasse phytoplanctonique dans la ZTM, et les faibles taux de croissance photosynthétiques seraient compensés par une forte biomasse, qui expliquerait le pic de production primaire.

#### *Diversité pigmentaire et variabilité saisonnière.*

Dans l'estuaire de l'Escaut, les concentrations pigmentaires sont minimales pendant l'hiver ( $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fucoxanthine et  $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$  de chlorophylle *a*) et maximales en été ( $70 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fucoxanthine et  $220 \mu\text{g.L}^{-1}$  de chlorophylle *a*). Des niveaux relativement importants sont observés au printemps, alors que des plus faibles sont trouvés en automne. La lutéine et plus souvent la chlorophylle *b* sont présentes en plus de la fucoxanthine en amont de l'estuaire. Ces 2 pigments sont présents dans les Chlorophytes et les végétaux supérieurs. La décroissance de la chlorophylle *b* et de la lutéine le long du gradient de salinité montrent que des apports de tous types de Chlorophytes d'origine continentale sont soumis à une dégradation lorsqu'ils pénètrent dans l'estuaire (Bianchi *et al.* 1993). Dans l'Escaut, la source de chlorophylle *b* et de lutéine se trouve être le bloom de Chlorophytes au niveau de la ville d'Anvers.

Dans la Seine, les concentrations en pigments montrent une forte variabilité saisonnière atteignant un ordre 2 entre l'hiver ( $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) et l'été ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). En avril, juin et août la même distribution de chlorophylle *b* et lutéine que dans l'Escaut est observée. La source de chlorophylle *b* et de lutéine semble être due à une production de Chlorophytes d'origine fluviale.

La Gironde montre de plus faibles variations saisonnières en ce qui concerne la concentration totale en pigments. Les communautés phytoplanctoniques sont dominées par les Diatomées en automne et en hiver, alors qu'au printemps et en été, des blooms

autochtones de phytoplancton se produisant en aval du BV se composent d'une part importante de Dinoflagellés et de Chlorophytes. Ceci est également montré par Muylaert & Sabbe (1999) dans une étude spécifique du phytoplancton par microscopie. alors que les observations d'hiver sur la Gironde sont préférentiellement rapportées aux apports continentaux.

Le Rhin montre également de relativement faibles fluctuations de la concentration totale en pigments pendant les périodes étudiées. La structure des communautés varient significativement entre les échantillonnages. Ceci est probablement dû à un très faible temps de résidence des eaux (de l'ordre d'une semaine), qui limite l'établissement de la production phytoplanctonique dans l'estuaire.

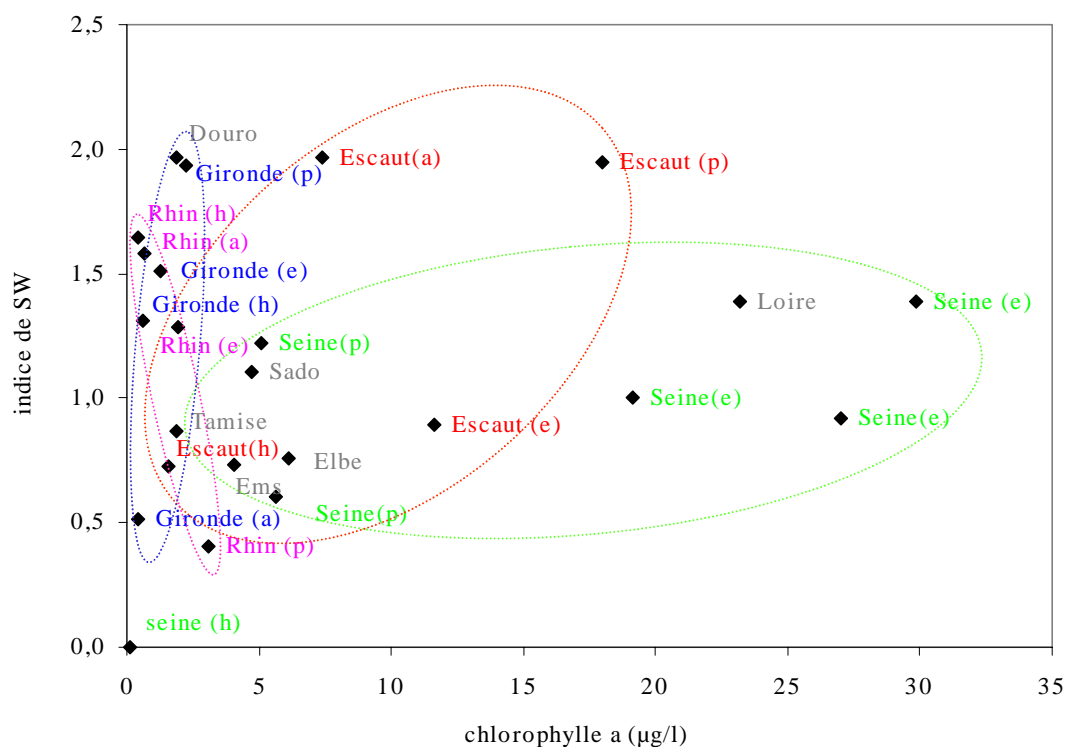
Nous avons utilisé l'index de Shannon-Weaver index (cf. chapitre.2) pour décrire la diversité pigmentaire de chaque échantillonnage. Les résultats d'une combinaison entre l'indice de shannon-Weaver et la biomasse pour chaque campagne dans tous les estuaires sont présentés sous forme de graphe en plan dans la figure 3-2a.

On observe globalement que la diversité pigmentaire est extrêmement faible en hiver et en automne (autour de 0.5 bits), alors que les valeurs sont fortes au printemps et en été (autours de 2 bits). Cet index de diversité associé à la valeur moyennée de chlorophylle *a* nous permet de distinguer 3 comportements dans l'Escaut, la Seine, le Rhin et la Gironde :

- Le premier modèle est trouvé sur l'Escaut où on observe une très forte variation des concentrations en chlorophylle *a* associée à une forte diversité pigmentaire au printemps et en automne et à une plus faible diversité en été et en hiver.

- Un second modèle illustré par la Seine où on trouve de très fortes variations de biomasse associées à des variations moyennes de l'indice de diversité maximum au printemps et minimales en hiver.

- Un troisième modèle est observé dans la Gironde et le Rhin, il se caractérise par des variations annuelles en chlorophylle *a* beaucoup plus faibles et à de fortes fluctuations de l'index de diversité pigmentaire.

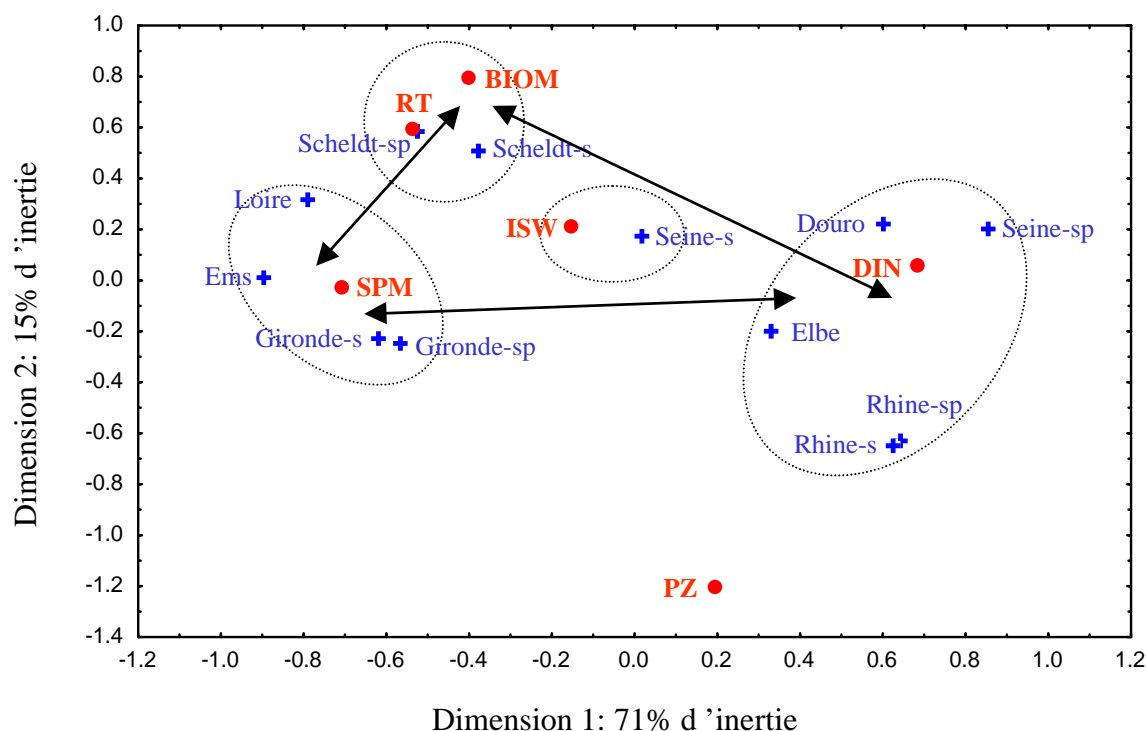


**Figure 3-2.** Variations de l'indice de diversité pigmentaire combiné à la biomasse totale estimée par la teneur en chlorophylle *a*.

*Comparaison de la distribution des pigments basées sur la typologie estuarienne.*

Nous avons combiné les données de pigment du phytoplancton avec plusieurs indices caractéristiques de l'influence anthropique et du forçage physique sur les estuaires dans le but d'élaborer une typologie. Les indices du forçage physique choisis sont le temps de résidence des eaux (TR) et la moyenne de la concentration en matière en suspension (SPM). Nous avons choisi l'apport des rivières en azote inorganique dissous (DIN) comme une mesure de l'influence anthropique. Ces variables ont été combinées avec la concentration moyenne en chlorophylle *a* (BIOM), la localisation de la zone de production maximale (ZP) dans l'estuaire et l'indice de Shannon-Weaver (ISW), ces variables étant calculées à partir des données de pigments. Nous avons choisi d'étudier les campagnes estivales (printemps et été) pour effectuer des comparaisons (la Tamise étant donc exclue). Le Sado n'a pas été retenu à cause de la trop grande différence hydrographique et morphologique de son bassin (très faible débit et aspect lagunaire de l'estuaire). Ainsi notre base de données comprend 6 variables (DIN, TR, SPM, PZ, BIOM & ISW) et 12 points de données représentant des valeurs moyennées (Douro, Elbe, Ems, Loire, et 2

campagnes sur la Gironde, le Rhin, la Seine & l'Escaut afin de comparer les caractéristiques phytoplanctoniques en terme de typologie estuarienne sur différentes périodes). La typologie est basée sur une analyse des correspondances et le résultat est présenté dans la figure 3-3. Les 2 premiers axes expliquent respectivement 71 et 15% de la variation, ainsi la représentation en 2 dimensions choisie couvre au moins 86% de la variabilité totale.



**Figure 3-3.** Visualisation en plan de l'analyse des correspondances effectuée à partir de la matrice (6x12) des variables et échantillons choisis.

Cette figure est lue en terme de proximité et de regroupement d'estuaires. De plus les variables ont été projetées sur le même plan afin de visualiser leur poids dans l'inertie des 2 axes expliquant le maximum de variabilité dans les échantillons. Trois groupes émergent de cette analyse :

- L'Elbe, le Rhin, la Seine au printemps et le Douro ont les mêmes particularités caractérisées par un fort apport en DIN, un faible temps de rétention et une faible concentration en chlorophylle *a*.
- L'Ems, la Loire et la Gironde forment un second groupe, caractérisé par une forte concentration en SPM.

- L'Escaut est séparé de ce second groupe et clairement individualisé par sa forte biomasse et son long temps de rétention.
- La Seine en été semble être caractérisée par une plus forte diversité pigmentaire. La position de la variable de diversité pigmentaire (ISW) est très centrale, elle semble donc dépendre des autres paramètres de manière équivalente.

En fonction des variables choisies, on conclura pour cette analyse que les estuaires se différencient en fonction de 3 variables majeures (SPM, DIN & BIOM) qui expliquent le maximum de variabilité dans les particularités estuariennes. Cette analyse des correspondances montre que la Gironde, l'Escaut, la Seine et le Rhin, les quatre estuaires étudiés plus en détail, appartiennent chacun à un type différent. Le seul facteur qui semble avoir une influence mineure sur cette typologie est la situation de la zone de production de phytoplancton (PZ).

### 2-1-3. Conclusions apportées par l'études des teneurs pigmentaires le long des gradients de salinité des 10 estuaires étudiés.

1/ Le suivi des teneurs en pigments sur les 10 estuaires étudiés montre dans un premier constat que les **Diatomées** est le groupe phytoplanctonique systématiquement représenté quelque soit la saison, quelque soit le type d'estuaire et quelque soit la salinité. On ajoute à ce groupe les **Chlorophytes, les Cryptophytes et Dinoflagellés**, ceux-ci n'étant pas toujours présents et fréquemment localisés dans une portion de l'estuaire, et occasionnellement les Prasinophytes et les Prymnesiophytes.

2/ Un second constat permet de discerner trois modèles d'état des teneurs en pigments le long du gradient de salinité. Le premier regroupe les estuaires de **l'Ems, la Seine et la Loire** (plus occasionnellement l'Escaut et le Rhin) et est caractérisé par une forte biomasse en amont. Le second regroupe les estuaires de **l'Elbe, du Sado, de la Gironde** et de l'Escaut (hiver) et est caractérisé par une production en aval du BV. Le troisième regroupe l'estuaire de **l'Escaut et de la Tamise** et est caractérisé par une forte biomasse au niveau du BV.

3/ Si on résume les observations effectuées sur la diversité pigmentaire et les variations saisonnières, là aussi on distingue trois situations: Le premier modèle est **l'Escaut**, avec une forte variation de biomasse annuelle et une importante diversité pigmentaire. Le second modèle est représenté par **la Seine**, avec une forte variation de

biomasse annuelle et une diversité pigmentaire moyenne. Le troisième modèle regroupe **le Rhin et la Gironde**, avec une faible variation de la biomasse annuelle et une importante diversité pigmentaire.

4/ L'analyse des correspondances montre notamment que sur toute l'extension géographique étudiée la variabilité taxonomique phytoplanctonique est lié de manière équivalente aux autres facteurs étudiés mais ne permet pas de différencier les estuaires entre eux. Les facteurs MES, biomasse associée au temps de rétention et apports azotés révèlent trois groupes: Le premier constitué du **Rhin, du Douro, la Seine et de l'Elbe**; le second constitué de **l'Escaut**; le troisième regroupant la **Gironde, la Loire et l'Ems**.

En résumé, on notera que l'Escaut s'individualise systématiquement tant au niveau des variations saisonnières que de la distribution des pigments, de plus l'analyse statistique permet de l'isoler des autres estuaires par une configuration caractéristique liant sa forte biomasse et son long temps de rétention. A l'opposé, on pourra placer la Gironde et le Rhin dont les biomasses sont systématiquement plus faibles mais qui se différencient par les causes de cette faible production. La Gironde semble être régie par son fort taux de MES tandis que le Rhin est commandé par son important apport en azote dissous et son très faible temps de rétention.



## 2-2. Distribution des pheopigments dans 10 estuaires européens

### 2-2-1. résultats

Les concentrations en chlorophylle *a* et en ses produits de dégradation colorés (pheophorbide *a*, pheophytin *a* et pyropheophytin *a*) sont moyennées pour 3 zones de l'estuaire : en amont, au niveau du maximum de turbidité et en aval. Ces zones, qui peuvent être distinguées dans tous les estuaires, excepté dans le Rhin et le Douro, ont été décrites parce qu'elles constituent des entités biogéochimiques différentes. Les moyennes des concentrations en pheophorbide *a*, pheophytine *a* et pyropheophytine *a* et de leur somme par rapport au total des produits chlorophylliens *a* (somme de la chlorophylle *a* et des pheopigments *a*) sont listés dans le tableau 2 pour les différentes entités biogéochimiques (F: fleuve, ZMT: zone de maximum de turbidité, Av: aval).

La concentration en pheopigments *a* varie de  $0.013 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans la Gironde en hiver à  $29.9 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans la Seine en été. Toutes les formes de pheopigments *a* ne sont pas nécessairement présentes dans chaque échantillonnage. Dans la Loire, la Seine (avril), la Tamise et l'Elbe, on observe seulement la présence de pheophytine *a* et de pyropheophytine *a*, alors que la pheophorbide *a* prédomine dans le Rhin, l'Ems et la Seine (juillet et août). Généralement, la pyropheophytine *a* est moins concentrée que la pheophorbide *a* et la pheophytine *a*.

Le rapport pheopigment *a* sur le total des produits chlorophylliens caractérise 3 situations différentes :

- Premièrement, de très faibles rapports (autour de 2%) ont été trouvés sur l'Elbe, le Douro, la Seine (juin) et la Loire.
- Deuxièmement, des rapports intermédiaires (autour de 15%) sont observés dans l'Ems, le Sado, et occasionnellement sur la Gironde (printemps), sur le Rhin (printemps et été), la Seine (avril, juin) et sur l'Escaut (automne).
- Troisièmement, des rapports excèdent 30% sont trouvés sur la Gironde (hiver et été), sur le Rhin (hiver), la Seine (mars, août) et sur l'Escaut (hiver et printemps).

Il ressort, de manière générale, que la concentration en pheopigments *a* est maximale au niveau de la zone de turbidité maximale.

		pheophorbide	pheophytine	pyropheophytine	total pheo/total chlorophylliens (%)
<b>Loire</b>	<b>ZMT</b>	0,000	0,108	0,745	1,52
	<b>Av</b>	0,000	0,000	0,089	1,01
<b>Douro</b>		0,000	0,016	0,023	2,04
<b>Tamise</b>	<b>F</b>	0,000	0,000	0,017	0,98
	<b>ZMT</b>	0,000	0,045	0,153	3,58
	<b>Av</b>	0,000	0,000	0,000	0,00
	<b>F</b>	0,867	0,000	0,235	9,23
<b>Ems</b>	<b>ZMT</b>	0,591	0,000	0,206	15,04
	<b>Av</b>	0,220	0,000	0,046	9,32
<b>Elbe</b>	<b>F</b>	0,000	0,124	0,253	2,41
	<b>ZMT</b>	0,000	0,032	0,000	1,52
	<b>Av</b>	0,000	0,003	0,051	0,90
	<b>Sado</b>	0,579	0,000	0,167	13,65
<b>Rhin aut.</b>		0,000	0,000	0,000	0,00
<b>Rhin hiver</b>		0,133	0,065	0,032	34,22
<b>Rhin print.</b>		0,267	0,110	0,046	12,14
<b>Rhin été</b>		0,111	0,197	0,049	15,66
<b>Gironde aut.</b>	<b>F</b>				
	<b>ZMT</b>				
	<b>Av</b>				
<b>Gironde hiver</b>	<b>F</b>	0,096	0,059	0,013	13,42
	<b>ZMT</b>	0,110	0,073	0,032	29,05
	<b>Av</b>	0,078	0,110	0,053	30,25
<b>Gironde print.</b>	<b>F</b>	0,067	0,120	0,048	9,45
	<b>ZMT</b>	0,000	0,137	0,000	9,15
	<b>Av</b>	0,036	0,087	0,025	5,77
<b>Gironde été</b>	<b>F</b>	0,190	0,168	0,068	19,95
	<b>ZMT</b>	0,402	0,614	0,133	54,74
	<b>Av</b>	0,188	0,493	0,041	39,19
<b>Escaut aut.</b>	<b>F</b>	1,266	1,066	1,221	16,18
	<b>ZMT</b>	1,190	0,930	1,509	17,71
	<b>Av</b>	0,000	0,159	0,393	12,15
<b>Escaut hiver</b>	<b>F</b>	0,000	0,000	0,000	0,00
	<b>ZMT</b>	0,244	0,589	0,216	41,79
	<b>Av</b>	0,364	0,310	0,132	58,50
<b>Escaut print.</b>	<b>ZMT</b>	4,566	10,214	0,698	15,64
	<b>Av</b>	0,223	0,367	0,065	8,51
<b>Escaut été</b>	<b>F</b>				
	<b>ZMT</b>				
	<b>Av</b>				
<b>seine (mars)</b>	<b>F</b>	1,245	0,631	1,068	34,69
	<b>ZMT</b>	0,944	0,360	1,735	40,49
<b>seine (avril)</b>	<b>F</b>	0,000	2,029	0,000	18,23
	<b>Av</b>	0,000	0,941		17,68
<b>seine (juin)</b>	<b>F</b>	4,125	2,285	2,675	23,96
	<b>ZMT</b>	0,745	0,000	0,610	11,67
	<b>Av</b>	0,451	0,000	0,000	3,93
<b>seine (juillet)</b>	<b>F</b>	9,905	5,277	4,262	39,45
<b>seine (aout)</b>	<b>F</b>	6,955	0,199	2,490	20,55
	<b>ZMT</b>	29,901	1,826	6,249	42,59
	<b>Av</b>	1,569	0,014	1,359	19,34

**Tableau 3-2.** Résultats des mesures de phéopigments *a* moyennés par zones (F : fluviale, ZMT : zone de maximum de turbidité, Av : aval).

### 2-2-2. discussion

A cause de l'accumulation de la biomasse algale, la teneur en phéopigments dans le BV est généralement plus forte que dans les autres régions de l'estuaire. De plus, le rapport des phéopigments totaux sur la somme des produits chlorophylliens est également forte dans cette zone et reflète ainsi l'importance des processus de dégradation. Généralement, les formes pheophytines sont les plus courantes dans le BV, excepté dans l'Ems et la Seine (août). Ceci indiquerait que l'activité bactérienne hétérotrophe y est la voie majoritaire de la dégradation du phytoplancton (Bianchi, 1988; Goosen, 1999).

Le rapport des pheopigments *a* sur le total des produits chlorophylliens permet d'apprécier l'état des populations phytoplanctoniques et l'importance des processus de dégradation. Les valeurs les plus fortes du rapport ont été trouvées sur la Gironde, sur le Rhin, sur la Seine et sur l'Escaut montrant l'importance des phénomènes de dégradation dans ces 4 estuaires. Dans le Rhin et l'Escaut, le rapport est maximum pendant l'hiver et sur la Gironde et la Seine pendant l'hiver et l'été, alors que le printemps apparaît comme une période durant laquelle le phytoplancton est en pleine croissance caractérisée par un faible rapport. L'importance des processus de dégradation pendant l'été en Gironde et en Seine, reflété par un rapport élevé, est probablement relié à l'accroissement du temps de rétention des eaux et de la température pendant la période estivale.

Dans la Loire, le Douro, la Tamise et l'Elbe les pheophorbides n'ont pas été détectés et les rapports faibles à moyens sont attribués aux pheophytines seules indiquant un probable effet de la dégradation bactérienne (Bianchi, 1988; Goosen, 1999). Au contraire, dans le Sado, la Seine (août) et l'Ems les pheophorbides dominent, ce qui laisserait entendre que ce sont les phénomènes de broutage zooplanctonique qui sont majoritaires dans les phénomènes de dégradation (Barlow, 1993).

### 2-2-3. conclusions apportées par le suivi des phéopigments

Le calcul des rapports des pigments sur les pigments de dégradation a permis, de manière générale, de montrer l'importance du BV dans les processus de dégradation. Sur l'année, on observe une opposition entre deux périodes: Le printemps, pour lequel le rapport phéopigments/ chlorophylle *a* est faible, est une période de forte production de matériel frais; L'été et l'hiver, pour lesquels le rapport calculé est fort, due à l'augmentation de température et à la diminution du temps de résidence en période estivale et due à la présence de matériel moins frais en période hivernale.

### 3- Est-il possible de discerner la matière organique continentale grâce aux marqueurs pigmentaires ?

#### 3-1 introduction: utilisation d'index pigmentaires en milieu estuarien

La chlorophylle *b* et la lutéine sont des pigments accessoires présents chez toutes les Chlorophytes (Jeffrey, 1974). En 1990, Bianchi et Findlay proposent d'utiliser un rapport de la chlorophylle *b* sur la lutéine afin de distinguer les apports organiques aux systèmes aquatiques dus aux macrophytes émergées et immergées ainsi qu'aux végétaux supérieurs. Cet index est utilisé comme traceur des sources de la matière organique dans l'estuaire de l'Hudson et dans les sédiments (Bianchi *et al.* 1993<sub>a</sub>). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'un rapport proche de 1 est la signature de matériel d'origine terrestre, la concentration en lutéine étant plus importante chez les plantes vasculaires.

Comme il a été montré par Bianchi *et al.* (1991 & 1993<sub>b</sub>), le rapport de la chlorophylle *b* sur la lutéine est modifié par le niveau de dégradation du matériel étudié. Le taux de dégradation de la chlorophylle *b* étant plus élevé que celui de la lutéine, du fait des structures moléculaires différentes de ces 2 composés. Nous aurons donc une diminution de cet indice pendant la dégradation des végétaux. Afin d'utiliser correctement cet index, nous devons connaître le niveau de dégradation de l'échantillon étudié. Ainsi, nous avons choisi de suivre, en plus de ces 2 pigments, la concentration en pheopigments *b*. Il est nécessaire de prendre en compte cette nouvelle donnée pour calculer un index complet. En effet toutes les études montrent que l'utilité des pigments photosynthétiques comme biomarqueurs de la matière organique est largement dépendant du degré de dégradation et de la spécificité de la source.

Dans un premier temps, nous avons calculé l'index chlorophylle *b* / lutéine défini par Bianchi en 1990, auquel nous avons ajouté un index de dégradation donné par le rapport des phéopigments *b* ((chlorophylle *b* + pheophytine *b*) / chlorophylle *b*) sur la lutéine. Nous considérons ici que la part de la lutéine dégradée est largement inférieure à la chlorophylle *b* et est donc négligeable. Le résultat est représenté graphiquement dans les figures (3-4 a, b et c), les histogrammes entiers sont considérés comme une image du matériel initial, non dégradé et le niveau de dégradation est représenté par une combinaison des 2 rapports calculés. Tous ces rapports sont calculés en poids. Si on remplace la chlorophylle *b* par la phéophytine *b*, qui n'a pas le même poids moléculaire, l'erreur produite n'est que de 2.5% en poids.

Le but de l'étude présentée ici est d'appliquer, aux données in situ des estuaires, la combinaison des 2 indices définis plus haut et d'en évaluer leur utilité. Les estuaires sont des systèmes appropriés pour une évaluation critique de cette approche. Ils sont influencés à la fois par les apports terrigènes et aquatiques continentaux, par des blooms phytoplanctoniques autochtones et par des processus de dégradation renforcés particulièrement au sein du BV.

Type de végétaux	Chlorophylle b / lutéine
Formes émergées	
<i>Typha angustifolia</i>	1.32
<i>Nuphar advena</i>	1.21
<i>Pontederia cordata</i>	1.12
<i>Trapa natans</i>	1.29
<i>Scirpus fluviatilis</i>	1.04
Formes immergées	
<i>Vallisneria americana</i>	3.67
<i>Potamogeton sp.</i>	4.36
<i>Myriophyllum sp.</i>	3.89

**Référence :** Bianchi, 1991

**Tableau 3-3.** Valeurs de l'index (chl-b/lutéine) rapportées de la littérature

### 3-2 Résultats

Plusieurs études réalisées au laboratoire ont permis de calculer les rapports entre la chlorophylle *b* et la lutéine et parfois de suivre leurs évolutions face aux processus de dégradation. Ces études, dont les résultats sont présentés dans le tableau 3-4, montrent que le rapport décroît lorsque le matériel est dégradé et ce de manière plus efficace dans le cas de matériel algal que dans le cas de végétaux supérieurs, la litière de peuplier ne montre d'ailleurs pas de différence entre le rapport « frais » et après dégradation. D'autre part, on observe pas de différences entre les valeurs du rapport pour les formes émergées que pour les formes immergées.

Type de végétaux	Chlorophylle b / lutéine (Frais)	Chlorophylle b / lutéine (Dégradé –15 jours)
Formes immergées		
<i>Scenedesmus suspicatus</i>	5.4	0.1
<i>Chamydomonas sp.</i>	7.6	3.6
<i>Ulva</i>	0.01 ?	
<i>Zostera marina</i>	9.0	
<i>chaetomorpha</i>	6.5	
Formes émergées		
<i>Populus populi</i>	5.0	4
Litière	5.0	5
<i>Juncus</i>	3.7	
<i>Rubus</i>	5.4	
<i>Ulex</i>	8.2	
<i>Baccharis</i> (jeune)	2.4	
<i>Pinus</i> (jeune)	3.8	
<i>Pinus</i> (mature)	5.3	
<i>Pinus</i> (dégradé)	4.7	

**Tableau 3-4.** Valeurs de l'index (chl-b/lutéine) établies au laboratoire

### 3-3 Distribution *in situ* du rapport chlorophylle *b* / lutéine

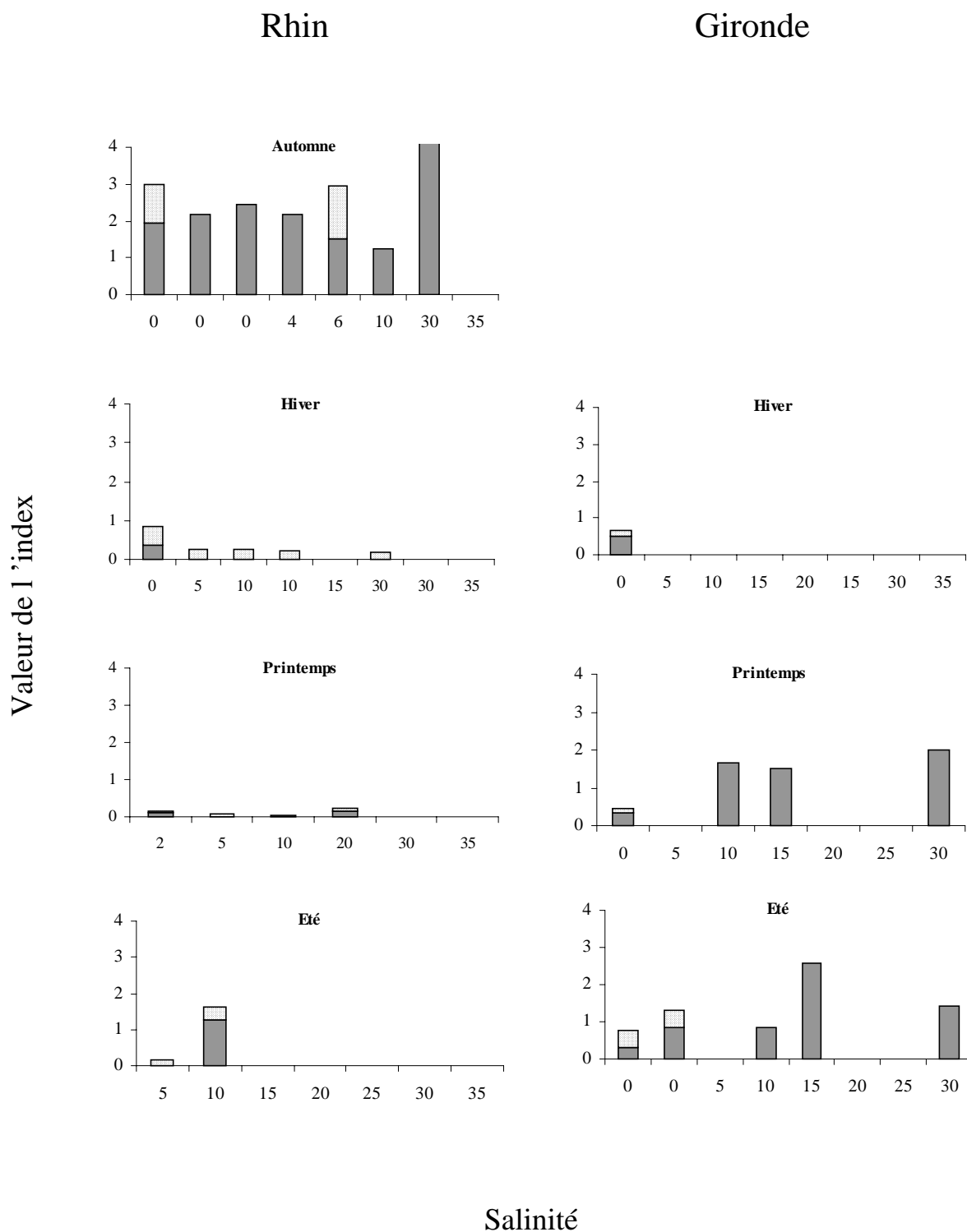
Dans le Rhin, l'automne est caractérisée par un fort rapport en aval indiquant la présence de matériel frais (phytoplancton ou plantes supérieures). Dans la partie fluviale et au niveau du BV (salinité 6 environ), on trouve un rapport plus faible suggérant une forte contribution de matériel dégradé. En hiver, sachant que la production phytoplanctonique est quasi nulle, la valeur de l'index sera plutôt attribuée à des végétaux supérieurs partiellement dégradés en amont et dilués dans l'estuaire. Pendant le printemps et l'été, on trouve un faible rapport, indice d'une faible dégradation. L'origine n'est pas clairement établie à cause des conditions hydrologiques sur le Rhin (faible temps de rétention et fort débit) faisant de cet estuaire un milieu très instable.

Sur l'Escaut à l'automne, on observe en aval un rapport élevé qui montre peu de dégradation on attribuera donc une telle configuration à une production algale autochtone. En amont, au niveau du maximum de turbidité, on retrouve des rapports fortement

dégradés provenant de phytoplancton et/ou de végétaux supérieurs en voie de dégradation. Pendant l'hiver, on observe de faibles rapports (voisin de 1) en amont mais pas de pheopigments. On pourra attribuer ceci à l'apport continental de végétaux supérieurs, la production phytoplanctonique étant très faible à cette saison; ce matériel semble ensuite dégradé lorsqu'il pénètre dans l'estuaire (rapport égal à 0.5 avec une proportion assez importante de pheopigments). Aux plus fortes salinités, on ne retrouve plus de chlorophylle *b* mais seulement de la pheophytine *b*. On a donc une dilution des produits dégradés tout au long de l'estuaire. Au printemps, l'absence de pheophytine *b* et une faible valeur de l'index nous laisse penser à une production d'algue phytoplanctonique dans la partie fluviale de l'estuaire. En été, dans la partie rivière on trouve un rapport très élevé malgré la part importante de matériel dégradé. Au niveau de la zone de turbidité maximum on observe toujours un matériel fortement dégradé, puis dans le milieu de l'estuaire on observe un rapport variant de 2 à 4 peu dégradé pouvant être rapporté à une production autochtone d'algue phytoplanctonique.

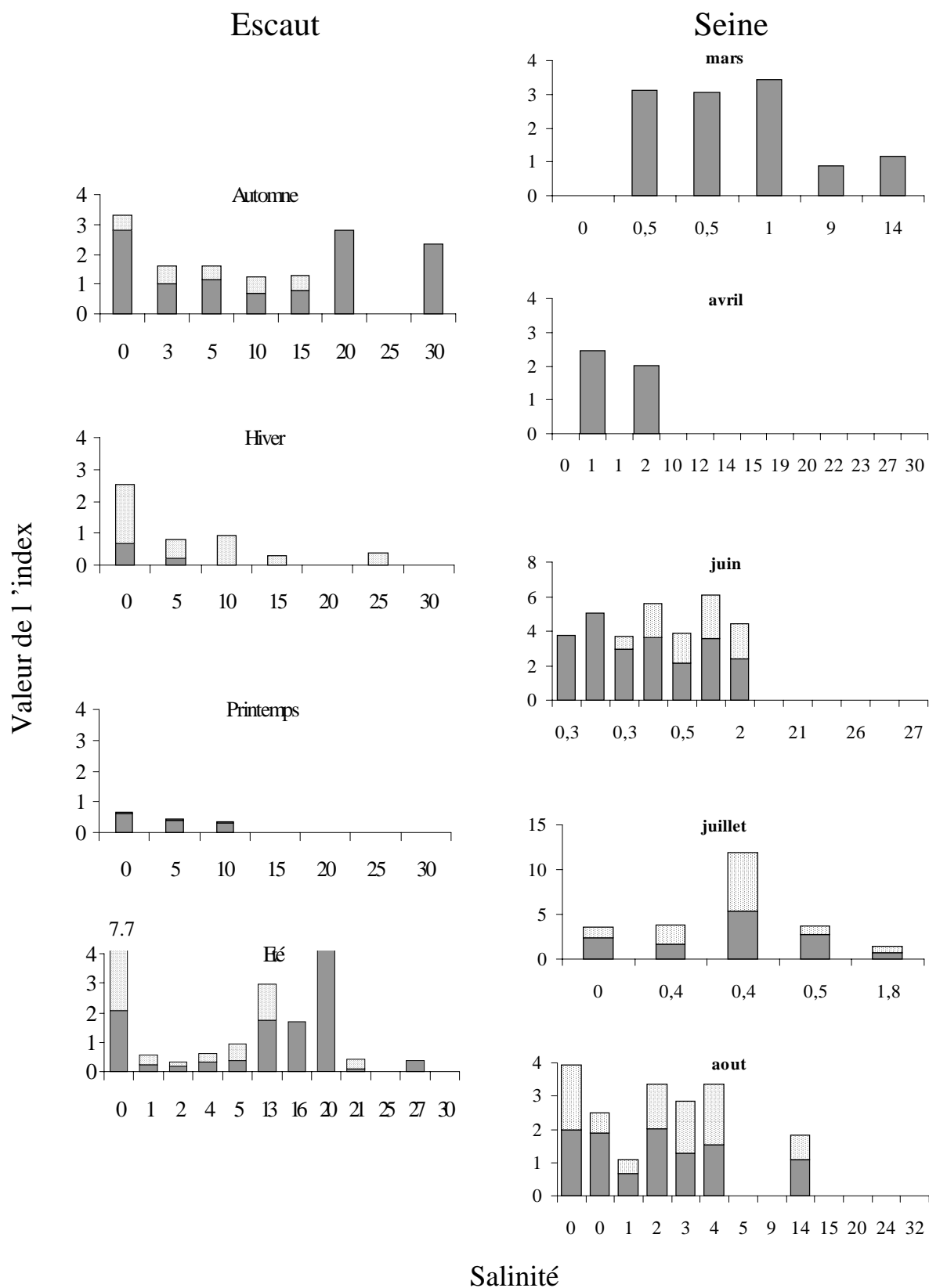
Pour la Gironde, on ne trouve pas de chlorophylle *b* en automne et l'hiver montre des rapports faibles et une partie des pigments sont dégradés. Au printemps, l'amont présente des rapports faibles et une grande partie des pigments sont dégradés tandis que dans la partie aval, des rapports plus importants et le peu de dégradation constatée, indique la présence de phytoplancton. En été, on retrouve à peu près la même distribution qu'au printemps. On observe également qu'entre les salinités 20 et 25 le rapport est nul (pas de chlorophylle *b*); par ailleurs on sait que dans cette partie de l'estuaire, deux autres populations se développent : les Diatomées et les Dinoflagellés (cf. chapitre 3-paragraphe 2-1). Les populations semblent donc se succéder le long du gradient de salinité de l'estuaire.

