

Betty AMELINEAU
5^{ème} Année

PROJET DE FIN D'ETUDES
(Option QSE : Qualité Sécurité Environnement)

**Détermination de la flore phytoplanctonique du Canal du
Mozambique d'après l'analyse des pigments par HPLC**

Mr François BAURAND

Responsable du laboratoire de chimie marine

Février - Septembre 2005

ESCOM
13 bd de l'Hautil
95092 Cergy-Pontoise cedex

IRD, Centre de Brest
Technopôle La Pointe du Diable
29280 Plouzané

RÉSUMÉ

Titre : Détermination de la flore phytoplanctonique du Canal du Mozambique d'après l'analyse des pigments par HPLC

Les échantillons d'eau de mer prélevés dans le Canal du Mozambique contiennent des pigments caractéristiques du phytoplancton marin. Cette étude de la production primaire s'inscrit dans le programme ECOTEM : **ECO**logie **T**rophique dans les **E**cosystèmes **M**arins. La technique d'analyse HPLC, développée en collaboration avec des partenaires scientifiques, permet l'identification et la quantification de certains pigments représentatifs de classes de phytoplanctons.

L'objectif final consiste à évaluer l'écosystème des grands pélagiques de cette zone tropicale, niveau le plus élevé de la chaîne alimentaire. Cette étude permettra de mieux connaître et d'évaluer les richesses biologiques de l'océan.

Mots clés : pigment, phytoplancton, pélagique, zone tropicale, technique d'analyse HPLC, production primaire.

ABSTRACT

Title : Evaluation of the phytoplanktonic plant in the Mozambique Channel studying the analysis of pigments by HPLC

Sea water samples taken in the Mozambique Channel contain characteristic pigments of the marine phytoplankton. This primary production study falls under ECOTEM program : **T**rophic **ECO**logy in the **M**arine **E**cosystems. The analysis technique of HPLC, developed with scientific partners, permitted us to identify and quantify characteristics pigments of classes of phytoplankton.

The aim of the project is to determine the ecosystem of large pelagic in this tropical area, the highest level of the food chain. This study will enable us to know and evaluate the biological richness of the ocean.

Key words : pigment, phytoplankton, pelagic, tropical area, analysis technique HPLC, primary production.

Pour faciliter la compréhension de mon rapport, les **mots** qui seront en rouge seront définis dans un lexique situé page 42. Ce sont généralement des mots issus du milieu océanographique qui méritent une définition pour les lecteurs étrangers à ce domaine.

I) Introduction générale

Les pigments phytoplanctoniques peuvent être caractérisés et quantifiés dans l'eau de mer. Actuellement, ils sont dosés pour permettre d'évaluer la biomasse primaire et par là, ils sont donc un élément incontournable de l'évaluation des richesses biologiques de l'océan.

L'objectif de mon travail est d'étudier, à partir de concentrations pigmentaires, la composition **taxonomique** du phytoplancton du Canal du Mozambique. Il est possible grâce à la chromatographie liquide de mesurer sur des échantillons naturels, y compris dans les eaux **oligotrophes**, les pigments caractéristiques des groupes d'algues les plus représentatifs du phytoplancton marin.

Les compositions pigmentaires traceront les changements des communautés phytoplanctoniques, susceptibles de se répercuter jusqu'au niveau le plus élevé du réseau trophique, en l'occurrence le thon.

II) L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD)

II-1) Présentation générale

Créé en 1944, l'ORSTOM (**O**ffice de la **R**echerche **S**cientifique et **T**echnique **O**utre-**M**er) devenu l'IRD (**I**nstitut de **R**echerche pour le **D**éveloppement) en 1999 est, depuis 1984, un établissement public français à caractère scientifique et technologique, placé sous la double tutelle des ministères chargés de la Recherche et de la Coopération.

II-1-a) Ses missions

L'IRD conduit des programmes scientifiques centrés sur les relations entre l'homme et son environnement dans les pays du Sud, dans l'objectif de contribuer à leur développement. Il remplit les missions fondamentales de :

- ✚ recherche,
- ✚ expertise et valorisation,
- ✚ soutien et formation,
- ✚ information scientifique.

II-1-b) Situation géographique

L'IRD mène des recherches en partenariat avec les acteurs scientifiques, sociaux et politiques des pays du Sud, d'où l'importance d'une représentation physique à l'étranger. Implanté en Afrique, en Asie, dans l'océan Indien, en Amérique latine et dans le Pacifique, il dispose de 35 centres et représentations dans le monde, dont :

- ✚ cinq centres en France métropolitaine : Paris, Bondy, Montpellier, Brest et Orléans,
- ✚ cinq centres dans les DOM-TOM : Guyane, Martinique, Nouvelle-Calédonie, Polynésie française et La Réunion,
- ✚ 25 représentations dans des pays étrangers.

Les chercheurs de l'IRD interviennent dans une cinquantaine de pays.

II-2) L'IRD, Centre de Bretagne

II-2-a) Historique

L'ORSTOM s'inscrit en partenaire du Centre National pour l'**EX**ploitation des **O**céans (CNEXO) dès la création de ce dernier en 1967. Quelques équipes scientifiques s'installent au Centre **O**céanologique de **B**retagne (COB) pendant sa construction à Brest au début des années 1970. Ce sont des océanographes physiciens ou biologistes et des géophysiciens qui travaillent dans ce centre polyvalent, le plus important du territoire national, de concert avec les équipes du CNEXO mais aussi d'autres établissements et notamment la très jeune Université de **B**retagne **O**ccidentale (UBO).

En 1975, l'implantation brestoise de l'ORSTOM est formalisée par la création d'une antenne auprès du CNEXO, dirigée par Christian Champagnat, chercheur halieute réputé. A partir de cette date, de nombreux scientifiques de l'ORSTOM séjournent à Brest pour exprimer les résultats de leurs travaux conduits outre-mer ou pour élaborer les programmes qu'ils projettent de réaliser. Base arrière pour les uns, base avancée pour les autres, cette antenne se caractérise

par une très forte mobilité des scientifiques qui trouvent au COB un creuset d'émulation intellectuelle et les soutiens logistiques, documentaires, informatiques ou autres dont ils ont besoin.

L'antenne brestoise est considérée comme le pôle océanologique de l'ORSTOM et devient le troisième centre métropolitain de l'institut en 1990 après Bondy et Montpellier. Une réforme en profondeur transforme l'ORSTOM en IRD en 1999 et des structures opérationnelles rinnovées se mettent en place : ce sont les UR (Unités de Recherche) et les US (Unités de Service) qui conduisent leur action scientifique en s'appuyant sur le centre régional de gestion de la Recherche et sur les services qu'il offre en relation avec le siège parisien.

II-2-b) Implantation géographique

A quelques kilomètres de Brest, le Centre IRD de Bretagne est situé sur le campus de l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) (photo 1), au coeur du Technopôle Brest-iroise qui représente un pôle océanologique de dimension européenne en termes d'effectifs et de concentration d'établissements spécialisés.



photo 1 : vue aérienne du campus IFREMER.

C'est un centre de recherche qui accueille actuellement une quarantaine de personnes : chercheurs, ingénieurs, techniciens, personnel administratif, étudiants et stagiaires. Outre son rôle de base métropolitaine pour les équipes de l'IRD, le Centre a pour vocation de contribuer à l'accueil et la formation des cadres scientifiques des pays et institutions partenaires de l'IRD.

II-2-c) Thématique

La thématique scientifique du Centre IRD de Bretagne est essentiellement orientée sur les Sciences de la Mer. Climat tropical, océanographie du large et côtière, modélisation, acoustique sous-marine, **sclérochronologie** et **halieutique** sont les thèmes de recherche qui y sont développés.

Le Centre de Bretagne apporte un soutien technique, notamment pour la préparation de campagnes océanographiques, aux équipes de l'IRD et de partenaires basées en France, dans les DOM-TOM et à l'étranger. La gestion de la flotte océanographique de l'institut y est également assurée par le Bureau Technique des Moyens Navals de l'IRD.

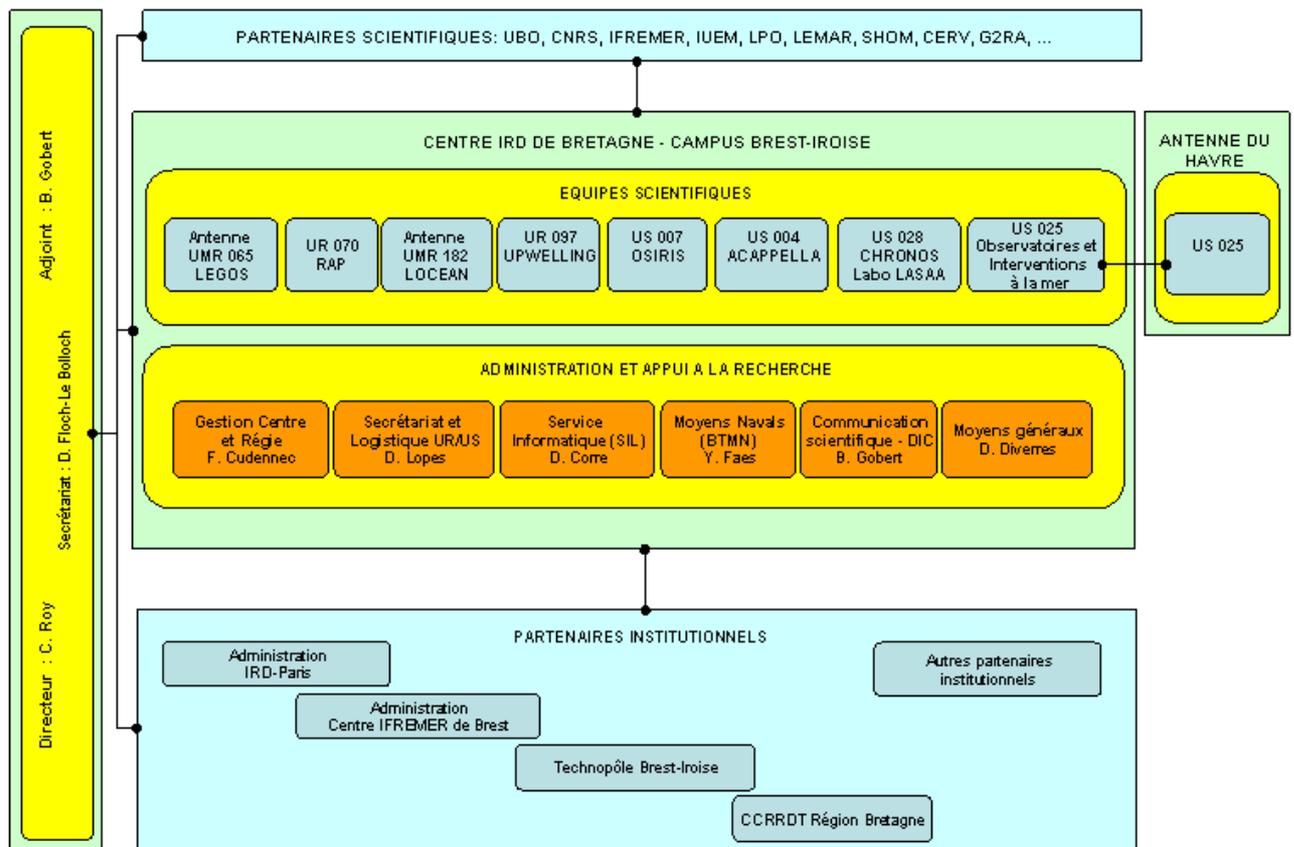
Avec l'Ifremer et l'UBO, le centre est partenaire de la bibliothèque La Pérouse, centre de documentation sur la mer situé également sur le technopôle Brest-iroise. Sur le plan local, ses partenaires scientifiques principaux sont l'Ifremer avec qui l'IRD a créé un laboratoire commun, le LASAA (Laboratoire de Schlérochronologie des Animaux Aquatiques), l'UBO, le LPO (Laboratoire de Physique des Océans), l'IUEM (Institut Universitaire Européen de la

Mer), le LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement MARin) et le SHOM (Service Hydrographique et Océanographique de la Marine).

Le Centre a vocation régionale, et à ce titre son Directeur est chargé de la gestion, de l'animation et de la coordination des activités de l'IRD en régions Bretagne et Pays de la Loire.

Le Centre IRD de Bretagne est notamment membre de la Conférence des Organismes de Recherche en Bretagne et du Réseau Bleu (forum des laboratoires et établissements à vocation marine du Grand Ouest).

II-2-d) Organigramme du Centre de Bretagne



II-3) L'US 025 : Interventions à la Mer et Observatoires Océaniques

II-3-a) Présentation

Une Unité de Service (US) est un regroupement de personnel qui relève de l'institut ou d'un organisme extérieur à celui-ci pour assurer la mise en œuvre, la coordination et la gestion déconcentrée des activités scientifiques et techniques de l'établissement.

L'US 025 a pour vocation de gérer et mettre en œuvre le matériel océanographique embarqué, d'assurer la gestion opérationnelle des réseaux d'observation océanique de l'institut, et de valoriser les nombreuses observations océaniques in situ et satellitaires par des actions spécifiques.

Cette US a pour vocation de répondre aux besoins manifestés par les utilisateurs, de toutes disciplines, des diverses plates-formes d'étude de l'océan : navires océanographiques, navires non spécialisés, systèmes d'observation océanique, etc.

Pour ma part, j'ai intégré le laboratoire de chimie marine qui dépend de l'US 025. Il est composé de trois personnes : mon maître de stage, responsable du laboratoire, d'un technicien supérieur et d'un ingénieur chimiste océanographe basé à la Réunion, pôle océan Indien, qui fait parti de cette US.

II-3-b) Objectifs

Ses objectifs sont multiples :

- ✦ assurer la gestion opérationnelle des réseaux d'observation océanique de l'institut,
- ✦ gérer et mettre en oeuvre, en s'intégrant aux équipes scientifiques lors des missions à la mer, le matériel océanographique commun embarqué,
- ✦ assurer le suivi et la maintenance des équipements fixes, scientifiques, informatiques et de navigation, des navires de l'institut,
- ✦ participer à l'acquisition et à l'installation de nouveaux équipements,
- ✦ assurer la formation des utilisateurs et l'accueil de stagiaires,
- ✦ assurer des tâches d'expertise dans les domaines de compétence,
- ✦ en liaison avec les Moyens Navigants, programmer les missions des navires de l'IRD.

III) Introduction au sujet

III-1) Programme ECOTEM

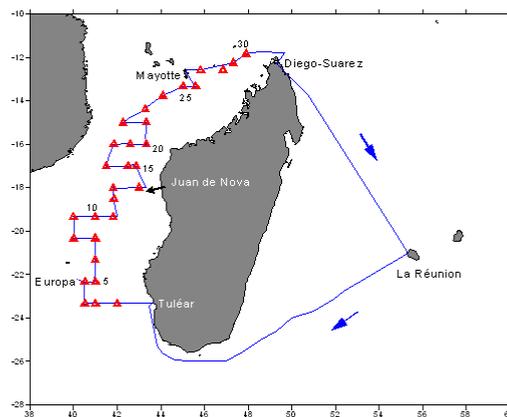
III-1-a) Présentation

L'actuelle série des campagnes à la mer ECOTEM (**ÉCO**logie **Tro**phique dans les **Écos**ystèmes **Mar**ins) menée par l'UR 109 THETIS (**TH**ons tropicaux et **Écos**ystèmes **pélagiques**, **Taxies**, **I**nteractions et **S**tratégies d'exploitation) s'est terminée en novembre 2004. Cette série constituée de cinq campagnes a permis de récolter de l'information scientifique sur la zone nord des Seychelles et sur le Canal du Mozambique (cartes 1 et 2) :

- ⊕ ECOTEM 4, juillet 2002 au large des Seychelles,
- ⊕ ECOTEM 5, septembre 2002 dans le Canal du Mozambique,
- ⊕ ECOTEM 9, septembre 2003 dans le Canal du Mozambique,
- ⊕ ECOTEM 6, mai 2004 dans le Canal du Mozambique,
- ⊕ ECOTEM 7, novembre 2004 dans le Canal du Mozambique.



carte 1 : le Mozambique



ECOTEM-5 : Trajet de la campagne et positions des stations hydrologiques

carte 2 : le Canal du Mozambique

Les campagnes ECOTEM 4 et 5 ont été réalisées à bord du navire océanographique «La Curieuse» et les campagnes ECOTEM 9, 6 et 7 à bord du palangrier «Le Cap Morgane».

Trois US du Centre IRD de Bretagne ont été concernées par ce programme, soit directement lors d'embarquements (US 004 et US 025) soit indirectement pour traitement d'échantillons (US 028 et US 025). Les domaines couverts ont été l'acoustique, la chimie et la **sclérochronologie** (photo 2).



photo 2 : extraction des **otolithes** du thon

III-1-b) Objectifs d'ECOTEM

L'objectif principal est l'étude de l'écosystème des grands **pélagiques** dans le Canal du Mozambique.

Une des interrogations du programme ECOTEM est de savoir si les conditions hydrologiques particulières de la zone étudiée engendrent des enrichissements en sels nutritifs et par conséquent une augmentation de la fertilité des eaux, qui peut se répercuter jusqu'au niveau le plus élevé de la chaîne alimentaire.

Les thèmes des campagnes sont les thèmes suivants : hydrologie, production primaire, structure spatiale et diversité des espèces/proies des grands prédateurs **pélagiques** dans le Canal du Mozambique.

III-1-c) Travaux effectués lors des campagnes en mer

⊕ Stations hydrologiques :

- profils verticaux CTD (Conductivité, Température, Densité), sonde utilisant de l'électronique de haute précision,
- capteurs de pression,
- capteurs de fluorescence,
- capteurs d'oxygène.

⊕ Prélèvements d'eau de mer à six niveaux différents entre la surface et 300 m de profondeur avec différents paramètres :

- sels nutritifs : nitrate, nitrite, phosphate, silicate,
- pigments phytoplanctoniques,
- matière organique particulaire.

- ✚ Acoustique : détection et caractérisation de concentrations de proies (poissons **pélagiques**, crustacés, céphalopodes) et de prédateurs supérieurs à une fréquence de 38 kHz.
- ✚ Pêche :
 - chalutages **pélagiques** à différents niveaux à bord de «La Curieuse», selon les détections acoustiques, entre 25 et 250 m (photo ANNEXE 1 p. 44)
 - palangres à bord du «Cap Morgane» (photo 3).



photo 3 : bateau de pêche «Le Cap Morgane»

- ✚ Ornithologie : comptages d'oiseaux marins (sternes, fous, photos ANNEXE 1 p. 44) notamment sur les îles éparses de Juan de Nova et d'Europa.
- ✚ Comptage de mammifères marins le long de transects océaniques.

En matière d'acoustique, les objectifs des campagnes sont d'évaluer la distribution spatiale et l'abondance des proies de thons dans la zone située au nord de l'île Juan de Nova, puis de mettre ces résultats en relation avec les données environnementales et les captures réalisées à l'aide d'une palangre. Deux sondeurs émettant des ultras sons de fréquences différentes (38 et 120 kHz) ont été utilisés simultanément pour mieux différencier les organismes détectés. Les données acoustiques récoltées sont dans l'ensemble de qualité satisfaisante et concernent des observations variées réalisées à différentes échelles spatiales de l'environnement des grands **pélagiques** (particulièrement le thon) dans le nord du Canal du Mozambique.

En matière de chimie, il s'agit de réaliser les analyses pour les cinq campagnes ECOTEM, c'est-à-dire traiter les échantillons et les données récoltées. L'étude de la distribution des sels nutritifs et des pigments phytoplanctoniques lors de ces campagnes permet d'évaluer la production primaire dans le Canal du Mozambique, premiers maillons de la chaîne alimentaire des thons et autres grands **pélagiques**.

Personnellement, j'ai été responsable de l'analyse des pigments phytoplanctoniques des cinq campagnes ECOTEM soient environ 570 échantillons uniques et donc très précieux.

III-2) Généralités sur le phytoplancton

III-2-a) La chaîne alimentaire : définitions et principe (schéma 1)

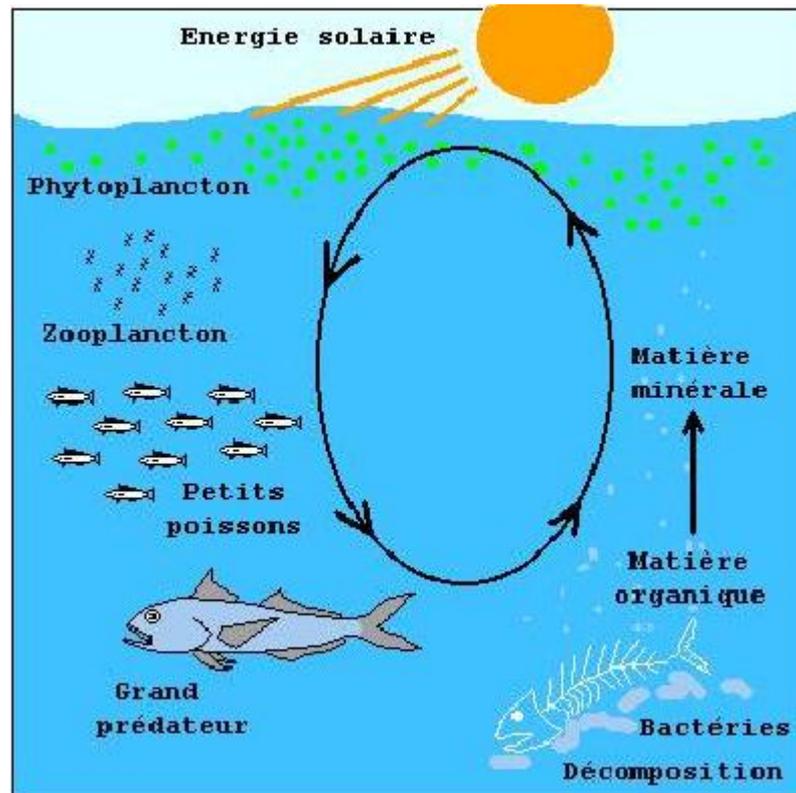


schéma 1 : la chaîne alimentaire

Phytoplancton : le phytoplancton, du grec planctos qui signifie errant, est essentiellement composé d'algues unicellulaires, et forme la base de la chaîne alimentaire des océans. Absorbant des éléments minéraux tels que l'azote, le phosphore ou le fer, il transforme la matière minérale en matière organique grâce à l'énergie lumineuse captée par la chlorophylle au cours de la photosynthèse.

Le phytoplancton est composé d'espèces très variées pouvant former des chaînes ou des agrégats, la taille des espèces rencontrées peut varier de 1 à 1000 μm , la moyenne se situant vers les 20 à 50 μm . Ils flottent dans les eaux, sans pouvoir s'opposer à leurs déplacements. On l'oppose ainsi au **necton**. Il est principalement **pélagique** mais certains sont **benthiques**. Le plancton végétal : le phytoplancton se différencie du plancton animal : le zooplancton. Bien que certains organismes planctoniques puissent atteindre des tailles importantes comme les méduses, la très grande majorité du plancton est si petit qu'on ne peut le voir qu'à l'aide d'un microscope.