La Seine montre des valeurs d'index compris entre 3 et 4 et non dégradé pour les mois de mars et d'avril et en amont de l'estuaire. On penchera donc pour cette période pour une production d'algues phytoplanctoniques. Au mois de juin, nous avons des rapports un peu plus élevés mais on commence à observer des valeurs d'index dégradé dans une zone correspondant au BV. La production amont semble donc subir une dégradation lorsqu'elle pénètre dans l'estuaire. Pour les mois de juillet et d'août, on retrouve la même distribution avec des valeurs d'index montrant une dégradation de 20 à 50 % dans une zone correspondant au maximum de turbidité.

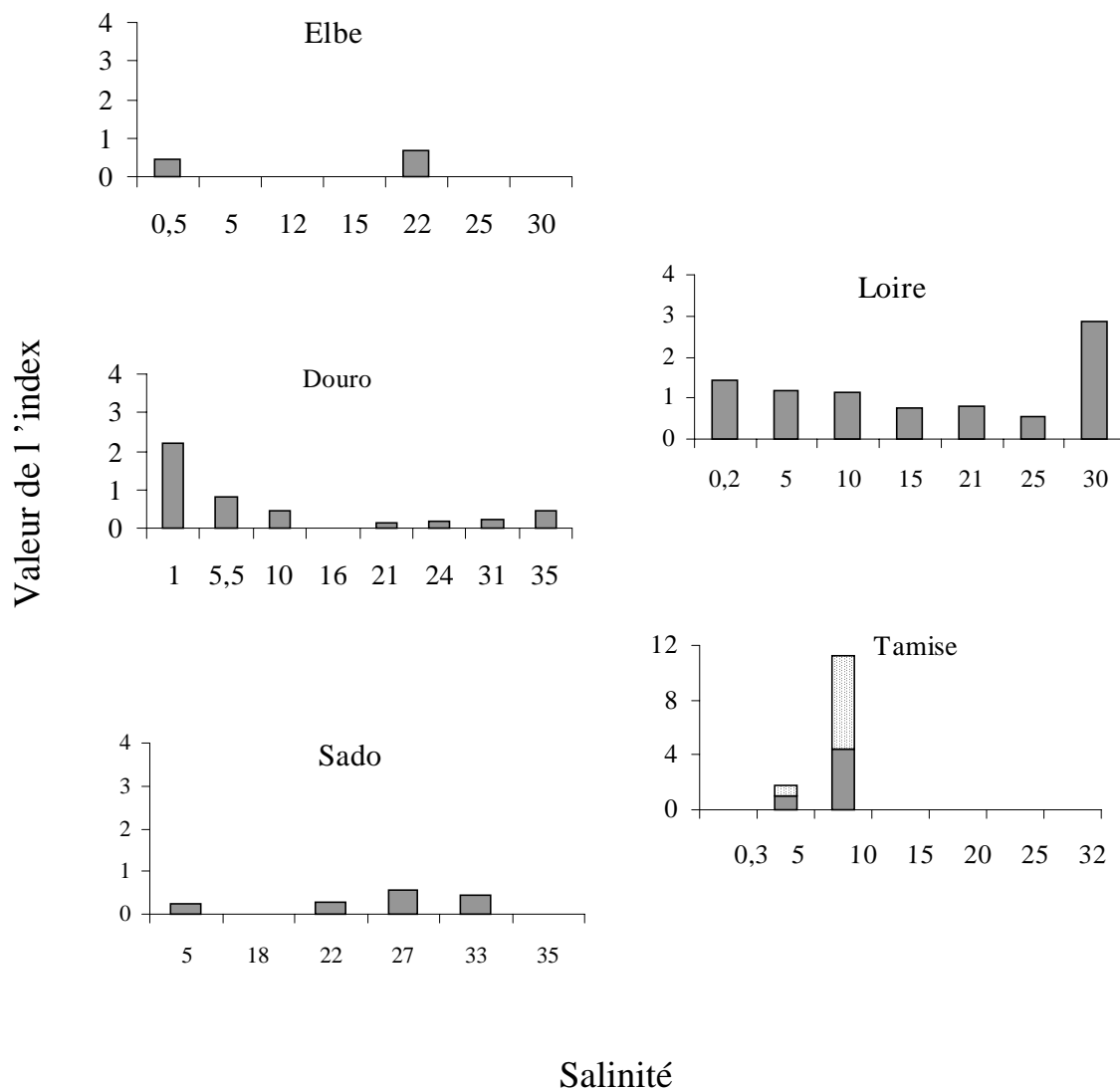


**Figure 3-4a.** Distribution de l'index (chl-b/lutéine) le long du gradient de salinité des estuaire du Rhin et de la Gironde (gris foncé : portion non-dégradé, gris clair : part dégradée).





**Figure 3-4b.** Distribution de l'index (chl-b/lutéine) le long du gradient de salinité des estuaires de l'Escaut et de la Seine (gris foncé : portion non-dégradé, gris clair : part dégradée).



**Figure 3-4c.** Distribution de l'index (chl-b/lutéine) le long du gradient de salinité dans les estuaires de la Tamise, de l'Elbe, du Sado, du Douro et de la Loire (gris foncé : portion non-dégradé, gris clair : part dégradée).

Nous n'avons pas trouvé de traces de chlorophylle *b* dans l'estuaire de l'Ems, par conséquent aucun rapport n'a pu être calculé. En ce qui concerne les estuaires de l'Elbe, de la Loire, du Douro et du Sado la valeur de l'index fluctue entre 0.3 et 3 mais aucune présence de pheopigments *b* n'a été détectée. Par ailleurs, la chlorophylle *b* et la lutéine ont aussi bien été décelées en amont qu'en aval de l'estuaire avec des valeurs du rapport fortes (3) dans la Loire pour des salinités supérieures à 30. On observe une distribution très différente sur la Tamise, où la valeur de l'index, quoique très élevée, montre une part fortement dégradée (plus de 60%). Cette concentration en pheopigments *b* se situe dans la zone de maximum de turbidité. Par ailleurs la campagne sur la Tamise a eu lieu en hiver et la production de phytoplancton y est quasi nulle.

Nous avons donc établi dans ces estuaires qu'en hiver on a, de manière générale, une dilution de matériel continental de la rivière à la mer. Au printemps, on observe plutôt l'augmentation des apports de matériel continental (phytoplancton ou végétaux supérieurs immergés ou non) frais dans l'estuaire. En été on note la présence systématique d'algues vertes et d'une forte dégradation en amont (au niveau du BV), certainement due à la forte activité bactérienne liée à l'augmentation de la température. A l'automne, les estuaires sont toujours productifs et la zone de dégradation se situe principalement au niveau du BV.

### **3-4 Discussion:**

Les résultats montrent clairement que la connaissance de la concentration en pheopigments associée à la valeur de l'index permet toutefois d'éliminer la difficulté majeure du suivi de l'index qu'est la dégradation différentielle. Ainsi, la signature que représente cet index, nous a permis de dissocier par exemple sur l'Escaut en été une zone de production autochtone de Chlorophytes en aval et par opposition une zone de dégradation de matériel continental de signature différente au sein du BV. L'étude du rapport chlorophylle *b* / lutéine dans les estuaires ne permet cependant pas de déterminer strictement les sources de la MO végétale apportée par la rivière et de les dissocier des productions autochtones de micro-algues, la variation de l'indice au sein d'un même groupe, principalement due à l'adaptation chromatique à la lumière, étant plus importante que la variation entre les groupes végétaux.

D'autres biomarqueurs ont été utilisés dans ces environnements afin de suivre le devenir et les sources de la MO. La lignine, important constituant des plantes vasculaires, constitue un excellent traceur de la matière apportée par la rivière. Le rapport C/N défini par

Redfield est connu pour refléter l'origine de la MO : les plus fortes valeurs étant attribuées aux sources terrigènes. Au contraire les faibles valeurs sont attribuées au phytoplancton et macroalgue marine, ces organismes étant enrichies en composés azotés. Ce rapport peut également traduire l'état de dégradation de la MO mais son interprétation reste délicate . Dans d'autres études, les acides gras sont utilisés pour déterminer les groupes phytoplanctoniques mais restent peu significatifs (Denant 1988). D'un autre côté l'étude du rapport des acides gras insaturés /saturés permet d'apprécier l'état de fraîcheur du matériel vivant. Lorsqu'on se trouve comme ici dans un milieu où les apports de MO par la rivière sont très importants, la combinaison des isotopes du carbone, de l'azote et du sulfure peut être utilisée pour distinguer les sources : plancton, plantes immergées et émergées (Peterson et al. 1985).

La reconnaissance des sources de la MO présente au sein de l'estuaire n'est donc pas chose aisée. La combinaison de plusieurs paramètres peu éventuellement parer au manque de précision d'un seul type de mesure.

### **3-5. conclusion: réponse apportée et intérêt de l'utilisation de l'index comme marqueur de la MO continentale?**

La valeur de l'index associée aux concentrations en phéopigments *b* est d'un double intérêt: il permet de dissocier, sur un estuaire donné, des lots de matière organique de signatures différentes ayant des origines diverses même si celles-ci ne sont pas clairement identifiables; et donne la possibilité de contrôler le niveau de dégradation propre de ces groupes de matière organique.

### **4- conclusion générale.**

- L'étude des estuaires couvrant toute la **zone tempérée** ouest européenne montre d'un estuaire à un autre des **variations homogènes des communautés phytoplanctoniques** (mêmes groupes phytoplanctoniques, mêmes distributions saisonnières de ces derniers).

- Les différences marquantes entre ces estuaires tiennent en fait à leurs paramètres hydro-sédimentologiques en relation avec leur géomorphologie : les temps de rétention des eaux et des particules, la biomasse totale, les teneurs en MES et les apports azotés (impact

humain) permettent d'identifier trois grands types d'estuaires dont **l'Escaut, Le Rhin et la Gironde sont parfaitement représentatifs.**

- Si on cherche à appréhender l'état de maturation de la MO au sein de l'estuaire, on observe généralement que le **BV constitue une importante zone de dégradation** et que des contrastes saisonniers marqués existent : le printemps où le phytoplancton, en bon état de « fraîcheur », peut représenter une part significative de la MO totale ; l'hiver, à l'opposé, où la MO est essentiellement détritique.

- Il n'a pas été possible à l'aide de marqueurs pigmentaires, de **différencier les MO** autochtone d'origine fluviale, estuarienne ou marine, ni même de séparer la MO d'origine allochtone et autochtone. Toutefois, certains indices pigmentaires (chl-b/lutéine) ont permis d'individualiser, dans les estuaires eux-mêmes, des lots différents de MO, sans que l'on puisse systématiquement et avec certitude leur attribuer une origine précise.

Suite à une analyse par HPLC, au protocole somme toute relativement aisé, l'identification et la quantification des pigments constituent indéniablement un outil efficace pour le suivi des assemblages phytoplanctoniques en milieu estuarien. De plus, ces composants constituent un atout majeur dans l'étude de l'état de maturation de la matière organique phytoplanctonique par la quantification des phéopigments.



*Chapitre 4* – Evaluation des cinétiques et voies  
de dégradation des pigments





## Chapitre 4 : Détermination des cinétiques et voies de dégradation des pigments.

Les estuaires sont des écosystèmes où les activités biologiques autotrophes et hétérotrophes sont particulièrement intenses : d'une part, les apports de sels nutritifs par les fleuves favorisent les floraisons phytoplanctoniques et, d'autre part, les apports de matière organique favorisent l'activité hétérotrophe (Goosen *et al.*, 1999 ; Heip *et al.*, 1995). Dans les estuaires macrotidaux, les activités autotrophe et hétérotrophe sont en grande partie contrôlées par la turbidité. La pénétration de la lumière dans le BV étant très faible (cf. chapitre 1), la photosynthèse y est limitée (Cole *et al.*, 1992 ; Irigoien & Castel, 1997). Au contraire, ce BV constitue un lieu particulièrement propice à l'installation d'une abondante communauté de bactéries hétérotrophes (de l'ordre de  $10^7$  bactéries.ml<sup>-1</sup> dans la Gironde) qui se fixent sur les particules (Crump *et al.*, 1998). Pour ces raisons, les activités autotrophes et hétérotrophes sont faiblement couplées en milieu estuarien macrotidal (Findlay *et al.*, 1991). La production primaire est maximale dans le fleuve en amont du BV et aux plus hautes salinités en aval du BV tandis que la respiration et la production bactérienne sont maximales dans le BV (Goosen *et al.*, 1999). Globalement, la respiration excède la production primaire dans les estuaires (Gattuso *et al.*, 1998) , et constitue à ce titre une source de CO<sub>2</sub> pour l'atmosphère (Frankignoulle *et al.*, 1998).

De la même manière que nous nous sommes servi de l'analyse des pigments par chromatographie en phase liquide dans le chapitre précédent afin de quantifier l'importance relative des différents groupes phytoplanctoniques à l'aide de leur signature pigmentaire (Barlow *et al.*, 1997 ; Bianchi *et al.*, 1996 ; Roy *et al.*, 1996), nous avons utilisé l'analyse des pigments pour suivre les cinétiques et les voies de dégradation du matériel pigmentaire sous l'action du broutage zooplanctonique et/ou de l'activité bactérienne à l'aide notamment des produits de dégradation des chlorophylles (cf. chapitre 4B). Ces deux types d'informations ont

aussi été obtenues en milieu côtier et en milieu estuarien peu turbide où le phytoplancton est la principale source de pigments dans la colonne d'eau (Ahel *et al.*, 1996 ; Tester *et al.*, 1995 ; Veyssy *et al.*, 1999). Au contraire, dans les estuaires macrotidaux turbides, la matière organique particulaire (MOP) allochtone est souvent majoritaire et contribue de manière significative au signal pigmentaire des eaux, ce qui complique considérablement l'interprétation des distributions de pigments (Bianchi *et al.*, 1993 ; Letelier *et al.*, 1993).

Ce chapitre est donc composé de deux parties A et B. Dans la première partie, les résultats des expérimentations sur les évaluations des cinétiques de dégradation de la MO végétale dans le BV seront présentés. Dans la seconde partie, une expérience mettant en jeu des processus de broutage et de dégradation bactérienne est décrite. Ces derniers résultats ont permis de définir les voies de dégradation des produits chlorophylliens en fonction des processus choisis.

## Partie A - Evaluation des cinétiques de dégradation

### 1- Introduction

Dans cette partie une série d'expérimentations nous ayant amené à mieux cerner les cinétiques des processus de dégradation des pigments de la MOP végétale de l'estuaire sera présentée. En effet, la MOP d'origine végétale au sein de l'estuaire est issu soit de la production phytoplanctonique autochtone et de celle apportée par le fleuve et la marée, soit de végétaux supérieurs provenant principalement des litières lessivées sur le bassin versant et des macrophytes installées sur les berges, qui contiennent entre autre, tout comme les chlorophytes, de la chlorophylle *b* et de la lutéine. Or, chez les végétaux supérieurs, les pigments sont protégés par des composés structuraux (lignine, cires et cellulose) et cellules contenant ces pigments ont probablement une durée de vie prolongée dans le BV comparé aux mêmes pigments d'origine phytoplanctonique (Bianchi & Findlay, 1991 ; Bianchi *et al.*, 1991). Ainsi un même pigment sera dégradé plus lentement lorsqu'il est issu de végétaux supérieurs que lorsqu'il provient du phytoplancton. Cette propriété confère donc aux mesures de pigments un intérêt en tant que traceur de la dégradation de MOP d'origines diverses.

Au cours de cette étude nous avons suivi la dégradation de matériel phytoplanctonique dans le BV par une approche *in vitro*. L'objectif que nous nous sommes fixé ici est de déterminer les cinétiques de dégradation des pigments marqueurs de la MOP d'origine végétale : le phytoplancton et les végétaux supérieurs sous l'action de divers paramètres et processus : **les MES, l'oxygène, la température et le type de matériel végétal**. Le schéma général des expérimentations, dont les résultats sont discutés dans ce chapitre, est décrit dans le chapitre 2, paragraphe 3-2. Le déroulement spécifique de chaque expérience est repris dans les paragraphes correspondant.

## 2 -Influence des MES sur la cinétique de dégradation de la MO

Nous avons choisi de suivre la dégradation de micro-algues dans le BV de la Gironde. Le groupe phytoplanctonique choisi est les Chlorophycées, celui-ci étant bien représenté en milieu fluvial amont (Etcheber, 1983). Le matériel algal utilisé, obtenu par culture, a été incorporé et mélangé avec des échantillons d'eau du BV. L'évolution temporelle de trois pigments marqueurs (chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et lutéine) des Chlorophycées et de leurs produits de dégradation a été suivie au cours de deux expériences différentes. La première consiste à cerner l'influence des MES sur la dégradation des pigments de la micro algue suivie. La seconde consiste à confirmer l'action des bactéries attachées aux particules dans la dégradation des pigments.

### 2-1. Déroulement des expériences

L'effet de la turbidité sur la dégradation des pigments a été étudié au cours d'une série de 2 expériences. La première a pour but de cerner l'effet des MES sur la dégradation du matériel phytoplanctonique et la seconde l'effet des bactéries attachées aux particules sur ce même matériel phytoplanctonique.

#### 2-1-1. Influence de la concentration en MES.

Réacteurs	3 réacteurs de teneurs respectives en MES : RC = 0,00 g.l <sup>-1</sup> ; R1 = 0,38 g.l <sup>-1</sup> ; R2 = 0,78 g.l <sup>-1</sup>
Conditions testées	T° = 20°C ; bien oxygéné
Matériel végétal utilisé	<i>Scenedesmus suspicatus</i>
Echantillonnage	1, 3, 7, 14 et 28 jours
Analyse	Pigments ; carbone organique particulaire (COP)

**Tableau 4-1.** Détail du matériel et méthodes utilisés pour tester l'influence de la concentration des MES.

Des inoculi de culture d'algues ont été introduits dans les trois réacteurs, à raison de 25 µg et 50 µg de chlorophylle *a* par gramme de particules dans le réacteur R1 et R2 respectivement, ce qui correspond aux apports fluviaux de phytoplancton dans le bouchon vaseux pendant la période estivale (Veyssy *et al.*, 1999). Le réacteur de contrôle (RC) a reçu une quantité équivalente de chlorophylle *a* correspondant à 36 µg.l<sup>-1</sup>. La concentration en

chlorophylle *a* était de 1,3  $\mu\text{g.l}^{-1}$  dans l'échantillon fraîchement prélevé de BV avant introduction de l'algue, et, de 37,8  $\mu\text{g.l}^{-1}$  après inoculation. Seule la chlorophylle *a* était quantifiable dans l'échantillon de BV avant inoculation, les autres pigments présent n'a pu être détectés dans notre échantillon (prélèvements effectués au mois de février). La durée de l'incubation a été fixée a un mois (28 jours).

#### 2-1-2 Influence de l'oxygène.

Pour cette expérience un échantillon de crème de vase a été incubé sans agitation pendant toute la durée de l'expérience à l'exception des moments de prélèvements. Cette expérience constitue une étape préliminaire dans l'étude de ce paramètre.

Réacteurs	1 réacteur de teneurs en MES : 140 g/l
Conditions testées	T° = 20°C ; sans oxygène
Matériel végétal utilisé	<i>Scenedesmus suspicatus</i>
Echantillonnage	1, 3, 7, 14 et 28 jours
Analyse	Pigments

**Tableau 4-2.** Détail du matériel et méthodes utilisés pour tester l'influence de l'oxygène.

Pour connaître l'état d'oxygénation dans le milieu, nous avons utilisé une mini électrode à oxygène introduite dans le réacteur. Au temps  $t_0$  de cet expérience, nous avons agité l'échantillon puis nous l'avons laissé décanter sans agitation. Après une dizaine de minutes, on obtient dans tout l'échantillon un état d'anoxie. Tout l'oxygène de la colonne d'eau a été consommé. Après décantation, on observe une ré-oxygénation de la colonne d'eau par diffusion de l'atmosphère. En abaissant l'électrode au niveau de la crème de vase déposée, on observe à nouveau l'anoxie. Les pigments présents dans ce milieu ont donc été soumis à cette anoxie durant les 28 jours de l'incubation.

#### 2-1-3. Influence de la communauté bactérienne.

Au cours de cette expérience des incubations de même type que celles décrites pour l'expérience 1 ont été réalisées en comparant pour une même turbidité, la variation des teneurs en pigments dans un incubateur contenant un échantillon de BV stérilisé (réacteur stérile RS) d'une part et, d'autre part, un incubateur contenant un échantillon de BV non stérilisé (réacteur non stérile RNS).

Réacteurs	2 réacteurs de teneur en MES = 3.00 g.l <sup>-1</sup> ; un réacteur stérilisé (RS) et un non stérilisé (RNS)
Conditions testées	T° = 20°C ; bien oxygéné
Matériel végétal utilisé	<i>Chlamydomonas sp</i> – cultivée de manière axénique
Echantillonnage	0, 3, 7, 14 et 28 jours
Analyse	Pigments ; dénombrement bactérien

**Tableau 4-3.** Détail du matériel et méthodes utilisés pour tester l'influence des bactéries .

L'échantillon de bouchon vaseux ( concentration en MES=3 g.l<sup>-1</sup>) a été stérilisé 2 fois pendant 40 minutes à 121°C afin d'éliminer toutes les bactéries, même sporulantes. La culture d'algues vivantes a ensuite été mélangée dans 5 litres du bouchon vaseux stérilisé (RS) et non stérilisé (RNS), dans la proportion de 50 µg de chlorophylle *a* par gramme de particules. Le mélange a ensuite été incubé comme décrit précédemment avec une souche axénique de *Chlamydomonas sp*. Le réacteur stérile a cependant été modifié : il s'agit d'une enceinte fermée, où de l'air filtré (0,2 µm ) est propulsé pour assurer l'oxygénation et dans lequel les aliquotes ont été prélevées de manière aseptique à la flamme. De la même manière que précédemment, la durée de l'incubation a été fixée a un mois (28 jours).

## 2-2 résultats

Le choix de l'ordre de la cinétique n'est pas évident même si une cinétique d'ordre 1 est décrite dans le cas des caroténoïdes en milieu aqueux (Minguez-Mosquera *et al.*, 1995 ; Bianchi & Findlay, 91 ; Nelson, 93). Pour des raisons pratiques, nous avons calculé le facteur  $k$  de la cinétique de la manière suivante :  $k = 1/C_0 (dC / dt)$ .

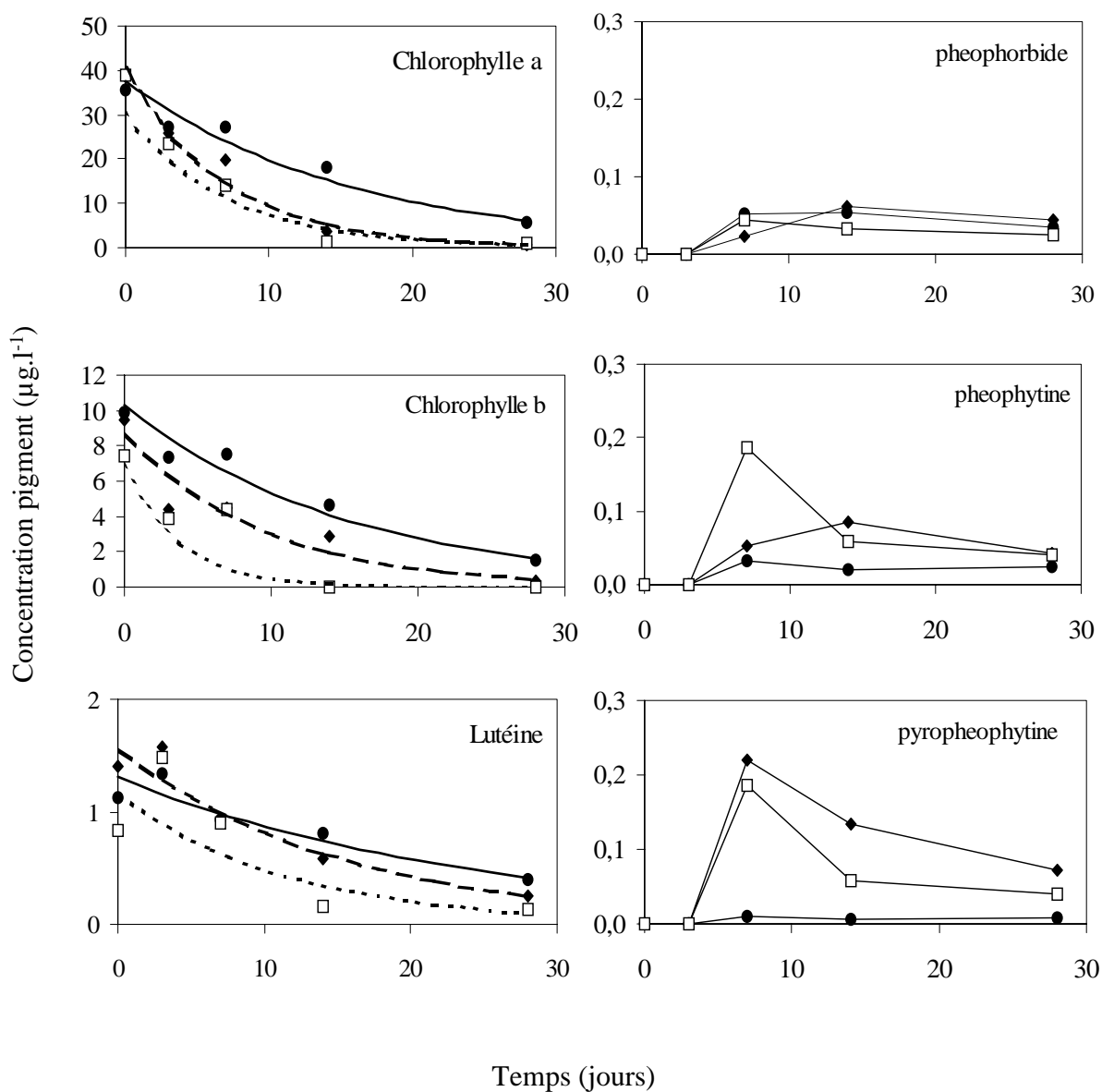
### 2-2-1. Influence de la concentration en MES.

Les concentrations des trois pigments (chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et lutéine) décroissent rapidement lors des 15 premiers jours d'incubation dans R1 et R2 (figure 4A-1). La lutéine augmente au début de l'incubation. Ce phénomène peut être attribué à une adaptation pigmentaire de l'algue aux nouvelles conditions auxquelles elle est soumise (Lemaire *et al.*, sous presse). On observe très nettement pour les trois pigments une dégradation plus rapide en présence de particules du BV (R1 et R2) qu'en l'absence de particules (RC). Les produits de dégradations de la chlorophylle *a* (phaeophorbide, phaeophytine et pyropheophytine) montrent une double cinétique : ils s'accumulent pendant la deuxième semaine (entre 8 et 13 jours), puis diminuent. La présence de MES favorise la production de phaeophytine *a* et de pyropheophytine *a*, mais ne semble pas avoir d'influence sur la phaeophorbide *a*.

La mesure de la cinétique de disparition des pigments donne les résultats suivants :

	RC	R1	R2
Lutéine :	0.021 j <sup>-1</sup>	0.040 j <sup>-1</sup>	0.058 j <sup>-1</sup>
Chlorophylle <i>b</i> :	0.038 j <sup>-1</sup>	0.050 j <sup>-1</sup>	0.071 j <sup>-1</sup>
Chlorophylle <i>a</i> :	0.035 j <sup>-1</sup>	0.065 j <sup>-1</sup>	0.068 j <sup>-1</sup>

Cette cinétique est d'autant plus grande que le nombre de particules présentes dans le réacteur est important. Quelque soit la concentration en MES la lutéine se dégrade moins vite que la chlorophylle *a* puis la chlorophylle *b* qui semble être le plus labile des trois pigments suivis.



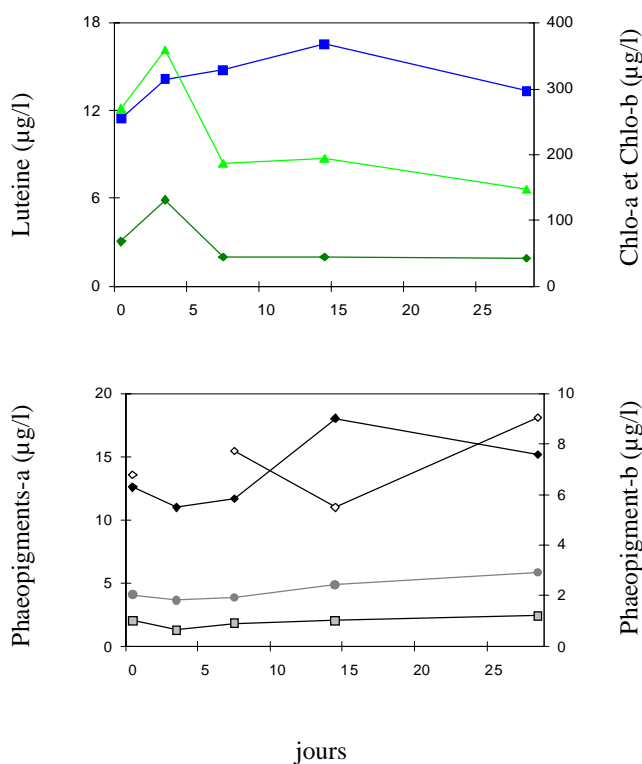
**Figure 4A- 1.** Distribution des pigments et produits de dégradation au cours du temps dans les 3 réacteurs de l'expérience : ● R C (0.00 g de MES.l<sup>-1</sup>) ; ◆ R 1(0.38 g de MES.l<sup>-1</sup>) ; □ R 2 (0.78 g de MES.l<sup>-1</sup>) .



Au maximum de production de pheopigments (entre 7 et 15 jours) le rapport chlorophylle *a* / pheopigments totaux est égal à 52. Cette valeur est élevée par rapport aux autres études *in vitro* pour lesquelles on observe des valeurs comprises entre 5 et 20 (Bianchi & Findlay, 1991 ; Bianchi et al., 1991).

### 2-2-2 Influence de l'oxygène.

Au niveau de la crème de vase, les teneurs en pigments ne varient pratiquement pas. Une augmentation des chlorophylles *a* et *b* est tout de même observée à 3 jours (figure 4A-2). Dans les échantillons de crème de vase, on observe très peu de formation de pheopigments en dehors de ceux déjà présents au début de l'expérience et ceux sont les phaeophytines *a* et *b* qui dominent.



**Figure 4A-2.** Suivi des teneurs en pigments (■ chlorophylle *a* ; ■ chlorophylle *b* et ■ luteine) et pheopigments (◆ phéophytine *a* ; ● phéophorbide *a* ; □ pyrophéophytine *a* ; ◇ phéophytine *b*) dans les réacteurs contenant la crème de vase au cours du temps.

### 2-2-3. Influence de la communauté bactérienne.

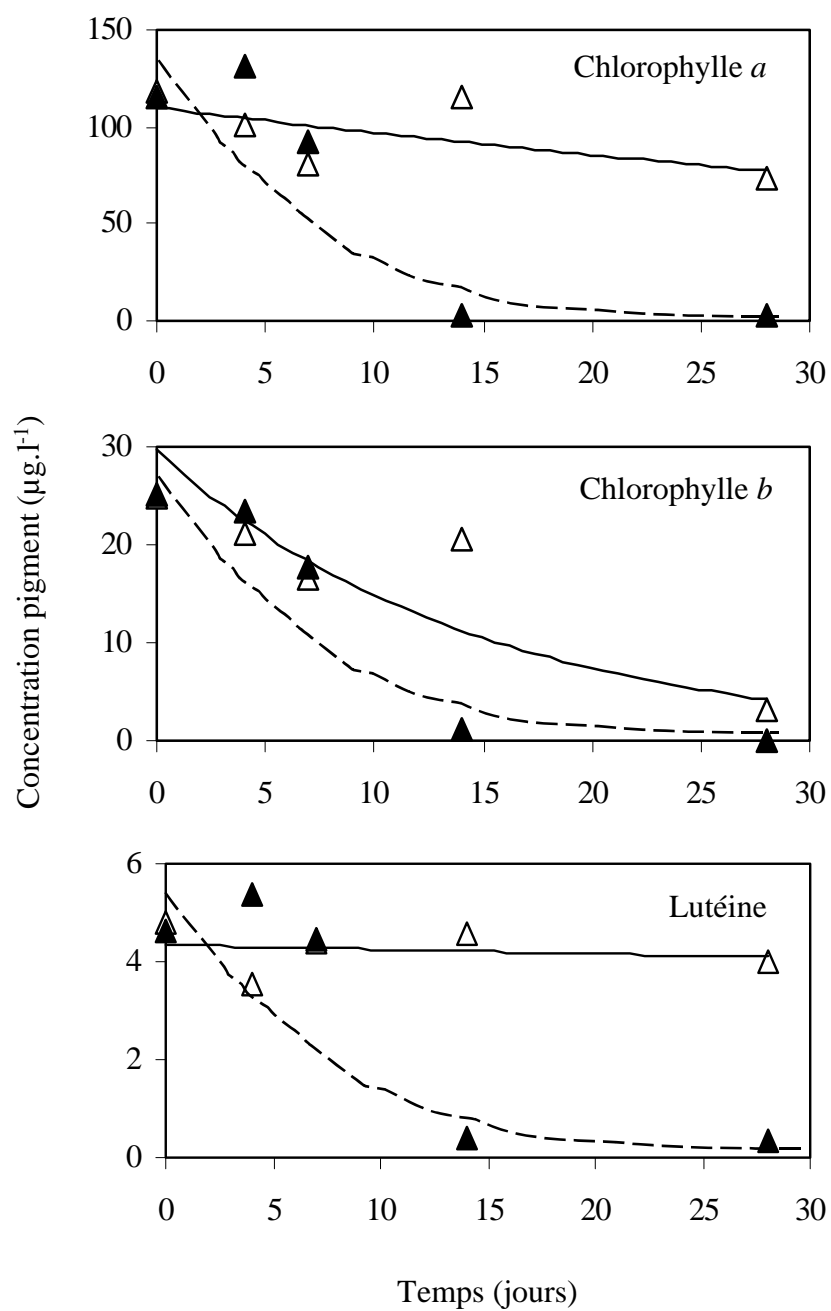
On constate également ici une augmentation de la concentration des pigments dans le réacteur RNS entre 0 et 3 jours, attribuée à l'adaptation de l'algue aux nouvelles conditions du milieu (figure 4A-3). L'évolution des concentrations dans les deux réacteurs est différente. Au niveau des échantillons non-stériles, l'évolution va vers une décroissance nette des teneurs des trois pigments suivis. Dans le réacteur RS, à l'inverse, on n'observe pas de décroissance de la chlorophylle *a* et de la lutéine et une décroissance de la chlorophylle *b* plus faible que dans le réacteur RNS.

Les dénombrements des bactéries totales révèlent une teneur de  $10^6$  UFC (unités formant colonie) par litre dans les deux réacteurs ce qui indique une contamination du réacteur RS. Cependant, l'isolation de souches bactériennes montre la présence d'une communauté diversifiée dans le réacteur RNS tandis qu'une seule souche a été observée dans le réacteur RS. L'observation au microscope révèle qu'il s'agit d'un bacille gram négatif de type vibrio, non sporulant provenant d'une contamination lors de la mise en culture de l'algue ou de l'incubation.

La mesure de la cinétique de disparition des pigments donne les résultats suivants :

	RS	RNS
Lutéine :	$0.007 \text{ j}^{-1}$	$0.065 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>b</i> :	$0.031 \text{ j}^{-1}$	$0.068 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>a</i> :	$0.014 \text{ j}^{-1}$	$0.070 \text{ j}^{-1}$

Les résultats de cinétiques montrent une nette différence entre l'action de l'échantillon de BV stérile et le non-stérile. Ces valeurs sont jusqu'à 10 fois plus importante pour la luteine lorsqu'on se trouve en présence d'un pool bactérien naturel. Si on compare les pigments suivi, la lutéine paraît être également ici plus réfractaire que les chlorophylles.



**Figure 4A-3.** Suivi des pigments au cours du temps dans les réacteurs stérile et non-stérile (△ stérile ; ▲ non-stérile).

### 2-3 discussion

Nous avons constaté une dégradation des pigments pendant toute la durée des expériences, en dehors d'un pic de pigments après 3 jours d'incubation qui semble être une adaptation pigmentaire de la communauté algale aux nouvelles conditions.

Les phases de la dégradation, pour un paramètre choisi, peuvent être décrites par un autre modèle composé de deux phases. La première croissante pendant les premiers jours puis une phase décroissante jusqu'à la fin de l'expérimentation. Cependant le manque de points de mesure ne nous a pas permis de corroborer ce modèle de manière systématique.

L'action des particules comme accélérateur de la dégradation des pigments du phytoplancton a donc bien été montrée. On note que dans le milieu estuarien, une grande partie des bactéries sont attachées aux particules et que celles-ci montrent une activité métabolique importante (Hernandez-Palomino, 1997). Lors de la filtration du BV (sur GF/F, 0.7 $\mu$ m) nous avons, en plus de la séparation des particules et du dissous, fait une sélection dans la communauté bactérienne. Ainsi, dans le réacteur RC il ne reste que les bactéries dites libres, le pool bactérien est donc plus faible au sein du réacteur de contrôle. Les résultats de cinétique de disparition des pigments confirment des résultats connus dans la littérature et montrant une dégradation différentielle entre les pigments. Ainsi la lutéine est systématiquement plus réfractaire que les chlorophylles, la chlorophylle b paraissant être la plus fragile.

Par ailleurs, nous avons pu remarquer que, dans le cas de la crème de vase, où les MES sont concentrées à plus de 140 g/l, les pigments ne sont pas ou peu dégradés. La seule différence physico-chimique avec les autres réacteurs est l'absence d'oxygène. Plusieurs études sur les dégradations de pigments ont montré que l'oxygène était le facteur clé de cette dégradation. D'autres facteurs comme la lumière ou la température sont des accélérateurs seulement en présence d'O<sub>2</sub> (Leavitt, 1988). L'oxygène jouerait sur la dégradation en augmentant le taux d'activité bactérienne et pas par action directe car nous n'avons pas trouvé ici de molécules formées avec l'O<sub>2</sub> du groupes 5,6-epoxy (Leavitt, 1988).

La troisième expérience menée sur le rôle des bactéries permet de répondre au doute qui pouvait rester à l'issue de la première expérience en ce qui concerne l'action biotique ou abiotique des particules. Cette expérience cible, en effet, le rôle des bactéries dans la dégradation du matériel phytoplanctonique dans le BV de l'estuaire de la Gironde, et confirme

l'action de la population bactérienne naturellement présente dans le milieu comme cela a déjà pu être montré dans des sédiments lacustres (Leavitt, 88). Les résultats des calculs de cinétique montrent eux aussi clairement l'impact positif des bactéries du milieu sur la dégradation des pigments du phytoplancton. Le milieu du bouchon vaseux peut être assimilé à un milieu sédimentaire de surface où l'oxygénation reste suffisante pour stimuler la dégradation des pigments de manière chimique ou par stimulation de l'activité bactérienne (Steenbergen et al., 94 ; Leavitt, 88).

### 3 -Influence de la température

Comme pour l'expérience précédente, nous avons choisi de suivre la dégradation de Chlorophytes et de Diatomées dans des échantillons provenant du BV de la Gironde, ces groupes étant bien représentés en milieu fluvial amont (Etcheber, 1983). Le matériel algal obtenu par culture a été incorporé et mélangé avec des échantillons d'eau du BV et, l'évolution temporelle des pigments marqueurs de ces groupes (chlorophylle *a*, fucoxanthine, chlorophylle *b* et lutéine) et de leurs produits de dégradation a été suivie. L'effet de la température sur la dégradation des pigments a été, en particulier, étudié au cours de cette expérience en utilisant 2 groupes algaux différents.

#### 3-1 Déroulement de l'expérience

Réacteurs	3 réacteurs de teneur en MES = 440 mg.l <sup>-1</sup>
Conditions testées	T <sub>1</sub> = 5°C ; T <sub>2</sub> = 25°C ; bien oxygéné
Matériel végétal utilisé	<i>Scenedesmus suspicatus</i> et <i>Asterionella formosa</i>
Echantillonnage	à 0, ½, 3, 7, 14 et 22 jours
Analyse	Pigments ; carbone organique particulaire (COP) ; dénombrement bactérien ; respiration

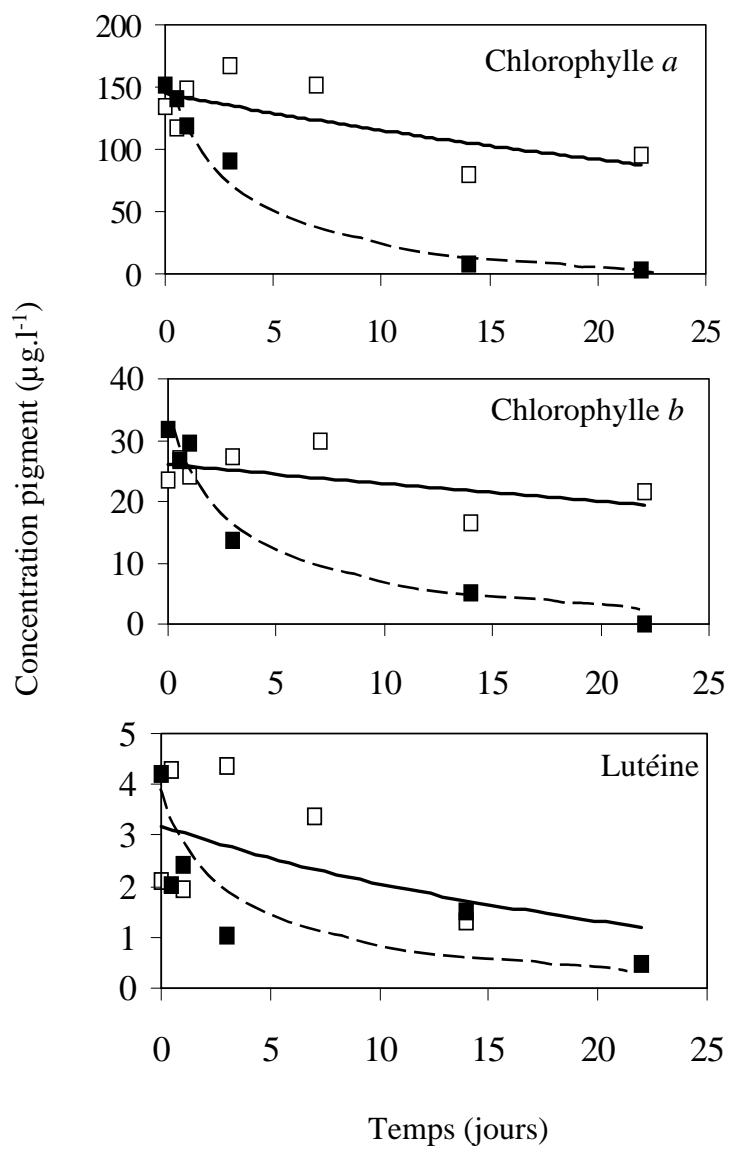
**Tableau 4-3.** Détail du matériel et méthodes utilisés pour tester l'influence de la température .

Le premier réacteur est maintenu à 5°C, le second à 25°C, couvrant ainsi la gamme de température existante sur les estuaires en zone tempérée. La concentration en chlorophylle *a* était de 0.3 µg.l<sup>-1</sup> dans le BV avant introduction des algues, de 135 µg.l<sup>-1</sup> après inoculation dans les réacteurs contenant la Chlorophycée et de 1.0 µg.l<sup>-1</sup> dans les réacteurs contenant la Diatomée. La durée de l'incubation a été fixée à trois semaines (22 jours).

#### 3-2 résultats

##### 3-2-1. Distribution des pigments.

Seule la chlorophylle *a* était quantifiable dans l'échantillon de BV avant inoculation, la chlorophylle *b* et la lutéine étant en dessous du seuil de détection



**Figure 4A-4.** Suivi des pigments au cours du temps dans les réacteurs pour les 2 températures testées (□ 5°C ; ■ -25°C) pour les Chlorophycées.

Les résultats des teneurs en pigments de l'expérience sur les diatomées ne sera pas présenté. En effet il nous a été difficile d'obtenir une culture suffisamment dense pour que l'image pigmentaire soit lisible tout au long de l'expérimentation. La teneur en chlorophylle *a* à  $t_0$  dans les réacteurs n'est que de  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  et donc rapidement non identifiable lors de la dégradation des cellules.

La tendance globale, dans les mesures effectuées sur les chlorophycées (figure 4A-6), est une disparition plus rapide des pigments à  $25^\circ\text{C}$  qu'à  $5^\circ\text{C}$ . Avec une différence moins marquée pour la lutéine.

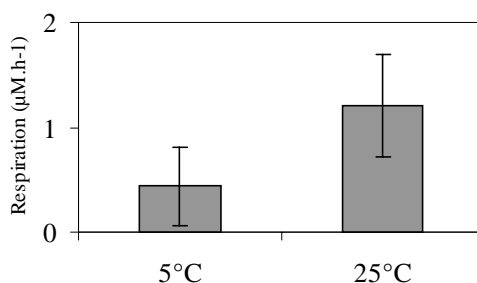
Le calcul des cinétiques de dégradation des pigments suivies donne les résultats suivant :

	$5^\circ\text{C}$	$25^\circ\text{C}$	$20^\circ\text{C}$ (RC page 100)
Lutéine :	$0.027 \text{ j}^{-1}$	$0.046 \text{ j}^{-1}$	$0.021 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>b</i> :	$0.021 \text{ j}^{-1}$	$0.060 \text{ j}^{-1}$	$0.038 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>a</i> :	$0.029 \text{ j}^{-1}$	$0.068 \text{ j}^{-1}$	$0.035 \text{ j}^{-1}$

La distribution des cinétiques entre les pigments est plus homogène à  $5^\circ\text{C}$  qu'à  $25^\circ\text{C}$  où on retrouve une distribution équivalente à celle rencontrée lors de l'expérience de dégradation des chlorophycées pour des teneurs variables en MES. Cette distribution montrait une plus grande résistance de la lutéine par rapport aux chlorophylles.

### 3-2-2. Respiration et contenu bactérien.

Nous avons suivi l'évolution du nombre de bactéries par dénombrement classique sur gélose nutritive et également la respiration sur 48 heures par mesure de l'oxygène dissous pour chaque prélèvement.



**Figure 4A-5.** Suivi des respirations dans les réacteurs au cours du temps pour les 2 températures testées .

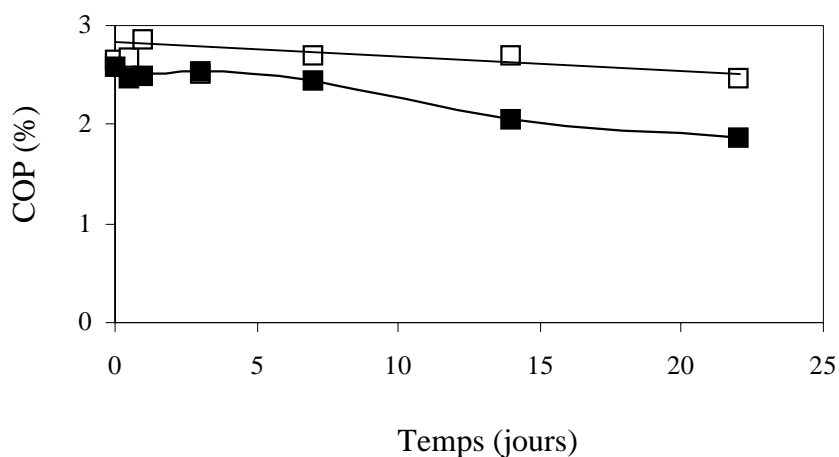


Les mesures de respiration sont effectuées sur 48 heures, par mesure de l'oxygène dissous par la méthode de Winkler. Les résultats montrent que la respiration est plus importante lorsque l'on augmente en température. Ces résultats sont à prendre avec précautions (écart types important) car l'analyse de l'oxygène n'a pu être faite que sur de très petits volumes (10 à 15 ml) et la précision plus faible.

Les résultats du dénombrement bactérien sur gélose nutritive ne montrent que très peu de variations au cours du temps et entre les températures. Le nombre de bactéries reste pratiquement homogène pendant l'incubation (de  $10^4$  à  $10^5$  UFC (Unité Formant Colonie)). La méthodologie utilisée pour ce dénombrement n'est sans doute pas, dans notre cas, la mieux adaptée pour apprécier les changements dans les communautés.

### 3-2-3. Distribution du COP.

Ces teneurs en COP sont de l'ordre de 2.5 % au temps  $t_0$ , sachant que les teneurs respectives de l'échantillon de BV et de la culture d'algue sont de 1.75 % et 46 %.



**Figure 4A-6.** distribution des teneurs en COP au cours du temps dans les réacteurs pour les 2 températures testées ( $\square$  5°C ;  $\blacksquare$  25°C).

Les teneurs dans le réacteur à 5°C varient pas ou peu sur les trois semaines de l'expérience. A l'inverse, on observe une décroissance nette des teneurs en COP dans le réacteur à 25°C. On passe de 2.60 % à  $t_0$  à 1.88 % à  $t_{22}$ , valeur se rapprochant de la teneur *in situ* du BV. Ainsi la vitesse de dégradation du COP a pu être calculée de la même manière que pour les pigments. On obtient donc une cinétique égale à  $0.014 \text{ j}^{-1}$  pour le COP à une température de 25°C.

3-2-4. Evaluation du  $Q_{10}$  pour les paramètres mesurés

<b>Paramètre</b>	<b><math>Q_{10}</math></b>
Communauté bactérienne (UFC/ml)	1.19
Respiration ( $\mu\text{mol/l/h}$ )	1.30
COP (mg/l)	2.08
Lutéine ( $\mu\text{g/l}$ )	0.99
Chlorophylle <i>b</i> ( $\mu\text{g/l}$ )	1.62
Chlorophylle <i>a</i> ( $\mu\text{g/l}$ )	2.16

**Tableau 4-4.** Mesure des valeurs de  $Q_{10}$  pour les paramètres mesurés.

Les valeurs de  $Q_{10}$  montrent un même impact de la température sur l'évolution des communautés bactériennes et sur les pigments (chlorophylles et lutéine). L'impact semble être beaucoup faible sur le COP.

**3-3 discussion**

Nous avons donc observé une diminution systématiquement plus rapide des teneurs en pigments dans le réacteur à 25°C par rapport au réacteur à 5°C. Cette tendance a été également observée lors du suivi du COP dans les mêmes échantillons. Si on regarde les valeurs calculées des cinétiques, on constate alors qu'à basse température les vitesses de dégradation sont sensiblement équivalentes pour tous les pigments suivis (caroténoïdes et chlorophylles) alors qu'à 25°C la lutéine est plus réfractaire que les chlorophylles. Cette différence a d'ailleurs déjà été constatée lors des précédentes expérimentation ainsi que dans la littérature (Bianchi *et al.*, 1993). D'autre part, lorsqu'on regarde la valeur de la cinétique de dégradation du COP, on constate que celle-ci est jusqu'à 4 fois plus faible que celle des pigments. La teneur en COP est mesurée sur un mélange de particules et d'algues, de ce fait la diminution de cette teneur est affectée à la fois par la minéralisation du phytoplancton mais aussi de la MO contenue dans le BV à l'origine. Il reste donc difficile ici de rapporter la cinétique de dégradation des pigments à l'ensemble des cellules phytoplanctoniques.

En conclusion, on a pu montrer qu'il y a accélération de la dégradation des pigments et du COP avec l'augmentation de la température, notamment pour les chlorophylles *a* et *b*. Nos résultats concordent avec ceux issus d'une étude sur des sédiments lacustres (Leavitt, 88) et que cette augmentation de température joue aussi un rôle évident sur le métabolisme des

bactéries responsables de cette dégradation (mesure de respiration 3 fois plus importante en moyenne à 25°C qu'à 5°C).

#### 4- Influence du matériel végétal.

##### 4-1 Déroulement de l'expérience.

Réacteurs	2 réacteurs de teneur en MES = 0.546 g.l <sup>-1</sup>
Conditions testées	T° = 20°C ; bien oxygéné
Matériel végétal utilisé	<i>Populus</i> (peuplier commun) et sa litière
Echantillonnage	0, 7, 14, 30 et 60 jours
Analyse	Pigments ; carbone organique particulaire (COP)

**Tableau 4-4.** Détail du matériel et méthodes utilisés pour tester l'influence du matériel végétal.

Dans l'un des réacteurs a été ajouté 30 g de feuilles et dans l'autre 7 g de litière (poids humides) pour des volumes de végétaux, introduits dans les réacteurs, à peu près équivalents.

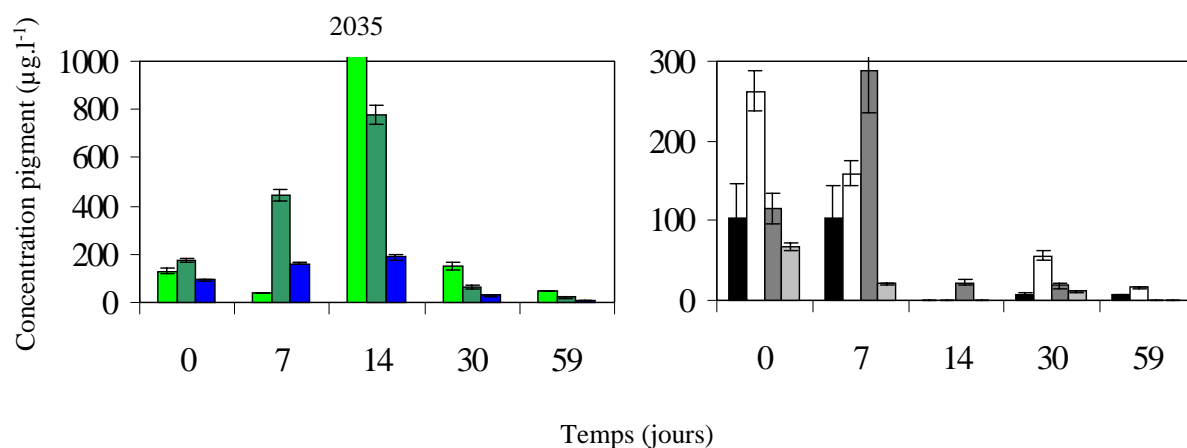
L'essence choisie pour cette expérience est le peuplier (*Populus*), bien représentée sur le bassin versant de la Garonne. Elle a été récoltée au printemps ainsi que la litière provenant de la même essence exclusivement. La durée de l'incubation a été fixée à deux mois (59 jours).

##### 4-2. Résultats.

Les teneurs en pigments et pheopigments sont présentés sur la figure 4A-2 pour les résultats de dégradation des feuilles fraîches et sur la figure 4A-3 pour les résultats concernant la litière.

Les résultats à 0 et 7 jours montrent des teneurs en chlorophylles *a* et *b* et en luteine très inférieures à celles obtenues à 14 jours. Ces faibles concentrations en pigments sont accompagnées de fortes concentrations en pheopigments. Ce résultat est attribué à un problème durant l'extraction. On rencontre en effet des difficultés à extraire la totalité des pigments de matériel végétal vasculaire frais à cause de la présence de composés protecteurs comme les cires recouvrant les feuilles. Ce problème est en général contourné en employant une technique d'extraction adaptée. Cette technique consiste à ébouillanter le matériel végétal

quelques secondes puis à le refroidir immédiatement dans un bain de glace. Le problème de l'utilisation de cette technique est que la perte du matériel est importante et par conséquent inutilisable lors d'une étude quantitative comme ici. En revanche, à partir de la deuxième semaine le matériel végétal se trouve dans un état de décomposition avancé où la surface des feuilles ne comporte pas ou peu de résidus de cire. L'extraction de ces échantillons peut alors être conduite normalement.



**Figure 4A-7.** Suivi des pigments (chlorophylle a ; chlorophylle b et lutéine) et produits de dégradation (pheophytine a, pheophytine b, pheophorbide a, pheophorbide b) dans le réacteur contenant les feuilles.

En conséquence, on considèrera donc les résultats des prélèvements effectués à partir de la deuxième semaine jusqu'à deux mois. En ce qui concerne les teneurs en chlorophylles *a* et *b* et en lutéine, on obtient des résultats régulièrement décroissants de 15 jours à deux mois. Des répliquas des mesures montrent l'homogénéité des concentrations sur l'ensemble du volume végétal mis à incuber. Si on mesure la disparition des pigments sur ces 6 semaines, on obtient les résultats suivants :

Lutéine :	$0.021 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>b</i> :	$0.022 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>a</i> :	$0.022 \text{ j}^{-1}$

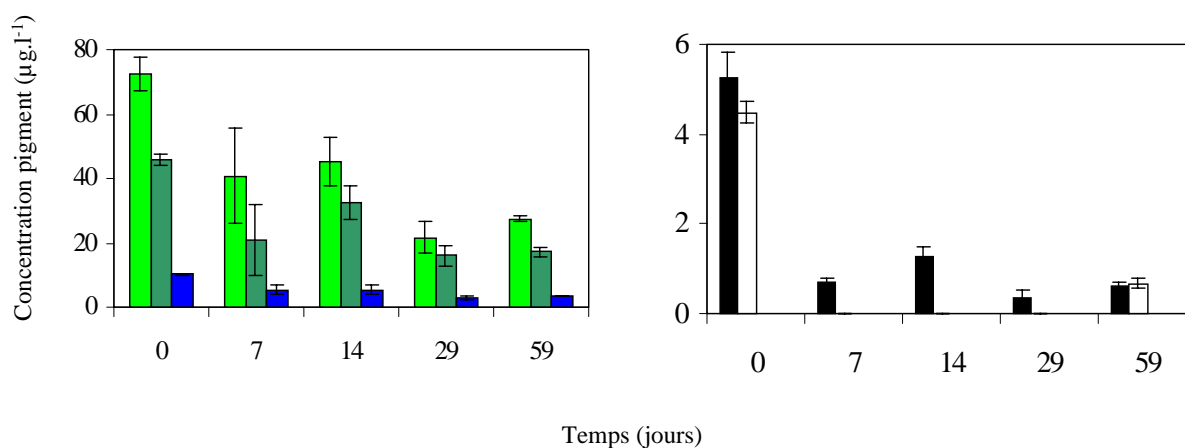
On note ici que la cinétique de dégradation des pigments est équivalente chez tous les pigments (chlorophylles et lutéine).

En ce qui concerne les teneurs en phéopigments, les résultats (non présentés ici) montrent une disparition des pheophorbides au profit des pheophytines à l'issue de

l'expérience. On note également que la concentration en pheophytine *b* est supérieure à celle de la pheophytine *a*.

Les échantillons de litière ne montrent pas le même problème expérimental lors de l'extraction puisque l'état de décomposition du matériel d'origine est déjà important et qu'il n'y a quasiment plus de composés protégeant les cellules et entravant l'extraction des pigments contenus dans celles-ci. Nous suivons donc ici les résultats des teneurs en pigments et phéopigments sur les deux mois de l'expérience. On note clairement une diminution des teneurs en pigments durant l'incubation.

Les répliquas montrent une bonne homogénéité de l'impact de la dégradation sur l'échantillon.



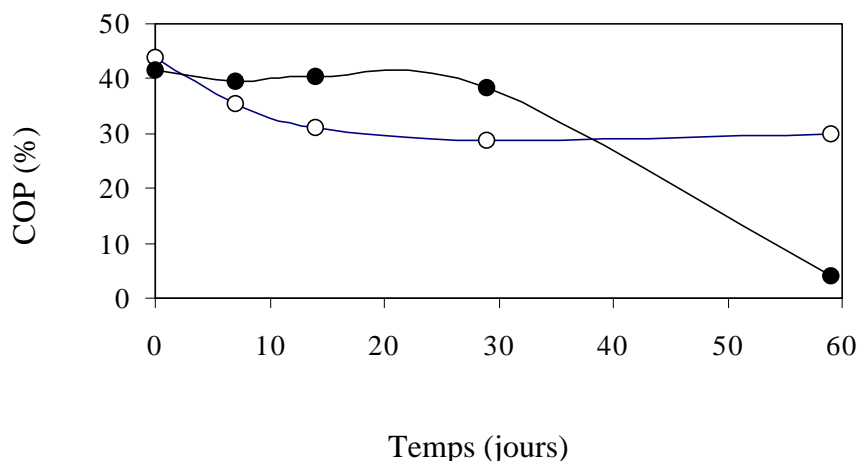
**Figure 4A-8.** Suivi des pigments (■ chlorophylle *a* ; ■ chlorophylle *b* et ■ lutéine) et produits de dégradation (■ pheophytine *a*, □ pheophytine *b*, ■ pheophorbide *a*, □ pheophorbide *b*) dans le réacteur contenant la litière.

Les mesures des cinétiques de disparitions de pigments au sein de ces incubateurs donnent les résultats suivants :

$$\begin{aligned} \text{Lutéine} &: 0.011 \text{ j}^{-1} \\ \text{Chlorophylle } b &: 0.011 \text{ j}^{-1} \\ \text{Chlorophylle } a &: 0.011 \text{ j}^{-1} \end{aligned}$$

On note ici que les pigments possèdent la même vitesse de disparition et que cette vitesse est 2 fois inférieure à celle des feuilles fraîches.

Au niveau des teneurs en pheopigments, on constate l'absence des pheophorbides durant toute la durée de l'expérience. De plus les teneurs en phéophytines diminuent considérablement la première semaine voire disparaissent pour la phéophytine *b* et reste ensuite quasiment constant pendant toute la durée de l'expérience.



**Figure 4A-9.** Suivi du carbone organique particulaire (○ litière ; ● feuilles) au cours de l'incubation des feuilles et litière de peuplier dans le bouchon vaseux.

Les résultats de mesure de carbone organique sur les échantillons de feuilles et de litière ont été reportés sur le graphe 4A-4 en fonction du temps d'incubation. Ces résultats montrent que les teneurs en COP sont équivalentes au début de l'expérience puis que les deux types de matériel évoluent différemment. On constate en effet pour la litière une diminution du COP dans les deux premières semaines puis une stabilisation des teneurs à 30%. En ce qui concerne les échantillons de feuilles, le comportement est différent, on n'observe peu de changements au cours du premier mois puis une très forte diminution au bout du deuxième mois où la concentration atteint seulement 4%. Les calculs de cinétique de disparition du COP sont les suivantes :

$$\text{Feuilles} : 0.015 \text{ j}^{-1}$$

$$\text{Feuilles (dernier mois)} : 0.029 \text{ j}^{-1}$$

$$\text{Litière} : 0.005 \text{ j}^{-1}$$

### 4-3. Discussion

Ces résultats montrent que la dégradation est moins efficace sur la litière que sur les feuilles fraîches. Si on regarde plus en détail la dégradation des feuilles, on observe 2 phases, la première (un mois environ) durant laquelle la dégradation est peu efficace, période durant laquelle les tissus protecteurs se dégradent, et, la seconde, durant laquelle les pigments sont plus accessibles à cette dégradation.

Bianchi et Findlay (1991) ont déterminé les cinétiques de dégradation dans le BV de l'estuaire de l'Hudson de ces mêmes pigments mais issues de quatre macrophytes aquatiques. Ils obtiennent des constantes de dégradation d'ordre 1 (K) comprises entre 0,02 et 0,04  $\text{j}^{-1}$  pour les chlorophylles *a* et *b* et entre 0,01 et 0,02  $\text{j}^{-1}$  pour la lutéine. Ces valeurs sont similaires à celles que nous obtenons, l'expérimentation est effectuée dans des conditions similaires aux nôtres (obscurité, 20°C, 100 jours d'incubation). Les cinétiques calculées confirment également qu'il existe des dégradations différentielles entre les pigments et que la lutéine est systématiquement plus réfractaire que les chlorophylles, comme cela a déjà été constaté dans d'autres études (Bianchi et al., 93 ; Bianchi & Findlay, 91). Dans le BV de l'estuaire de la Gironde, les particules sont maintenues en suspension dans la colonne d'eau par les courants de marée en condition oxygènes (Abril *et al.*, 1999) et la lutéine est tout de même dégradée en dépit de son caractère réfractaire du à l'absence de groupe époxyde (Bianchi *et al.* 1991,1993), mais moins rapidement que les chlorophylles. Cette différence n'est peu ou pas visible lors de la dégradation des végétaux supérieurs. La différence de structure entre les deux matériaux végétaux utilisés est certainement la cause de cette différence. Les pigments issus des végétaux supérieurs sont beaucoup plus protégés par des composés structuraux tels que les lignines et les cires. Ainsi si on compare les cinétiques de dégradation du phytoplancton et des plantes vasculaires, on observe clairement que la disparition des pigments est plus rapide chez les cellules phytoplanctoniques. Cette différence est atténuée lorsqu'on compare le réacteur témoin avec la dégradation des feuilles fraîches.

## 5- Conclusion générale : synthèse

Dans cette étude, nous avons obtenu des cinétiques de dégradation de matériel phytoplanctonique dans les échantillons de BV de la Gironde à l'aide d'un suivi de pigments photosynthétiques dans des systèmes d'incubations *in vitro*. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 4A-1. Ils montrent le rôle important joué par les bactéries attachées aux particules et de manière plus efficace sur le matériel phytoplanctonique.

	MES (g/l)		Lutéine	Chlorophylle <i>b</i>	Chlorophylle <i>a</i>	COP
<b>Phytoplancton et</b>	0	RC	0.021	0.038	0.035	0.016
<b>Communauté</b>	0.38	R1	0.040	0.050	0.065	-
<b>bactérienne</b>	0.78	R2	0.058	0.071	0.068	-
	3.0	RNS	0.065	0.068	0.070	-
	3.0	RS	0.007	0.031	0.014	-
<b>Phytoplancton et</b>	0.44	5°C	0.027	0.021	0.029	-
<b>Température</b>	0.44	25°C	0.046	0.060	0.068	0.014
<b>Végétaux supérieurs</b>	0.54	Feuilles	0.021	0.022	0.022	0.020
	0.54	Litières	0.011	0.011	0.011	0.005

**Tableau 4A-1.** Compilation des valeurs de vitesses ( $j^{-1}$ ) de dégradation des pigments suivis

Veyssy et al. en 1999 ont calculé que les apports fluviaux de MOP à l'estuaire de la Gironde provenaient pour plus de 90% des sols, dont environ la moitié était constituée de litières (débris de feuilles partiellement dégradées) lessivées par les premières crues d'automne. Dans leur budget, le matériel phytoplanctonique représente moins de 10% des apports de MOP totaux. Dans le BV, ces différents matériels se mélangent et sont dégradés à des vitesses variables selon leur nature biochimique (Etcheber, 1983). Modéliser les processus biogéochimiques estuariens et les niveaux d'oxygénation de l'estuaire en réponse aux perturbations anthropiques sur les bassins versants (eutrophisation et érosion) est aujourd'hui une priorité (Billen et al., 1994 ; Thouvenin et al., 1994). Or une telle démarche passe par une bonne connaissance des cinétiques de dégradation des différents pools de MOP par la population bactérienne du BV. Pour la première fois nous avons mesuré la dégradation de chlorophytes (micro algues et végétaux supérieurs) à différentes turbidités. Les pigments sont dégradés à une vitesse équivalente à celle du COP dans les feuilles ( $k = 0.02 j^{-1}$ ). Ainsi, les



---

cinétiques obtenues sur les pigments peuvent servir de modèle pour la totalité du matériel phytoplanktonique.



## Partie B – Suivi des voies de dégradation des pigments du phytoplancton

### 1 -Introduction

Un recensement bibliographique des études portant sur l'identification des voies de dégradation et sur l'utilisation des produits de dégradation des pigments photosynthétiques comme biomarqueurs de ces voies, a été réalisé sur plus de 30 articles parus au cours de ces 10 dernières années (tableau 4 B-1).

Environnement	Matériel étudié	Processus mises en jeu	Produits formés	Références
Océan ouvert	Particules en suspension	Broutage par méso- et micro-zooplancton	Phéophorbide et pyrophéophorbide	Llewellyn, 96
Océan ouvert	Colonne d'eau – bloom phyto.		Phéophorbide <i>a</i>	Barlow, 93
Océan ouvert	Phytoplancton	Broutage par copépodes et micro-zooplancton	Phéophorbide <i>a</i>	Barlow, 95
Océan ouvert	Colonne d'eau - Phytoplancton	Broutage ( ?)	Phéophorbide <i>a</i>	Bidigare, 86
Océan ouvert	Particules en suspension	Broutage → Sénescence →	Pyrophéophorbide <i>a</i> Phéophorbide <i>a</i> -like	Head, 94
Milieu côtier	Sédiments - zone intertidale	Broutage → Photo-oxydation et sénescence →	Phéophorbide <i>a</i> Phéophytine <i>a</i>	Lucas, 99
Milieu côtier	Sédiments –zone subtidale	Broutage → Sédiments →	Phéophorbide <i>a</i> Phéophytine <i>a</i>	Sun, 94
Milieu côtier	Sédiments intertidaux	Broutage par meio-faune et macro-faune	Phéophorbide <i>a</i> (phéophytine <i>a</i> en trace)	Cariou- LeGall, 95

Milieu côtier	Sédiments vaseux intertidaux	Broutage (contenu stomacal) → Contenu du sédiment →	Phéophorbide <i>a</i> et Phéophytine <i>a</i> Phéopigments en trace	Buffan-Dubau, 96
Milieu côtier	Colonne d'eau – bloom phyto.	Pelotes fécales de copépodes	Pyrophéophytine <i>a</i> et phéophorbide <i>a</i>	Head, 92
Milieu côtier	Particules en suspension	Pelotes fécales des copépodes	Pyrophéophorbide <i>a</i> et phéophytine <i>a</i> (trace)	Head, 94
Milieu côtier	Bloom de Diatomées	Broutage par copépodes	Différents produits suivant le type d'ingestion	Head, 96
Milieu côtier	Particules en suspension	Broutage	Phéophorbide <i>a</i> ou Phéophytine <i>a</i> suivant les classes de taille de particules	Williams, 91
Milieu côtier	Sédiments	Broutage par mesozooplancton → Broutage sur Chlorophytes « superflous feeding » →	Phéophorbide <i>a</i> et phéophytine <i>a</i> -like Phéophytine <i>b</i> Chlorophyllide <i>a</i>	Klein, 89
Prés-salés	Sédiments vaseux	Broutage (Contenus stomacaux) → Contenu du sédiment →	Phéophorbide <i>a</i> et phéophytine <i>a</i> Phéophytine <i>a</i> et -like	Buffan-Dubau, 00
Estuaire	Colonne d'eau et sédiments	Broutage → Sénescence →	Pheophorbide <i>a</i> Chlorophyllide <i>a</i>	Bianchi, 93
Estuaire	Sédiment – zone intertidale	Broutage par herbivores benthiques → Action des bactéries →	Phéophorbide <i>a</i> Phéophytine <i>a</i>	Barranguet, 97
Estuaire	Sédiments – zone intertidale	Broutage par mollusques et poissons	Phéophorbide <i>a</i>	Brotas, 98
Estuaire	Colonne d'eau - phytoplancton	Broutage	Phéophorbide <i>a</i> et phéophytine <i>a</i> (plutôt en été et en surface)	Roy, 96
Milieus hypersalés	Tapis microbiens	Diatomées/Cyano. Cyanobactéries	Phéophorbides Phéophytines	Villanueva et al., 94

Lac	Phytoplancton	Broutage par copépodes et daphnies	Phéophorbide <i>a</i>	Quiblier-Lloberas, 94
Lac	Colonne d'eau – phytoplancton	Sénescence	Chlorophyllide <i>a</i>	Yacobi, 96
Lac	Particules en suspension	Broutage	Chlorophyllide <i>a</i> et Phéophorbide <i>a</i>	Hurley, 90

**Tableau 4 B-1.** Relations entre les produits formés et les processus de dégradation des pigments mis en jeu dans différents environnements.

Il existe en effet un grand nombre de travaux visant à comprendre la formation et la distribution des produits de dégradation des pigments photosynthétiques. Tous ont pour but de mieux cerner les voies de dégradation et les produits formés afin de s'en servir comme biomarqueurs de processus présents dans le milieu naturel. On retient de ces études qu'il existe 3 formes majeures colorées issues de la dégradation des chlorophylles : la chlorophyllide, la phéophorbide et la phéophytine auxquelles viennent s'ajouter des formes allomères (-like) ainsi que des formes plus avancées de la dégradation, les pyrophéopigments (cf. chapitre 1). La production de phéophytine et de phéophorbide est généralement associée à la dégradation de la chlorophylle par broutage. La phéophytine apparaît également en l'absence de broutage dans les sédiments, sa formation est alors rapportée à l'action de bactéries et de champignons. La chlorophyllide est présente dans les cellules algales en tant que précurseur à la synthèse de la chlorophylle (cf. chapitre 1). Lors de cette biosynthèse de chlorophylle *a*, la chlorophyllide *a* est présente en faible quantité et ne s'accumule pas, une accumulation est donc plutôt associée à des processus de sénescence. On retrouve également cette forme sous l'action du broutage superflu (superfluous feeding) par les copépodes. Enfin, la chlorophylle peut être transformée directement en produits incolores après broutage par des protozoaires (Klein, 1986), et les copépodes (Head et Harris, 1996).