Photosynthèse : **eau + gaz carbonique + énergie solaire => matière végétale + O₂**

La photosynthèse permet aux végétaux qui contiennent des pigments de vivre à partir de composés minéraux. On dit qu'ils sont **autotrophes**.

Les pigments se situent dans des structures spécialisées, les chloroplastes présents dans la majorité des espèces qui composent le phytoplancton.

Zooplancton : animaux vivant dans la colonne d'eau et incapables de lutter contre les courants.

Production primaire : développement de matière organique végétale (phytoplancton) à partir de la matière minérale par le processus de la photosynthèse.

Production secondaire : développement des animaux herbivores à partir du phytoplancton.

Production tertiaire : développement des animaux carnivores à partir d'autres animaux.

Le principe de la chaîne alimentaire

C'est la cascade des échanges alimentaires dans un milieu peuplé d'animaux et de végétaux, l'ensemble formant une **biocénose**. Chaque organisme est prédateur du maillon précédent et proie du maillon suivant. La boucle du cycle se referme schématiquement* entre le dernier maillon prédateur et le premier maillon végétal par la décomposition de la matière organique (cadavres) en matière minérale : opération qui est assurée par les bactéries.

* : en réalité, chaque maillon de la chaîne comprend une partie des organismes qui est consommée par le maillon suivant et une partie qui meurt naturellement ou accidentellement : pollution, maladies, etc. Il y a donc à chaque étape à la fois passage à l'étape suivante et retour au monde minéral par décomposition.

Les étapes de la chaîne alimentaire ou niveaux trophiques permettent de mettre en évidence trois groupes d'organismes :

- **Les producteurs** : macro algues et phytoplancton qui utilisent l'énergie solaire pour produire de la matière organique vivante à partir du CO₂. Ils constituent le premier maillon de la chaîne.
- **Les consommateurs** : prédateurs herbivores pour le premier maillon, puis carnivores pour les suivants. Ce sont les maillons intermédiaires.
- **Les décomposeurs** : bactéries qui assurent la minéralisation de la matière organique. Elles représentent le dernier maillon de la chaîne.

III-2-b) Pigments et photosynthèse

Les pigments ne peuvent réaliser la photosynthèse qu'en présence de lumière. Les pigments ont des spectres d'absorption particuliers et les radiations solaires sont absorbées proportionnellement à l'épaisseur d'eau et d'une manière sélective (schéma 2). Les radiations rouges sont rapidement arrêtées alors que les radiations bleues peuvent atteindre des profondeurs plus importantes. Les différentes couleurs visibles du spectre sont plus ou moins rapidement absorbées.

La couleur rouge (grande longueur d'onde) est la première à disparaître dès 25 mètres de profondeur.

Le jaune est visible jusqu'à 100 mètres et le vert, 250 mètres environ. Le bleu et le violet ont des longueurs d'onde leur permettant de pénétrer à de grandes profondeurs. La lumière qui persiste au delà de 500 mètres n'est plus visible pour l'homme. Nous sommes alors dans la zone aphotique. La lumière qui persiste dans cette zone est utilisée par certaines espèces qui possèdent des yeux hypertrophiés, leur offrant une acuité visuelle largement supérieure à celle de l'homme.

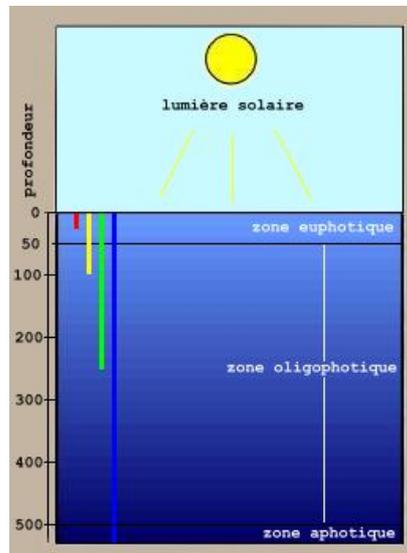


schéma 2 : pénétration de la lumière dans la mer

- **Zone euphotique (0 - 50 m) :** zone où peuvent se développer les algues vertes. L'éclairage naturel est suffisant pour permettre aux végétaux chlorophylliens de pratiquer la photosynthèse et assurer ainsi leur développement.
- **Zone oligophotique (50 - 500 m) :** la lumière est insuffisante au développement des algues vertes, mais permet aux algues rouges et brunes de se développer avec encore la possibilité de pratiquer la photosynthèse.
- **Zone aphotique (au delà de 500 m) :** obscurité totale. La photosynthèse n'est plus possible, entraînant une absence de végétation. Le rayonnement bleu qui persiste dans cette zone n'est pas perceptible par l'oeil humain.

IV) Analyse des pigments

IV-1) Introduction

La chlorophylle, principal pigment photosynthétique du règne végétal à la fois sur terre et en mer, sert depuis 40 ans d'indicateur de biomasse des végétaux marins microscopiques. Son étude ainsi que sa mesure présentent de grands intérêts en océanographie du fait de ces nombreuses applications dans l'océan. Se situant à la base de la chaîne alimentaire, ce statut de ressource primaire du phytoplancton traduit l'intérêt de son étude, notamment pour les zones de pêche. Le phytoplancton joue un rôle dans la production d'oxygène et dans l'absorption du dioxyde de carbone, ce qui limite l'effet de serre, et intervient dans l'évolution du climat. De plus, les mesures de chlorophylle ont pu révéler des zones de forts contrastes de fertilité : des gyres océaniques **oligotrophes** avec leur concentration basse en chlorophylle en surface et leur maximum vers 100-150 nm, aux eaux riches en chlorophylle rencontrées dans les zones d'**upwelling** et le long des fronts de talus, en mers côtières et en estuaires. Le phytoplancton intervient également dans les paramètres optiques de l'environnement marin («bloom phytoplanctonique»).

C'est pourquoi, aujourd'hui, les océanographes doivent être capables de mener en routine et de façon précise des analyses de pigments phytoplanctoniques afin de comprendre ces processus océaniques.

L'étude de la distribution des pigments phytoplanctoniques dans les différentes classes d'algues a fait apparaître la notion de pigments marqueurs. En effet, il s'est avéré que certains pigments étaient caractéristiques d'une classe phytoplanctonique. Différentes techniques comme la **Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)** sont apparues pour l'analyse du phytoplancton dans un but **taxonomique**. Ces études peuvent aboutir à l'établissement de cartes de répartition de la biomasse marine, qui constituent des sources d'informations sur les phénomènes océanographiques.

La mesure de la concentration des pigments dans les eaux marines donnera une bonne estimation de la biomasse du phytoplancton. En effet, les pigments contenus par le phytoplancton ont une valeur indicatrice forte pour certains groupes phytoplanctoniques. Ces campagnes permettent donc de fournir des indications sur la nature des populations à une position et une profondeur données et ainsi d'observer leur impact sur la géochimie de l'océan.

La méthode est relativement simple : en mer, on récupère le phytoplancton sur des filtres capables de retenir toutes les cellules, on extrait les pigments avec un solvant suivant un protocole et on mesure leur concentration par HPLC. Pour ma part j'ai réalisé les deux dernières étapes.

Beaucoup de pigments sont caractéristiques de certains groupes, dont voici quelques exemples (photos ANNEXE 2 p. 45) :

- ⊕ la fucoxanthine se rencontre principalement chez les **diatomées** qui se multiplient très rapidement lorsque les nitrates et les silicates sont abondants,
- ⊕ la 19'-hexanoylfucoxanthine est un indicateur des prymnésiofycées, parmi lesquelles les coccolithophoridés,
- ⊕ quant aux chrisophytes, ils sont identifiables par la 19'-butanoylfucoxanthine,

- ⊕ la chlorophylle C est surtout présente chez les **eucaryotes** qui croissent en abondance en présence de nitrates,
- ⊕ les cyanobactéries sont identifiables par la zéaxanthine,
- ⊕ la péridinine ne se rencontre que chez les dinoflagellés, qui forment des efflorescences parfois toxiques en eaux côtières.

La méthode de dosage des pigments actuellement utilisée est fortement inspirée des travaux de WRIGHT. Cette méthode a été mise en place par l'EPSHOM (Etablissement Principal de Service Hydrographique et Océanographique de la Marine) avec lequel l'IRD travaille en étroite collaboration.

Les prochlorococcus (**procaryotes**) possèdent la divinyle-chlorophylle A comme pigment majoritaire, contrairement à la plupart des phytoplanctons **eucaryotes** dont le pigment majoritaire est la mono-chlorophylle A. Ces deux pigments diffèrent par la présence de deux groupements vinyles (divinyle-chlorophylle A) ou d'un seul (mono-chlorophylle A, appelée par abus de langage chlorophylle A).

La différence de structure chimique entre la mono-chlorophylle A et la divinyle-chlorophylle A consiste en un remplacement d'un groupement éthyle par un groupement vinyle en position C-8 du macrocycle (structures chimiques ANNEXE 3 p. 46). En raison de cette structure assez similaire, ces deux pigments ont tendance à coéluer en HPLC, ce qui peut entraîner une erreur d'estimation dans la concentration des pigments. Ceci ne pose pas de problèmes lorsque les échantillons proviennent d'un milieu tempéré ou la divinyle-chlorophylle A est absente. Par contre, dans les zones tropicales **oligotrophes** où les teneurs en nutriments sont faibles, les prochlorococcus dominent les communautés phytoplanctoniques. Et le Canal du Mozambique, zone de travail des campagnes ECOTEM, est une zone tropicale.

Une seconde méthode est donc nécessaire pour séparer ces deux pigments car il est impossible d'identifier et donc de quantifier ces pigments par la méthode WRIGHT. La seconde méthode est inspirée des travaux de BARLOW.

Etat des lieux au commencement de l'étude

Les échantillons d'ECOTEM 5 ont été analysés en 2003 par François BAURAND, Responsable du laboratoire de chimie marine de l'IRD de Brest, dans les locaux de l'EPSHOM et avec leur chaîne d'analyse. La méthode chromatographique utilisée fut celle de WRIGHT. La méthode a été optimisée au niveau des solvants, du gradient, de la température de la colonne, du débit de la phase mobile, etc. Cependant, la méthode d'extraction des pigments est différente de celle que j'ai utilisée pour les autres campagnes ECOTEM.

Sécurité et hygiène dans le laboratoire

Le risque majeur à mon poste de travail réside dans l'utilisation de solvants facilement inflammables comme le méthanol, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle.

Tout d'abord, il est nécessaire de repérer les interrupteurs d'alarme incendie, les extincteurs, les issues de secours et les instructions en cas d'alerte.

J'utilise pour chaque manipulation les moyens de protection individuelle : blouse, gants, lunettes et la manipulation des solvants utilisés s'effectue sous la hotte. Les produits sont bien étiquetés et les symboles de danger doivent être visibles. Les bouteilles de solvants sont déposées dans des cuvettes de rétention pour l'alimentation de la chaîne en phase mobile. Le stockage des bouteilles neuves ainsi que les solvants usés s'effectue dans un local sécurité du site éloigné de toute présence humaine.