Matériel étudié	Fonctions mises en jeu	Produits formés	Références
Détritus de phytoplancton	Broutage par macro-zooplancton → Pelotes fécales →	Phéophorbide <i>a</i> -like et Phéophytine <i>a</i> -like Pyrophéophytine <i>a</i>	Nelson, 93
Phytoplancton Chlorophylle <i>a</i> marquée au C <sup>14</sup>	Broutage par meio-et micro-faune	Phéophytine <i>a</i>	Sun, 93
Macro-algue et épiphytes	Broutage par mollusques	Phéophytine et phéophorbide <i>a</i>	Roller, 95
Macrophytes	Broutage par copépodes, ostracodes, ciliés, cladocères, rotifères, nématodes et oligochètes	Phéophorbide <i>a</i>	Bianchi, 91
Macro-algues (Ulves et Zostères)	Broutage par Bivalves et Polychètes → Micro-benthos →	Phéophorbide <i>a</i> Phéophytine <i>a</i>	Bianchi, 88
Macro-phytes et phytoplancton	Broutage par amphipodes → Action des bactéries →	Phéophorbides <i>a</i> Phéophytine <i>a</i>	Bianchi, 91

**Tableau 4 B-2.** Relations entre les produits formés et les processus de dégradation des pigments mis en jeu dans les études *in vitro*.

Il apparaît de ces différentes conclusions que la relation entre les voies de dégradation et les produits formés n'est pas strictement identifiée. Ainsi, il a été montré que la proportion de la chlorophylle dégradée lors du transit dans le tractus digestif de certains animaux, varie avec le taux d'assimilation. La relation entre ces 2 phénomènes pourrait être expliquée par l'action de 2 pools enzymatiques : l'un présent chez les animaux et l'autre chez l'algue ingérée (Head et Harris, 96). L'étendue de la dégradation de la chlorophylle semble également dépendre du passé nutritionnel des espèces présentes (Penry, 1991). On note une différence entre les études de terrain (tableau 4B-1) et les études au laboratoire (tableau 4B-2). Ces dernières donnant des résultats très différents et dans plus de deux tiers de ces études on observe la présence de plusieurs types de phéopigments pour un seul processus étudié (broutage par les copépodes, protozoaires,...). Dans le cas des études de terrain, les auteurs ont tendance à faire des déductions directes sur la présence d'un produit de dégradation et de son lien à phénomène donné. On a ainsi constaté que pour 12 de ces études sur les 23

recensées, la présence de phéophorbide associée au constat de broutage par le zooplancton suffit à relier les deux par un lien de cause à effet.

Ainsi, afin de mieux comprendre les relations existant entre les processus et les produits de la dégradation des pigments du phytoplancton dans les environnements estuariens, nous avons choisi une stratégie d'expérimentation *in vitro* permettant d'isoler autant que possible des processus jouant sur cette dégradation. La sénescence du phytoplancton, le broutage par les copépodes et la dégradation bactérienne sont les trois processus étudiés dans cette expérience. La stratégie d'étude est basée sur le suivi des teneurs en pigments du phytoplancton par HPLC. Ce suivi permet à la fois de calculer les cinétiques de dégradation des pigments et de caractériser les voies de dégradations associées aux processus mis en jeu par la production de phéopigments caractéristiques. Ces processus (sénescence, broutage et dégradation bactérienne) ne se réalisant pas dans les mêmes échelles de temps, l'expérience a donc dû être adaptée à chacun d'eux.

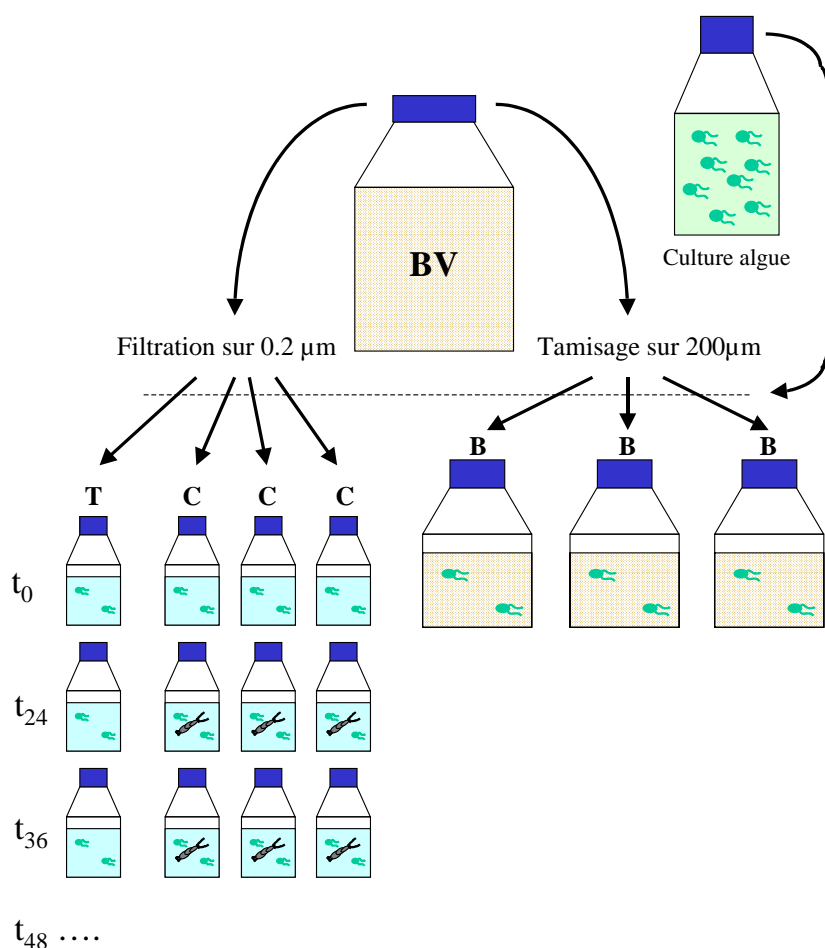
## 2 – Méthodologie

L'expérience présentée ici vise donc à comprendre l'impact de la pression biologique sur la formation de produits de dégradation de la chlorophylle et la cinétique de dégradation des pigments du phytoplancton dans le milieu estuarien. Nous avons choisi la Gironde comme site atelier, et la zone du bouchon vaseux comme lieu de processus privilégié au sein de l'estuaire. Les groupes taxonomiques choisis sont représentatifs des groupes présents dans l'estuaire Gironde au moment du prélèvement (Etcheber, 1983), celui-ci ayant eu lieu au début du mois de septembre 2001.

### 2-1. Déroulement de l'expérience.

Trois processus ont été testés au cours de cette expérimentation : (1) la sénescence des cellules algales seules; (2) l'effet du broutage par des copépodes sur ces cellules algales; (3) l'action des bactéries et protozoaires sur la dégradation de ces cellules phytoplanctoniques. Pour ce faire, 3 types de microcosmes ont été mis en place (figure 4B-1). Les 8 microcosmes témoins (T) ont été remplis avec un volume de 1.225 l d'eau du milieu ( zone du BV de l'estuaire) filtrée sur 0.2  $\mu\text{m}$  à laquelle nous avons ajouté une aliquote de culture de Chlorophycées *Scenedesmus suspicatus* (cf. chapitre 2). Une seconde série de 3 x 6 microcosmes, appelés (C), a été remplie avec un volume de 1.225 l d'eau du milieu filtrée sur

0.2  $\mu\text{m}$  puis une aliquote de culture algale *Scenedesmus suspicatus* a été ajoutée ainsi que 100 copépodites V et VI *Eurythemora affinis* triés à partir d'une pêche effectuée dans la même zone de l'estuaire que les prélèvements d'eau. Les copépodes ont été préalablement rincés avec le même échantillon d'eau filtrée sur 0.2  $\mu\text{m}$ . Une troisième série de 3 microcosmes (B), contient 4 litres de l'eau de l'estuaire tamisée sur 200  $\mu\text{m}$ , afin de retirer les copépodites « âgés » (stades III à VI) et les adultes, à laquelle est ajoutée une aliquote d'algues équivalente aux 2 précédentes séries. La quantité de chlorophylle a apportée au systèmes à  $t_0$  est de  $150 \mu\text{g.l}^{-1}$  environ pour un nombre de cellules algales aux alentours de 500000 cellules par millilitre.



**Figure 4B-1.** Schéma conceptuel de la mise en place des traitements testés au sein des microcosmes T, C, B.



L'ensemble des microcosmes ont été maintenu à l'obscurité afin de se soustraire à l'activité de photosynthèse.

Des prélèvements, de volumes variables (10 ml à 1 litre) suivant le type d'analyse, ont été effectués dans les microcosmes au moment de leur mise en place, puis après 24, 30, 36, 48 et 72 heures, et enfin après 7 jours et 14 jours pour les séries témoins T et les séries B ( tableau 4B-3). L'ajout des copépodes a été effectué après 24 heures afin que les cellules algales aient eu le temps de s'acclimater au nouveau milieu. Une adaptation des teneurs pigmentaires a déjà été constatée lors de précédentes manipulations dans les toutes premières heures de l'incubation (cf. chapitre 4A).

Tout au long de ces incubations, les microcosmes ont été conservés à l'obscurité afin d'éliminer le facteur de production photosynthétique et la dégradation photochimique. La température a été maintenue constante à 20°C.

Pas de temps		$t_0$	$t_{24}$	$t_{30}$	$t_{36}$	$t_{48}$	$t_{72}$	$t_{7j}$	$t_{14j}$
Paramètre									
<b>bactéries</b>	T	× 1			× 1		× 1	× 1	× 1
	C	× 3					× 3		
	B	× 3			× 3		× 3	× 3	× 3
<b>algues</b>	T	× 1			× 1		× 1	× 1	× 1
	C	× 3					× 3		
	B	× 3			× 3		× 3	× 3	× 3
<b>Copépodes</b> (contenus Stomacaux)	T								
	C		× 3	× 3	× 3	× 3	× 3		
	B								
<b>pigments</b> (colonne d'eau)	T	× 1	× 1	× 1	× 1	× 1	× 1	× 1	× 1
	C	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3
	B	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3
<b>protozoaires</b>	T								
	C								
	B	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3	× 3

**Tableau 4B-3.** Recensement du nombre des échantillons prélevés au cours de l'expérience.

L'analyse de ces échantillons est effectuée en utilisant les techniques décrites dans le chapitre 2 : analyse des pigments par chromatographie liquide, comptages bactériens par épifluorescence, comptage cellulaire direct des algues et des protozoaires par microscopie.

## 2-2. Choix des protocoles expérimentaux.

La mise en place d'une telle expérience s'est basée sur une série d'études consultables dans la littérature (tableau 4B-1 et -2) mais aussi sur des adaptations spécifiques. Ces adaptations ont été liées à des contraintes matérielles (choix du nombre de répliquas), des problèmes méthodologiques (comptages de microorganismes en milieu turbide) et des contraintes analytiques (sensibilité des méthodes et limite de détection).

### 2-2-1. Contraintes d'ordre matériel.

Les microcosmes B (figure 4B-1) contiennent des particules du bouchon vaseux à une concentration de  $280 \text{ mg.l}^{-1}$ . Ces microcosmes doivent donc être maintenus sous agitation pendant les 15 jours de l'expérience. Aussi des bouteilles de volumes importants (5 litres) ont été choisis pour constituer ces microcosmes afin de se prévenir des effets de paroi existant souvent dans le cas d'incubations longues. Le rapport entre le volume total et la surface des parois est ainsi plus faible et les perturbations moins importantes. Les échantillons de BV pour analyse ont été prélevés tout au long de l'expérience dans un même microcosme B. Afin d'obtenir un set de données statistiquement valable trois microcosmes B ont été mis en place, constituant ainsi trois répliquas du traitement B. La stratégie de mise en incubation est, pour les traitements C et T, différente puisque un microcosme est utilisé entièrement pour un prélèvement. Une telle stratégie est nécessaire car elle permet pour chaque microcosme d'isoler le même nombre de copépodes et de conserver les mêmes conditions pendant toute l'expérience. Des microcosmes répliquas ont pu être mis en place pour la série C mais pas pour la série témoin T pour cause de manque d'échantillon d'eau et de matériel, aucun des résultats issus de cette série ne possède donc de répliquas d'analyse.

### 2-2-2. Contraintes d'ordre méthodologique.

Le principal problème de méthodologie est dû à la difficulté de compter des microorganismes dans des échantillons à forte teneur en particules. Malgré de nombreux tests et adaptations des méthodologies de comptage des cellules algales et du micro-zooplancton, il nous a été impossible de réaliser le dénombrement des cellules dans les échantillons issus de la série B. Cependant une identification des organismes les plus fréquents a quand même pu être effectuée et sera présentée dans le paragraphe 3-1.

En ce qui concerne le comptage des populations bactériennes, une méthode de désorption des bactéries des particules, associée à une méthode de dénombrement bactérien par épifluorescence a été développée au laboratoire (Andouche, 2001) et a permis ici d'obtenir des résultats précis et très reproductibles.

### 2-2-3. Contraintes d'ordre analytique.

La difficulté lors de cette expérience a été d'obtenir une réponse analytique détectable des teneurs en pigments issues des dosages effectués sur les copépodes (contenus stomacaux et pigments constitutionnels). Cette difficulté n'a pu être contournée qu'en additionnant les extraits des trois répliquas multipliant par trois (300 individus) la teneur dans l'échantillon et permettant ainsi de passer au dessus des limites de détections de l'analyseur. Ainsi les teneurs en pigments issues des copépodes ne possèdent pas de répliquas d'analyse.

## 2-3. Analyse des données et expression des résultats.

### 2-3-1. Analyse des données

i / Pour aboutir aux valeurs de taux de filtration F et d'ingestion I des algues par les copépodes et estimer ainsi les activités de broutage au sein des microcosmes, nous avons utilisé les formules suivantes:

$$g = \frac{\ln C_0 - \ln C_t}{t} + k$$

où g est le taux de broutage ( $h^{-1}$ ), k le coefficient de croissance cellulaire ( $h^{-1}$ ),  $C_0$  la concentration initiale en cellules et  $C_t$  la concentration au temps t de l'incubation (h). On admettra ici que k est nul puisque l'expérience est conduite à l'obscurité.

Frost (1972) déduit de cette expression le taux de filtration F ( $ml \cdot animal^{-1} \cdot j^{-1}$ ):

$$F = \frac{V \cdot g}{N} \cdot \Delta t$$

où V est le volume du flacon d'incubation (ml) et N le nombre d'organismes dans l'incubateur. F représente le volume du milieu à partir duquel les cellules phytoplanctoniques sont retirées par le copépode.

L'autre variable utilisée ici est le taux d'ingestion défini par les expressions suivantes:

$$\langle C \rangle = \frac{C_1^* [e^{(k-g)(t_2-t_1)} - 1]}{(t_2 - t_1)(k - t)}$$

$$\text{avec } C_2 = C_1 \cdot e^{k(t_2-t_1)}$$

$$\text{et } C_2^* = C_1^* \cdot e^{(k-g)(t_2-t_1)}$$

où C est la concentration en cellules (Cell/ml) dans l'incubateur contrôle et C\* la concentration dans l'incubateur contenant les brouteurs.

d'où :

$$I = F \cdot \langle C \rangle$$

ii / Les cinétiques de dégradation des pigments ont été mesurées, de la même manière qu'au chapitre 4A ( $k = 1/C_0 (dC/dt)$ ), les résultats seront donc exprimés en  $\text{jour}^{-1}$ .

### 2-3-2. Traitement statistique

Des tests de variations des teneurs pigmentaires par l'analyse des variances ont été réalisés sur les résultats possédant des répliquas. Préalablement, un test de normalité des données (test de Kolmogorov-Smirnov) et d'homogénéité des variances (test de Levene) ont été passés avec succès pour tous les résultats testés.

Ainsi, un test ANOVA a pu être utilisé afin de s'assurer que les variations entre les teneurs en pigments mesurées au cours de l'expérience étaient significatives ou non ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ).

## 3 -Résultats

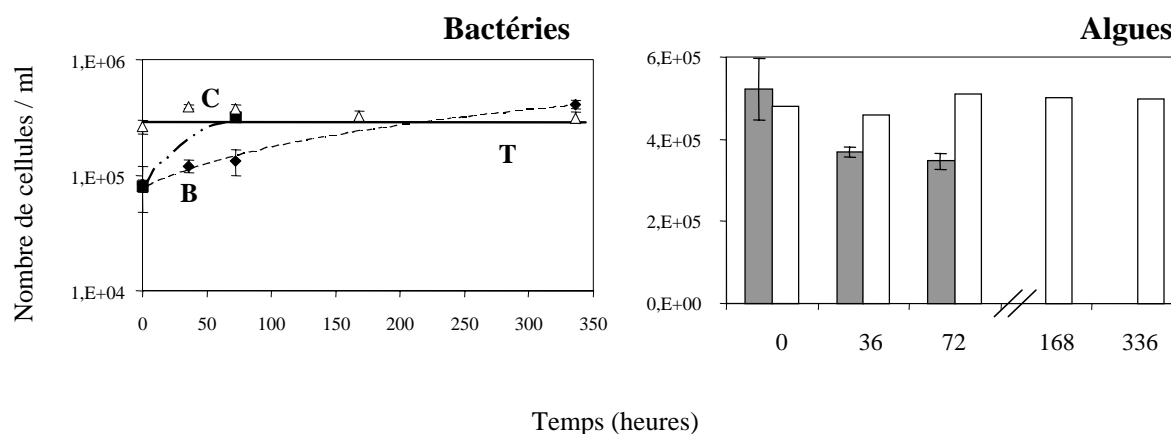
### 3-1. Suivi des communautés de bactéries et de la population d'algues présentes dans les microcosmes au cours de l'incubation.

Les comptages du nombre de bactéries par la méthode d'épifluorescence ont montré des résultats très reproductibles (figure 4B-2). Nous n'avons que peu de différences entre les répliquas des microcosmes. Les communautés de bactéries dans les microcosmes témoins (T) et ceux contenant les copépodes (C) contiennent au départ moins de bactéries que la série B

puisque l'échantillon d'eau de l'estuaire utilisé dans ces microcosmes a été filtré sur 0.2  $\mu\text{m}$ , excluant ainsi la grande majorité des microorganismes présent dans l'échantillon de BV. Puis les communautés évoluent vers des valeurs équivalentes de l'ordre de  $10^6$  bactéries par millilitre, ce qui est cohérent avec des densités de populations existantes dans le milieu naturel (Hernandez-Palomino, 1997). On constate cependant une progression plus rapide du nombre de bactéries dans les microcosmes contenant les copépodes par rapport aux microcosmes témoins. Cette progression n'a pu être seulement suivie que sur 72 heures (fin de l'expérience dans les microcosmes C), mais si on applique à ces valeurs une courbe de tendance exponentielle, on constate que le nombre de bactéries se stabilise à la même valeur ( $10^6$  bactéries/ml) que dans les deux autres séries (Figure 4B-2).

Comme cela a été expliqué au paragraphe de méthodologie, les comptages de protozoaires ont présenté des difficultés et nous n'avons pu obtenir des résultats fiables. Dans cette étude, notre but n'étant pas de suivre l'action des protozoaires sur le phytoplancton, nous n'avons pris aucunes des précautions d'usage pour la préservation du microzooplancton, ni au moment de la pêche ni au moment de l'incubation. L'agitation en continue des réacteurs pendant toute la durée de l'expérience est un facteur supplémentaire nous permettant de penser que les protozoaires présents au départ n'étaient pas dans des conditions idéales pour être très actifs dans la consommation des algues et bactéries présentes dans l'incubateur. Cependant, l'identification des groupes majeurs composant ce microzooplancton a quand même pu être effectuée. En général, la taille des organismes était inférieure à 30  $\mu\text{m}$  sauf pour les Diatomées. Les groupes majeurs identifiés étaient constitués de Diatomées (*Coscinodiscus*, centriques et pennées), de Dinoflagellés (Gymnodiniales) et de Ciliés (Tintinides, *Mésodinium* et *Uronéma*).

Les comptages de cellules algales ont montré eux aussi une grande régularité inter répliquas (figure 4B-2). Comme cela a été expliqué au paragraphe de méthodologie, aucun comptage n'a pu être effectué sur la série B. Le nombre de cellules dans la série témoin reste le même sur toute la durée de l'expérience. Par contre, le nombre de cellules dans les microcosmes contenant les copépodes diminue de manière très significative (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ) sur les 72 heures de l'incubation.



**Figure 4B-2.** Suivi du nombre de cellules bactériennes (B : ◆ , C : ■ , T : △ ) et algales dans les microcosmes au cours du temps (C : ■ , T : □).

Le suivi du nombre de cellules algales dans les réacteurs contenant les copépodes nous a permis de déterminer des taux de filtration (F : ml/individu/heure) et de broutage (I : cellule/individu/heure) des individus (tableau 4B-4). Par ailleurs, aucune mortalité significative n'a été constatée chez les copépodes au cours des premières 72 heures de l'incubation.

		Moyenne	Ecart Type
<b>Taux de filtration F</b> (ml/ind/h)	36 heures	0.0721	0.0072
	72 heures	0.0644	0.0106
<b>Taux d'ingestion I</b> (cell/ind/h)	36 heures	30.3	2.3
	72 heures	26.3	3.8

**Tableau 4B-4.** Calcul des taux de filtration et d'ingestion des copépodes sur le phytoplancton lors des expérimentations.

La consommation d'algues apparaît constante au cours du temps. Les taux de broutage et d'ingestion sont équivalents après 36 heures et après 72 heures. Ces taux sont plutôt faibles pour une espèce comme *Eurythemora affinis* par rapport à des taux mesurés en milieu naturel (1.5 ml/ind/h, White et Roman, 1992) mais la nourriture choisie pour l'expérience (Chlorophycée, *Scenedesmus suspicatus*) ne constitue pas l'essentiel du régime classique en milieu naturel. Des taux équivalents (0.08 ml/ind/h) ont été mesurés lors d'incubations sur des copépodites au stade IV (Razouls et al, 1998).

### 3-2. Distribution des pigments dans les microcosmes au cours de l'incubation.

3-2-1. Suivi des pigments et produits de dégradation sur les 72 premières heures de l'expérience.

#### *Distribution des caroténoïdes (figures 4B-3).*

Les concentrations en lutéine, néoxanthine, violaxanthine,  $\alpha$ -carotène et  $\beta$ -carotène ne varient pas (ANOVA  $n=3$ ,  $p>0.05$ ) sur 72 heures dans tous les microcosmes. Par ailleurs, on note la présence de fucoxanthine marqueur de la présence de Diatomées dans les échantillons issus des microcosmes B, certainement introduites mélangées aux particules du BV. Si on observe précisément les extraits effectués sur les copépodes, on remarque systématiquement la présence de lutéine et néoxanthine marquant la consommation de la Chlorophycée par les copépodes mais surtout la concentration croissante d'astaxanthine, pigments de transformation du  $\beta$ -carotène par les copépodes, celui-ci s'accumulant ensuite dans la carapace. La présence d'astaxanthine dans l'extrait des copépodes à 24 heures correspond à la coloration naturelle des copépodes en début d'expérimentation.

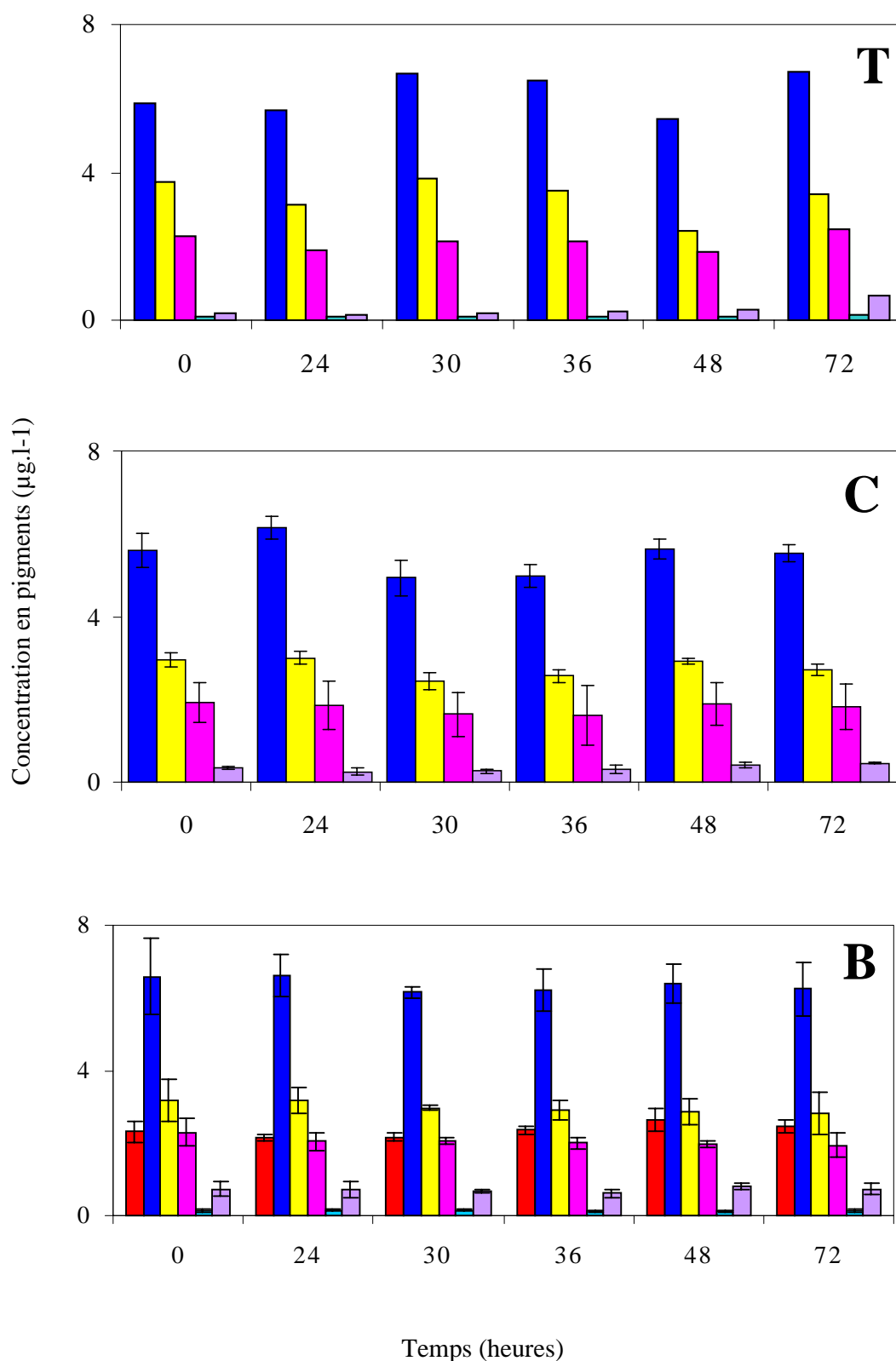
#### *Distribution de la chlorophylle a et de ces produits de dégradation (Figures 4B-4).*

La concentration en chlorophylle *a* ne varie pas (ANOVA  $n=3$ ,  $p>0.05$ ) dans les microcosmes T et C (aux environs de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Pour les microcosmes B, la concentration de départ est plus forte ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) que dans les autres microcosmes car à l'innoculum de Chlorophycées vient s'ajouter la teneur naturelle du bouchon vaseux. Au niveau du contenu des copépodes on observe une accumulation de chlorophylle *a* tout au long de l'expérience.

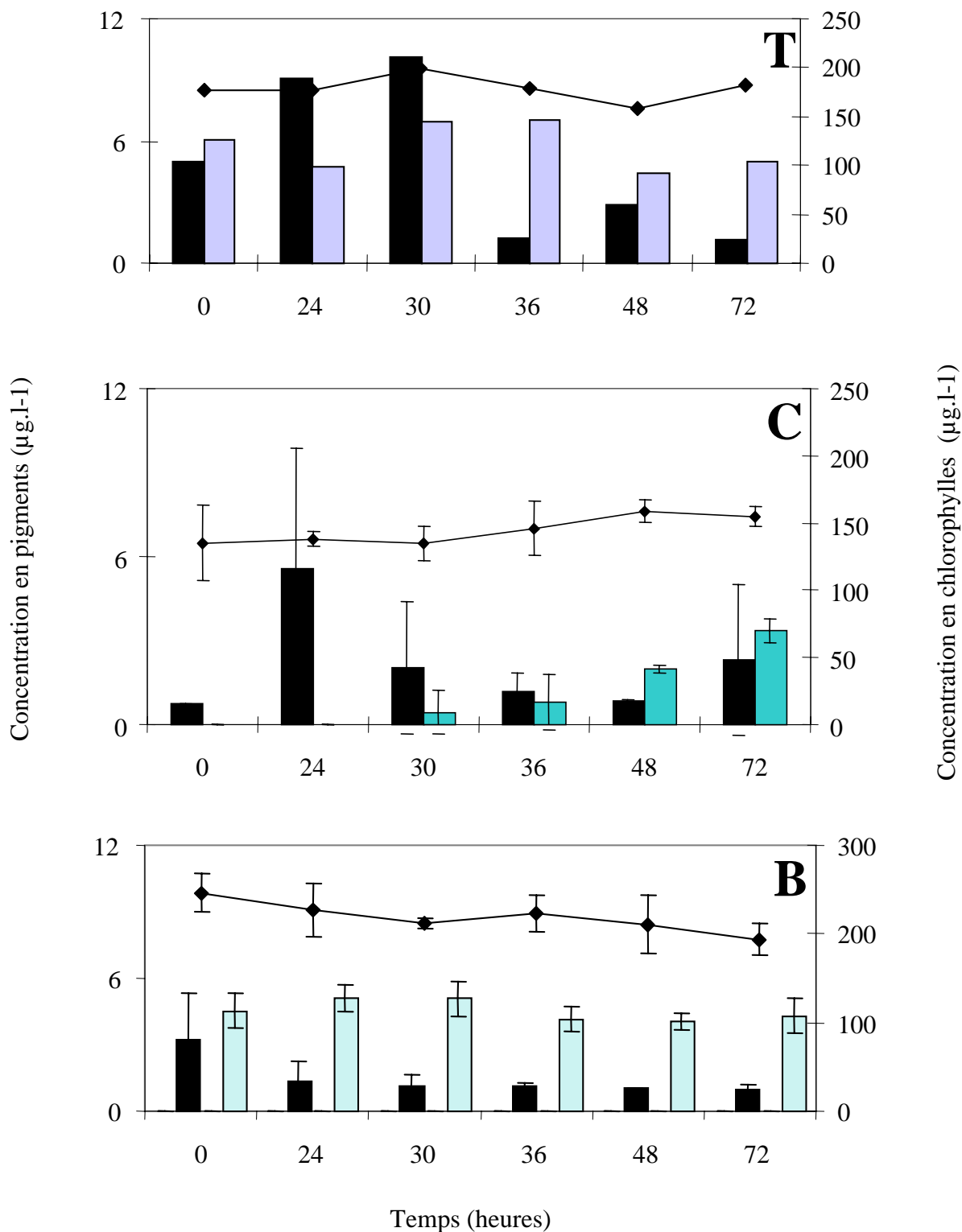
Les microcosmes témoins montrent une teneur constante (ANOVA  $n=3$ ,  $p>0.05$ ) en chlorophyllide *a* et une teneur en phéophytine *a* qui diminue fortement (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ) à partir de 36 heures. La phéophytine *a* est présente systématiquement dans les microcosmes C et B en quantité constante pendant toute la durée de l'expérience. Au sein des microcosmes contenant les bactéries et protozoaires (B) on observe la présence en continu de pyrophéophytine *a*. Dans les microcosmes contenant les copépodes (C), la pyrophéophytine *a* augmente progressivement pendant les 72 heures de l'expérience. Les contenus stomacaux révèlent uniquement la présence de pyrophéophytine *a*, avec une légère diminution après 72 heures.

En conséquence, les rapports chlorophylle *a* sur le total des phéopigments varient de manières différentes en fonction des traitements. Au sein des microcosmes témoins on observe une augmentation du rapport de 15 à 30, alors qu'au sein des microcosmes B le rapport reste stable. Une légère augmentation de 2 à 6 est observée dans les contenus des copépodes. Dans les microcosmes C le rapport n'a pu être établi car il existe une plus grande variabilité dans les mesures.

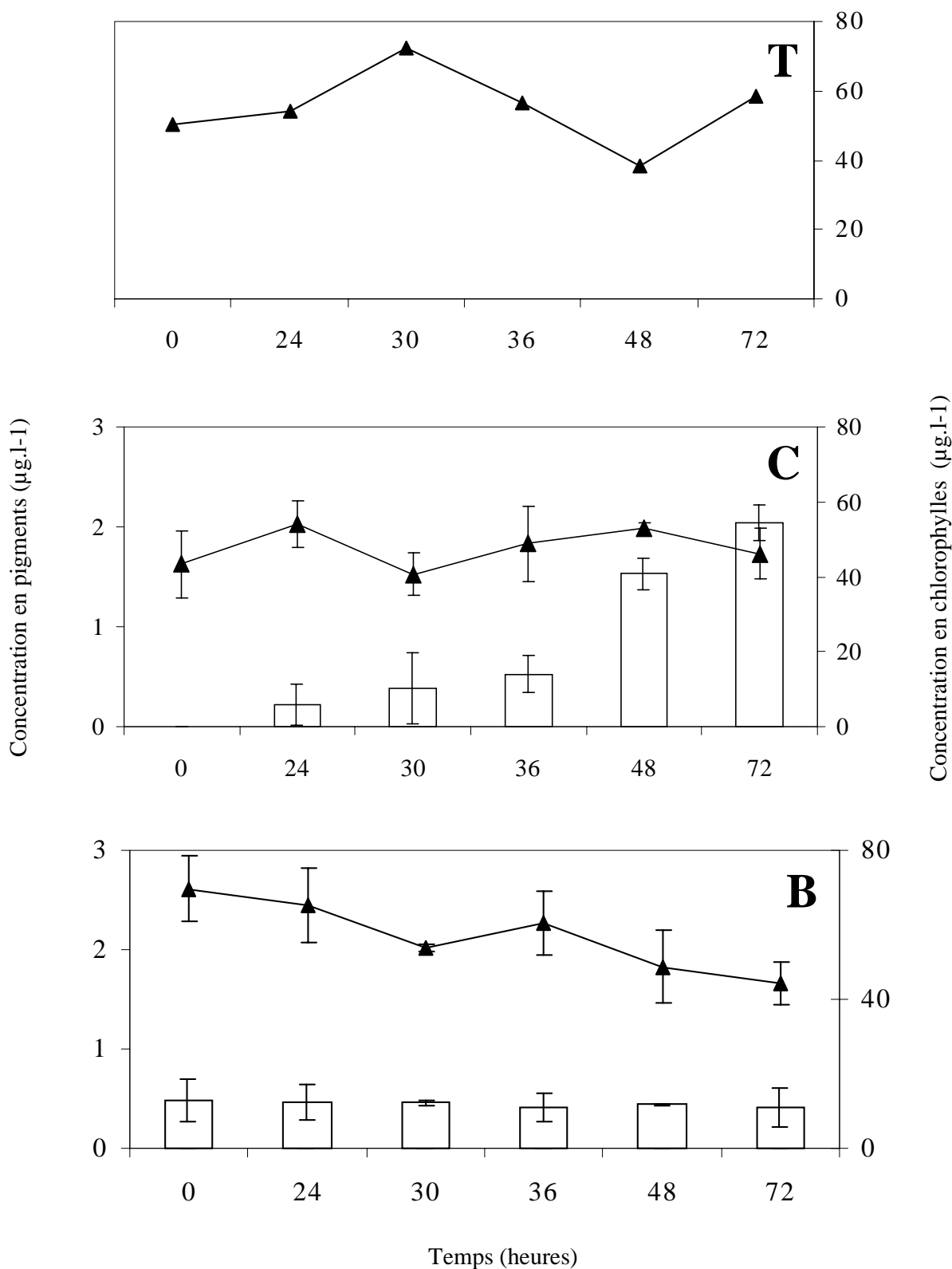




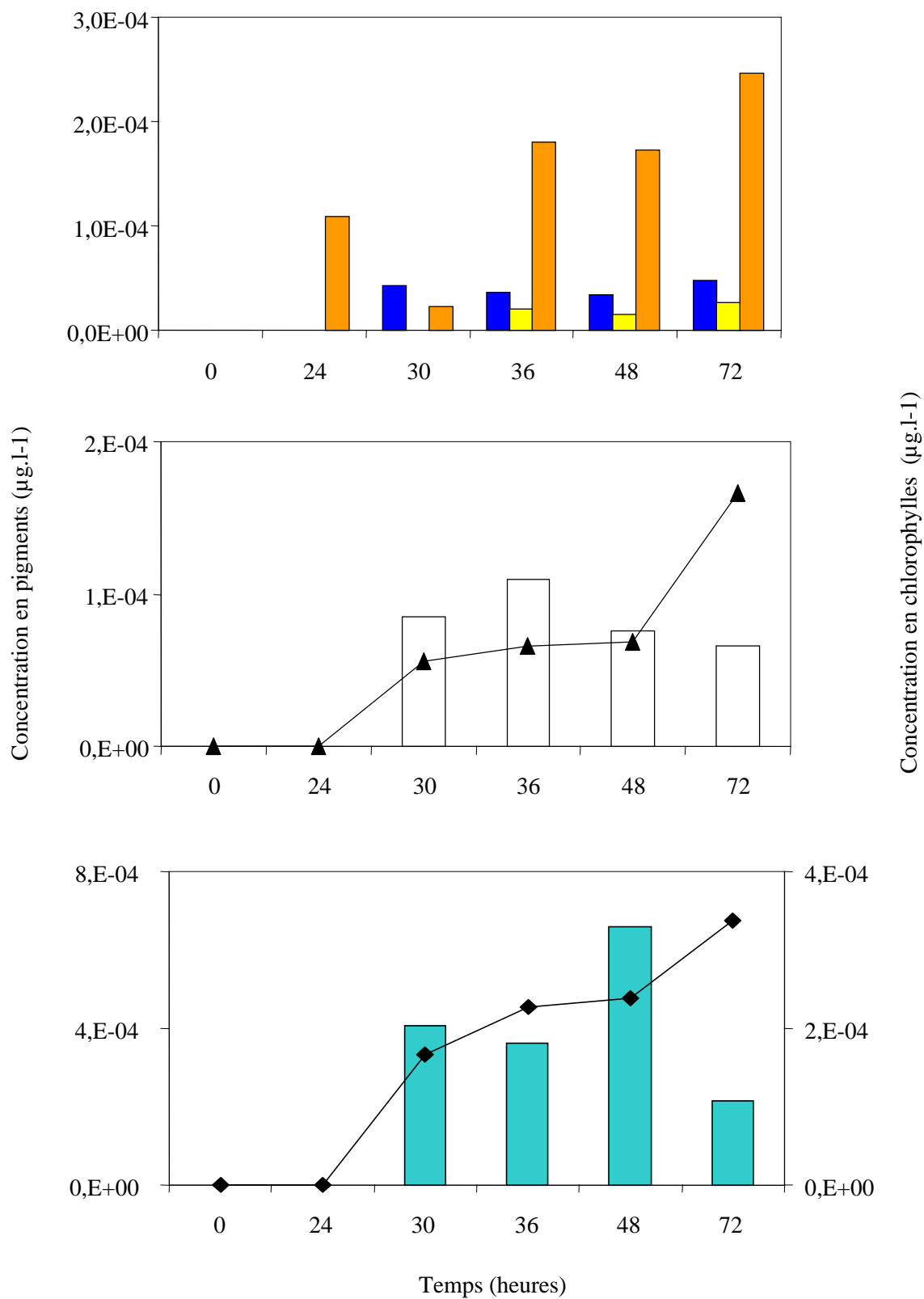
**Figure 4B-3.** Distribution des pigments caroténoïdes ( ■ fucoxanthine ; ■ lutéine ; ■ néoxanthine ; ■ violaxanthine ; ■  $\alpha$ -carotène ; ■  $\beta$ -carotène) dans les microcosmes (T, C et B) sur 72 heures.