IV-2) Prélèvement et conditionnement en mer

A bord du bateau, l'eau de mer est prélevée dans des flacons en plastique blanc, Polypropylène Nalgène®. Immédiatement après le prélèvement, il faut réaliser la filtration sous vide à une pression inférieure à 200 mbars (photos ANNEXE 4 p. 47). Il faut éviter la dégradation ou la perte de pigments qui pourrait intervenir lorsque les filtres se colmatent et que la filtration se prolonge trop longtemps. Le volume filtré varie entre deux et quatre litres selon la pauvreté ou la richesse des eaux. Les filtres utilisés sont en fibre de verre (Whatman GF/F ; 0,7 µm ; 25 mm de diamètre). Les filtres sont ensuite pliés en deux avec les cellules de phytoplancton à l'intérieur et insérés dans un cryotube en plastique. Le tube est identifié par une lettre correspondant à la campagne et deux chiffres correspondant à la station et à la profondeur du prélèvement (exemple : F01-002 est un échantillon d'ECOTEM 6 parce que F est la sixième lettre de l'alphabet, station n°1 à une profondeur donnée). Enfin, les tubes sont entreposés dans l'azote liquide avant d'être transportés au laboratoire dans un surcongélateur à -75°C.

IV-3) Conservation des filtres

La température et le temps de conservation sont des points critiques. La conservation à température ambiante n'est pas recommandée car les pigments subiraient une dégradation poussée. Une étude menée à différentes températures a testé les conditions de conservation jusqu'à 11 mois et a conclu ce qui suit :

- ⊕ Plus la température est basse, plus la durée de conservation croît.
- ⊕ Le produit de dégradation majoritaire de la chlorophylle A est toujours la chlorophyllide A ; après 11 mois de conservation, cela ne représente pas plus du quart de la perte de chlorophylle A.
- ⊕ Il ne se forme pas de phéopigments A durant la conservation.

Dans le laboratoire de chimie marine, les filtres sont congelés à -75°C dans un surcongélateur et les plus anciens datent de juillet 2002 (campagne ECOTEM 4) faute d'une chaîne HPLC, de personnes qualifiées et de temps. Mais les conditions de conservation dans le laboratoire sont très satisfaisantes pour une bonne et longue conservation.

IV-4) Extraction des pigments

Au laboratoire de chimie marine, les filtres sont découpés en petits morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux, puis déposés dans un tube de 10 ml en verre. Ils sont extraits dans 2 ml de méthanol à 100 % et passés aux ultrasons pendant 15 s. Ensuite les tubes sont placés à 4°C dans l'obscurité (trempage), pendant une heure minimum, les pigments étant sensibles à la chaleur et à la lumière. Les extraits sont passés à travers des filtres de 0,2 µm à l'aide d'une seringue dans des vials de 2,5 ml pour enlever toutes les particules solides, puis les vials sont déposés dans l'échantillonneur automatique qui est capable de maintenir les extraits de pigments à 4°C grâce à un plateau réfrigéré. Une fois que les échantillons sont injectés dans la colonne HPLC, ils sont conservés au congélateur à -20°C.

La méthode d'extraction des pigments de l'EPSHOM, utilisée pour l'extraction des échantillons de la campagne ECOTEM 5 est la suivante :

- ✦ découper et placer le filtre dans un tube en verre d'environ 10 ml,
- ✦ ajouter 3 ml d'acétone/eau (90/10),
- ✦ passer le tube aux ultrasons pour éclater les cellules (puissance 100 W pendant 30 s),
- ✦ broyer le filtre à l'aide d'une baguette de verre,
- ✦ centrifuger durant 3 minutes à 3000 tours par minute,
- ✦ récupérer le surnageant et placer le dans un vial.

Pourquoi n'ai-je pas utilisé cette méthode d'extraction ?

1. Il est plus simple d'utiliser du méthanol pur que de réaliser le mélange acétone/eau qui peut générer une source d'erreur supplémentaire.
2. L'acétone est peu toxique mais le traitement aux ultrasons n'est pas optimisé, puisque l'extraction doit être améliorée par un broyage mécanique durant 1 minute.
3. Seul le surnageant est récupéré, il y a donc une perte significative de solution pigmentaire par rapport à la filtration que j'utilise. Cela permet donc de réaliser plus d'injections du même échantillon.
4. Après une étude bibliographique, l'ouvrage d'A.Aminot et de R.Kérouel (*Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses.*) nous invite à utiliser cette méthode d'extraction.

D'une manière générale, l'extraction n'engendre pas de dégradation des pigments. Des contrôles effectués sur phytoplancton de culture et échantillons naturels n'ont pas montré de dégradation notable (1 à 4 %) de la chlorophylle A jusqu'à deux jours de trempage au réfrigérateur.

V) Chaîne d'analyse HPLC

V-1) Matériel

Les mesures de pigments sont faites sur une chaîne HPLC de l'EPSHOM avec qui l'IRD a signé une convention pour le prêt de l'appareillage pour la durée de mon stage (photo 4). Ce système est équipé de la façon suivante :

- ✦ Un **chromatogramme** qui comprend un passeur d'échantillons (Thermo Separation Products : TSP, Spectra System AS 3000) équipé d'un plateau réfrigéré à 4°C pouvant contenir 105 échantillons, et d'un four de colonne programmé à 30°C. Il permet également d'effectuer la préparation des échantillons, notamment l'ajout de solution tampon ou d'étalon interne et enfin l'homogénéisation de l'échantillon par agitation.
- ✦ Une **pompe** (TSP, Spectra System P1000 XR) permettant l'utilisation de quatre solvants en gradient. Elle fonctionne grâce à un **moteur** type DX 10 CREYSSENSAC.
- ✦ Une **bouteille d'hélium** standard comprimé de 2,7 m³ fournie par Air Liquide[®] qui permet le dégazage des solvants. La bouteille est munie d'un manomètre pour le contrôle de la pression.
- ✦ Un **détecteur UV** à balayage (TSP, Spectra System UV 3000) qui permet d'acquérir le spectre UV visible des composés en sortie de colonne et de visualiser le chromatogramme à différentes longueurs d'ondes : entre 190 et 700 nm.
- ✦ Une **interface** (TSP, Spectra System SN 4000) qui permet la communication entre le détecteur, le passeur d'échantillons et l'unité informatique.
- ✦ Un **ordinateur** composé d'une unité centrale PHILIPS[®], d'un écran PEACOCK[®], d'un clavier, d'une souris et d'une imprimante HP[®] Deskjet 660C. Il est piloté avec le logiciel PC 1000 (TSP). C'est un Pentium 233 MMX-32 MO fonctionnant sous OS/2.

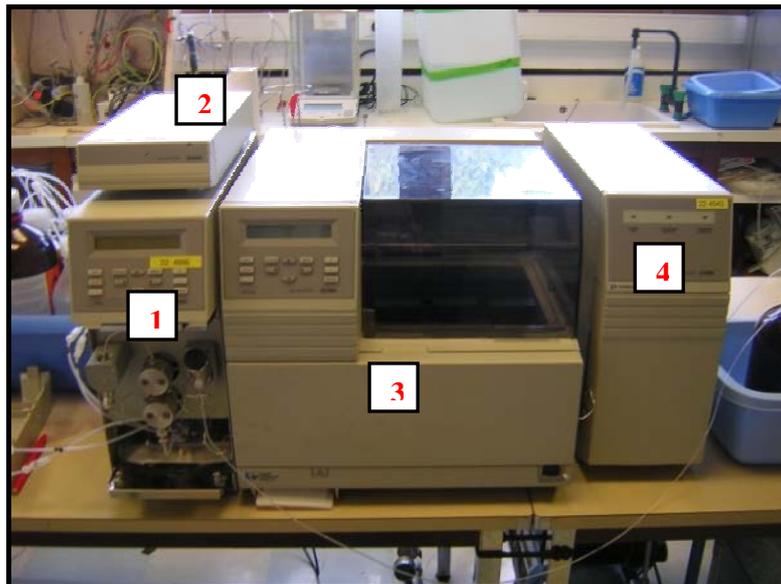


photo 4 : pompe (1) + interface (2) + échantillonneur (3) + détecteur (4)

V-2) Installation

J'ai proposé d'installer cet équipement sur une paillasse centrale pour circuler autour librement. En effet, il est plus aisé d'avoir accès à l'arrière des appareils pour effectuer tous les connexions et maintenir une surveillance régulière. De plus, les appareils sont équipés de ventilateur, il ne faut donc pas confiner l'arrière de l'appareillage mais laisser l'air se renouveler en permanence. La bouteille d'hélium ainsi que le moteur sont situés sous la paillasse.

Les différents éléments composant cette chaîne ont été désinstallés avant mon arrivée. J'ai dû procéder à une installation complète sans la moindre procédure. A l'avenir, afin de faciliter cette étape d'installation, j'ai proposé de rédiger un protocole illustré de nombreuses photos numériques pour visualiser les différentes connexions et les liaisons entre les structures de l'appareillage. C'est un document qui se révélera très utile quand l'appareillage devra déménager du laboratoire.

V-3) Mise en route

J'ai également rédigé un protocole pour la mise en route de l'HPLC, les opérations sont commandées depuis l'ordinateur :

- ✦ rinçage des aiguilles, des boucles d'injection et des seringues, purges des voies de solvants,
- ✦ préparation des échantillons,
- ✦ programmation des conditions opératoires : volume injecté, distance entre l'aiguille et le fond du vial pour les prélèvements, températures du plateau réfrigéré et de la colonne, longueurs d'ondes du détecteur, temps d'équilibre entre deux injections, viscosité de l'échantillon, etc.
- ✦ programmation des injections,
- ✦ suivi des chromatogrammes en direct,
- ✦ traitement des chromatogrammes,
- ✦ possibilité d'accès à une bibliothèque de spectre,
- ✦ rapport d'analyse.

Le système d'exploitation OS/2 n'est pas très convivial à l'utilisation et il est installé seulement sur l'ordinateur relié à la chaîne, ce qui empêche de travailler et de surveiller à distance.

De plus, on ne peut pas exporter les chromatogrammes sous un fichier WORD ou les valeurs sous un fichier EXCEL, cela limite les utilisations du logiciel pour rédiger des rapports d'analyse.

Enfin, ce système d'exploitation n'est pas compatible avec les ordinateurs portables du laboratoire, si l'unité centrale ne fonctionne plus normalement, toutes les données des campagnes seront perdues. C'est pourquoi, je sauvegarde les résultats très régulièrement sous un fichier EXCEL.

Le laboratoire de chimie marine espère s'équiper pour les prochaines années d'un nouveau logiciel beaucoup plus convivial qui serait installé en réseau sur les ordinateurs des utilisateurs de la chaîne.

VI) Première expérimentation : purification des pigments phytoplanctoniques

VI-1) Objectifs de la purification

L'objectif principal de cette purification est de se familiariser avec l'analyse de pigments sur la chaîne HPLC. Les standards et les échantillons sont très précieux de part leurs coûts et leurs unicités. Il me paraît donc indispensable de réaliser quelques essais pour s'entraîner et s'habituer au fonctionnement de l'appareillage.

De plus, cela permet d'isoler des pigments par une technique chromatographique séparative relativement simple et peu coûteuse.

VI-2) Bibliographie, choix de la méthode

Un protocole de purification des pigments phytoplanctoniques existe mais il n'est pas complet. J'ai donc effectué des recherches bibliographiques sur les colonnes « SEP-PACK ». Il existe différents types de colonne selon la nature de la phase stationnaire : phase inverse C8, C18... et phase normale : amino NH₂, cyano CN, diol...