**Figure 4B-4.** Distribution de la chlorophylle *a* (ligne continue) et de ces produits de dégradation ( chlorophyllide *a* ; ■ phéophytine *a* ; ■ pheophorbide *a* ; ■ pyropheophytine *a* ; ■ pyropheophorbide *a*) dans les microcosmes (T, C et B) sur 72 heures.



**Figure 4B-5.** Distribution de la chlorophylle *b* (ligne continue) et de ces produits de dégradation (  $\square$ phéophytine *b* ;  $\blacksquare$ pheophorbide *b* ) dans les microcosmes (T, C et B) sur 72 heures.



**Figure 4B-6.** Distribution des pigments et produits de dégradation des chlorophylles *a* (◆) et *b* (▲) dans les copépodes (■ astaxanthine; ■ lutéine ; ■ néoxanthine ; □ pheophytine *b* ; ■ pyropheophytine *a*) sur 72 heures.

*Distribution de la chlorophylle b et de ces produits de dégradation (Figure 4B-5).*

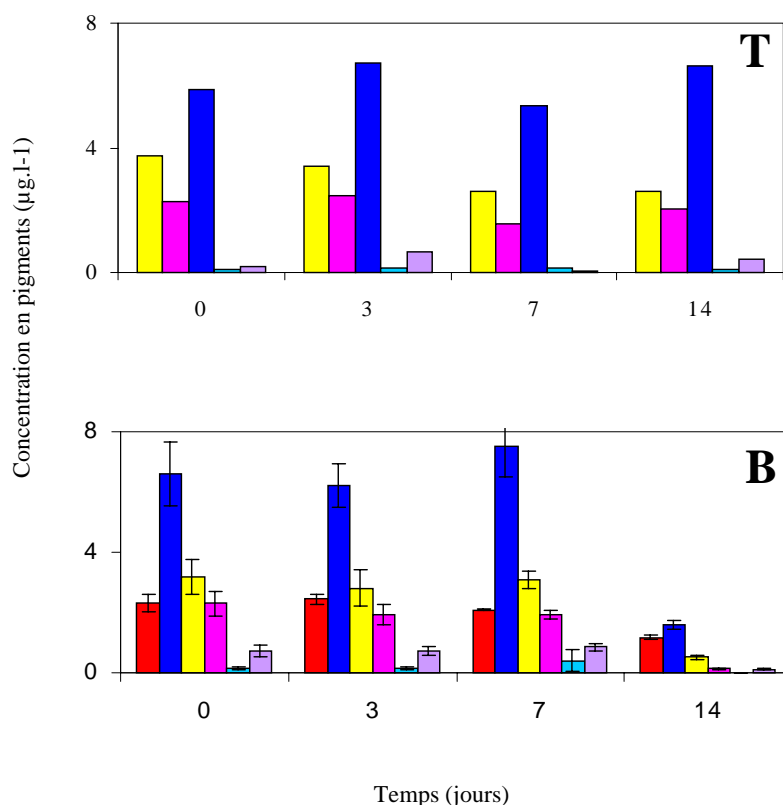
La teneur en chlorophylle *b* ne varie quasiment pas (ANOVA  $n=3$ ,  $p>0.05$ ) dans les microcosmes T et C pendant les 72 heures de l'expérience. Une certaine hétérogénéité est cependant constatée dans les témoins. La concentration en chlorophylle *b* est en constante diminution (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ) dans les microcosmes B. Les contenus des copépodes marquent à l'inverse une accumulation de pigment au cours des 72 heures.

Nous n'avons pas mesuré de phéopigments *b* dans les microcosmes (T), les concentrations étant sans doute en dessous de la limite de détection. Dans tous les autres microcosmes (C) on observe de la phéophytine *b* en quantité croissante (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ). Au contraire, pour les contenus des copépodes, la concentration diminue légèrement à 72 heures.

## 3-2-1. Suivi des pigments et produits de dégradation à plus long terme (15 jours).

*Distribution des caroténoïdes (Figure 4B-7).*

Au niveau du microcosme témoin (T), on observe pas de diminution des teneurs sur les 15 jours de l'expérience (ANOVA  $n=3$ ,  $p>0.05$ ). Dans les microcosmes contenant les bactéries et protozoaires (B) les teneurs diminuent de manière significative (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ) de 75% environ sur les deux semaines. Ce phénomène est plus visible sur les pigments marqueurs de la Chlorophycée (Lutéine, néoxanthine,...) introduite au début de l'expérience que pour la fucoxanthine issue des Diatomées déjà présentes l'échantillon de BV.



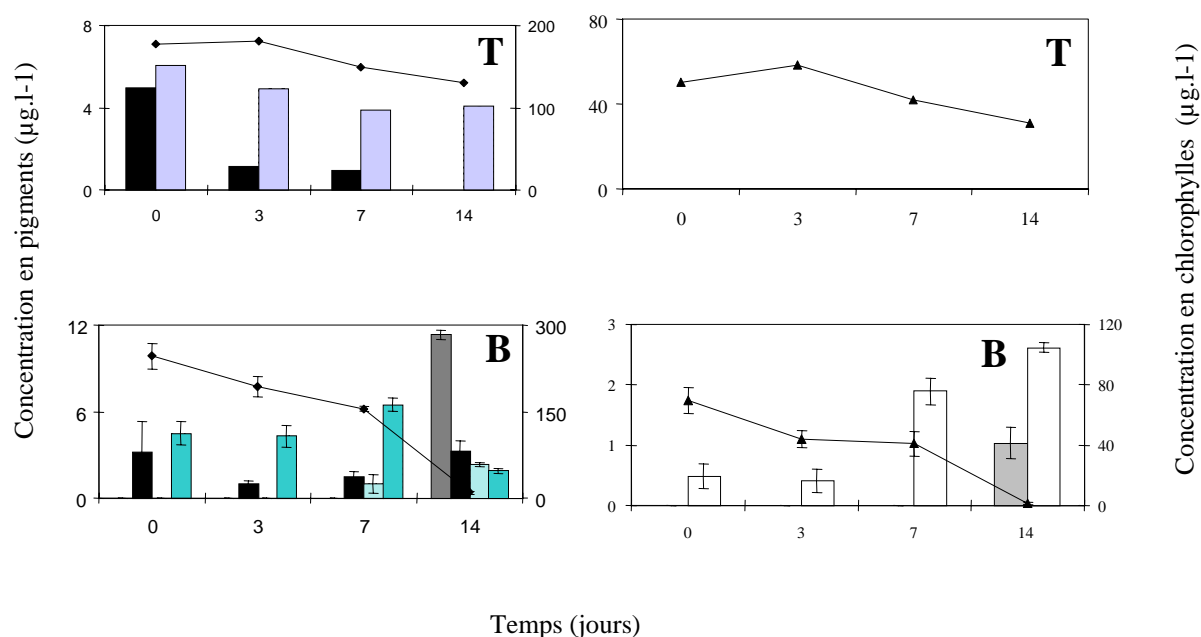
**Figure 4B-7.** Distribution des pigments caroténoïdes (■ fucoxanthine ; ■ lutéine ; ■ néoxanthine ; ■ violaxanthine ; ■ α-carotène ; ■ β-carotène) dans les microcosmes T et B sur 14 jours.

*Distribution de la chlorophylle a et de ces produits de dégradation (Figure 4B-8).*

Dans les microcosmes B, on observe une diminution (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ) de la concentration en chlorophylle *a* depuis le début de l'expérience, alors que les témoins montrent qu'une très faible diminution. Les microcosmes témoins montrent une teneur constante (ANOVA  $n=3$ ,  $p>0.05$ ) en chlorophyllide *a* et une teneur en phéophytine *a* qui diminue fortement dès trois jours, et n'est plus détectable au bout de 15 jours. Au niveau des microcosmes B, on a une apparition de phéophorbide *a* et pyropheophorbide *a* après une semaine d'incubation, alors que la phéophytine *a* et la pyropheophytine *a* restent plus ou moins constantes ( $p>0.05$ ). Une diminution marquée du rapport chlorophylle *a* sur phéopigments totaux est observée dans les microcosmes contenant les bactéries et protozoaires, le rapport passant de 35-40 à 1.

*Distribution de la chlorophylle b et de ces produits de dégradation (Figure 4B-8).*

La concentration en chlorophylle *b* est en constante diminution (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ) dans les microcosmes B avec une quasi disparition après 15 jours d'incubation, alors que pour le témoin on observe pas ou peu de diminution de cette teneur. C'est seulement au sein des microcosmes contenant les bactéries et protozoaires que l'on a pu mesurer des phéopigments *b*. La phéophytine *b* augmente régulièrement diminution (ANOVA  $n=3$ ,  $p<0.001$ ) pendant toute la durée de l'expérience alors que la phéophorbide *b* n'apparaît qu'après 15 jours d'incubation.

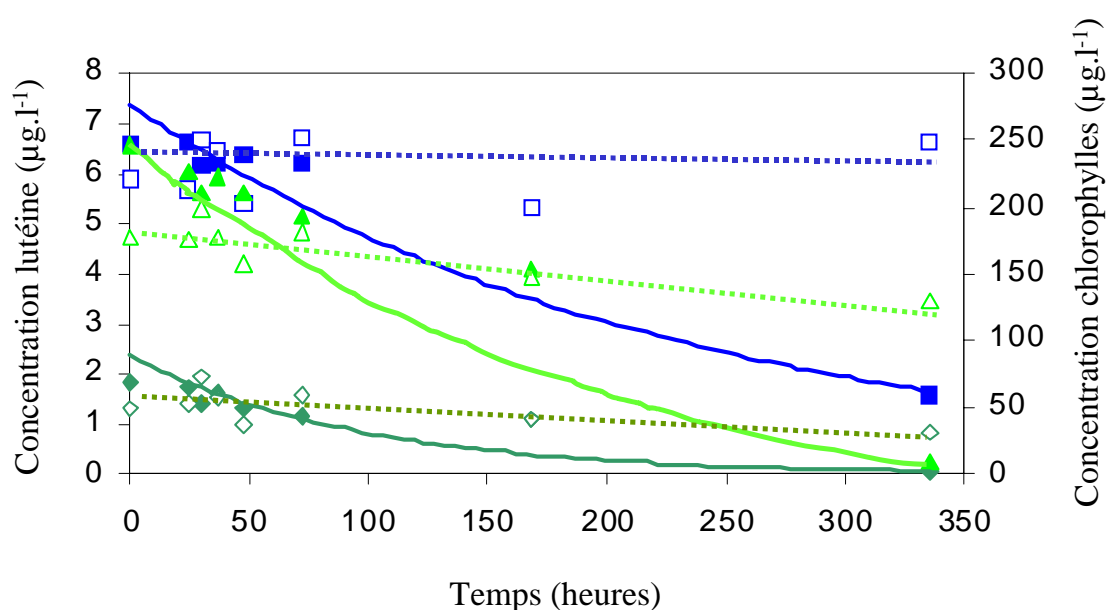


**Figure 4B-8.** Distribution de la chlorophylle *a* et de la chlorophylle *b* (lignes continues) et de leurs produits de dégradation (■ chlorophyllide *a*; ■ phéophytine *a*; ■ pheophorbide *a*; ■ pyropheophytine *a*; ■ pyropheophorbide *a*, □ phéophytine *b*; ■ pheophorbide *b*) dans les microcosmes Témoins et bactéries sur 14 jours.

### 3-2-3. Evaluation des cinétiques de dégradation associées aux paramètres étudiés.

Les cinétiques des trois pigments représentatifs de la dégradation de la Chlorophycée étudiée (Chlorophylle *a*, Chlorophylle *b* et Lutéine) ont été suivis (figure 4B-9). Des courbes de tendance exponentielles ont été définies et permettent d'évaluer ces cinétiques et de les comparer. Les teneurs en pigments dans les microcosmes T ne varient pas ou peu sur le temps de l'expérience. Ces réacteurs constituent des contrôles dans la détermination des vitesses de

disparition des pigments. L'évolution des teneurs en pigments au sein du réacteur contenant les copépodes, comme agents de la dégradation, ne montre pas de grandes variations entre le début et la fin de l'expérience celle-ci n'a duré que 72 heures dont 48 heures de contact entre les copépodes et les algues et 24 heures d'adaptation au milieu pour les algues en début d'expérimentation. L'action des copépodes sur la vitesse de dégradation des pigments n'a pu être montrée ici probablement à cause de la courte durée de l'expérience. Au delà de 48 heures d'incubation on pouvait craindre que les copépodes ne survivent pas. La vitesse de dégradation des pigments par le zooplancton dépend essentiellement du taux d'ingestion des cellules phytoplanctoniques.



**Figure 4B-9** Evaluation des cinétiques de dégradation des chlorophylles *a* (▲) et *b* (◆) et de la lutéine (■) sur 15 jours dans les séries T (figuré vide et ligne pointillée) et B (figuré plein et ligne continue).

Pour la dégradation des pigments en présence de bactéries et protozoaires, la tendance est plus nette. On constate une diminution nette des teneurs en pigments pendant les 15 jours de l'expérience.

Lutéine :	$0.054 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>b</i> :	$0.070 \text{ j}^{-1}$
Chlorophylle <i>a</i> :	$0.069 \text{ j}^{-1}$



Ces résultats montrent une plus grande résistance de la lutéine (vitesse plus faible) et une plus grande labilité de la chlorophylle *b*, ce fait aillant d'ailleurs été constaté à plusieurs reprises pour d'autres expérimentations (cf. chapitre 4A).

#### 4 -Discussion

Nous avons donc pu étudier individuellement l'action de trois facteurs agissant sur la dégradation du phytoplancton dans le milieu estuarien.

Les microcosmes **témoins (T)** permettent de suivre la sénescence des cellules algales sans l'intervention de processus photochimiques puisque l'expérience s'est déroulée à l'obscurité mais également sans l'intervention des hétérotrophes (protozoaires et bactéries) puisque l'échantillon d'incubation a été préalablement filtrée sur 0.2  $\mu\text{m}$  éliminant la quasi totalité des micro-organismes du milieu naturel. L'augmentation des teneurs en bactéries au sein de ces microcosmes est due à la présence de microorganismes dans la culture d'algue utilisée pour l'inoculum. Les bactéries associées à la culture d'algue sont différentes de la communauté présente au sein de l'estuaire et de ce fait ont une action plus réduite sur la dégradation des cellules phytoplanctoniques (cf. chapitre 4A).

Le nombre de cellules algales ne diminue quasiment pas pendant les 15 jours de l'expérience et les concentrations en caroténoïdes et chlorophylles ne changent pas ou peu. Le changement identifiable est la disparition de la phéophytine *a* présente dans les premiers temps de l'expérience, en tant que produit intermédiaire, celle-ci ne s'accumule pas et est rapidement transformée en produits incolores non identifiées. Ce qui caractérise ces microcosmes est la présence de la chlorophyllide tout au long de l'expérience, son accumulation est révélatrice de la sénescence des cellules. La chlorophyllide constitue une étape dans la biosynthèse de la chlorophylle ainsi elle est systématiquement transformée et n'a pas le temps de s'accumuler quand la cellule est vivante. La valeur du rapport chlorophylle *a* sur phéopigments augmente et passe de 15 à 30, on peut penser ici qu'il y a production de composés incolores de la chlorophylle *a* qui ne sont pas pris en compte dans le calcul du rapport. De même, il existe probablement une production de produits de dégradation incolores de la chlorophylle *b*, vu qu'aucune forme colorée n'a pu être identifiée.

Les microcosmes contenant les **copépodes (C)** permettent de cerner l'action spécifique du broutage du zooplancton sur les cellules phytoplanctoniques. Le nombre de

bactéries augmente légèrement durant l'expérience, la culture d'algue et les 100 copépodes ajoutés quoique rincés, sont porteurs de bactéries. Celles-ci se sont développées au cours de l'expérience, cependant nous n'avons pas affaire à un consortium naturellement présent dans le bouchon vaseux. On peut donc penser que leur action dégradante n'est que peu efficace (Leavitt, 1988).

L'impact du broutage a pu être évalué par le suivi du nombre de cellules algales dans les microcosmes. Ces résultats (0.07 ml/ind/h) montrent un taux de filtration 20 fois inférieur comparé à ce qui a été trouvé en milieu naturel (1.5 ml/ind/h) (White *et al.*, 1992) sans doute lié à l'unicité des proies. Par ailleurs, les taux de filtration sont à peu près équivalents à ceux déjà mesurés dans d'autres expérimentations *in vitro*: 0.08 ml/individu/h) (Razouls *et al.*, 1998). La différence de régime imposée aux copépodes par rapport au milieu naturel est sans doute ce qui joue sur le faible taux de filtration. Cependant, on observe une augmentation des teneurs en chlorophylles *a* et *b* dans les contenus des copépodes ainsi qu'une accumulation des teneurs en astaxanthine. Ce caroténoïde étant issu de la transformation du carotène par les copépodes, son accumulation indique bien une activité de broutage.

On note que peu de variations existent dans les concentrations en caroténoïdes et en chlorophylles pendant les 72 heures de l'expérience. Cependant, une diminution nette est observée dans le nombre de cellules algales consommées lors de ces incubations. Si on calcule la quantité de chlorophylle *a* par cellule chez *Scenedesmus suspicatus* on obtient 0.3 pg Chlo-*a*/cell. En se référant à la quantité de cellules disparues au cours de l'incubation, on obtient une diminution théorique de 45  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de chlorophylle *a*, or rien de tel n'a été mesuré. Cette non-disparition de chlorophylle *a* dans les incubateurs (C) peut être, en partie, expliquée par le fait qu'on analyse également le contenu des pelotes fécales au sein desquelles les résidus de chlorophylle *a* sont retenus. De plus, la part de phéopigments produits est très faible, d'un facteur 10 inférieure, et n'influence que très peu la concentration totale en chlorophylle *a*.

Si on s'intéresse maintenant à la formation des produits de dégradation des chlorophylles, on observe la présence de phéophytines *a* et *b* dans les microcosmes contenant les copépodes et la présence de pyrophéophytine *a* dans les contenus des copépodes. A aucun moment nous n'avons décelé de traces de phéophorbide comme il est habituellement observé dans les études de terrain sur le broutage des copépodes (tableau 4B-1). La phéophytine *a* déjà présente en début d'expérience laisse la place à la formation de pyrophéophytine. Il a déjà été montré que lorsque le degré de destruction de la chlorophylle est faible on a plutôt des formes pyrolysées de phéopigments du type des pyrophéophytines (Head et Harris, 1992). Or ici on

observe sur 72 heures une accumulation des chlorophylles dans les contenus des copépodes. On peut donc penser que le niveau de destruction est lent puisque largement inférieur au taux d'ingestion.

Le dernier traitement, contenant les **bactéries et protozoaires (B)** nous a permis d'étudier l'action de la communauté bactérienne sur la dégradation du phytoplancton. Nous avons donc utilisé un échantillon naturel tamisé sur 200  $\mu\text{m}$  afin de s'affranchir de l'action des copépodes "âgés". Cependant un tel échantillon d'eau de l'estuaire contient également une communauté microzooplanctonique. De nombreuses études (Paranjab, 1987; Burkill et al., 1987) montrent que le taux d'ingestion des protozoaires est équivalent, voire plus important que le taux d'ingestion des copépodes en milieu côtier. Or nous n'avons pas constaté de modification des teneurs en pigments dans cette série d'incubations pendant 72 heures comme c'est le cas dans la série contenant les copépodes (C). Ceci laisserait donc à penser que les protozoaires seraient peu nombreux et/ou peu actifs durant l'expérience. On reliera donc les conclusions de ces incubations (B) prioritairement à l'action de la communauté bactérienne.

Les teneurs en caroténoïdes sont constantes pendant la première semaine, puis diminuent considérablement la deuxième semaine. Les concentrations en chlorophylles *a* et *b* sont constantes les deux premiers jours puis commencent à décroître pour quasiment disparaître au bout de 15 jours. Les chlorophylles sont plus fragiles et on observe un changement dans les teneurs en phéopigments dès la première semaine. On observe en effet l'apparition de phéophorbide *a* et *b* ainsi que de la pyropheophorbide *a*, alors que celles-ci sont en général associée à une activité de broutage (tableau 4B-1). Par ailleurs, le rapport chlorophylle *a* / phéopigments diminue de manière très claire entre 35-40 et 1 au bout de 15 jours montrant une activité de dégradation constante et très efficace. Le calcul des cinétiques de dégradation des pigments majeurs des Chlorophycées (chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et lutéine) montre des vitesses très importantes si on les compare avec les résultats obtenus dans le chapitre 4A, et, une dégradation différentielle est bien constatée ici entre la lutéine plus réfractaire et les chlorophylles.

<b>Processus</b>		<b>Phéopigment produit</b>
Sénescence		Chlorophyllide
Broutage	copépodes	Phéophytines <i>a</i> et <i>b</i>
	protozoaires	?
Dégradation	bactéries	Phéophorbides <i>a</i> et <i>b</i>

Cette expérience nous révèle des résultats complémentaires de ceux que nous avons pu relever dans la littérature pour des études *in vitro*. La variabilité des phéopigments produits est certainement due à la différence dans les enzymes impliquées dans la dégradation comme le suggèrent Head et Harris (1996). Les algues possèdent des activités enzymatiques différentes et ceci associé à un comportement particulier des organismes hétérotrophes (taux d'ingestion chez les copépodes par exemple) joue un rôle dans le choix de la voie de transformation des chlorophylles. On peut également penser que le temps et les conditions d'incubation, permettant la séparation des processus, affectent également la chimie de la transformation des molécules de pigments. C'est pourquoi il est difficile de relier directement des résultats obtenus par incubation *in vitro* aux résultats de terrains. Cependant, ces résultats suggèrent clairement que ce qui est défini habituellement comme un lien entre le broutage et la phéophorbide n'est pas évident et que la présence de cette dernière est indissociable de l'activité bactérienne existante autour de l'activité de broutage en milieu naturel.

*Chapitre 5* – Pigments et biogéochimie dans  
les estuaires européens



## Chapitre 5 : Pigments et géochimie des milieux estuariens

### 1- Introduction

Comme cela a déjà été signalé dans le paragraphe 1-4, la MO d'origine végétale joue un rôle biogéochimique fondamental en milieu estuarien, du fait qu'elle peut représenter une fraction importante de la MO particulaire totale, mais aussi du fait qu'elle interfère activement dans le cycle de certains composés.

Le rapprochement des résultats obtenus, concernant les teneurs pigmentaires et divers paramètres étudiés par nos collègues du programme BIOGEST, dans la dizaine d'estuaires étudiés doit nous aider à mieux cerner l'importance du phytoplancton dans ces milieux frontières continent-océan.

Aussi, en se servant du jeu de données des campagnes BIOGEST, avons-nous voulu aborder les questions suivantes pour les estuaires macrotidaux européens:

- productivité primaire et teneurs pigmentaires sont-ils des paramètres qui varient dans le même sens ?
- le phytoplancton représente-t-il une fraction importante de la MO minéralisée durant son transfert dans l'estuaire ?
- y-a-t-il une relation entre les teneurs pigmentaires et les émissions de CO<sub>2</sub> dans les systèmes estuariens étudiés ?
- enfin, le phytoplancton a-t-il une incidence particulière dans les émissions de composés soufrés et organiques halogénés volatiles dans ces mêmes estuaires ?

## 2- Activité phytoplanctonique : pigments et Productivité Primaire

### 2-1. Introduction

Dans sa très pertinente revue bibliographique traitant de la problématique de reconnaissance du phytoplancton et de sa quantification en milieux estuariens, Burdloff (1997) analyse méthodiquement les difficultés posées par les mesures des pigments (indices de biomasse) et de l'activité photosynthétique (production primaire) de même que les peu évidentes relations existantes entre ces deux paramètres.

Si l'analyse des divers pigments photosynthétiques par HPLC permet une identification somme toute intéressante, une grande étendue de méthodes est employée pour mesurer la productivité primaire, les méthodes à l'oxygène et surtout au  $^{14}\text{C}$  étant les plus fréquemment utilisées. Néanmoins, les interprétations demeurent encore incertaines : sont délicates dans ces milieux les notions de production primaire brute et nette (PP brute-respiration). Ainsi, si on effectue des incubations de courte durée avec des taux de respiration faibles, on obtient une mesure de la PP brute. Au contraire, la notion de PP nette sera introduite lors d'incubation longue, de l'ordre de vingt quatre heures (Williams, 1993). De même, la variabilité spatio-temporelle des paramètres hydrodynamiques et physico-chimiques font qu'il est préférable de se livrer à des mesures *in vitro* en conditions variables. Il faut alors élaborer des courbes de réponses du phytoplancton à l'intensité lumineuse (courbe P/I) pour la modélisation ultérieure de la PP dans la colonne d'eau, ce qui dans ces milieux reste complexe, chaque modèle ayant ces limites (Burdloff, 1997).

L'intérêt des mesures BIOGEST est d'avoir pu appliquer la même approche méthodologique à un ensemble d'estuaires diversifiés, ce qui permet des comparaisons significatives.

### 2-2. Méthode

Les mesures de productivité primaire ont été faites par le Laboratoire d'Océanographie Chimique de l'Université Libre de Bruxelles dans le cadre du programme BIOGEST sur la majorité des estuaires étudiés.



Ces mesures sont effectuées par la méthode classique d'incorporation au  $^{14}\text{C}$  sur de courtes durées. Des séries aliquotes d'échantillons ont été incubées *in vitro* à des températures et des conditions d'éclairement très variables de manière à prendre en compte au maximum la très forte variabilité des caractéristiques physico-chimiques du milieu estuarien.

Les mesures de production primaire présentées ici correspondent à des productions potentielles exprimées en  $\mu\text{mol}$  de carbone par litre et par heure.

## 2-3 Variabilité de la Production Primaire dans les estuaires étudiés

### 2-3-1. Comparaison inter-estuaires.

Les résultats présentés ici concernent sept des estuaires étudiés dans le cadre du programme BIOGEST. Le tableau 5-1 regroupe les résultats moyennés sur l'ensemble du gradient de salinité de l'estuaire considéré.

Estuaire	PP moyenne ( $\mu\text{molC/l/h}$ )	Valeurs min-max
<b>Escaut</b>		
Déc. 96	<b>0.45</b>	0.27 – 0.94
Mai 98	6.41	2.14 – 25.04
Juil. 96	<b>14.31</b>	0.74 – 87.7
Oct. 98	2.97	1.18 – 8.12
<b>Gironde</b>		
Juin 97	1.44	0.3 – 3.46
Oct. 96	0.91	0.22 – 1.31
<b>Rhin</b>		
Mars 98	0.89	0.22 – 2.37
Juil. 97	1.66	0.25 – 2.83
Oct. 96	0.89	0.29 – 2.19
<b>Loire</b>	11.13	0.82 – 45.10
<b>Ems</b>	2.64	1.67 – 4.06
<b>Douro</b>	1.40	0.51 – 2.88
<b>Sado</b>	7.32	0.89 – 13.03

**Tableau 5-1.** Valeurs moyennes, minimales et maximales de la Production Primaire potentielle dans les estuaires étudiés (données du Laboratoire d'Océanographie Chimique de l'Université Libre de Bruxelles).

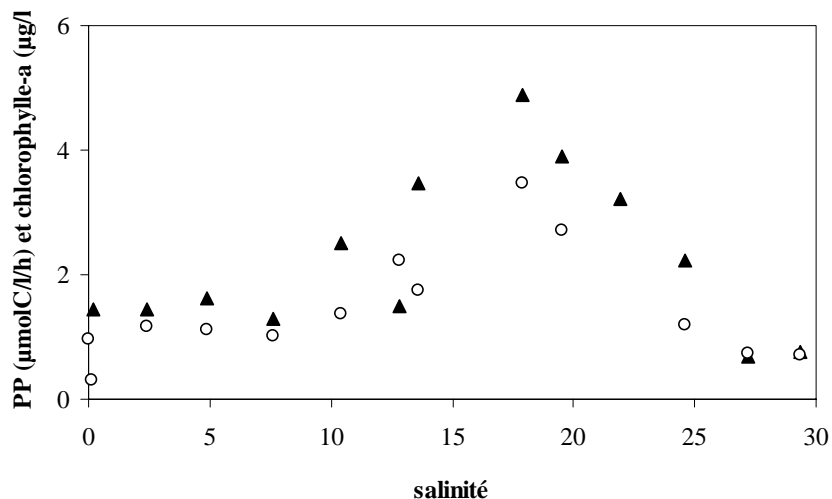
Dans leur partie fluviale, les estuaires de l'Escaut et de la Loire présentent les valeurs les plus élevées de PP, pouvant aller jusqu'à  $87.7 \mu\text{molC.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  dans l'Escaut en été. Les valeurs les plus basses ont été relevées dans le Rhin (teneurs en sels nutritifs faibles) et la Gironde (estuaire plus turbide). Les autres estuaires présentent des taux de PP compris entre 1 et  $7 \mu\text{molC.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , valeurs classiques pour des estuaires relativement turbides.

### 2-3-2. Distribution saisonnière.

Les variations saisonnières ont été étudiées sur les estuaires du Rhin, de l'Escaut et de la Gironde. La période estivale présente les plus fortes valeurs de PP dans les trois estuaires et l'hiver, période uniquement étudiée sur l'Escaut, montre les valeurs les plus basses de cette étude et ce de manière très homogène sur l'ensemble de l'estuaire (faible écart entre les valeurs minimales et maximales).

### 2-3-3. Distribution amont-aval.

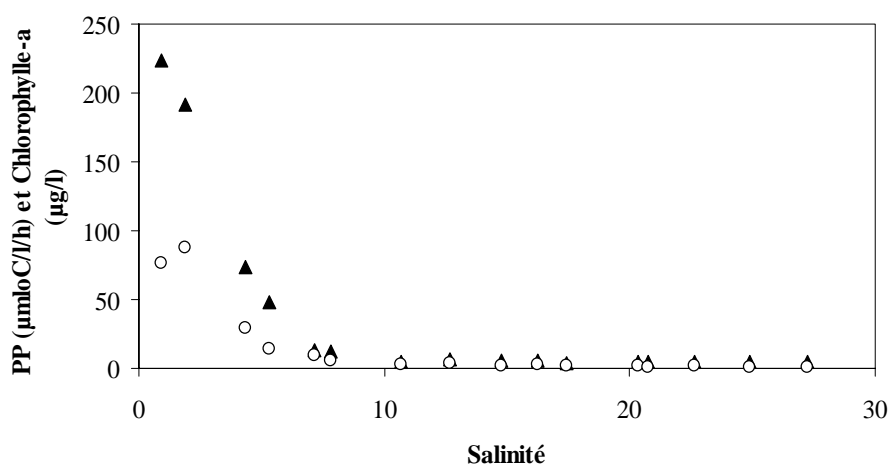
Plusieurs situations s'opposent dans la distribution amont-aval des mesures de PP. La première est illustrée par la Gironde au printemps et révèle une production phytoplanctonique marine plus élevée en aval du BV (figure 5-1) pour des salinités allant de 15 à 25. Cette distribution est également observée sur le Sado, l'Ems et l'Elbe.



**Figure 5-1.** Distribution des teneurs en chlorophylle *a* (▲) et des valeurs de Production Primaire (○) dans l'estuaire de la Gironde (juin 97).

Un second type de distribution est illustré par l'Escaut où le maximum de PP est situé en amont de l'estuaire (figure 5-2). Cette distribution est également observée dans les estuaire du Douro et de la Loire. Le Rhin montre une situation intermédiaire avec à la fois des maxima en amont et pour des salinités allant de 15 à 25.

Ces deux types de distribution mettent simplement en évidence le fait que ce sont les zones fluviales amont et les zones d'embouchure estuarienne qui sont les plus productives, ceci en relation directe avec le phénomène d'eaux claires, alors que dans l'estuaire central les fortes turbidités limitent toute production phytoplanctonique (Irigoien et Castel, 1997).

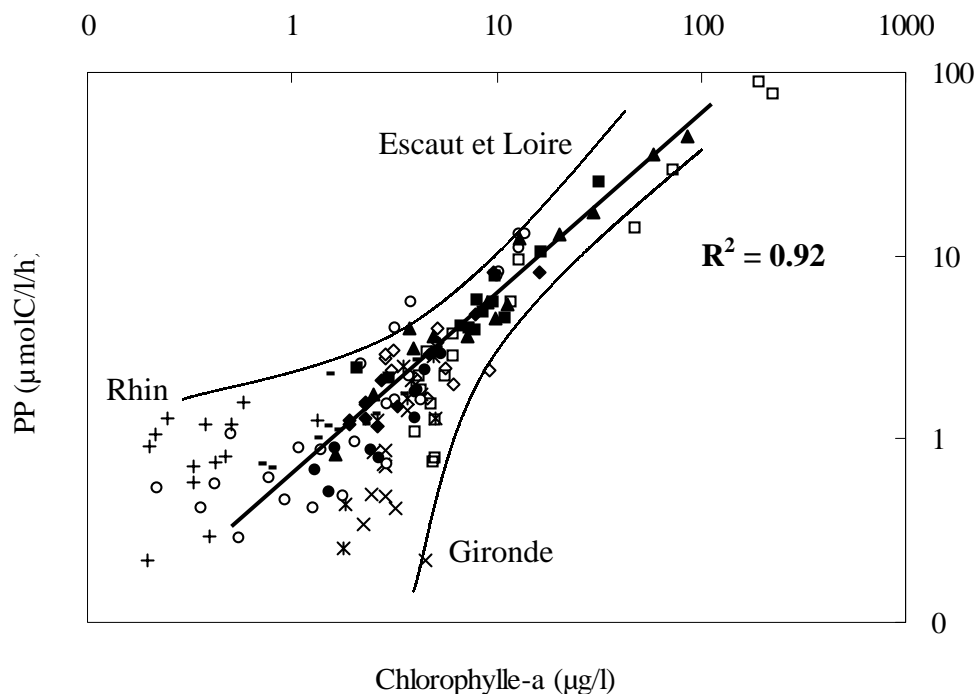


**Figure 5-2.** Distribution des teneurs en chlorophylle *a* (▲) et des valeurs de Production Primaire (○) dans l'estuaire de l'Escaut (Juillet 96).

#### 2-4. Recherche de corrélations entre pigments et Productivité Primaire.

Une corrélation très significative ( $R^2 = 0.92$ ) est observée entre les valeurs de PP et la mesure de la chlorophylle *a* indicatrice de biomasse phytoplanctonique (figure 5-3). Deux ensembles s'individualisent clairement d'une telle représentation : le premier regroupe les estuaires de la Loire et de l'Escaut très riches en phytoplancton dans leur zone amont (fortes valeurs de PP et de chlorophylle *a*) et à l'opposé le Rhin et la Gironde montrant de faibles valeurs

de PP et de chlorophylle *a*, où on peut néanmoins observer, pour la Gironde des développements phytoplanctoniques, sporadiques (Etcheber, 1986).



**Figure 5-3.** Corrélation entre les valeurs de production primaire et les teneurs en chlorophylle *a* (biomasse phytoplanctonique) sur l'ensemble des estuaires étudiés (+ :Rhin, o : Gironde, □ : Escaut, ▲ : Loire).

## 2-5. conclusion

Même pour les estuaires visités à différentes saisons, il est vrai que la portée de nos résultats souffre du faible pas temporel de notre échantillonnage qui, au moins pour les parties fluviales et les embouchures de ces estuaires (zones à fortes variabilités saisonnières de la fraction organique) n'est pas assez conséquent pour bien intégrer ces variations temporelles.

Aussi, est-il intéressant de voir que les paramètres PP potentielles et teneurs en chlorophylle permettent de bien différencier les estuaires eutrophisés (Loire et Escaut, dans leur partie amont) et estuaires faiblement productifs (Rhin, Gironde) qui, pour des raisons différentes (limitation de sels nutritifs et très fortes turbidités) affichent des valeurs basses des paramètres étudiés ici.

### 3-Rôle du phytoplancton dans le bilan du carbone organique estuarien

#### 3-1 Introduction

A l'aide des résultats BIOGEST et des données bibliographiques complémentaires concernant les teneurs en carbone organique particulaire dans les différents estuaires, un bilan approché global de la minéralisation de ce paramètre à l'intérieur de ces systèmes a été proposé (Abril et al., 2002). Le but de l'approche exposée ci-dessous est de confronter ces résultats à nos données portant sur :

- la biomasse phytoplanctonique ;
- les cinétiques de dégradation de la fraction planctonique et des litières ;

de façon à faire ressortir les facteurs majeurs qui influencent le devenir de la MO dans les estuaires : qui son origine, donc de son état de labilité, ou de la structure hydro-sédimentologique des milieux traversés gouverne préférentiellement l'évolution de la fraction organique ?

#### 3-2 Bilan du carbone organique des différents estuaires

Les résultats correspondant aux bilans de CO dans les différents estuaires sont rassemblés dans le tableau 5-2. Les temps de résidence figurant dans le tableau correspondent aux temps de résidence des eaux, les temps de résidence des particules n'étant pas connus pour tous les estuaires.

Estuaire	Temps de résidence (jour)	POC fluvial (mg/l)	POC BV (mg/l)	Perte (mg/l)	% minéralisé	POC algal/POC total (%)
Escaut	30-70	18.3	3.5	14.8	82	10
Gironde	60-90	2.6	1.3	1.3	50	5
Ems	30-70	2.8	1.3	1.5	57	<5
Tamise	30	3.5	1.0	2.5	72	5
Sado	30	2.9	1.2	1.7	59	15
Loire	15-30	2.9	1.4	1.5	52	55
Elbe	15-30	2.8	1.7	1.1	38	20
Rhin	5	0.8	0.75	<0.1	5	20
Douro	2	0.5	0.5	0	0	40

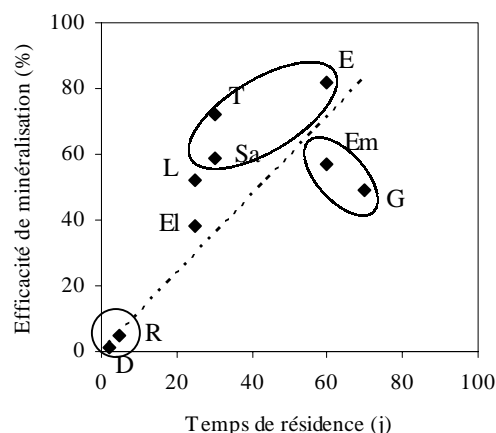
**Tableau 5-2.** Bilan de CO entre les parties fluviales et estuariennes (Abril et al., 2002).

Les bilans présentés sur l'Escaut, la Gironde et à un moindre degré sur le Rhin, ont été dressés à partir de suffisamment de données pour paraître précis (missions complémentaires faites par G.Abril durant son séjour en Belgique de deux ans et H.Etcheber) et les teneurs moyennées de POC fluvial, pondérées par le facteur débit, sont de l'ordre de grandeur des valeurs précédemment relevées (Abril et al.,2002).

Les teneurs moyennes en CO des particules des ZMT des différents estuaires, stables dans le temps, et bien mesurées lors des campagnes BIOGEST, associées aux teneurs en MES de ces zones, ont permis de calculer les teneurs en POC estuarien avec une précision raisonnable. Par différence entre le POC fluvial et POC estuarien, ont été estimées les pertes de CO entre les deux sous-ensembles estuariens et proposés des pourcentages de minéralisation par rapport au POC fluvial entrant (Abril et al., 2002).

Les pourcentages de POC algal sur le POC total pour chaque estuaire ont été calculées à l'aide de la relation  $\text{POC algal} = a \times \text{chlorophylle } a$ , avec une attention toute particulière, dans chaque estuaire, portée au facteur « a », dont on connaît l'extrême variabilité dans les environnements aqueux (Cloern et al.,1995).

Sur la figure 5-4, ont été portés l'efficacité de minéralisation en fonction des temps de résidence des eaux dans les différents estuaires étudiés.



**Figure 5-4.** Distribution de l'efficacité de minéralisation en fonction du temps de résidence des eaux dans les estuaires étudiés (R :Rhin, D :Douro, El :Elbe, L :Loire, Sa :Sado, T :Tamise, E :Escaut, Em :Ems, G :Gironde) (Abril et al., 2002).

### 3-3 Discussion et conclusion

Il ressort clairement de notre analyse que le Rhin, la Gironde et l'Escaut, échantillonnées saisonnièrement, sont trois estuaires où la fraction organique a un devenir très différent :

- l'Escaut, un estuaire où la MO entrante, à caractère fortement labile (la MO d'origine anthropique est largement majoritaire devant la fraction planctonique, Abril, 1999) et où les eaux ont un temps de résidence suffisamment long pour être minéralisé à près de 80% ; la Tamise est à un moindre degré le Sado se rapproche de ce modèle ;
- la Gironde, un estuaire où, bien que la MO soit à près de 50% de la MO d'origine pédologique plutôt réfractaire (Veyssy et al., 1999), les particules restent suffisamment longtemps pour que le pool phytoplanctonique et le matériel issu des litières (près de 50 à eux deux de la MO entrante) puissent être minéralisés, ce qui correspond aux bilans trouvés par Veyssy et al. (1999) ; l'Ems est proche de ce type d'estuaire.
- enfin, le Rhin, à temps de résidence des eaux très court, où on n'observe que de très légères décroissances des teneurs en CO particulaires, quand elles existent, alors que la fraction phytoplanctonique est fortement significative, tout ce matériel étant appelé à se dégrader en domaine côtier hors estuaire ; le Douro est proche de ce modèle.
- la Loire est un cas intermédiaire où la fraction phytoplanctonique près de la moitié des apports est vraisemblablement consommée dans l'estuaire, alors que l'autre fraction organique (pédologique) passe l'estuaire sans encombre.

Par manque de précision, on ne peut rien dire sur l'Elbe, alors que pour la Seine, nos données ne sont pas suffisantes sur les apports amont au niveau de Poses, nous n'avons pas pu pousser nos investigations plus avant. De part nos critères, si la charge organique entrante particulière est riche en phytoplancton, ce matériel devrait être consommé dans l'estuaire, toute la MO anthropique devrait connaître le même avenir.

## **4- Disparition du phytoplancton : pigments et respiration (flux de CO<sub>2</sub>)**

### **4-1 Introduction**

La pression partielle en CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) dans les eaux est un paramètre conditionné par l'activité biologique et les conditions physiques du milieu: respiration et production primaire sont respectivement source et puits de CO<sub>2</sub>, tandis que les conditions de vent et de courant, en contrôlant l'intensité des échanges à l'interface air-eau, influencent les transferts de CO<sub>2</sub> vers l'atmosphère et donc sa concentration dans l'eau (Gattuso et al 1998; Frankignoulle et al. 1998). Puisque le phytoplancton joue un rôle important dans l'équilibre hétérotrophie/autotrophie d'un écosystème, on peut supposer observer une relation entre pCO<sub>2</sub> et chlorophylle *a* dans les estuaires.

### **4-2 Méthode**

La pression partielle de CO<sub>2</sub> est mesurée à l'aide d'un équilibrateur, branché sur un circuit d'eau prélevée en continu. Le principe consiste à équilibrer l'eau avec un volume d'air dans lequel est mesuré la pCO<sub>2</sub> à l'aide d'un analyseur à Infra-Rouge LICOR. L'échange de CO<sub>2</sub> entre l'air et l'eau est optimisé dans l'équilibrateur, où l'eau percole de haut en bas d'un cylindre rempli de billes, traversé par un débit d'air de bas en haut (Abril, 1999). La pCO<sub>2</sub> s'exprime en  $\mu$ atmosphères.

### **4-3 Variabilité de la pCO<sub>2</sub> dans les estuaires**

#### 4-3-1. Comparaison inter-estuaires.

Les eaux des estuaires sont la plupart du temps sursaturées en CO<sub>2</sub> par rapport à l'équilibre atmosphérique (370  $\mu$ atm), avec des valeurs de pCO<sub>2</sub> très variables aussi bien d'un estuaire à un autre, de l'amont vers l'aval et d'une saison à l'autre.



	pCO <sub>2</sub> totalité estuaire		pCO <sub>2</sub> zone amont (S<15)		pCO <sub>2</sub> zone aval (S>15)	
Rhin	914	— 438	1170	— 372	516	— 117
Escaut	2784	— 2363	4581	— 1996	867	— 359
Gironde	935	— 549	1204	— 573	559	— 153
Loire	1950	— 721	2128	— 709	1628	— 695
Tamise	1589	— 1053	2596	— 453	708	— 375
Ems	1656	— 908	2418	— 761	1003	— 300
Elbe	628	— 295	847	— 271	409	— 58
Douro	1256	— 688	1763	— 360	547	— 174
Sado	1919	— 1318	3703	— 1730	1473	— 761

**Tableau 5-3.** Données moyennes de pCO<sub>2</sub> mesurées dans les estuaires pendant Biogest. Les intervalles de variations correspondent aux écart types calculés à partir de l'ensemble des données; ils rendent compte de la variabilité spatiale sur la zone considérée et dans le cas de l'Escaut, la Rhin et la Gironde, de la variabilité saisonnière.

L'Escaut étant l'estuaire le plus pollué par des rejets domestiques, il présente les plus fortes sursaturations en CO<sub>2</sub> (tableau 5-3), en particulier dans sa zone amont, où la valeur maximale observée était de 7718 µatm en Mai 1998 à la salinité 0.6, ce qui correspond à une sursaturation de près de 2000%. Viennent ensuite la Loire, la Tamise, l'Ems et le Sado avec une pCO<sub>2</sub> moyenne de l'ordre de 1600-2000 µatm. Enfin, le Rhin, la Gironde le Douro et l'Elbe forment un groupe à pCO<sub>2</sub> plus modérée, inférieure en moyenne à 1300 µatm (tableau 5-2).

#### 4-3-2. Distribution spatio-temporelle.

En ce qui concerne les variations de l'amont vers l'aval, on observe de manière systématique une décroissance de la pCO<sub>2</sub> avec la salinité (Tableau 5-2 et Figure 5-5), que l'on attribue à une respiration plus intense à l'amont où se situe le plus souvent le bouchon vaseux et à un dégazage important dans la zone amont (Frankignoulle et al. 1998). Il est intéressant de noter que pour les zones aval, la Loire, l'Ems et le Sado présentent des pCO<sub>2</sub> supérieures à celles de l'Escaut. Ceci est dû à plusieurs facteurs :

- dans l'Escaut, la production de CO<sub>2</sub> par la respiration hétérotrophe, mais aussi par l'acidification due au processus de nitrification, est très localisée dans la zone amont ;

- dans la Loire, le bouchon vaseux était très étendu lors de la campagne de mesure, s'étendant largement au-delà de la salinité 15 ;
- dans l'Ems et le Sado, le lessivage semi diurne de larges zones intertidales constitue une source importante de CO<sub>2</sub> pour les eaux de salinité > 15.

Des sous-saturations locales en CO<sub>2</sub> ont aussi été observées localement, toujours dans la zone aval où la pénétration de la lumière permet une activité photosynthétique.

La pCO<sub>2</sub> présente des variations saisonnières importantes dans chaque estuaire, avec un maximum en été et un minimum en hiver (Figure 5-5), la respiration étant fortement conditionnée par la température. Cependant, aux saisons intermédiaires, la pCO<sub>2</sub> peut aussi être très élevée. C'est le cas dans l'Escaut, lors des premières crues d'automne, lorsque le lessivage de zones urbaines apporte de grandes quantités de MO labile et au printemps dans la Gironde, quand les apports de MO phytoplanctonique fluviale commencent à être importants.

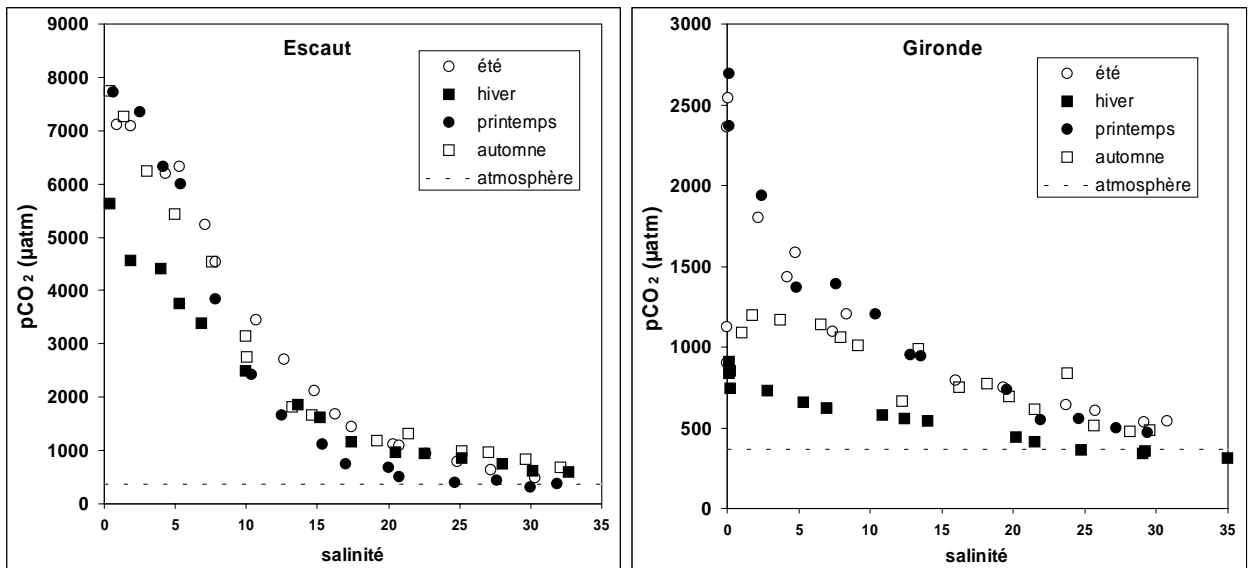
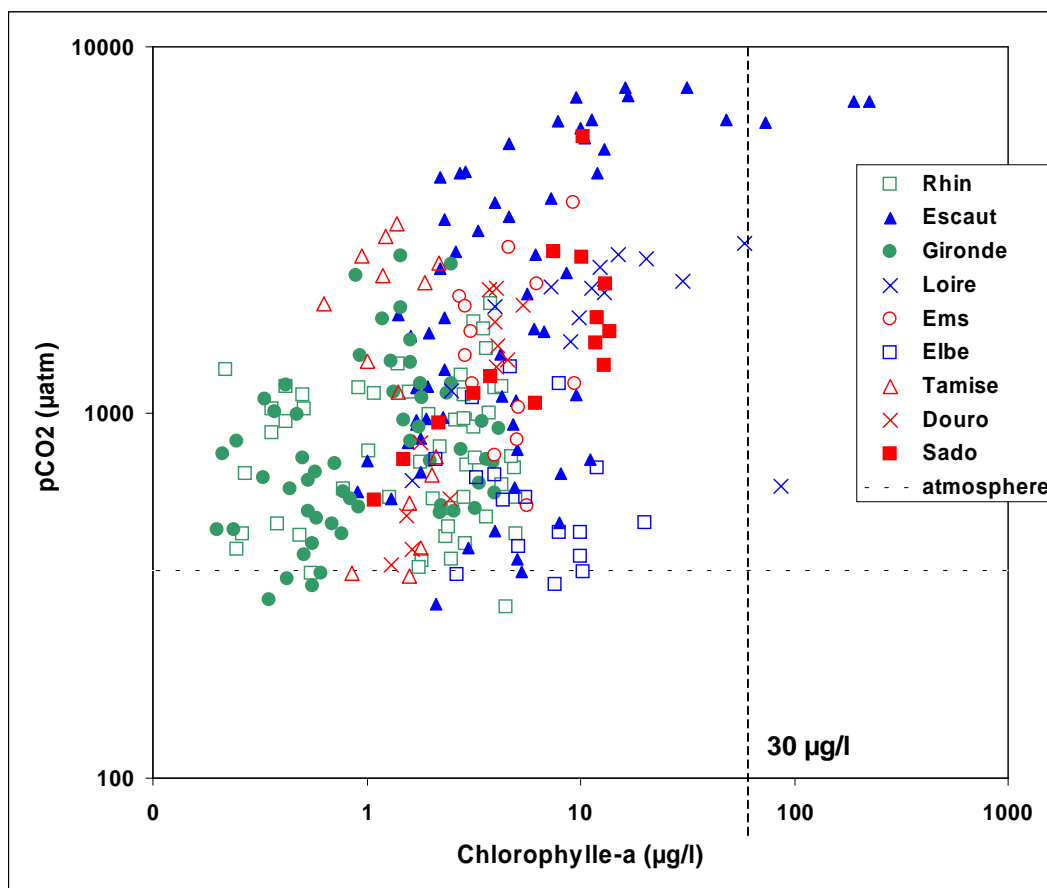


Figure 5-5: variations saisonnières de la pCO<sub>2</sub> dans la Gironde et dans l'Escaut.

#### 4-4. Recherche de corrélations entre les pigments et la pression de CO<sub>2</sub>

La photosynthèse par le phytoplancton agissant comme puits de CO<sub>2</sub>, on pourrait s'attendre à une corrélation négative entre biomasse phytoplanctonique et pression partielle en CO<sub>2</sub>, comme c'est le cas par exemple dans l'océan côtier (Frankignoulle & Borges 2001). Dans la Figure 5-6, la pCO<sub>2</sub> est représentée en fonction de la concentration en chlorophylle *a*. On constate que, même représentés en échelle log-log, ces deux paramètres ne sont pas corrélés, que l'on considère un estuaire seul ou tous les estuaires ensemble.



**Figure 5-6:** distribution de la pCO<sub>2</sub> en fonction de la Chlorophylle *a* dans les estuaires étudiés pendant Biogest, toutes saisons et salinités confondues.

On peut cependant tirer de ce diagramme deux observations intéressantes qui permettent de mieux comprendre le métabolisme dans les estuaires. La première observation est que les

biomasses phytoplanctoniques les plus importantes ( $\text{chl-a} > 30 \mu\text{g/l}$ ) observées dans les zones amont des estuaires de la Loire et de l'Escaut dont les fleuves sont les plus eutrophisés (Abril et al. 2002), correspondent à des  $\text{pCO}_2$  élevées, sauf le point rivière échantillonné sur la Loire ( $\text{pCO}_2 = 626 \mu\text{atm}$ ). Ceci vient du fait que, dans ces zones fortement turbides, où les déficits en oxygène les plus marqués ont été observés (<30% de la saturation en oxygène), le phytoplancton n'agit plus en tant que puits de  $\text{CO}_2$ , mais au contraire contribue par ses fortes biomasses à la respiration du système: d'une part les cellules phytoplanctoniques respirent lorsqu'elles se retrouvent à l'obscurité et d'autre part elles servent de substrat préférentiel pour l'activité hétérotrophe bactérienne. Ce fonctionnement semble aussi valable pour le Sado, où  $\text{pCO}_2$  et  $\text{Chl-a}$  sont corrélés positivement.

La seconde observation concerne les sous-saturations en  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2 < 370 \mu\text{atm}$ ) qui ont été observées uniquement dans les zones marines (Salinité > 20) des estuaires du Rhin, de la Gironde, de l'Elbe, de la Tamise et de l'Escaut. Seule l'activité photosynthétique du phytoplancton est susceptible de créer ces sous-saturations et d'inverser le flux de  $\text{CO}_2$  à travers l'interface eau-air. Or on constate qu'elles apparaissent dans une gamme très large de biomasse phytoplanctonique allant de  $0.35 \mu\text{g/l}$  de  $\text{Chl-a}$  en Février 1998 à la salinité 35 dans la Gironde à  $10.3 \mu\text{g/l}$  de  $\text{Chl-a}$  en Avril 1997 à la salinité 21.7 dans l'Elbe. Il n'y a donc pas de lien direct entre biomasse phytoplanctonique, production primaire et  $\text{pCO}_2$  dans l'eau. Ceci peut être expliqué d'une part par le fait que, selon les régimes de mélange vertical et de disponibilité de la lumière, une forte biomasse phytoplanctonique ne se traduit pas nécessairement par une forte production primaire nette (cf paragraphe 2 de ce chapitre), et d'autre part par le caractère très dynamique et complexe des transferts de  $\text{CO}_2$  aussi bien par advection amont-aval que par ventilation vers l'atmosphère. En effet, pour créer une sous-saturation en  $\text{CO}_2$ , l'activité photosynthétique doit tout d'abord utiliser tout le  $\text{CO}_2$  en excès dans l'eau et notamment celui produit dans la zone amont plus turbide puis transporté vers l'aval avec les masses d'eau. S'il est possible que, de l'amont vers l'aval, l'écosystème estuarien passe d'un métabolisme net hétérotrophe à un métabolisme net autotrophe, cela ne se traduit pas nécessairement par un passage simultané d'une source à un puits de  $\text{CO}_2$  pour l'atmosphère. Si elle reçoit des eaux largement sur-saturées en  $\text{CO}_2$  venant de l'amont, la zone euphotique en aval peut rester source de  $\text{CO}_2$  pour l'atmosphère même si la production primaire brute y est largement supérieure à la respiration totale (Gattuso et al. 1998;

Borges & Frankignoulle 1999; Abril 1999). Ainsi, selon l'intensité de la ventilation de l'excès de CO<sub>2</sub> vers l'atmosphère, l'activité photosynthétique sera plus ou moins capable de créer des sous-saturations dans l'eau. Par exemple, en Février 1998 dans le panache de la Gironde, on peut supposer que des conditions météorologiques favorables au dégazage, avec des vents forts, ont prévalu quelques jours avant la campagne, diminuant la pCO<sub>2</sub> résiduelle dans l'eau, et qu'ensuite la production primaire par une biomasse phytoplanctonique peu abondante (Chl-a=0.35µg/l) a suffi pour créer une sous-saturation des eaux.

#### **4-5 Conclusion**

Contrairement à d'autres écosystèmes (océans ou lacs), les pigments ne constituent pas un paramètre permettant de décrire la pression partielle en CO<sub>2</sub> dans les estuaires. Ceci est dû à la complexité d'une part des transferts d'amont-aval des cellules phytoplanctoniques et des réponses de leur métabolisme à des conditions de lumière variables et d'autre part de l'intensité des échanges de CO<sub>2</sub> par advection entre les masses d'eau et entre l'eau et l'atmosphère.

### **3- Action du phytoplancton sur la chimie des gaz : pigments et concentrations de DMS et de composés organiques halogénés volatiles.**

#### **A- Chimie du DMS et phytoplancton.**

##### **5A-1. Introduction**

Parmi les composés soufrés volatiles (DMS, COS, CS<sub>2</sub>), le diméthyl sulfure (DMS) représente plus de 50% des émissions de soufre naturel, et apparaît comme un produit intermédiaire dans les processus biologiques et chimiques. Dans les eaux naturelles, DMS est produit par clivage enzymatique de la molécule de diméthylsulphonium propionate (DMSP), celui-ci étant produit par plusieurs classes de phytoplancton. Il est établi que des liens existent entre les émissions de DMS et le climat à travers la formation d'aérosols et de noyaux de condensation de nuages (CCN).

Les marges océaniques ont été reconnues comme sources significatives de DMS (Andrea, 1986 ; Turner *et al.*, 1996) et plusieurs résultats suggèrent que les estuaires et les plumes associées peuvent représenter une source importante de DMS vers l'atmosphère (Iverson *et al.*, 1989, Turner *et al.*, 1996), seul composé sulfureux dont nous allons étudier les éventuelles relations le liant aux concentrations en pigments dans les estuaires étudiés.

### **5A-2. Méthode**

Le DMS a été mesuré lors d'une dizaine de campagnes du programme BIOGEST par le Centre des Faibles Radioactivités (Gif-sur-Yvette). Les composés soufrés des échantillons d'eau de surface sont piégés à  $-90^{\circ}\text{C}$  et analysés par Chromatographie en phase Gazeuse associée à un détecteur à chemi-luminescence du sulfure (Sciare et al., 2002). Ce détecteur donne une réponse linéaire pour tous les composés soufrés. La limite de détection se situe à 0.1 ng pour tous les composés.

### **5A-3. Distribution du DMS dans les estuaires**

#### 5A-3-1. Comparaison inter-estuaires ;

Le Rhin et la Loire sont caractérisés par les concentrations en DMS les plus fortes. La Gironde, l'Escaut, l'Elbe et l'Ems révèlent des teneurs 3 à 4 fois moins élevées (tableau 5-4). Le Rhin présente un contexte hydrographique particulier avec un très fort débit fluvial impliquant un faible temps de résidence des eaux. Le gradient de salinité se localise sur une très faible distance et on peut dire que pour des salinités supérieures à 5, on se trouve dans la plume de l'estuaire. Cette distribution et la présence de Dinoflagellés expliquent les fortes valeurs mesurées dans cet estuaire par rapport aux autres. Exception faite des pics observés dans certains estuaires (Gironde aval, Rhin), les teneurs en DMS rencontrées lors de cette étude sont 5 à 10 fois inférieures à celles qu'on peut observer dans les eaux côtières et dans l'océan (Turner *et al.*, 1996).

## 5A-3-2. Distribution saisonnière.

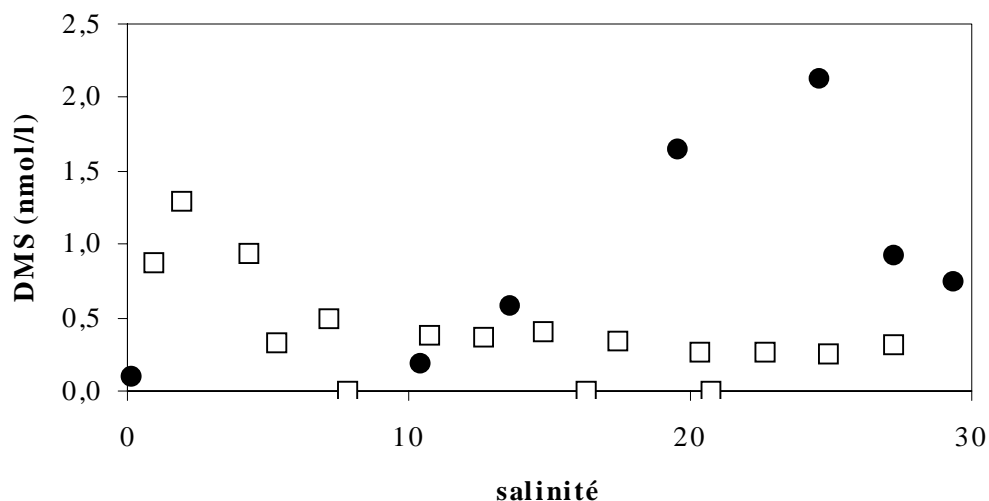
Des variations saisonnières révèlent avec des maxima pendant les périodes printanière et estivale. Ces différences sont à la fois dues à une forte biomasse de phytoplancton pendant ces périodes mais surtout vraisemblablement à un changement spécifique des populations.

<b>Estuaire</b>	<b>DMS (nmol/l)</b>	<b>Valeurs min-max</b>
<b>Escaut</b>		
Mai 98	0.6 (n=16)	0.4 – 1.2
Juillet 96	0.5 (n=13)	0.3 – 1.3
Décembre 96	0.4 (n=13)	0.02 – 2.4
<b>Gironde</b>		
Juin 97	0.7 (n=18)	0.05 – 1.7
Septembre 97	<b>0.2</b> (n=17)	0.03 – 1.0
<b>Rhin</b>		
Juillet 97	<b>4.2</b> (n=14)	0.4 – 10.0
<b>Elbe</b>		
Avril 97	0.9 (n=50)	0.1 – 2.5
<b>Ems</b>		
Juillet 97	<b>0.2</b> (n=16)	0.03 - 1.4
<b>Loire</b>		
Septembre 98	1.3 (n=20)	0.4 – 3.8

**Tableau 5-4.** Variabilité saisonnières des concentrations de DMS dans les estuaires étudiés et pour les saisons suivies (Sciare *et al.*, 2002).

## 5A-3-3. Distribution amont-aval.

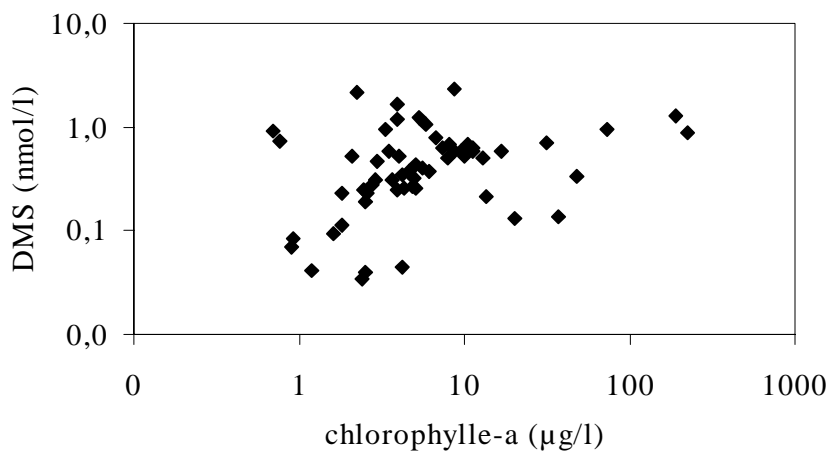
Deux distributions peuvent résumer l'évolution amont-aval des teneurs en DMS par rapport au gradient de salinité. La première, illustrée par la Gironde (figure 5-7), montre une augmentation des teneurs en aval et dans la plume de l'estuaire. Cette distribution est également observée dans l'Elbe, l'Ems et le Rhin. La seconde, illustrée par l'Escaut, montre un maximum des teneurs en DMS en amont du BV. Cette distribution est également observée sur la Loire.



**Figure 5-7.** Distribution des teneurs en DMS dans les eaux de surface des estuaires de la Gironde (●) et de l'Escaut (□) le long du gradient de salinité.

#### 5A-4. Recherche de corrélations entre les pigments et les teneurs en DMS

Aucune corrélation significative n'a pu être observée entre les teneurs en DMS et la biomasse phytoplanctonique (chlorophylle a) (figure 5-8), toutes valeurs confondues pour les estuaires étudiés.

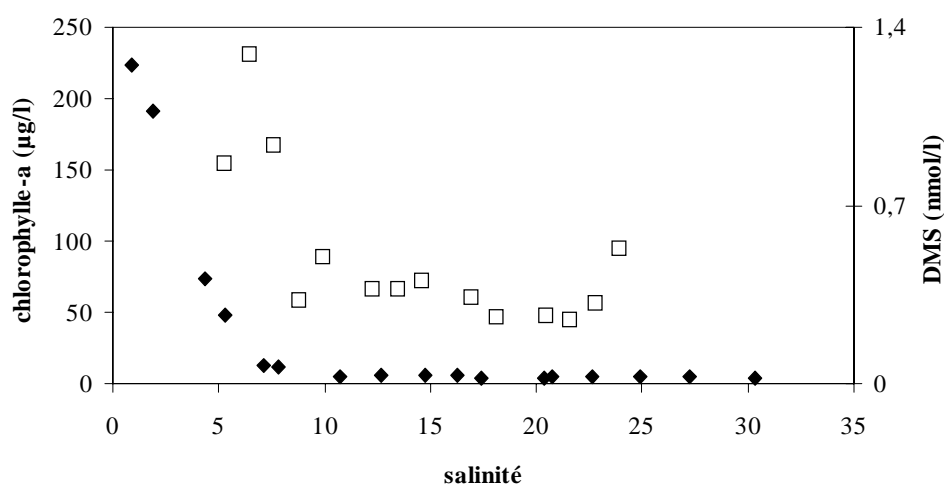


**Figure 5-8.** Corrélation entre les valeurs de DMS et les teneurs en chlorophylle a (biomasse phytoplanctonique).



Ce phénomène tient en partie au fait que lorsqu'on n'a pas de production phytoplanctonique, les teneurs en DMS sont logiquement faibles ; cependant ces teneurs ne sont pas toujours fortes lorsqu'on a une production phytoplanctonique plus importante.

Sur l'exemple de deux cas particuliers on peut expliquer cette absence de corrélation entre les paramètres (figure 5-9). En amont, on observe à la fois un pic de DMS et de chlorophylle *a* montrant une corrélation nette entre les deux paramètres. La très forte production phytoplanctonique, dominée par les Diatomées pourtant peu productrice de DMSP, est associée à des valeurs maximales de DMS, celles-ci restant faibles par rapport aux teneurs mesurées en océan ouvert. Au contraire, en aval le pic de DMS observé n'est pas relié à un pic de chlorophylle *a*. Les espèces présentes aux salinités supérieures à 25, probablement des Dinoflagellées, sont alors associées à une production de DMSP plus importante.



**Figure 5-9.** Distribution des teneurs en DMS (□) et en chlorophylle *a* (◆) (biomasse phytoplanctonique) dans l'estuaire de l'Escaut (juillet 96).

### 5A-5 Conclusion

Etablir des corrélations entre les teneurs en DMS et les teneurs en pigments reste difficile ceci est dû en grande partie au fait que le DMS n'est pas produit dans les mêmes proportions par toutes les espèces phytoplanctoniques or l'analyse des pigments ne permet pas la détermination des communautés phytoplanctoniques au niveau de l'espèce.

## **B- Chimie de l'iode et du sélénium et phytoplancton.**

### **5B-1. Introduction**

L'iode (I) et le sélénium (Se) sont connus pour être des micronutriments essentiels au développement biologique de nombreuses espèces vivantes comme les plantes les animaux mais aussi l'être humain (Kirk, 1991). Les productions anthropogénique et naturelle des composés organiques halogénés volatiles, comme le iodomethane (MeI), joue un rôle important dans la chimie atmosphérique, car ces composés sont impliqués dans la diminution de la couche d'ozone (Gribble, 1992).

Le MeI naturellement présent dans le milieu naturel est également connu pour être un fort agent méthylant capable de remobiliser de nombreux métaux lourds dans leurs formes les plus toxiques pour l'environnement (Thayer et al., 1984). Les distributions du MeI et autres composés alkyl-iodiques (ethyl-, propyl-iodide, chloriodomethane) sont bien connues dans l'océan et l'atmosphère (Edmonds et Morita, 1998) mais peu de choses ont été faites sur la production et le devenir de ces composés en milieu estuarien. Le MeI et certains alkyl-iodiques sont produits, en autres, par des algues marines (Edmonds et Moritas, 1998). La production de MeI issue des voies biologiques est probablement la source la plus significative des flux des océans à l'atmosphère.

Les composés organiques du sélénium, comme les sélénométhionines et les sélénocystines, peuvent être formés après assimilation de sélénium inorganique par les bactéries et certaines espèces phytoplanctoniques (Cutter et Bruland, 1984). La formation d'espèces de sélénium volatiles contribue de manière importante aux transferts atmosphériques et au cycle global du sélénium (Amouroux et al., 2001).

Le cycle de l'iode et du sélénium dans les estuaires et la zone côtière semble jouer un rôle important dans le transfert de ces éléments entre océan et continent. Dans de tels écosystèmes marqués par des activités biologiques intenses et des processus de sédimentation et re-suspension, la formation et la volatilisation des alkyl-iodiques et -séléniques représentent des processus majeurs dans la mise en disponibilité de ces éléments dans les eaux de surface. Aussi, devant le peu de connaissances du cycle de ces composants en milieu estuarien, avons nous mesuré ces paramètres lors des campagnes du programme Biogest et cherché à voir si le phytoplancton, caractérisé par la mesure des pigments, a un rôle influent sur leurs teneurs dans ces zones d'interface continent-océan.