J'ai choisi une colonne C18 car les colonnes chromatographiques utilisées sur la chaîne HPLC sont des colonnes dites « phase inverse », les pigments sont des composés plus ou moins polaires (structures chimiques ANNEXE 3 p. 46) qui ont donc plus ou moins d'affinités avec la phase stationnaire, elles traversent donc la colonne avec la phase mobile.

De plus, nous avons au laboratoire des colonnes «SEP-PACK» C18 prêtées par l'EPSHOM.

Aucune quantité de solvant n'est précisée dans le protocole. Lors de la première purification, j'ai donc utilisé les solvants grâce aux couleurs des différents pigments qui traversent la colonne transparente. Dès qu'un pigment sortait de la colonne, je modifiais la composition de la phase mobile.

Par la suite, j'ai apporté des précisions sur les quantités et des remarques pratiques au protocole de purification pour compléter et améliorer la procédure.

Notre choix s'est porté sur une algue supérieure brune **benthique** : «sargassum muticum» car elle contient plusieurs pigments. Pour cet essai, l'algue a été ramassée sur la plage de Lampaul-Plouarzel (photo 5).

C'est une algue endémique du Japon plus connue sous le nom de «sargasse géante». Cette algue a été trouvée pour la première fois en 1973 sur les côtes anglaises et en 1975 sur les côtes françaises. Depuis, elle s'est répandue partout de la Norvège à la Méditerranée. On la trouve jusqu'à 20 mètres de profondeur en des peuplements qui peuvent parfois être très denses. Elle est devenue la source de multiples nuisances écologiques. De par sa grande taille, elle recouvre la surface des eaux et asphyxie les autres algues voisines.



photo 5 : la sargasse dans son milieu naturel

VI-3) Mode opératoire

- ✦ Immerger l'algue pendant 10 secondes dans de l'eau bouillante contenant 1,5 % d'acétate d'ammonium, soit 15 g dans un litre d'eau bouillante (photo 6). Rapidement refroidissez la avec de la glace fondante ce qui contribue à l'élimination des enzymes (chlorophyllases) qui la contiennent.



photo 6 : sargasse dans l'eau bouillante

- ✦ Pour obtenir davantage d'informations et s'entraîner, nous avons filtré l'eau bouillante : 867 ml d'eau filtrée. Le papier filtre est placé au surcongélateur à -80°C en attente d'extraction et d'analyses HPLC.
- ✦ Presser l'algue avec du papier absorbant afin d'éliminer l'eau d'imbition.
- ✦ Broyer l'algue ainsi séchée à l'aide du mixeur électrique avec un peu d'acétone/eau à 90/10 (minimum de solvant pour que l'algue soit entièrement noyée). Attention d'utiliser de la verrerie adaptée pour l'utilisation de l'acétone. En effet, ce dernier solvant "attaque" le plastique du bol du mixeur ! (photo 7)



photo 7 : broyage de l'algue

- ✦ Maintenir l'ensemble à -5°C pendant deux heures (bain d'eau glacée avec du chlorure de sodium) (photo 8).



photo 8 : bain d'eau glacée

- ✦ Récupérer le produit liquide de ce mélange en filtrant le mélange à l'aide d'un entonnoir et d'un papier filtre.
- ✦ On obtient ainsi un filtrat vert foncé que l'on conserve dans le congélateur à -20°C .
- ✦ Conditionner la colonne «SEP-PACK C18» avec 50 ml de méthanol puis avec 50 ml d'eau distillée.

Remarque : la colonne ne doit jamais rester à vide pour ne pas sécher après le début du conditionnement. En effet, cela pourrait perturber les échanges entre la phase stationnaire, la phase mobile et les pigments.

- ✦ Une fois le conditionnement terminé, verser dans la colonne «SEP-PACK» 2 ml du filtrat, inutile d'en déposer plus car la séparation des pigments phytoplanctoniques contenus dans l'algue en sera d'autant plus difficile. Veillez à ne pas bouger la colonne durant la manipulation pour ne pas bouleverser les échanges éluant/phase stationnaire/pigment.
- ✦ Premièrement, verser un mélange de méthanol/eau à 50/50 (≈ 20 ml) puis à 60/40 (≈ 20 ml) et enfin à 70/30 (≈ 20 ml), vous obtiendrez de la chlorophyllide A qui est un pigment de couleur bleu-vert. Lors de l'extraction, je n'ai pas observé de coloration, la chlorophyllide A n'est pas présente ou alors elle se trouve en très faible concentration.
- ✦ Deuxièmement, verser un mélange de méthanol/eau à 80/20 (≈ 170 ml), vous obtiendrez de la chlorophylle C2 qui est un pigment vert émeraude (photo 9).

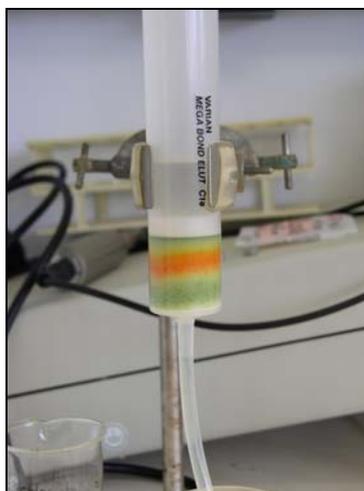


photo 9 : chlorophylle C2 en sortie de colonne

- ✚ Troisièmement, verser du méthanol pur (≈ 50 ml), vous obtiendrez de la **fucoxanthine qui est orange** (photo 10).

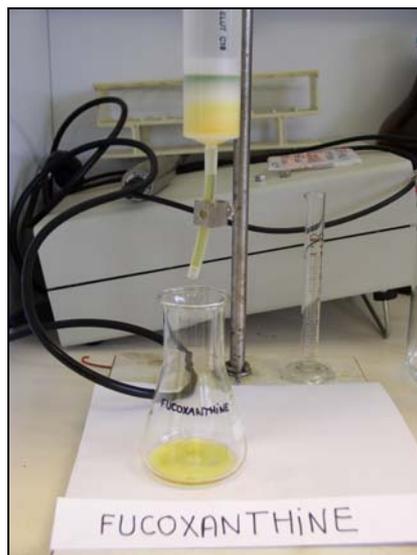


photo 10 : fucoxanthine en sortie de colonne

- ✚ Dernièrement, verser un mélange de méthanol/acétone à 60/40 (≈ 50 ml), vous obtiendrez de la **chlorophylle A qui est un pigment de couleur bleu-vert** (photo 11).

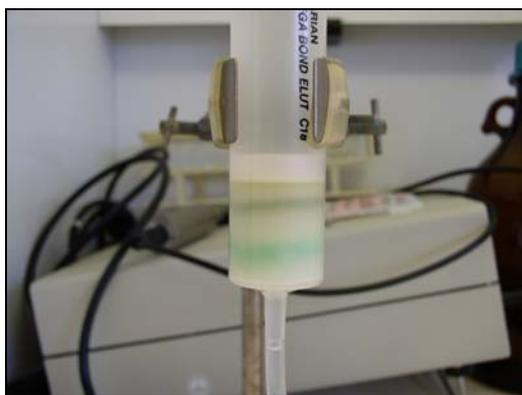


photo 11 : chlorophylle A en sortie de colonne

Pour minimiser les quantités de solvants et d'hélium et gagner du temps lors de l'extraction, il est judicieux de récupérer les solutions de la colonne que lorsqu'elles sont colorées. Le nettoyage de la colonne s'effectue avec de l'acétone pure jusqu'à ce que la phase stationnaire retrouve sa couleur blanche d'origine.

Extraction des pigments phytoplanctoniques

Celle-ci se fait en ajoutant à chaque solution récupérée du chloroforme et de l'eau distillée.

Soient les notations suivantes :

- V_1 = chlorophylle C2 + méthanol + eau
- V_2 (chloroforme) = $0,9 V_1$
- V_3 (eau) = $0,1 V_1$

- ✦ Ajouter V2 et V3 à V1 dans une ampoule à décanter, agiter et dégazer (photo 12).

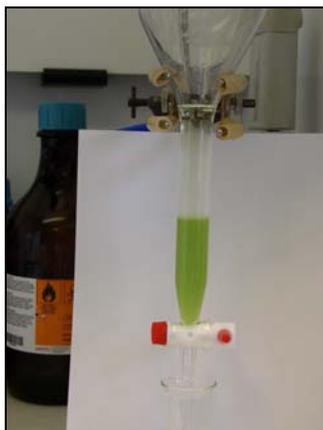


photo 12 : ampoule à décanter

- ✦ Attendre la séparation des deux solutions qui se forment : dans la partie inférieure la solution chlorée, la plus lourde contenant le pigment et au-dessus, la solution aqueuse contenant le(s) solvant(s).
- ✦ Récupérer la solution inférieure, elle contient donc le chloroforme et le pigment.
- ✦ Extraire le pigment par un fin filet d'hélium (photo 13). Cette dernière opération est d'autant plus longue, que le volume V2 est important. Pour l'accélérer, on peut placer un bain-marie d'eau chaude pour faciliter l'évaporation du chloroforme.



photo 13 : extraction par l'hélium

- ✦ Lorsqu'il ne reste que quelques ml, transvaser le volume dans un petit tube en verre taré pour récolter le pigment concentré.
- ✦ Peser, identifier (photo 14) et placer le tube à -20°C .



photo 14 : tube en verre contenant le pigment : fucoxanthine

- ✦ Faire de même pour les autres pigments phytoplanctoniques récupérés après le passage des différents solvants, sachant qu'après l'extraction du chloroforme par de l'hélium, les différents solvants à mélanger aux différents pigments phytoplanctoniques concentrés, sont les suivants :
- chlorophyllide A : acétone/eau à 90/10,
- chlorophylle C2 : acétone/eau à 90/10,
- fucoxanthine : méthanol,
- chlorophylle A : acétone/eau à 90/10.

Concentration de la solution filtrat

- ✦ L'acétone contenue dans le filtrat est facilement évaporée par un dégazage à l'hélium.
 - ✦ Il s'agit maintenant d'éliminer le plus possible l'eau présente dans le filtrat pour concentrer la solution et déposer plus de pigments sur la colonne.
- Remarque** : pour avoir moins de solvant, il aurait peut être fallu broyer l'algue à sec, sans solvant, et ensuite ajouter le minimum de solution acétone/eau pour noyer l'algue broyée.
- ✦ Comme précédemment, conditionner la colonne «SEP-PACK» avec du méthanol (50 ml) puis de l'eau distillée (50 ml).
 - ✦ Déposer le filtrat sur la colonne : en théorie les pigments ne sont pas élués car il n'y a pas d'ajout de phase mobile, seule l'eau devrait traverser la colonne. Cependant le filtrat contient encore un peu d'acétone donc les pigments sont un peu élués et une solution orangée est récupérée et conditionnée au réfrigérateur à 4°C (photo 15).
 - ✦ Une fois le filtrat élué, récupérer les pigments en nettoyant la colonne avec le minimum d'acétone pure.
 - ✦ Evaporer quelques ml d'acétone avec un filet d'hélium de manière à réduire encore le volume de la solution. Dans notre cas, nous obtenons finalement 10 à 13 ml de solution verte foncée concentrée en pigments.