### 5B-2. Méthode

La détermination des alkyl-iodiques et séléniques dans les échantillons estuariens a été réalisée par la méthode de piégeage cryogénique associée à une analyse par Chromatographie en phase Gazeuse et par ICP/MS (Pécheyran et al., 1998). Cette technique permet une séparation de plusieurs espèces gazeuses d'iode et de sélénium et simultanément de leurs isotopes. La limite de détection se situe à  $1 \text{ fmol.l}^{-1}$  pour le MeI et à  $15 \text{ fmol.l}^{-1}$  pour le DMSe.

### 5B-3. Distribution des composés alkyl-iodiques et séléniques dans les estuaires

Les résultats brièvement abordés ici sont issus d'une étude effectuée par le laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement de l'université de Pau et développés dans l'article de Tessier *et al.* 2002.

#### 5B-3-1. Comparaison inter-estuaires ;

Les résultats présentés ici concernent les estuaires de l'Escaut, du Rhin et de la Gironde. Si on considère les résultats de TVI (somme des concentrations de l'ensemble des composés iodiques volatiles) et de TVSe (somme des concentrations de  $\text{Me}_2\text{Se}$ ,  $\text{Me}_2\text{SSe}$  et  $\text{Me}_2\text{Se}_2$ ) dans les eaux de surface, on observe une plus forte concentration dans l'Escaut que dans le Rhin et la Gironde (tableau 5-5). Ces mesures montrent clairement que les espèces volatiles de l'iode et du sélénium sont ubiquistes, apparaissent aussi dans la Gironde où les apports anthropiques et les processus biologiques sont plus faibles.

Estuaire	n	TVI (pmol.l <sup>-1</sup> )	Valeurs min-max	TVSe (pmol.l <sup>-1</sup> )	Valeurs min-max
<b>Escaut</b>					
Déc. 96	13	<b>9</b>	1 - 17	<b>7.7</b>	0.2 - 27.7
Mai 98	13	<b>68</b>	10 - 294	<b>17.6</b>	3.7 - 53.0
Juil. 96	14	<b>7</b>	1 - 15	<b>6.5</b>	0.2 - 15.3
Oct. 98	15	<b>26</b>	10 - 67	<b>41.2</b>	4.3 - 102.2
<b>Gironde</b>					
Fév. 98	12	<b>3</b>	2 - 5	<b>1.3</b>	0.1 - 2.3
Juin 97	13	<b>8</b>	5 - 13	<b>0.6</b>	0.1 - 1.1
Sept. 97	25	<b>8</b>	3 - 19	<b>6.0</b>	2.2 - 8.7
Oct. 96	17	<b>3</b>	2 - 5	<b>0.8</b>	0.4 - 1.3
<b>Rhin</b>					
Nov. 97	16	<b>5</b>	2 - 9	<b>11.0</b>	2.1 - 16.9
Mars 98	13	<b>10</b>	4 - 18	<b>13.9</b>	1.1 - 30.7
Juil. 97	15			<b>2.1</b>	0.6 - 5.2
Oct. 96	12	<b>5</b>	3 - 9	<b>4.7</b>	0.4 - 10.3

**Tableau 5-5.** Concentrations des composés volatiles de l'iode et du sélénium dans les trois estuaires étudiés et pour les quatre saisons suivies (Tessier *et al.*, 2002).

### 5B-3-2. Distribution saisonnière ;

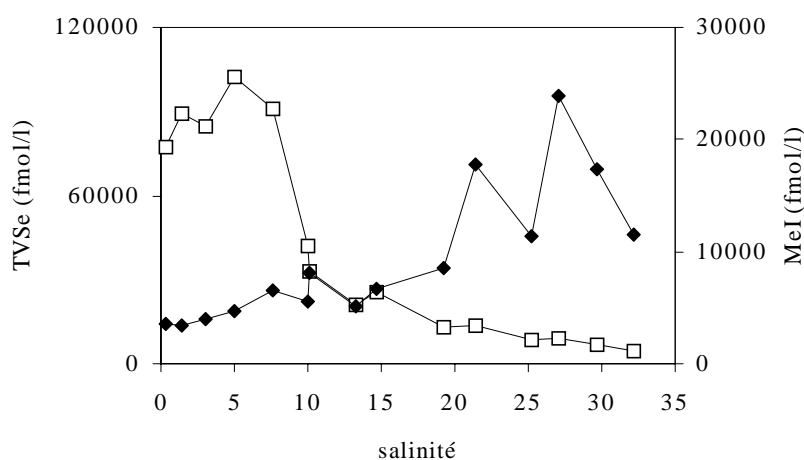
Les teneurs en TVI et TVSe présentent une forte variabilité saisonnière avec des concentrations maximales généralement observées durant les périodes printanière et estivale (tableau 5-5).

### 5B-3-3. Distribution amont-aval.

Les concentrations en MeI décrivent la même distribution dans les trois estuaires. Les teneurs dans les eaux de surface augmentent avec la salinité et sont maximales pour des salinités allant de 20 à 35 (figure 5-10). Ces fortes concentrations sont observées au niveau de zones de maximum de production phytoplanctonique apparaissant durant les périodes printanières et

estivales suggérant que cette activité est impliquée directement ou indirectement dans la production de MeI.

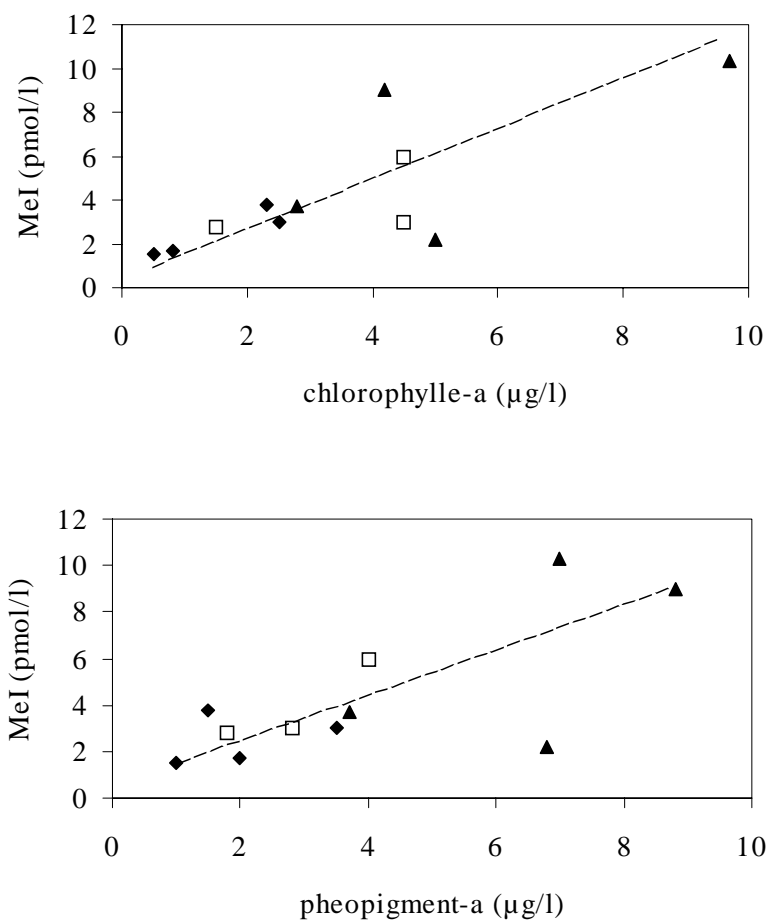
Les concentrations en  $\text{Me}_2\text{Se}$  décrivent également la même distribution dans les trois estuaires pour les saisons étudiés. Ces teneurs décroissent le long du gradient de salinité et présentent un maximum entre les salinités 0 et 10 (figure 5-3). Cette région correspond en général à un maximum de turbidité et/ou une plus faible teneur en oxygène. Cette zone représente en effet une zone d'accumulation de biomasse phytoplanctonique dans laquelle l'activité hétérotrophe, impliquée dans le dégradation de cette MO, génère une baisse des teneurs en oxygène



**Figure 5-10.** Distribution des concentrations en TVSe (□) et MeI (◆) dans l'estuaire de l'Escaut (octobre 98).

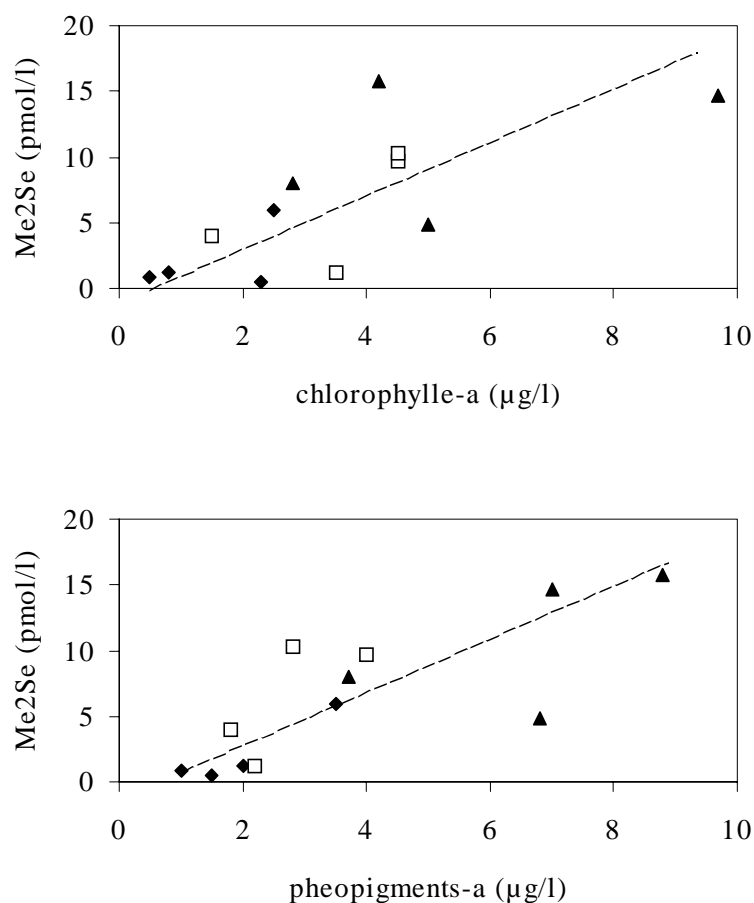
#### **5B-4. Recherche de corrélations entre les pigments et les composés organiques halogénés volatiles**

Si on observe les relations existantes entre les teneurs en MeI et les teneurs en chlorophylle *a* et phéopigments *a*, marqueurs de la biomasse phytoplanctonique et de son état de dégradation, on remarque une corrélation positive entre ces données (figure 5-11). Ces résultats suggèrent bien que les variations de biomasse au sein de l'estuaire en fonction des saisons contrôle la production de MeI via des processus biologiques.



**Figure 5-11.** Corrélation entre les valeurs de MeI et les teneurs en chlorophylle *a* (biomasse phytoplanctonique) et phéopigments *a*.

De la même manière, on obtient une corrélation positive entre les teneurs en dimethyl sélénium ( $\text{Me}_2\text{Se}$ ) et les teneurs en chlorophylle *a* et phéopigments *a*. La relation est cependant plus nette lorsqu'on s'intéresse aux pigments de dégradation. Ceci sont présents en quantité importante dans les zones où la turbidité est importante et où on a accumulation de MO d'origine végétale. Ces conditions semblent donc être favorables à la production de sélénium volatile via la dégradation de MO.



**Figure 5-12.** Corrélation entre les valeurs de Me<sub>2</sub>Se et les teneurs en chlorophylle *a* (biomasse phytoplanctonique) et phéopigments *a*.

### 5B-5 Conclusion

Les résultats des corrélations montrent qu'on a effectivement une relation étroite entre les teneurs en composés organiques halogénés du sélénium et de l'iode et les processus de production/dégradation des populations phytoplanctoniques. Par voie de conséquence, on peut conclure que les estuaires constituent un environnement favorable à l'émission de ces composés vers l'atmosphère.

## 6- Conclusion générale

La MO phytoplanctonique peut représenter une fraction importante de la MO particulaire totale en milieu estuarien, le rapprochement des résultats obtenus, concernant les teneurs pigmentaires et les paramètres de PP, de CO, de DMS et de composés organiques halogénés dans la dizaine d'estuaires étudiés, montrent clairement que le phytoplancton interfère activement dans le cycle de certains de ces composés.

→ Cette étude comparative a permis de montrer que les valeurs de **PP potentielles associées aux teneurs en chlorophylle** permettent de bien différencier les estuaires eutrophisés (Loire et Escaut, dans leur partie amont) des estuaires faiblement productifs (Rhin, Gironde).

→ Les résultats des corrélations montrent qu'on a effectivement une relation étroite entre les teneurs en **composés organiques halogénés du sélénium et de l'iode** et les processus de production/dégradation des **populations phytoplanctoniques**.

Pour les autres, la relation est moins nette avec les pigments :

→ L'étude comparative **des pigments et de la pression partielle en CO<sub>2</sub>** dans les estuaires montre que les relations entre ces deux paramètres ne sont pas évidentes, contrairement à d'autres écosystèmes (océans ou lacs). Ceci est dû à la complexité d'une part des transferts d'amont-aval des cellules phytoplanctoniques et d'autre part de l'intensité des échanges de CO<sub>2</sub> entre l'eau et l'atmosphère.

→ Etablir des corrélations entre les **teneurs en DMS et les teneurs en pigments** reste difficile ceci est dû en grande partie au fait que le DMS n'est pas produit dans les mêmes proportions par toutes les espèces phytoplanctoniques or l'analyse des pigments ne permet pas la détermination des communautés phytoplanctoniques au niveau de l'espèce.



## Conclusion générale



## Conclusion générale

Les estuaires, en tant que zones d'interface, jouent un rôle considérable dans les transferts de matière organique (MO) à l'océan puisqu'il sont très souvent le lieu de transformations profondes de cette matière.

Il y a de réelles difficultés à étudier la MO dans ces milieux, du fait de la multiplicité des sources et des mélanges des eaux faisant que la fraction organique se trouve là à des degrés de maturation fort divers.

La fraction phytoplanctonique est un composant important dont les pigments semblent être des biomarqueurs potentiels intéressants, faiblement étudiés en milieu estuarien en raison de la complexité évoquée ci-dessus.

Aussi notre étude traitant de la problématique des marqueurs pigmentaires en milieu estuarien présente-t-elle des aspects originaux et novateurs :

- la possibilité d'avoir des **mesures comparables sur un large éventail d'environnements estuariens européens**, suite à l'utilisation d'une méthodologie strictement identique (terrain et analyses) ;
- la **mesure *in vitro* des cinétiques de dégradation des pigments** permettant de préciser l'influence de paramètres physico-chimiques caractéristiques du milieu estuarien ;
- la **remise en question du suivi des voies de dégradation** par l'utilisation de traceurs pigmentaires (brouillage par le zooplancton (ex : copépodes), dégradation bactérienne et sénescence).

L'étude développée dans cette thèse s'articule principalement autour de deux questions majeures :

1- Comment se distribuent et évoluent les **populations phytoplanctoniques** dans différents **estuaires européens très contrastés** et est-il possible de caractériser ces fluctuations en étudiant les teneurs en pigments des eaux ?

2- Quels facteurs favorisent l'évolution de la **matière organique végétale** et les pigments sont-ils des **biomarqueurs efficaces** des transformations de cette MO?

En plus de la recherche de réponses à ces 2 questions majeures, nous avons essayé de mieux cerner le rôle du phytoplancton dans les processus biogéochimiques affectant certains composants chimiques présents dans l'estuaire.

Afin de répondre techniquement aux besoins d'une telle étude, l'optimisation d'une méthodologie de l'analyse des pigments, spécialement adaptée au milieu estuarien, s'est révélée nécessaire : son exposé détaillé montre que la technique de chromatographie liquide est très performante mais qu'il importe de travailler sur tous les paramètres (température, nombre et temps d'extraction, éluance, etc...) influents sur la qualité du dosage (sensibilité et reproductibilité optimales). Ce travail a permis d'aboutir à une méthodologie présentant ces qualités, capable de donner des résultats très satisfaisants sur nos échantillons estuariens.

On a par ailleurs procédé à la mise au point de protocoles d'étude *in vitro* du devenir de la MO pigmentaire : on a cherché à vérifier l'impact de paramètres environnementaux classiques du milieu estuarien (la concentration en MES, l'oxygène, la température, etc...) sur l'évolution de la MO. Les cinétiques de dégradation obtenues doivent donner une bonne idée du devenir des types de MO estuariennes étudiées.

---

*Comment se distribuent et évoluent les populations phytoplanctoniques dans différents estuaires européens très contrastés et est-il possible de caractériser ces fluctuations par les teneurs en pigments des eaux ?*

---

Même si l'échantillonnage n'a pu nous permettre de cerner finement les variations saisonnières des teneurs en pigments des eaux des différents estuaires ( 4 saisons étudiées pour l'Escaut, la Gironde, le Rhin et la Seine ; une seule, en période productive pour tous les autres), cette étude permet de comparer pour la première fois 10 estuaires européens échantillonnés et traités avec les mêmes approches de terrain et de laboratoire. Nous avons ainsi obtenu une banque de données sur les teneurs en pigments, leurs produits de dégradation et les index pigmentaires de ces estuaires.

Des différences marquantes existent entre ces estuaires : géomorphologies contrastées, temps de résidence des eaux et des particules très diversifiés mais aussi charges organiques des eaux très différentes. L'Escaut, la Gironde et le Rhin sont trois exemples parfaits d'estuaires aux caractéristiques opposées devant avoir une forte influence sur le devenir de la MO dans ces milieux.

Diverses conclusions marquantes ont pu être tirées.

- L'étude des pigments des eaux de ces **estuaires couvrant toute la zone tempérée ouest - européenne** montre, d'un estuaire à un autre, des variations homogènes des communautés phytoplanctoniques : les **Diatomées ubiquistes** présentent un caractère dominant, ce tout au long de l'année ; les Chlorophytes, Cryptophytes et Dinoflagellés ne sont que ponctuellement observés lors de périodes de bloom et restent concentrés sur certaines zones de l'estuaire ( amont et aval des HTZ);

- Les zones amont et aval des estuaires restent le plus souvent productrices, avec des contrastes saisonniers marqués : s'opposent franchement l'hiver et les autres saisons, où des successions de blooms, plus ou moins intenses selon les estuaires, sont connues ( ceci n'a pu être franchement montré lors de ce travail du fait du nombre réduit de campagnes). **La zone de maximum de turbidité (HTZ) constitue une importante zone de dégradation des pigments d'autant plus marquée que les temps de résidence des eaux et des particules sont longs.**

- Il n'a pas été possible à l'aide des marqueurs pigmentaires de **différencier les MO** autochtones d'origine fluviale, estuarienne ou marine, ni même de séparer la MO d'origine autochtone dans son ensemble de la MO allochtone d'origine pédologique. Toutefois, certains indices pigmentaires (chl-b/lutéine) ont permis d'individualiser, dans les estuaires eux-mêmes, des lots de MO différents, sans que l'on puisse systématiquement et avec certitude leur attribuer une origine précise.

---

*Quels facteurs favorisent l'évolution de la matière organique végétale et les pigments sont-ils des biomarqueurs efficaces des transformations de cette MO?*

---

L'étude *in vitro* de la matière organique végétale paraît incontournable si l'on veut comprendre le devenir de cette matière au sein du bouchon vaseux en milieu estuarien et interpréter correctement l'évolution de sa phase pigmentaire, comme cela a été souligné dans la littérature : « The usefulness of pigment biomarkers in natural systems is dependent upon how much we know about their decay kinetics as well as the mechanisms of transformation... », Bianchi et Findlay, 1991. L'utilisation des pigments en tant que biomarqueurs de cette matière organique s'est avérée efficace au niveau de l'évaluation des cinétiques de dégradation et a été testée pour la reconnaissance des processus dirigeant cette dégradation.

i) Le tableau récapitulatif ci-dessous synthétise les tests d'influence des paramètres physico-chimiques sur la cinétique de dégradation des pigments caractéristiques de plusieurs types de MO végétale auxquels nous nous sommes livrés ( \* : influence plus ou moins forte sur la dégradation ; nt : non testé ) :

	[MES]	T°	O <sub>2</sub>
Phytoplancton	***	***	***
Végétaux supérieurs	**	nt	nt
litière	*	nt	nt

En résumé, des teneurs en MES élevées favorisent grandement la dégradation des différentes sortes de MO testées, de même que l'élévation des températures des eaux (températures de période estivale par exemple) ; si les teneurs en MES sont telles que l'on se trouve en anoxie (cas de la crème de vase), alors les processus de dégradation se trouvent au contraire ralentis ; une bonne oxygénation des eaux est donc elle aussi un facteur favorisant les processus de dégradation.

Ces résultats montrent le rôle important joué par les bactéries attachées aux particules sur l'efficacité de la dégradation du matériel phytoplanctonique. En effet, la majeure partie des bactéries utilisent les particules comme micro - environnements de développement privilégiés, impliquant donc directement la concentration en MES dans l'intensité de la cinétique de dégradation. De plus, la température accentue le métabolisme de ces microorganismes, et, à l'inverse, l'absence d'oxygène implique une diminution des cinétiques renforçant l'idée que l'activité de dégradation est effectuée en majorité par des communautés aérobies.

ii) L'efficacité des pigments comme biomarqueurs servant à mesurer les cinétiques de dégradation de la MO végétale a pu être prouvée à l'issue de l'ensemble de ces expérimentations.

On observe ainsi, d'une part, que les pigments marqueurs du matériel « frais » (phytoplancton ou feuille) possèdent des cinétiques de dégradation du même ordre de grandeur que celles de la fraction organique dans sa totalité (mesures faites sur le COP) : valeurs allant de 0.014 à 0.020  $j^{-1}$ . D'autre part, les pigments traceurs du matériel plus « ancien » (litière) présente des cinétiques 3 à 4 fois inférieures (0.005  $j^{-1}$ ).

Ainsi, du fait des similitudes de résultats entre les mesures de pigments et de carbone organique, les cinétiques obtenues sur les pigments pourront servir de modèle pour la totalité du matériel végétal.

iii) La quantification des phéopigments constitue un atout majeur dans le suivi des voies de dégradation de la matière organique phytoplanctonique. Dans la littérature, concernant les études *in situ*, on associe classiquement la présence de phéophorbide *a* à l'activité de broutage. Les expériences *in vitro* menées par nos soins ne confirme pas cette relation : la production de phéophorbides n'est retrouvée que dans les réacteurs contenant des bactéries et non dans ceux contenant du zooplancton. Vraisemblablement, les données de la

littérature, obtenues en milieu naturel, ne tiennent pas compte du fait qu'aux activités de broutage sont toujours associées des activités bactériennes, considérées comme négligeables, alors qu'il n'en est rien.

---

*La fraction organique pigmentaire joue-t-elle un rôle dans l'établissement des bilans organiques estuariens et dans les émissions de gaz à effet de serre ?*

---

■ Il est clairement ressorti de nos données que les teneurs en production primaire associées à l'étude des pigments ont permis de différencier les estuaires eutrophisés (Loire et Escaut, dans leur partie amont) et estuaires faiblement productifs (Rhin, Gironde).

■ D'autre part, les influences conjuguées des temps de rétention des eaux et des particules dans l'estuaire et de la présence d'un bouchon vaseux développé conditionnent totalement l'efficacité de la minéralisation de la MO en milieu estuarien.

■ Si l'on a pu démontrer qu'une relation étroite existe entre les teneurs en composés organiques halogénés du sélénium et de l'iode et les processus de production/dégradation des populations phytoplanctoniques, il n'en est pas de même pour le CO<sub>2</sub>. Pour ce paramètre, ce sont les processus physico-chimiques qui gèrent son comportement (échanges de CO<sub>2</sub> par advection entre les masses d'eau et entre l'eau et l'atmosphère).

■ Enfin, si le phytoplancton est connu pour influencer directement la production de DMS, nous n'avons montré aucune relation significative entre nos données et les teneurs en DMS : ceci étant dû au fait que ces émissions sont liées à des espèces phytoplanctoniques spécifiques alors que les pigments ne permettent pas de préciser la taxonomie au-delà du groupe.



---

### *Bilan et perspectives*




---

Plusieurs facteurs influencent donc le devenir de la MO au sein des estuaires:

1- L'origine de la MO, donc sa nature et son degré de labilité:

Les résultats décrits dans cette étude permettent de montrer de façon claire que les cinétiques de dégradation du phytoplancton sont beaucoup plus rapides que celles des litières (MO pédologique). Il importe d'établir des comparaisons avec la MO d'origine anthropique, connue elle aussi pour être majoritairement labile.




On pourra utiliser les symboles suivant dans la suite de nos démonstrations.

Sources et labilité de la MO		
Pédologique		*
Phytoplanctonique		***
Anthropique		***

2- les temps de rétention (TR) des eaux et des particules liées à l'établissement d'une zone de maximum de turbidité (HTZ):

On a montré que la cinétique de dégradation de la fraction organique végétale est plus rapide quand on augmente les teneurs en MES. Un TR plus long et une concentration en MES plus forte allant souvent de pair, il s'ensuit forcément que les processus de dégradation de la MO seront alors plus marqués quand ces deux paramètres augmentent.

Précisons que, dans nos expériences, un temps minimal de 7 à 15 jours a été quasi systématiquement nécessaire avant toute dégradation significative de nos échantillons : ceci explique que, dans les estuaires à TR très faible (ordre de la semaine), nous n'ayons pas observé de dégradation notable de la MO (Rhin et Douro).

TR (débit/marée)	HTZ	
***	très développée	
**	moyennement développée	
*	Peu ou pas développée	

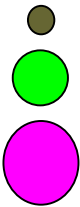
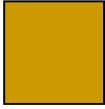
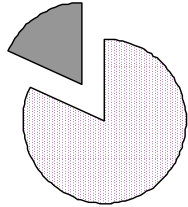
3- Précisons aussi l'importance du facteur saisonnier : le paramètre de la température des eaux favorise les processus de dégradation. Enfin, selon les degrés d'oxygénation des eaux, les processus dégradatifs connaissent des évolutions temporelles différentes.

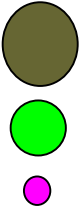
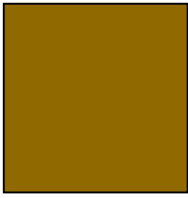
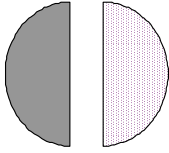
Les trois estuaires les plus étudiés (Escaut, Gironde et Rhin) sont parfaitement représentatifs de ces figures extrêmes que l'on peut rencontrer en zone tempérée :

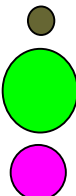

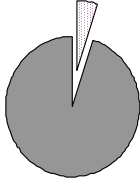
- Escaut et Gironde à charge organique entrante élevée, mais de nature très différente (prédominances de la fraction anthropique et pédologique respectivement) alors que dans le Rhin, ces apports restent modérés;

- HTZ très développée en Gironde, avec des TR très longs, la situation inverse existant pour le Rhin, alors que l'Escaut a des caractéristiques intermédiaires ;

- De 50 à 70-80% de la MO est minéralisée à l'intérieur de la Gironde et de l'Escaut respectivement, les long TR compensant le caractère moyennement labile de la MO girondine; la charge organique du Rhin ne subit, elle, qu'une très faible dégradation en dépit de son caractère labile du fait des très faibles TR dans l'estuaire.

<b>Escaut</b>	Qualité de la MO	Etat de la HTZ	% COP dégradé
			

<b>Gironde</b>	Qualité de la MO	Etat de la HTZ	% COP dégradé
			

<b>Rhin</b>	Qualité de la MO	Etat de la HTZ	% COP dégradé
			

L'importance de la HTZ et par conséquent du temps de rétention des particules dans l'estuaire ressort clairement ici comme un facteur décisif de l'efficacité de la minéralisation avec la nature du matériel organique transporté.

Il paraît indispensable de poursuivre ce type de recherches si l'on veut pouvoir prédire le devenir de la MO entrante dans les estuaires que nous envisageons d'étudier dans un proche avenir (programmes GIS-ECOBAG pour la Gironde ; SEINE-AVAL2 pour la Seine ; programme en gestation pour la Loire) :

- Etablir des cinétiques de dégradation d'un nouvel échantillonnage de litière (données trop restreintes pour le moment) ;
- Etablir des cinétiques de dégradation d'échantillons de sources anthropogéniques et de sources pédologiques (peu riches en litière en période de crue d'hiver ;
- Mieux cerner le rôle de l'oxygène en incubant des eaux de la Seine où des déficits en oxygène posent parfois problème.

Il sera bien sûr nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs pour suivre l'évolution des différentes MO à étudier. C'est avec la connaissance :

- des stocks entrants de ces MO (bases de données en cours d'acquisition) ;
  - des cinétiques de dégradation (objet de ces recherches *in vitro*) ;
  - des relations liant respirométrie et teneurs en MES (*in situ*) ;
- qu'on pourra modéliser l'oxygénation des eaux estuariennes et prédire le devenir de chaque fraction de MO au sein de l'estuaire.



## Références bibliographiques



**A**

- Abril, G.** (1999). Dynamique du carbone dans les estuaires européens: processus de minéralisation et transfert continent-océan-atmosphère. *Thèse Université Bordeaux 1*. 294p
- Abril, G., Fankignoulle, M.** (2001). Nitrogen-Alkalinity interactions in the highly polluted Scheldt bassin (Belgium). *Water Research* 35:844-850
- Abril, G., Etcheber, H., Borges, A.V., Frankignoulle, M.** (2000). Excess atmospheric carbon dioxide transported by rivers into the Scheldt Estuary. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, IIA*, 330:761-768.
- Abril, G., Nogueira, M., Etcheber, H., Cabeçadas, G., Lemaire, E., Bogueira, M.J.** (2002). Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. *Sous presse*.
- Ahel, M., Barlow, R.G., Mantoura, R.F.C.** (1996). Effect of salinity gradients on the distribution of phytoplankton pigments in a stratified estuary. *Marine Ecology Progress Series*. 143:289-295
- Allen, G.P.** (1972). Etude des processus sédimentaires dans l'estuaire de la Gironde. Mémoire IGBA., Bordeaux, 314pp
- Amouroux, D., Liss, P.S., Tessier, E., Hamren-Larson, M., Donard, O.FX.** (2001). Role of oceans as biogenic sources of selenium. *Earth planet science letter*. 189:277-283
- Andersen, R.A., Bidigare, R.R., Keller, M.D., Latasa, M.** (1996). A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the Atlantic and Pacific Oceans. *Deep-Sea Research II* vol 43, n°2-3:517-537
- Andouche, A.** (2001). Les bactéries allochtones des eaux estuariennes riches en matière en suspension. Mise en évidence par une technique d'épifluorescence sur substrat de viabilité. DEA, Université Bordeaux 1, 30pp.
- Andreae, M.O.** (1986). The ocean as a source of atmospheric sulphur compounds. In: The Role of air-sea exchange in geochemical cycling. Buat-Menard, P. (ed), Riedel, Dordrecht. 331-362
- Ansotegui, A., Trigueros, J.M., Orive, E.** (2001). The use of pigment signatures to assess phytoplankton assemblage structure in estuarine waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 52:689-703

**B**

- Barlow, R.G., Cummings, D.G., Gibbs, S.W.** (1997). Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls *a* and *b* and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. *Marine Ecology Progress Series*. 161:303-307
- Barlow, R.G., Mantoura, R.F.C., Gough, M.A., Fileman, T.W.** (1993)a. Phaeopigment distribution during the 1990 spring bloom in the northeastern Atlantic. *Deep-Sea Research II*. 40(11-12):2229-2242
- Barlow, R.G., Mantoura, R.F.C., Gough, M.A., Fileman, T.W.** (1993)b. Pigment signatures of the phytoplankton composition in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom. *Deep-Sea Research II*. 40(1-2):459-477
- Barlow, R.G., Mantoura, R.F.C., Peinert, R.D., Miller, A.E.J., Fileman, T.W.** (1995). Distribution, sedimentation and fate of pigment biomarkers following thermal stratification in the western Alboran Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 125:279-291
- Barranguet, C., Herman, P.M.J., Sinke, J.J.** (1997). Microphytobenthos biomass and community composition studied by pigment biomarkers: importance and fate in the carbon cycle of a tidal flat. *Journal of Sea research*. 38:59-70
- Bianchi T.S. & Argyrou M.E.** (1997). Temporal and spatial dynamics of particulate organic carbon in the Pontchartrain estuary, Southeast Louisiana, USA, Est. Coast. Shelf Sci. 45:557-569.

- Bianchi, T.S., Dawson, R., Sawangwong, P.** (1988). The effects of macrobenthic deposit-feeding on the degradation of chloropigments in sandy sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 122:243-255
- Bianchi, T.S., Demetropoulos, A., Hadjichristophorou, M., Argryrou, M., Baskaran, M., Lambert, C.** (1996). Plant pigments as biomarkers of organic matter sources in sediments and coastal waters of Cyprus (eastern Mediterranean). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 42:103-115
- Bianchi, T.S., Dibb, J.E., Findlay, S.** (1993). Early diagenesis of plant pigments in Hudson river sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 36:517-527
- Bianchi, T.S., Findlay, S.** (1990). Plant pigments as tracers of emergent and submergent macrophytes from the Hudson River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 47:492-494
- Bianchi, T.S., Findlay, S.** (1991). Decomposition of Hudson estuary macrophytes: Photosynthetic pigment transformation and decay constants. *Estuaries*. 14,1:65-73
- Bianchi, T.S., Findlay, S., Dawson, R.** (1993). Organic matter sources in the water column and sediments of the Hudson river estuary: the use of plant pigments as tracers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 36:359-376
- Bianchi, T.S., Findlay, S., Fontvieille, D.** (1991). Experimental degradation of plant materials in Hudson river sediments. *Biochemistry*. 1:17-33
- Bidigare, R.R., Frank, T.J., Zastrow, C., Brooks, J.** (1986). The distribution of algal chlorophylls and their degradation products in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research*. vol 33, n°7:923-937
- Bidigare, R.R., Kennicutt II, M.C., Brooks, J.M.** (1985). Rapid determination of chlorophylls and their degradation products by high-performance liquid chromatography. *Limnology and Oceanography*. 30(2):432-435
- Billen, G., Somville, M., de Becker, E., Servais, P.** (1985). A nitrogen budget of the Scheldt hydrographical basin. *Netherland Journal of Sea Research*. 19: 223-230
- Billen, G., Garnier, J., Hanset, P.** (1994). Modelling phytoplankton development in whole drainage networks: the RIVERSTRAHLER model applied to the Seine river system, *Hydrobiol.* 289:119-137.
- Bjørnland T & Liaaen-Jensen S** (1989) Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. In: Green JC, Leadbeater BSC, Diver WL (eds) *The chromophyte Algae: problems and perspectives*. (pp37-61) Clarendon press, Oxford
- Bochdansky, A.B., Deibel, D.** (1997). Destruction of chloropigments in copepod guts. 147:301-303
- Borges AV & Frankignoulle M** (1999) Daily and seasonal variations of the partial pressure of CO<sub>2</sub> in the surface seawater along the Belgian and southern Dutch coastal areas. *J. Mar. Sys.* 19: 251-266.
- Brotas, V., Plante-Cuny, M.** (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
- Buffan-Dubau, E., De Wit, R., Castel, J.** (1996) Feeding selectivity of the harpacticoid copepod *Canuella perplexa* in benthic muddy environments demonstrated by HPLC analyses of chlorin and carotenoid pigments. *Marine Ecology Progress Series*. 137:71-82
- Buffan-Dubau, E., Carman, K.R.** (2000). Diel feeding behaviour of meiofauna and their relationships with microalgal resources. *Limnology and Oceanography*. 45(2):381-395
- Burdloff, D.** (1997). Potentiel nutritif des particules et implications biologiques en milieu estuarien. Thèse de l'université Bordeaux 1. 207pp.
- Burdloff D, Gasparini S, Sautour B, Etcheber H & Castel J** (2000). Is the copepod egg production in a highly turbid estuary (the Gironde France) a function of the biochemical composition of seston? *Aquatic Ecology*,.



**C**

- Cariou-Le Gall, V., Blanchard, G.F.** (1995). Monthly HPLC measurements of pigment concentration from an intertidal muddy sediment of Marennes-Oléron Bay, France. *Marine Ecology Progress Series*. 121:171-179
- Cloern, J.E., Grenz, C., Videgar-lucas, L.** (1995). An empirical model of the phytoplankton chlorophyll: carbon ratio – the conversion factor between productivity and growth rate. *Limnology and Oceanography*. 40 (7): 1313-1321.
- Cole J.J., Caraco N.F., et Peierls B.L.** (1992). Can phytoplankton maintain a positive carbon balance in a turbid, freshwater, tidal estuary?, *Limnology and Oceanography*. 37 : 1608-1617.
- Crump B.C., Barros J.A. et Simenstad C.A.** (1998). Dominance of particle-attached bacteria in the Columbia River estuary, USA, *Aquat. Micr. Ecol.* 14 : 7-18.
- Cutter, G.A., Bruland, K.W.** (1984). Marine biogeochemistry of selenium: a reevaluation. *Limnology and Oceanography*. 29:1179-1192

**E**

- Edmonds, J.S., Morita, M.** (1998). The determination of iodine species in environmental and biological samples. *Pure and Applied Chemistry*. 70:1567-1584
- Etcheber, H.** (1986). Biogéochimie de la matière organique en milieu estuarien: comportement, bilan, propriétés. Cas de la Gironde. *Memoires de l'institut de géologie du bassin d'Aquitaine*. 379p
- Etcheber, H., Relexans, J.C., Béliard, M., Weber, O., Buscail, R., Heussner, S.** (1999). Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian margin (Bay of Biscay). *Deep Sea research*.
- Everitt, D.A., Wright, S.W., Volkman, J.K., Thomas, D.P., Lindstrom, E.J.** (1990). Phytoplankton community compositions in the western equatorial Pacific determined from chlorophyll and carotenoid pigment distributions. *Deep-Sea Research* vol 37, n°6:975-997

**F**

- Findlay S., Pace M.L., Lints D., Cole J.J., Caraco N.F. et Peierls B.** (1991). Weak coupling of bacterial and algal production in a heterotrophic ecosystem : the Hudson River estuary, *Limnol. Oceanogr.* 36 : 268-278.
- Frankignoulle M., Abril G., Borges A., Bourge I., Canon C., Delille B., Libert E. and Théate J.M.** (1998). Carbon dioxide emission from European estuaries, *Science* 282: 434-436.
- Frankignoulle, M., Borges, A.V.** (2001). European continental shelf as a significant sink for atmospheric carbon dioxide. *Global Biogeochemical cycles*. 15(3):569-576
- Frost, W.B.** (1972). Effects of size and concentration of particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*. 17:805-815
- Furlong, E.T., Carpenter, R.** (1988). Pigment preservation and remineralization in oxic coastal marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 52:87-99

**G**

- Gattuso J-P., Frankignoulle M. and Wollast R.** (1998). Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems, *An. Rev. Ecol. System.* 29: 405-434.
- Gieskes, W.W.C., Kraay, G.W., Nontji, A., Setiapermana, D., Sutomoto.** (1988). Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the Banda sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints. *Netherlands Journal of Sea Research*. 22(2):123-137
- Goericke, R., Repeta, D.** (1992). The pigments of *Prochlorococcus marinus*: The presence of divinyl chlorophyll *a* and *b* in a marine prokaryote. *Limnology and Oceanography*. 37(2):425-433

**Goosen N.K., Kromkamp J., Peene J., Van Rijswijk P. and Van Breugel P.** (1999). Bacterial and phytoplankton production in the maximum turbidity zone of three European estuaries : the Elbe, the Westerschelde and the Gironde, *J. Marine Systems* 22 : 151-171.

**Gribbe,G.W.** (1992). Naturally occurring organohalogen compounds-a survey. *Journal of Natural Prod.* 55:1353-1395

## H

**Head,E.J.H., Hargrave,B.T., Subba Rao,D.V.** (1994). Accumulation of a phaeophorbide a-like pigment in sediment traps during late stage of a spring bloom: A product of dying algae? *Limnology and Oceanography* 39(1):176-181

**Head,E.J.H., Harris,L.R.** (1992). Chlorophyll and carotenoid transformation and destruction by *Calanus* spp. grazing on diatoms. *Marine Ecology Progress Series.* 86:229-238

**Head,E.J.H., Harris,L.R.** (1996). Chlorophyll destruction by *Calanus* spp. Grazing on phytoplankton : kinetics, effects of ingestion rate and feeding history, and mechanistic interpretation. *Marine Ecology Progress Series.* 135 :223-235

**Heip C.H.R., Goosen N.K., Herman P.M.J., Kromkamp J., Middelburg J.J., Soetaert K.** (1995). Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries, *Ocean. Mar Biol. Ann. Rev.* 33:1-149.

**Herandez-palomino,A.** (1997). Etude ecologique du compartiment bactérien dans les estuaires de l'Elbe, de l'Escaut et de la gironde: dynamique, rôle dans le réseau trophique et caractéristiques métaboliques. Thèse Université Bordeaux 1.236pp

**Holm-Handsen,O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H.** (1965). Fluorimetric determination of chlorophyll. *J. Conseil.* 301 :3-15

**Hurley,J.P. Armstrong,D.E.** (1990). Fluxes and transformations of aquatic pigments in Lake Mendota, Wisconsin. *Limnology and Océanography.* 35(2):384-398

## I

**Inza B .** (1996). Etude en ecotoxicologie expérimentale de la bioaccumulation du cadmium et des dérivés du mercure par un mollusque filtreur d'eau douce (*Corbicula fluminea*). Thèse de l'université de Bordeaux 1 213pp

**Irigoien X. & Castel J.** (1997). Light limitation and distribution of chlorophyll pigments in a highly turbid estuary: the Gironde (France), *Est. Coast. Shelf Sci.* 44: 507-517.

**Ittekkot,V.** (1988). Global trend in the nature of organic matter in river suspensions. *Nature* 332:436-438.

**Ittekkot,V., Spitzzy,A., Lammerz,U.** (1982). Dissolved organic matter in the Elbe, Weser and Ems rivers and the German bight. In: "transport of carbon and minerals in major world rivers". Degens (ed). 52:749-756

**Iverson,R.L., Nearhof,F.L.,Andreae,M.O.** (1989). Production of dimethylsulfonium propionate and dimethylsulfide by phytoplankton in estuarine and coastal waters. *Limnology and Océanography.* 34:53-67

## J

**Jeffrey,S.W.** (1974) Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin-layer chromatography. *Mar. Biol.* 37:33-37.

**Jeffrey,S.W., Sielicki,M., Haxo,F.T.** (1975) Chloroplast pigment patterns in dinoflagellates. *J. Phycol.* 11:374-385.

**Jeffrey ,S.W.**(1989). Chlorophyll pigments and their distribution in the chromophyte algae. In: Green,J.C.,Leadbeater,B.S.C. and Diver,W.L. (eds), *The chromophyte Algae: Problems and perspectives*, Clarendon Press, Oxford, p. 13-36

- Jeffrey, S.W.** (1961). Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochemical Journal*. 80:336-342
- Jeffrey, S.W.** (1968). Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta*. 1962 :271-285
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W.** (1997). Phytoplankton pigments in oceanography. *UNESCO Publishing Paris*. pp661

## K

- Keil, R.G., Mayer, L.M., Quay, P.D., Richey, J.E., Hedges, J.I.** (1996). Loss of organic matter from riverine particles in deltas. *Geochimica Cosmochimica Acta*. 61:1507-1511
- Klein, B.** (1989). Determination of marine phytoplankton and microphytobenthos biomass and diversity by means of algal pigment analysis. *Thèse de l'Université de Groningen (Hollande)*.
- Klein, B., Gieskes, W.W.C., Kraay, G.G.** (1986). Digestion of chlorophylls and carotenoids by the marine protozoan *Oxyrrhis marina* studied by H.P.L.C. analysis of algal pigments. *Journal of plankton research*. 8(5): 857-836
- Kirk, K.L.** (1991) Biochemistry of the elemental halogens and inorganic halides. Plenum Press, New York. Pp.378
- Kromkamp J, Peene J., van Rijwijk P, Sandee A & Goosen N** (1995) Nutrients, light and primary production in the eutrophic, turbid WesterSchelde estuary (The Netherlands). *Hydrobiol.* 311: 9-19.

## L

- Laane, R.W.P.** (1982). Chemical characteristics of the organic matter in the waterphase of the Ems-Dollart estuary. Thèse de l'Université de Groningen (Pays-Bas), 134p
- Laane, R.W.P.** (1980). Conservative behaviour of dissolved organic carbon in the Ems-dollart estuary and the western Wadden sea. *Netherland Journal of Sea Research*. 14:192-199
- Lally, C.M., Parsons, T.R.** (1993). Biological Oceanography: an Introduction. *Pergamon Press*.
- Laureillard, J., Saliot, A.** (1993). Biomarkers in organic matter produced in estuaries: a case study of the Krka estuary (Adriatic Sea) using the sterol marker series. *Marine Chemistry*. 43:247-261
- Leavitt, P.R.** (1988). Experimental determination of carotenoid degradation. *Journal of paleolimnology*; 1:215-227
- Letelier, R.M., Bidigare, R.R., Hebel, D.V, Ondrusek, M., Winn, C.D., Karl, D.M.** (1993). Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis. *Limnology and Oceanography*. 38(7):1420-1437
- Lin, R.G.** (1988). Etude du potentiel de dégradation de la matière organique particulaire au passage eaudouce-eau salée: cas de l'estuaire de la Gironde. These de l'Université bordeaux 1. 209pp.
- Llewellyn CA & Gibb SW** (2000) Intra-class variability in the carbon, pigment and biomineral content of prymnesiophytes and diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **193**:33-44
- Llewellyn, CA., Mantoura, R.F.C.** (1996). Pigment biomarkers and particulate carbon in the upper water column compared to the ocean interior of the northeast Atlantic. *Deep-Sea Research I*. 43(8):1165-1184
- Lorenzen, C.J., Newton-Downs, J.** (1966). The specific absorption coefficients of chlorophyllide *a* and pheophorbide *a* in 90% acetone, and comments on the fluorimetric determination of chlorophyll and pheopigments. *Limnology and Oceanography*. 31(2):449-452
- 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
- Lund, J.W.G., Kipling, C., Lecren, E.D.** (1958). The invertebrate microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*. 11: 143-170

**M**

- Mackey,MD., Mackey, DJ., Higgins, HW., Wright, SW.** (1996). CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. 144:265-283
- 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
- Mc Lusky** (1981). The estuarine Ecosystem. Blackies (eds).
- Mc Lusky DS** (1989) The estuarine ecosystem. Chapman & Hall. New York 215pp.
- Meybeck,M.** (1982). Carbon, Nitrogen and phosphorus transport by world rivers. *American journal of Science*. 282:401-428
- Meybeck,M., Cauwet,G., Dessery,S., Somville,M., Gouleau,D., Billen,G.** (1988). Nutrients (organic C,P,N,Si) in the eutrophic river Loire and its estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 27:595-624
- Meyer-Harms,B., Von Bodungen,B.** (1997). Taxon-specific ingestion rates of natural phytoplankton by calanoid copepods in an estuarine environment (Pomeranian Bight, Baltic Sea) determined by cell count and HPLC analyses of marker pigments. *Marine Ecology Progress Series*. 153:181-190
- Minguez-Mosquera,M.I., Jaren-Galan,M.** (1995). Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *Journal of Scientific Food Agriculture*. 67:153-161
- Muylart,K., Sabbe,K.** (1999). Spring phytoplankton assemblages in and around the maximum turbidity zone of the estuaries of the Elbe (Germany), the Scheldt (Belgium/nederland) and the Gironde (France). *Journal of Marine Systems*. 22:133-149

**N**

- Nelson,J.R.** (1993). Rates and possible mechanism of light dependent degradation of pigments in detritus derived from phytoplankton. *Journal of Marine research*. 51:155-179

**P**

- Pécheyrat,C., Amouroux,D., Donard,O.FX.** (1998). Field determination of volatile selenium species at ultra trace levels in environmental waters by on-line purging, cryofocusing and detection by atomic fluorescence spectroscopy. *Journal of analytical atomic spectrometry*. 13:615-621
- Pennington FC, Haxo FT, Borch G & Liaaen-Jensen S** (1985) Carotenoids of cryptophyceae. *Biochem. Syst.Ecol.* 13:215-219.
- Peterson, B.J., Howarth, R.W., Garrit, R.H.** (1985). Multiple stable isotopes used to trace the flow of organic matter in estuarine food webs. *Science*. 227:1361-1363
- Pritchard, D.W.** (1967). What an estuary ? Physical point of view. Dans « Estuaries »G.H. Lauff (Ed.) Washington D.C. : 158-179

**Q**

- Quiblier-Lloberat,C.** (1994). Relations trophiques phyto-zooplancton en milieu lacustre: interets des pigments comme marqueurs organiques. Thèse de l'université Blaise-pascal. 202pp.

**R**

- Repeta,D.J.** (1989). Carotenoid diagenesis in recent marine sediments: II. Degradation of fucoxanthin to loliolide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 53:699-707
- Rendell AR, Horrobin TM, Jickells TD, Edmunds HM & Brown J Malcom SJ** (1997) Nutrient cycling in the Great Ouse Estuary and its impact on nutrient fluxes to the Wash, England. *Est. Coast. Shelf Sci.* 45: 653-668.

**Roy,S., Chanut,J., Gosselin,M., Sime-Ngando,T.** (1996). Characterisation of phytoplankton communities in the lower St. Lawrence Estuary using HPLC-detected pigments and cell microscopy. *Marine Ecology Progress Series*. 142:55-73

## S

**Schlüter L, Møhlenberg F, Havskum H & Larsen S** (2000) The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment / chlorophyll a ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **192**:49-63.

**Sciare,J., Mihalopoulos,N., Nguyen,B.C.** (2002). Spatial and temporal variability of dissolved sulphur compounds in European estuaries. *Biogeochemistry*. Sous presse

**Steenbergen,C.L.M., Korthals,H.J., Dobrynin,E.G.** (1994). Algal and bacterial pigments in non-laminated lacustrine sediment: Studies of their sedimentation, degradation and stratigraphy. *FEMS Microbiology Ecology*. 13:335-352

**Sun, MY., Lee, C., Aller, RC.** (1994). Anoxic and oxic degradation of <sup>14</sup>C-labeled chloropigments and a <sup>14</sup>C-labeled diatom in Long Island Sound sediments. *Limnology and Oceanography*. 38(7):1438-1451

**Stauber,J.L., Jeffrey,S.W.** (1988). Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms *Journal of Phycol.* 24:158-172

## T

**Tessier,E., Amouroux,D., Abril,G., Lemaire,E., Donard,O.FX.** (2002). Formation and volatilisation of alkyl-iodides and -selenides in macrotidal estuaries. *Biogeochemistry*. Sous presse

**Tester,P.A., Geesey,M.E., Guo,C., Paerl,H.W., Millie,D.F.** (1995). Evaluating phytoplankton dynamics in the Newport river estuary (North Carolina, USA) by HPLC-derived pigment profiles. *Marine Ecology Progress Series*. 124:237-245

**Thayer,J.S., Olson,G.L., Brinckman,F.E.** (1984). Iodomethane as a potential metal mobilising agent in nature. *Environmental Science and Technology*. 18:726-729

**Thouvenin B., Le Hir P., Romana LA.** Dissolved oxygen model in the Loire estuary. Changes in fluxes in Estuaries: Implication from science to management, Dyer K.R. & Orth R.J. (eds). Academic Press, New York 1994. Pp.169-178

**Turner,S.M., Malin,G., Nightingale,P.D., Lis,P.S.** (1996). Seasonal variation of dimethyl sulphide in the North Sea and an assesment of fluxes to the atmosphere. *Marine Chemistry*. 54: 245-262

## V

**Valiela,I.** (1995). *Marine Ecological Processes*. Second ed. Springer.

**Van Heukelem,L., Lewitus,A.J., Kana,T.M., Craft,N.E.** (1994). Improved separations of phytoplankton pigments using temperature-controlled high performance liquid chromatography. *Marine Ecology Progress Series*. 114:303-313

**Veyssy,E., Etcheber,H., Lin, R.G., Buat-menard,P., Maneux, E.** (199). Seasonal variations and origins of particulate organic carbon in the lower Garonne River at La Réole. *Hydrobiologia*. 391:113-126

**Villanueva,J., Grimalt,J.O., De Wit,R., Keely,B.J., Maxwell,J.R.** (1994). Chlorophyll and carotenoid pigments in solar saltern microbial mats. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. vol 58, n°21:4703-4715

## W

**Watts,C.D., Maxwell,J.R.** (1977). Carotenoid diagenesis in a marine sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 41:493-497

- Williams,P.J.leB.** (1993). Chemical and tracer methods of measuring plankton production. In: Measurement of primary production from the molecular to the global scale, Li,W.K.W., Maestrini,S.Y. (eds). *ICES Marine Science Symposium*, 197: 20-36
- Williams,S., Claustre,H.** (1991). Photosynthetic pigments as biomarkers of phytoplankton populations and processes involved in the transformation of particulate organic matter at the Biotrans site (47°N,20°W). *Deep-sea research*. vol 38, n°3:347-355
- Wiltshire, KH., Harsdorf, S., Smidt, B., Blöcker, G., Reuter, R., Schroeder, F.** (1998). The determination of algal biomass (as chlorophyll) in suspended matter from the Elbe estuary and the German Bight: A comparison of HPLC, delayed fluorescence and prompt fluorescence methods. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*. 222:113-131
- Wollast, R.** (1983). Interaction in estuaries and coastal waters. In : « The major biogeochemical cycles and their interactions », B.Bolin and R.B.Cook (Eds). SCOPE, Wiley. 385-407.
- Wollast, R.** (1982). Behaviour of organic carbon, nitrogen and phosphorus in the Scheldt estuary. *Thalassa jugoslavica*. 18:11-34
- Woolley,P.S., Moi,A.J., Hester,R.E., Keely,B.J.** (1998). A comparative study of allomerization reaction of chlorophyll a and bacteriochlorophyll a. *Journal of chemical sociaety Perkin Trans.* 2:1833-1839
- Wright,S.W., Jeffrey,S.W., Mantoura ,R.F.C., Llewellyn,C.A., Bjørnland, T., Repeta,D., Welschmeyer,N.** (1991). Improve HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. 77:183-196
- Wright,SW., Shearer,J.D.**(1984).Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Journal of Chromatography*. 294: 281-295

## Y

- Yacobi,Y.Z., Pollinger,U., Gonen,Y., Gerhardt,V., Sukenik,A.** (1996). HPLC analysis of phytoplankton pigments from Lake Kinneret with special reference to the bloom-forming dinoflagellate *Peridinium gatunense* (Dinophyceae) and chlorophyll degradation products. *Journal of Pankton Research*. 18(10):1781-1796
- Young,A., Britton,G.** (1993). Carotenoids in photosynthesis. Chapman and Hall edition (London and New York).

# Annexes





**RHIN**Unités  $\mu\text{g.l}^{-1}$ 

<b>Octobre 96</b>						
<b>station</b>	18	14	1	10	5	4
<b>salinité</b>	0	0,5	4,2	10	30	34
Chlorophylle-a	0,544	1,420	0,441	0,501	1,090	0,202
fucoxanthine	0,317	0,277	0,132	0,217	0,388	0,164
peridinine	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	0,081	0,134	0,015	-	-	0,007
lutéine	0,043	0,039	0,021	0,017	0,024	-
chlorophylle-b	0,127	0,129	0,063	0,037	0,136	0,027
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	-

<b>Juillet 97</b>							
<b>station</b>	8	2	13	14	11	4	3
<b>salinité</b>	5	10	15	20	25	30	33
Chlorophylle-a	2,360	2,645	2,527	1,987	2,803	0,637	0,518
fucoxanthine	0,699	0,379	0,663	0,614	1,387	0,328	0,442
peridinine	-	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	0,013	-	0,025	0,016	0,058	0,035	0,016
lutéine	0,139	0,109	0,052	0,039	0,029	0,008	-
chlorophylle-b	-	0,118	-	-	-	0,006	-
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	0,061	-

<b>Novembre 97</b>								
<b>station</b>	12	11	5	8	15	6	2	1
<b>salinité</b>	0	5	10	15	20	25	30	35
Chlorophylle-a	1,092	0,500	0,418	0,360	0,271	0,381	0,264	0,249
fucoxanthine	0,151	0,107	0,099	0,112	0,092	0,100	0,085	0,072
peridinine	-	-	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	0,023	0,023	0,013	0,018	0,007	-	-	0,006
lutéine	0,070	0,031	0,030	0,031	0,018	0,020	-	-
chlorophylle-b	0,030	-	-	-	-	-	-	-
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>Avril 98</b>						
<b>station</b>	5	1	10	9	2	3
<b>salinité</b>	5	9,5	14,4	20	28	33
Chlorophylle-a	3,286	2,065	2,946	2,966	3,043	4,069
fucoxanthine	0,667	0,626	1,025	1,074	0,965	1,456
peridinine	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	-	-	-	-	-	-
lutéine	0,153	0,121	0,115	0,071	0,035	0,011
chlorophylle-b	-	-	-	-	-	-
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	-





**Seine**

<b>Janvier 01</b>		
<b>salinités</b>	<b>fucoxanthine</b>	<b>chlo a</b>
0,000	0,044	0,278
1,000	0,024	0,234
3,000	0,014	0,095
9,000	0,080	0,079
12,000	0,075	0,070
20,000	0,007	0,078
21,000	0,012	0,092
24,000	0,013	0,068

<b>Mars 01</b>					
<b>salinité</b>	<b>chlo a</b>	<b>fucoxanthine</b>	<b>prasincox</b>	<b>luteine</b>	<b>chlo-b</b>
0,000	1,440	0,193	0,000	0,000	0,000
0,300	4,589	0,470	0,000	0,035	0,109
0,400	4,596	0,597	0,000	0,046	0,140
0,800	11,545	1,189	0,000	0,159	0,549
9,000	6,422	0,473	0,000	0,224	0,196
13,500	1,898	0,153	0,000	0,037	0,044
	5,082	0,512	0,000	0,084	0,173

<b>Avril 01</b>					
<b>salinité</b>	<b>chlo a</b>	<b>fucoxanthine</b>	<b>allox</b>	<b>luteine</b>	<b>chlo-b</b>
0,000	14,035	1,987	0,000	0,000	0,000
1,100	13,112	1,936	0,000	0,093	0,229
1,200	4,581	1,023	0,102	0,000	0,000
1,400	4,678	0,643	0,129	0,052	0,105
9,700	5,650	0,834	0,103	0,000	0,000
12,100	8,196	1,184	0,079	0,000	0,000
14,000	2,110	0,416	0,000	0,000	0,000
14,400	7,193	1,318	0,349	0,000	0,000
19,100	3,855	0,741	0,067	0,000	0,000
20,200	0,133	0,154	0,000	0,000	0,000
21,800	1,863	0,513	0,000	0,000	0,000
22,200	3,940	0,929	0,057	0,000	0,000
27,400	5,144	1,004	0,033	0,000	0,000
30,000	4,473	0,581	0,155	0,000	0,000

<b>Juin 01</b>					
<b>salinité</b>	<b>chlo a</b>	<b>fucoxanthine</b>	<b>prasincox</b>	<b>luteine</b>	<b>chlo-b</b>
0,300	83,239	10,976	0,964	0,977	3,663
0,300	44,755	5,363	0,362	0,432	2,187
0,300	20,935	3,687	0,858	0,309	0,920
0,400	15,636	3,214	0,908	0,209	0,762
0,500	4,103	0,545	0,000	0,076	0,164
0,500	4,347	0,600	0,000	0,063	0,222
1,300	15,226	2,563	0,537	0,246	0,597
8,500	5,288	0,800	0,000	0,000	0,000
21,200	5,459	1,709	0,000	0,000	0,000
23,800	8,236	1,761	0,000	0,000	0,000
25,700	3,633	0,637	0,000	0,000	0,000
26,300	16,238	4,778	0,000	0,000	0,000
26,300	21,587	4,347	0,000	0,000	0,000

<b>Juillet 01</b>					
<b>salinité</b>	<b>chlo a</b>	<b>fucoxanthine</b>	<b>prasincox</b>	<b>luteine</b>	<b>chlo-b</b>
0,000	15,882	2,297	0,488	0,327	0,781
0,400	30,392	4,434	1,647	0,667	1,110
0,430	39,813	5,948	0,000	0,252	1,362
0,500	30,485	3,764	0,748	0,273	0,755
1,820	32,618	5,131	0,000	0,965	0,660

<b>Aout 01</b>					
<b>salinité</b>	<b>chlo a</b>	<b>fucoxanthine</b>	<b>allox</b>	<b>luteine</b>	<b>chlo-b</b>
0,000	22,587	2,719	0,524	0,225	0,448
0,100	35,013	4,404	0,475	0,200	0,375
1,000	54,241	7,295	0,517	0,271	0,181
2,000	56,345	7,381	0,698	0,241	0,485
3,000	54,861	7,332	1,068	0,428	0,548
4,000	42,383	6,167	1,101	0,316	0,486
5,000	22,729	3,482	0,294	0,000	0,000
9,000	13,939	2,161	0,241	0,000	0,000
14,000	19,724	3,071	0,399	0,298	0,322
15,000	11,042	2,247	0,216	0,000	0,000
20,000	12,017	2,204	0,000	0,000	0,000
24,000	6,030	0,782	0,000	0,000	0,000
32,000	0,426	0,076	0,000	0,000	0,000

**Autres**

<b>Ems</b>							
<b>Juillet 97</b>							
<b>station</b>	6	7	4	12	1	9	11
<b>salinité</b>	1	5	11	15	20	26	30
Chlorophylle-a	10,838	4,503	1,998	1,920	2,573	3,166	3,299
fucoxanthine	1,654	1,039	0,555	0,638	0,641	0,956	0,719
peridinine	-	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	-	-	-	-	-	-	-
lutéine	0,725	0,432	0,166	0,118	0,083	0,072	0,023
chlorophylle-b	-	-	-	-	-	-	-
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	-	-

<b>Elbe</b>							
<b>Avril 97</b>							
<b>station</b>	21	5	9	20	16	11	13
<b>salinité</b>	0,5	5	12	15	22	25	30
Chlorophylle-a	15,272	2,174	1,960	5,277	12,009	4,762	1,567
fucoxanthine	3,091	0,461	0,894	1,734	2,962	2,299	0,473
peridinine	-	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	-	-	-	-	-	-	-
lutéine	0,579	0,172	0,061	0,115	0,061	0,060	0,012
chlorophylle-b	0,252	-	-	-	0,040	-	-
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	-	-

<b>Douro</b>								
<b>Septembre 97</b>								
<b>station</b>	9	1	3	10	12	6	11	5
<b>salinité</b>	1	5,5	10	16	21	24	31	35
Chlorophylle-a	3,764	3,293	2,307	1,751	0,825	1,247	0,792	0,880
fucoxanthine	0,612	0,442	0,468	0,294	0,152	0,230	0,130	0,145
peridinine	0,002	0,007	0,020	0,054	0,033	0,054	0,050	0,077
alloxanthine	-	-	-	-	-	-	-	-
lutéine	0,153	0,174	0,199	0,093	0,070	0,064	0,033	0,028
chlorophylle-b	0,335	0,144	0,085	-	0,009	0,012	0,008	0,012
19'hex.fucox.	-	-	-	0,058	0,085	0,090	0,098	0,113

<b>Sado</b>						
<b>Septembre 97</b>						
<b>station</b>	9	6	8	3	10	13
<b>salinité</b>	5	18	22	27	33	35
Chlorophylle-a	6,931	5,201	6,672	5,836	2,885	0,783
fucoxanthine	1,276	1,342	1,625	1,555	0,776	0,223
peridinine	-	0,077	0,183	0,091	0,009	0,018
alloxanthine	-	-	-	-	-	-
lutéine	0,352	0,417	0,213	0,161	0,056	0,020
chlorophylle-b	0,088	-	0,059	0,092	0,024	-

<b>Loire</b>							
<b>Septembre 98</b>							
<b>station</b>	1	8	12	11	5	15	4
<b>salinité</b>	0,2	5	10	15	21	25	30
Chlorophylle-a	74,311	35,787	25,154	8,495	8,338	3,152	7,227
fucoxanthine	10,030	4,313	3,863	1,486	1,344	0,624	1,283
peridinine	-	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	0,626	-	0,317	0,204	0,167	0,056	0,120
lutéine	2,453	0,782	0,437	0,180	0,145	0,037	0,015
chlorophylle-b	3,552	0,932	0,491	0,139	0,119	0,020	0,043
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	-	-

<b>Tamise</b>							
<b>Février 99</b>							
<b>station</b>	1	3	2	7	9	11	14
<b>salinité</b>	0,3	5	10	15	20	25	32
Chlorophylle-a	1,761	1,587	5,336	0,752	0,925	1,520	1,367
fucoxanthine	0,320	0,348	0,927	0,269	0,344	0,537	0,421
peridinine	-	-	-	-	-	-	-
alloxanthine	-	-	-	-	-	-	-
lutéine	0,041	0,060	0,023	0,024	-	0,014	0,006
chlorophylle-b	-	0,058	0,101	-	-	-	-
19'hex.fucox.	-	-	-	-	-	-	-

## Cultures d'algues

Préparation du milieu pour *Scenedesmus suspicatus* et *Asterionella formosa*- milieu **Dauta**.

### Milieu de culture :

Ordre	milieu de base	solution mère (g/l)
1	Na <sub>2</sub> EDTA	1
2	Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1
4	NaHCO <sub>3</sub>	50
5	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5
6	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	25
9	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	25
3	oligoéléments	
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20.10 <sup>-3</sup>
	CuCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	20. 10 <sup>-3</sup>
	MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	400. 10 <sup>-3</sup>
	CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	10. 10 <sup>-3</sup>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1. 10 <sup>-3</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	35. 10 <sup>-3</sup>
	Nutriments	
8	KNO <sub>3</sub>	200
7	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25

### Procédure :

- mettre 1 ml des solution mères par litre d'eau distillée ;
- autoclaver 45 min à 120 °C ;
- ajuster le pH entre 7.5 et 8.0.

### Remarque :

Pour la culture de la Diatomées *Astrionella formosa* un ajout de silice est nécessaire.



---



---

 Préparation du milieu pour la culture de *Chlamydomonas spp.* - milieu Jaworski
**Milieu de culture :**

Ordre	milieu de base	solution mère (g/l)
1	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	20
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.4
3	MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	50
4	NaHCO <sub>3</sub>	15.9
5	Na <sub>2</sub> EDTA	2.25
	FeNa EDTA	2.25
6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.48
	MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	1.39
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	1
7	Cyanocobalamine	0.04
	Thiamine HCl	0.04
	Biotine	0.04
8	NaNO <sub>3</sub>	80
9	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O	36

**Procédure :**

- mettre 1 ml des solution mères par litre d'eau distillée ;
- autoclaver 45 min à 120 °C .

Remarque : Ce milieu a été fabriqué avec le plus grand soin en ce qui concerne sa stérilité. La souche de *Chlamydomonas* étant axénique, nous avons préféré travailler sur milieu minéral uniquement même si celui-ci n'est pas suffisant pour une croissance optimale.

---

## Liste des travaux effectués pendant la Thèse

---

---

### PUBLICATIONS

#### Publications de rang A

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. Distribution of phytoplankton pigment in nine European estuaries and propose of an estuarine typology. *Biogeochemistry*. Sous presse

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. Effect of turbidity on phytoplankton pigment degradation in the Gironde estuary (SW, France). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Sous presse

G. Abril, M. Nogueira, H. Etcheber, G. Cabeçadas, E.Lemaire & M.J. Brogueira. Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. Sous presse

E. Tessier, D. Amouroux, E. Lemaire, H. Etcheber & O.F.X. Donard. Formation and volatilisation of alkyl-iodide and -selenide compounds in macrotidal estuaries. *Biogeochemistry*. Sous presse

E.Lemaire, R. De Wit, B. Sautour, M. Capdepuis, A.Andouche & V.David. *In vitro* phytoplankton pigments degradation in an estuarine environment : kinetics and pheopigment production. En préparation.

#### Publications de rang B

M.Trousselier, E.Buffan-Dubeau, E. Lemaire & Rutger De Wit. Microbial dynamics in the Arcachon Bay water column as affected by *Zostera noltii* and inorganic nutrient concentration. 1999.*Robust Final report*.

E. Lemaire & H. Etcheber. Degradation de la fraction organique pigmentaire des eaux de l'estuaire de la Gironde : Influence du bouchon vaseux. 2000. *Unité de Recherche Marine n°13. Rapport final*. IFREMER. 15pp

E. Lemaire, G. Abril, H. Etcheber & R. De Wit. Organic matter sources and biogeochemical processes which control organic matter transformations in the estuaries. 1999. *Biogest final report*.

---

## COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. Pigments distribution in surface waters from European estuaries. First Annual Scientific ELOISE conference, Arcachon, 21-23 mai 1997, Poster.

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. Spatial and temporal variations of plant pigments in the Gironde, Scheldt and Rhine estuaries. Second Annual Scientific ELOISE conference, Huelva, 30 septembre-4 octobre 1998, Poster.

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. Distribution of phytoplankton pigments in the surface waters of European estuaries. Second BIOGEST Scientific meeting, Pau, mars 1998. Communication orale.

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. Etude des contenus pigmentaires des eaux de surface des estuaires de l'Escaut, de la Gironde et du Rhin : caractérisation des variations saisonnières et inter-estuaires. Forum des jeunes océanographes, Marseille, mars 1999. Communication orale.

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. Survey of the phytoplankton pigment in the surface water of the Scheldt, the Rhine and the Gironde estuaries : caracterisation of the seasonal variations, organic matter sources and pigment/biogas correlations. Third BIOGEST Scientific meeting, Yerseke, avril 1999. Communication orale.

E.Lemaire, G.Abril, R.De Wit & H.Etcheber. The use of plant pigments as biomarkers of organic matter in the estuarine ecosystem. Mast Advanced Study Courses, Barcelone, juillet 1999 . Communication orale.

E. Lemaire, G.Abril, R. De Wit & H. etcheber. Liquid Chromatography studies of photosynthetic pigments in estuaries need to consider continental inputs and degradation processes. Pigment Workshop, Barcelone, mai 2001.

---

## Résumé

L'importance du rôle tampon des estuaires, interfaces majeures entre continents et océans, et leur capacité de filtre restent des caractéristiques dominantes de ces écosystèmes. Notre apport à l'étude de ces systèmes est de mieux cerner l'origine et le devenir de la matière organique (MO). Tout estuaire reçoit la MO apportée directement par le fleuve et par la mer, mais également produit sa propre matière dans sa partie centrale et récolte celle des zones humides et de ses berges, ceci sans compter sur l'apport anthropique des eaux usées. De plus, l'importance relative de ces différentes sources peut varier dans le temps et l'espace en fonction des caractéristiques propres de l'estuaire. Nous avons choisi dans cette étude de suivre la MO végétale et les pigments photosynthétique comme marqueurs de cette matière.

La technique HPLC (*High Performance Liquid chromatography*, Chromatographie Liquide Haute Pression) du contenu pigmentaire des échantillons, permet en une seule analyse d'obtenir des informations sur les classes phytoplanctoniques, mais aussi sur leur état de dégradation et le régime trophique du milieu.

Ainsi dans les estuaires européens investigués, la population phytoplanctonique dominante tout au long de l'année est composée de Diatomées. Le printemps et l'été sont les périodes les plus productives où la diversification pigmentaire est la plus forte. En effet, nous avons trouvé des populations importantes de Dinoflagellés, Cryptophytes, Chlorophytes dans la Gironde (F), l'Escaut (B/NL), le Sado (P) et la Loire (F) mais aussi des Prymnesiophytes dans le Rhin (NL) et le Douro (P).

L'autre question soulevée par cette étude est de préciser le mode de dégradation de la MO et les paramètres qui influence cette dégradation lorsque la MO pénètre dans la zone de maximum de turbidité de l'estuaire de la Gironde. Nous avons travaillé sur la matière organique d'origine phytoplanctonique par une technique d'incubation *in vitro*. Cette technique nous a permis de faire varier des paramètres comme : les teneurs en matière en suspension et en bactéries attachées, la température... . Nous avons ainsi clairement montré que l'augmentation de la teneur en particules accélère la dégradation des pigments. Nous avons pu également observer l'impact des communautés bactériennes estuariennes sur l'accroissement des cinétiques de dégradation. Dans un second temps, cette technique *in vitro* nous a permis de mettre en évidence les voies de dégradation des pigments du phytoplancton par rapport aux processus mis en jeu (sénescence, broutage zooplanctonique et dégradation bactérienne).

Enfin, nous avons mis en évidence le rôle du phytoplancton dans les émissions de gaz à effet de serre en milieu estuarien (DMS, composés aromatiques halogénés volatiles,...).

**Mots clés :** *estuaire, matière organique, phytoplancton, pigments, dégradation.*

---

## Abstract

Estuaries, major interface between ocean and continent, play an important role as a filter of organic matter (OM). In this study, the origin and fate of OM are evaluated in such systems. All estuaries receive OM from the river (natural and anthropic) and the sea, but also produce their own matter. The relative importance of each origin could vary in time and space following estuarine typology. We chose in this work to follow the vegetal OM and photosynthetic pigments as markers of this matter.

Pigments and carotenoids measured by liquid chromatography (HPLC) were used to characterise phytoplanktonic taxonomic dynamics and also to understand the degradation level of these populations.

Therefore, fucoxanthin is the most common accessory photosynthetic pigment showing that diatoms are the most common group in the estuaries and particularly predominating during autumn and winter. Springtime and summer are always the most productive periods and the most diversified. Indeed, Dinoflagellate, Chlorophytes and Cryptophytes were found in the Gironde, the Scheldt, the Sado and the Loire, but also Prymnesiophytes in the Rhine and the Douro estuaries.

In a second part of this study, we used pigment measurements during *in-vitro* experiments to investigate how freshwater phytoplankton material were mineralised when they entered into the maximum turbidity zone in the Gironde estuary. The preferential production of pheophytin *a* in presence of particles and the lack of degradation in the sterilised turbid sample revealed the role of attached bacteria on the particles in the degradation of phytoplankton. The experimental approach developed in this study allowed to bring to the fore the degradation ways of pigments link to the biological processes (senescence, grazing, bacterial degradation).

Finally, we could have surrounded the impact of the phytoplankton in biogases (DMS, CO<sub>2</sub>,...) emissions in estuarine systems.

**Key words :** *estuary, organic matter, phytoplankton, pigments, degradation.*

---