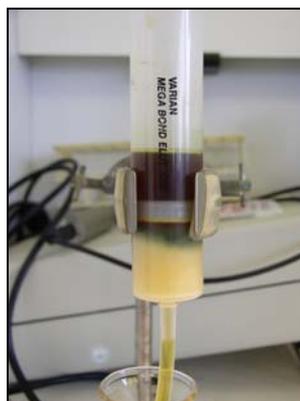


photo 15 : dépôt du filtrat sur la colonne

Deuxième colonne «SEP-PAK»

- ✦ Dépôt de 4 ml du mélange : on double la quantité par rapport à la première purification. Le reste est placé au congélateur.
- ✦ Les solvants d'éluion sont identiques à la première fois :

- mélange méthanol/eau à 50/50 : 20 ml
- mélange méthanol/eau à 60/40 : 20 ml
- mélange méthanol/eau à 70/30 : 20 ml

Les quantités utilisées sont inférieures, ce qui est normal car le dépôt contient moins de solvants, les pigments sont donc moins dilués et ils éluent plus rapidement. La concentration du filtrat est donc une bonne opération, c'est plus rapide et plus économique en consommation de solvants.

De plus, nous obtenons de la chlorophyllide A cette fois-ci en plus des trois autres pigments. De la même façon, les pigments sont extraits par le chloroforme, dilués dans leurs solvants respectifs et conservés au congélateur (photo 16).



photo 16 : de gauche à droite, les pigments : chlorophyllide A, chlorophylle C2, chlorophylle A et fucoxanthine

La balance du laboratoire n'est pas assez précise pour qu'il soit possible de connaître la concentration exacte des échantillons.

Cependant pour s'entraîner nous injectons ces échantillons sur la colonne HPLC selon la méthode WRIGHT à différentes concentrations, il s'agit d'injecter en réalité des quantités croissantes de pigments (10, 50 et 100 μ l).

Voici un exemple d'étalonnage de la fucoxanthine réalisé sous EXCEL (figure 1) : aire du pic en fonction de la quantité injectée (10, 50 et 100 μ l).

La transcanthaxanthine est un pigment qui nous sert de repère ici, la quantité injectée est toujours la même (35 μ l).

La chlorophyllide A n'est pas assez concentrée et ne montre pas de pic significatif même pour la plus grande quantité injectée.

Droite d'étalonnage de la fucoxanthine

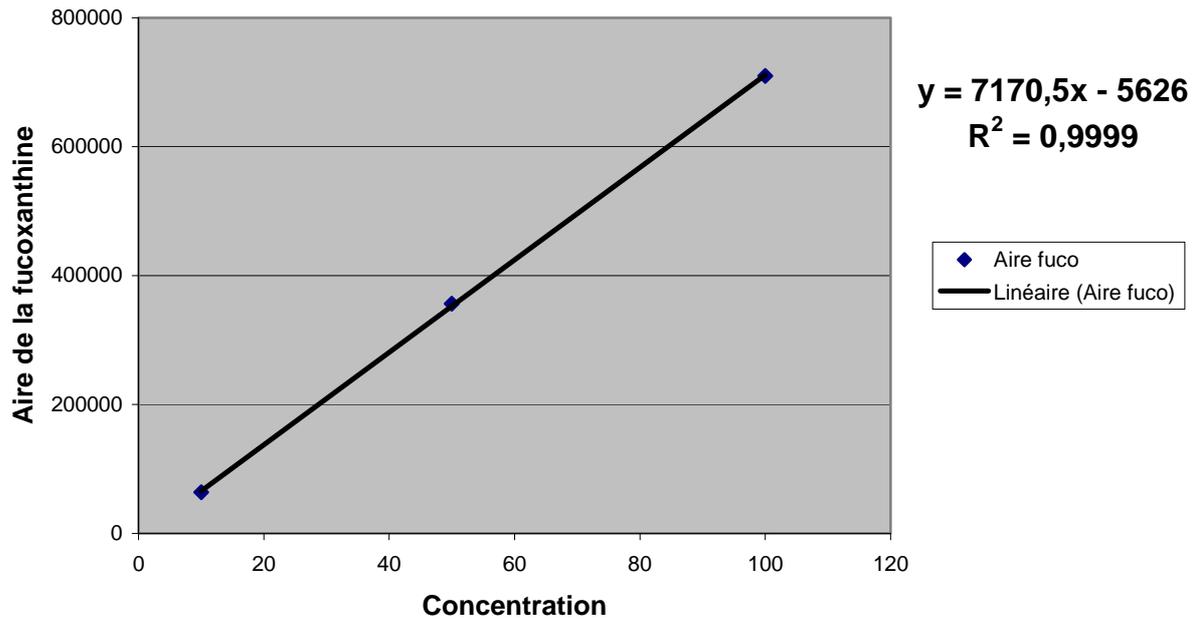


figure 1 : courbe d'étalonnage de la fucoxanthine

VI-4) Résultats

La purification des pigments phytoplanctoniques de la sargasse donne globalement de bons résultats puisque nous avons isolé trois pigments : la fucoxanthine, la chlorophylle A et la chlorophylle C2. Après leur passage en HPLC, ils se sont révélés quasiment purs et de bonne qualité. Cela m'a permis de me familiariser avec l'analyse des pigments sur la chaîne et cet entraînement était très utile étant donné la préciosité des standards de pigments et des échantillons.

VII) Mesure des pigments

VII-1) Bibliographie

La méthode d'identification et de quantification des pigments développée au laboratoire de chimie marine est fortement inspirée des travaux de S.W.WRIGHT, S.W.JEFFREY, R.F.C.MANTOURA, *et al* dans *Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Marine Ecology Progress Series*.

L'inconvénient majeur de ces travaux reste qu'il est impossible de séparer la mono-chlorophylle A de la divinyle-chlorophylle A, ainsi que la zéaxanthine de la transcanthaxanthine.

La divinyle-chlorophylle A est le pigment caractéristique du groupe phytoplanctonique des prochlorophytes, présents en milieu tropical et la zéaxanthine est le pigment marqueur des cyanobactéries.

La méthode de WRIGHT ne sépare pas non plus les chlorophylles C1 et C2, la 19'-butanoyloxyfucoxanthine et la siphonaxanthine ainsi que la 19'-hexanoylfucoxanthine et la 9'-cis-neoxanthine. Cependant elle sépare correctement les chlorophylles A et B.

Les pigments siphonaxanthine et 9'-cis-neoxanthine ne nous intéressent pas particulièrement dans notre étude car ils ne sont pas caractéristiques d'une espèce de phytoplanctons et ne sont que très rarement présents en zone tropicale. Par contre la 19'-butanoyloxyfucoxanthine est le pigment marqueur du groupe phytoplanctonique des chrysophytes et la 19'-hexanoylfucoxanthine du groupe des prymnésiophytes.

Cette méthode nous permet de séparer et d'identifier les pigments suivants dans l'ordre d'élution en sortie de colonne :

- ⊕ la chlorophylle C3,
- ⊕ les chlorophylles C1 et C2,
- ⊕ la 19'-butanoyloxyfucoxanthine,
- ⊕ la fucoxanthine,
- ⊕ la 19'-hexanoylfucoxanthine,
- ⊕ la chlorophylle B,
- ⊕ la chlorophylle A (mélange de mono et de divinyle-chlorophylle A),
- ⊕ le beta-carotène.

La méthode inspirée des travaux de R.G.BARLOW, D.G.CUMMINGS, S.W.GIBB dans *Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls a and b and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC* nous permet de séparer les deux formes de chlorophylle A ainsi que la zéaxanthine de la transcanthaxanthine.

Il n'est pas envisageable d'utiliser seulement la deuxième méthode pour nos analyses car elle ne sépare pas correctement tous les pigments chlorophylliens et caroténoïdes.

VII-2) Méthode de WRIGHT

VII-2-a) Conditions opératoires

Le traitement des échantillons est réalisé par le passeur automatique, ce qui assure une grande reproductibilité dans les volumes prélevés et injectés.

A 500 µl de l'extrait sont ajoutés 35 µl de transcanthaxanthine et 165 µl de solution P.

La transcanthaxanthine est un pigment absent des échantillons. En effet, c'est un carotène peu rencontré dans le milieu océanique et il est ajouté en quantité connue à l'extrait (35 µl). Il nous sert ici de repère et d'indicateur pour savoir si l'injection s'est bien réalisée. Son temps de rétention est proche de celui de la zéaxanthine.

La solution P est un tampon : 7,7 g d'acétate d'ammonium pour 100 ml d'eau distillée + 1,5 g d'acétate de tétrabutylammonium dans le tampon.

Elle permet d'éviter la formation des formes ioniques pour les molécules les plus polaires et ainsi de ne pas voir apparaître deux pics pour un même composé (la forme ionique et la forme organique).

Après une homogénéisation de 15 s par agitation, 100 µl sont injectés sur la colonne chromatographique dont voici les conditions d'analyse :

- ⊕ colonne C18 EQUISORB ODS2, 150 * 4,6 mm, 3µm, maintenue à 30°C.
- ⊕ débit : 1 ml/min.
- ⊕ gradient :

temps en min	solvant A en %	solvant B en %	solvant C en %
0	100	0	0
4	0	100	0
18	0	20	80
20	0	100	0
22	100	0	0
25	100	0	0

solvant A : méthanol / acétate d'ammonium 0,5M (80/20).

solvant B : acétonitrile / eau (90/10).

solvant C : acétate d'éthyle.

- ⊕ détection à 440 nm.

Voici un exemple de chromatogramme obtenu par la méthode WRIGHT. Il s'agit d'un échantillon de la campagne ECOTEM 6 : F06-05 (figure 2).

Les pigments présents sont par ordre croissant des temps de rétention (Tr) :

- les chlorophylles C3, C1 et C2 (Tr = 5,33 et 5,93 min),
- la 19'-butanoylfucoxanthine (Tr = 7,76 min),
- la 19'-hexanoylfucoxanthine (Tr = 8,83 min),
- les chlorophylles B et A (Tr = 13,67 et 14,71 min),
- le beta-carotène (Tr = 16,94 min),

et à Tr = 12,86 min le pic repère de la transcanthaxanthine.

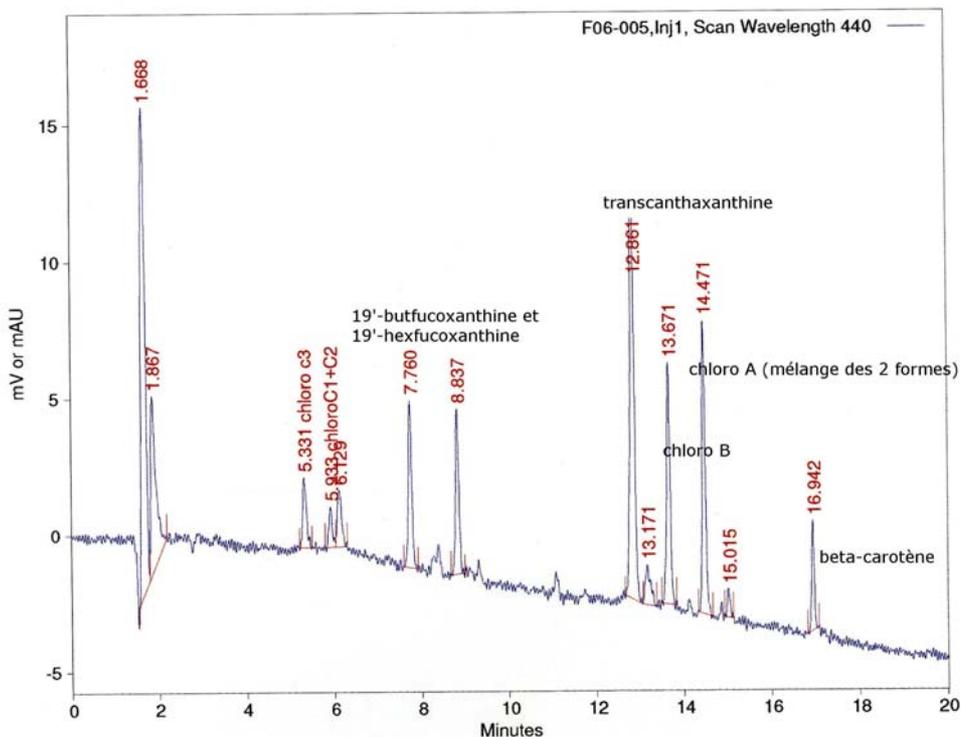


figure 2 : chromatogramme de l'échantillon F06-05 sous WRIGHT

VII-3) Méthode de BARLOW

VII-3-a) Conditions opératoires

Cette méthode plus sélective que la précédente nous permet de séparer la mono-chlorophylle A de la divinyle-chlorophylle A qui sont les deux formes de la chlorophylle A. Cette séparation n'étant pas possible avec la méthode WRIGHT. La zéaxanthine et la transcanthaxanthine sont également séparés.

Les méthodes qui suivent ne font plus intervenir de solution P dans les analyses comme dans la méthode WRIGHT. Elle est alors remplacée par du méthanol pur. Voici les nouvelles conditions d'analyse :

- ⊕ colonne C8 EQUISIL MOS-2, 100 * 4,6 mm, 3 µm, 120 Å et maintenue à 30°C.
- ⊕ débit : 1 ml/min.
- ⊕ gradient :

temps en min	solvant A en %	solvant B en %
0	75	25
1	50	50
20	30	70
25	0	100
32	0	100
39	75	25

solvant A : méthanol/acétate d'ammonium 1M (70/30).

solvant B : méthanol 100 %.

- ⊕ détection à 440 nm.

Voici le chromatogramme d'un blanc utilisant cette méthode (figure 3). Le résultat n'est pas celui escompté car le pic de transcanthaxanthine qui nous sert de repère n'est pas satisfaisant, il est large et donne l'impression de la présence de plusieurs produits et/ou d'impuretés.

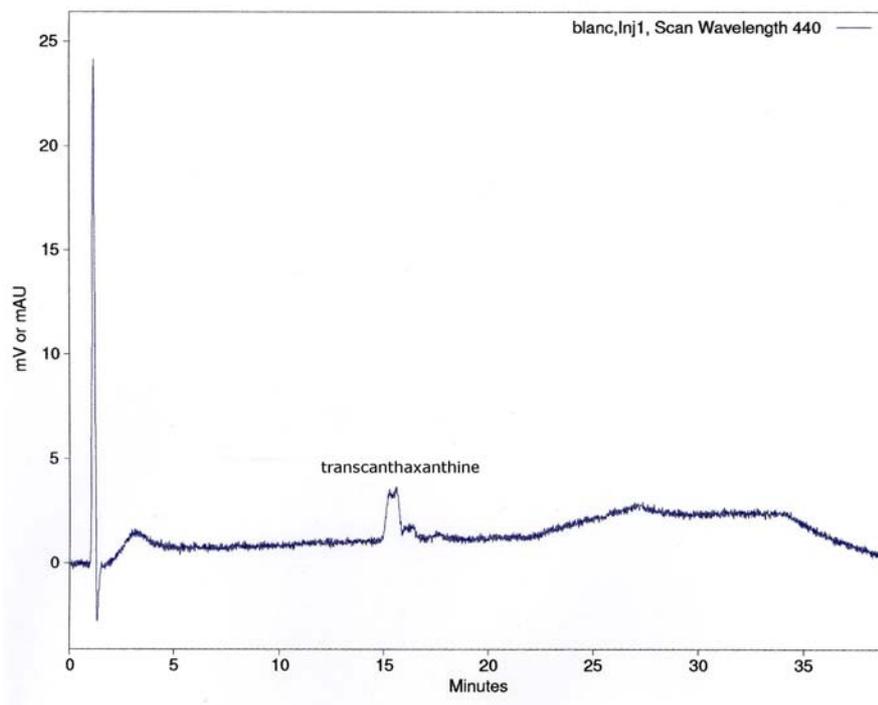


figure 3 : chromatogramme d'un blanc

J'ai donc procédé à d'autres manipulations et essais pour obtenir un pic avec une meilleure résolution :

- ⊕ Changement de gradient pour affiner le pic car le produit injecté donne l'impression de traîner dans la colonne, il s'étale → pas de meilleur résultat. Il s'agissait en fait de réduire le temps de l'analyse de quelques minutes (d'une durée d'analyse de 39 minutes, on passe à 30 minutes), la composition en solvants A et B restant identique.

temps en min	solvant A en %	solvant B en %
0	75	25
1	50	50
14	30	70
19	0	100
25	0	100
30	75	25

- ⊕ Modification de la composition de la solution A : méthanol/acétate d'ammonium 1M (60/40) toutes conditions opératoires égales par ailleurs.
- ⊕ Et préparation d'une nouvelle solution fraîche de transcanthaxanthine, il se peut que la solution se soit dégradée → le pic s'affine un peu mais il y a toujours la présence d'un petit pic accolé au pic majoritaire (figure 4).

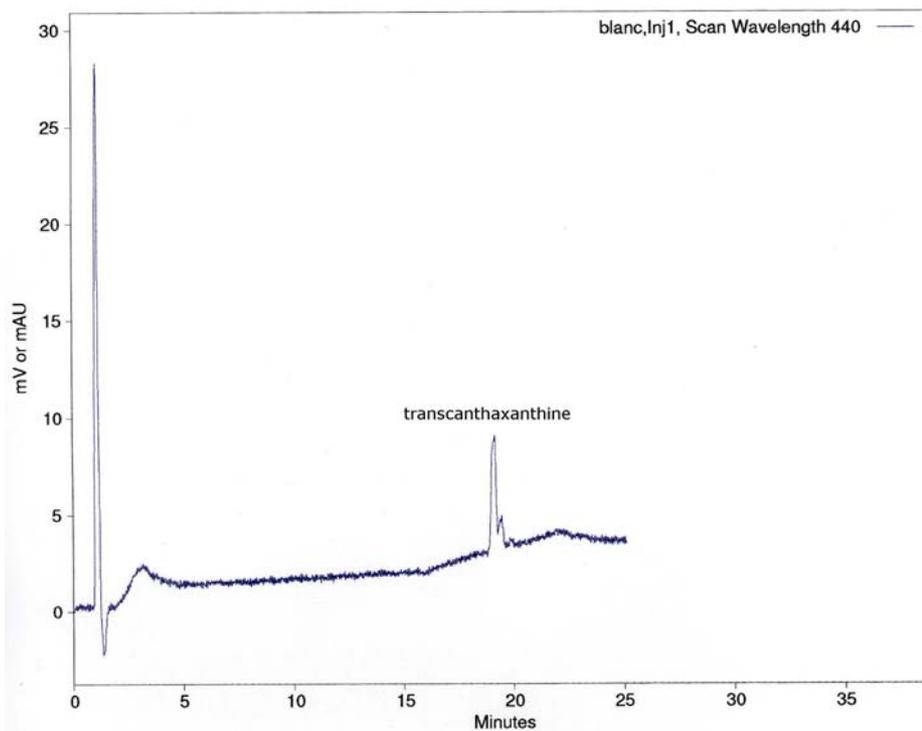


figure 4 : chromatogramme d'un blanc

- ⊕ Réintroduction de la solution P à la préparation de l'échantillon, elle joue peut être un rôle dans le dédoublement du pic de la transcanthaxanthine → pas de meilleur résultat.
- ⊕ Retour aux conditions initiales du gradient et remplacement du solvant méthanol par un mélange acétone/eau pour la préparation de l'échantillon car la méthode d'extraction de la publication utilise ce solvant et les essais réalisés en 2003 étaient à base de ce mélange → pas de meilleur résultat (figure 5).

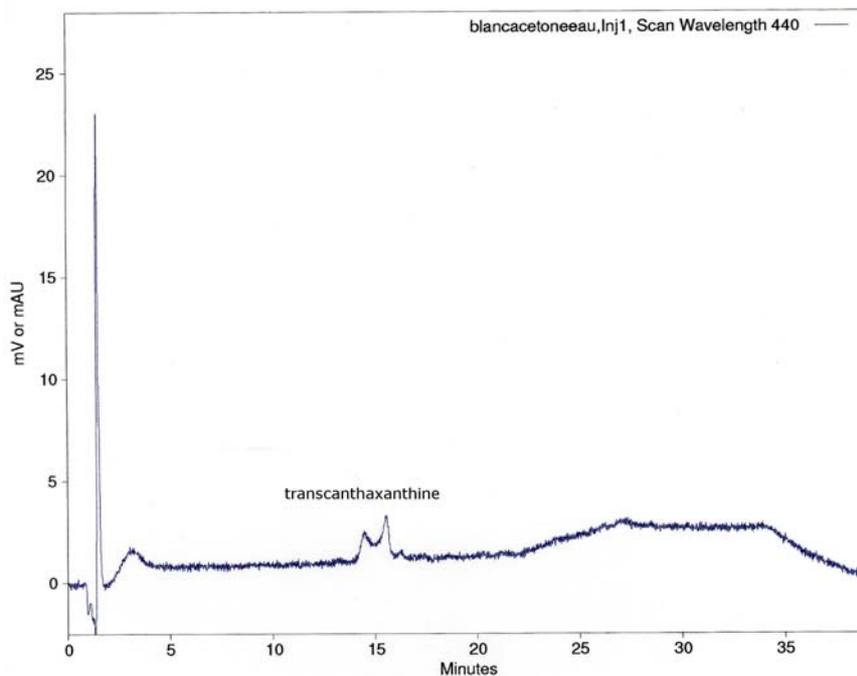


figure 5 : chromatogramme d'un blanc

- ⊕ Modification de la température du four de colonne de 30°C à 60°C. Une augmentation de la température de la colonne rend les solvants moins visqueux et une diminution de la viscosité de la phase mobile provoque une baisse des temps de rétention. Le temps de rétention de la transcanthaxanthine est inférieur, ce qui est normal mais la résolution du pic n'est toujours pas acceptable → pas de meilleur résultat.
- ⊕ Préparation d'une nouvelle solution d'acétate d'ammonium 1M, ce dernier produit étant très hygroscopique, la quantité pesée n'est peut être pas exactement celle désirée et donc la composition en sels de la solution mobile est modifiée → pas de meilleur résultat.
- ⊕ Injection d'un mélange des deux formes de chlorophylle A : la mono-chlorophylle A et la divinyle-chlorophylle A. On observe sur le chromatogramme le pic de la transcanthaxanthine et un autre pic qui nous indique que les deux formes de chlorophylle ont le même temps de rétention (figure 6). Ce résultat n'est pas satisfaisant car le but final est de séparer les deux formes de chlorophylle A.

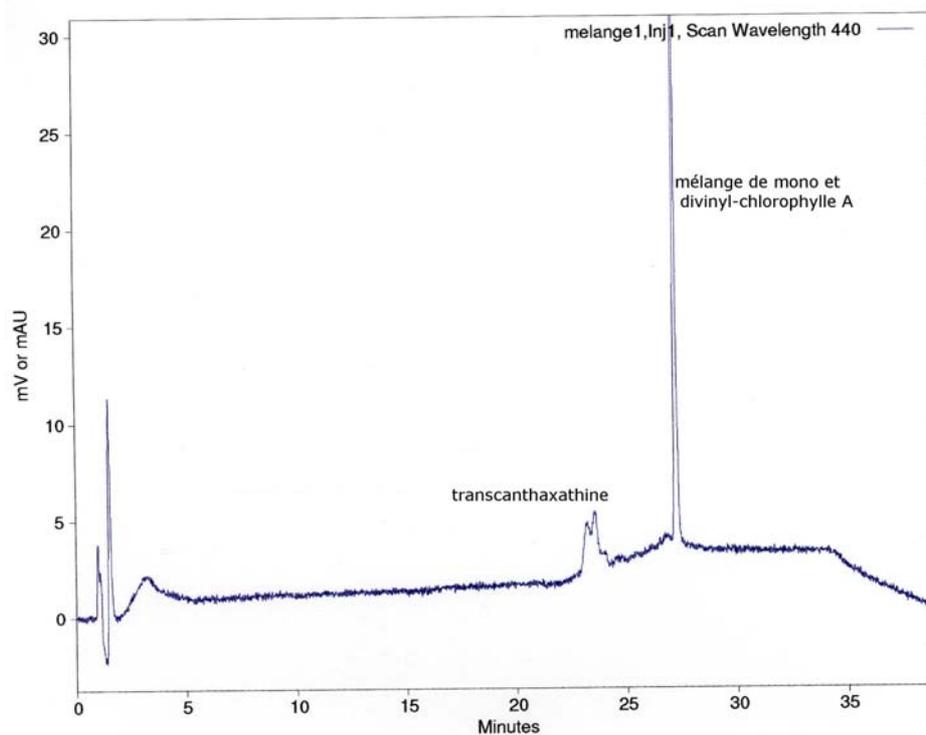


figure 6 : chromatogramme d'un mélange des deux formes de chlorophylle A

CONCLUSION : après plusieurs modifications et changements, on en conclut que la colonne est usagée et ne donne pas les résultats escomptés.

VII-3-b) Optimisation de la méthode

Une autre colonne phase inverse C8 est disponible au laboratoire, elle est plus longue.

- ⊕ colonne C8 SATISFACTION PLUS, 150 * 4,6 mm, 3 µm et maintenue à 30°C.
- ⊕ débit : 1 ml/min.
- ⊕ transposition du même gradient :

temps en min	solvant A en %	solvant B en %
0	75	25
1	50	50
20	30	70
25	0	100
32	0	100
39	75	25

solvant A : méthanol / acétate d'ammonium 1M (70/30).

solvant B : méthanol 100 %.

- ⊕ détection à 440 nm.

Voici le chromatogramme d'un blanc utilisant cette méthode (figure 7). Il y a toujours un léger dédoublement du pic dû à la transcanthaxanthine qui n'est pas visible avec la méthode WRIGHT car cette première méthode est moins sensible.

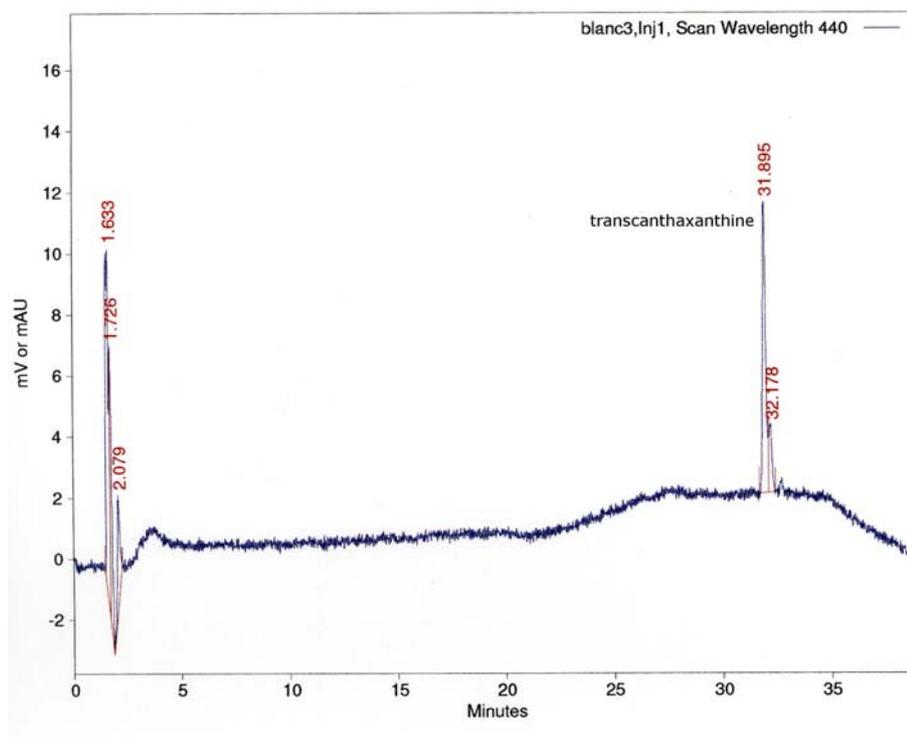


figure 7 : chromatogramme d'un blanc

Mais ce temps d'analyse ne permet pas la sortie des deux formes de chlorophylle A. En effet lors d'une injection du mélange de chlorophylle A, les pics caractéristiques des deux formes de chlorophylle A ne sont pas visibles. Les composés n'ont pas le temps nécessaire pour sortir de la colonne. Il faut augmenter le plateau à 100 % de méthanol de quelques minutes. La phase isocratique de méthanol débute toujours à t = 25 min mais se poursuit jusqu'à t = 40 min, soient huit minutes de plus que le précédent gradient.

Voici le nouveau gradient utilisé en gardant la même composition des solvants A et B :

temps en min	solvant A en %	solvant B en %
0	75	25
1	50	50
20	30	70
25	0	100
40	0	100
45	75	25
50	75	25

Les essais sont concluants puisque les deux formes de chlorophylle A sont maintenant appréciables sur le chromatogramme avec des temps de rétention très proches. Il faut donc être très vigilant quant à l'interprétation des chromatogrammes dont voici celui de l'échantillon F06-05 (figure 8).

La zéaxanthine sort à $Tr = 28,58$ min, la divinyle-chlorophylle A à $Tr = 38,40$ min et la mono-chlorophylle A à $Tr = 38,89$ min.

Le pic père de le transcanthaxanthine se situe à $Tr = 31,56$ min.

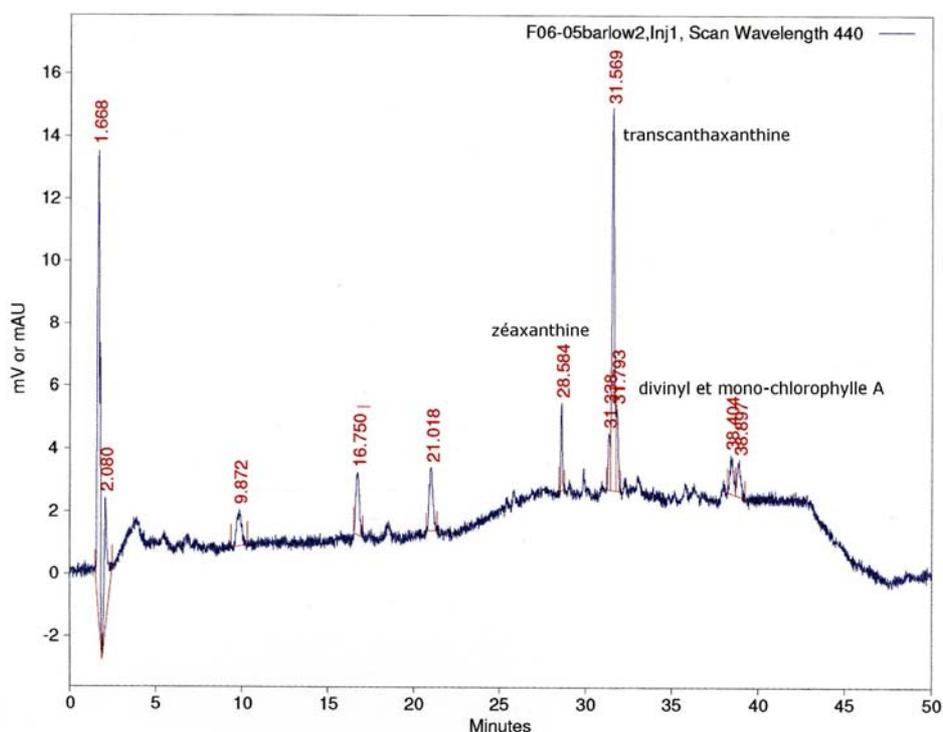


figure 8 : chromatogramme de l'échantillon F06-05 sous BARLOW

L'identification est réalisée par comparaison des temps de rétentions entre les pics de l'échantillon et le temps de rétention de pigments préalablement identifiés à partir de standards.

Pour un certain nombre d'échantillons et de pigments, cette identification est confirmée par la comparaison des spectres d'absorption à 440 nm. Cette procédure utilise une librairie spectrale enregistrée dans l'ordinateur de la chaîne (spectres UV ANNEXE 5 p. 48).

VIII) Calibration de l'appareillage

VIII-1) Standards de pigments

Douze standards de pigments achetés à DHI Water and Environment[®], à Horsholm au Danemark servent pour la calibration des mesures.

Les standards sont conditionnés dans des vials qui contiennent 2,5 ml de solution et un certificat d'analyse est fourni pour chaque standard.

La transcanthaxanthine, quant à elle provient du laboratoire de l'EPSHOM, elle est conditionnée dans une fiole d'un litre dans de l'acétone et conservée au réfrigérateur à 4°C. La poudre du pigment provient du fournisseur Extrasynthèse[®].

Afin de déterminer le coefficient de réponse de chacun des pigments à doser, nous injectons trois étalons de basse concentration, trois étalons de moyenne concentration et trois étalons de haute concentration, auxquels nous ajoutons une quantité connue de transcanthaxanthine. Cela suppose de posséder le pigment parfaitement pur ou d'en connaître sa pureté.

Chaque pigment est injecté trois fois à trois concentrations différentes :

- ⊕ basse concentration : 10 µl de standard dans 490 µl de méthanol
- ⊕ moyenne concentration : 50 µl de standard dans 450 µl de méthanol
- ⊕ haute concentration : 100 µl de standard dans 400 µl de méthanol

Ces standards sont tout d'abord injectés sur la colonne C18 selon les conditions chromatographiques de WRIGHT.

Voici les pigments purs, leurs concentrations, leurs temps de rétention moyens et les écarts types obtenus :

chlorophylle C3 (0,636 mg/l)	Tr = 5,43 min ($\sigma = 0,014$)
chlorophylle C2 (0,582 mg/l)	Tr = 6,27 min ($\sigma = 0,036$)
péridinine (0,984 mg/l)	Tr = 7,33 min ($\sigma = 0,047$)
19'-butanoylfucoxanthine (0,977 mg/l)	Tr = 7,86 min ($\sigma = 0,080$)
fucoxanthine (1,438 mg/l)	Tr = 8,48 min ($\sigma = 0,064$)
19'-hexanoylfucoxanthine (0,922 mg/l)	Tr = 8,94 min ($\sigma = 0,050$)
lutéine (1,333 mg/l)	Tr = 12,72 min ($\sigma = 0,035$)
transcanthaxanthine	Tr = 12,90 min ($\sigma = 0,056$)
chlorophylle B (1,113 mg/l)	Tr = 13,60 min ($\sigma = 0,045$)
beta-carotène (1,110 mg/l)	Tr = 17,03 min ($\sigma = 0,055$)

Un pigment : la zéaxanthine coélue avec la transcanthaxanthine. En effet, sur le chromatogramme, un seul pic est visible. Les deux pigments ont le même temps de rétention (figure 9). La zéaxanthine devra donc être détectée et quantifiée selon la méthode de BARLOW avec la colonne C8.

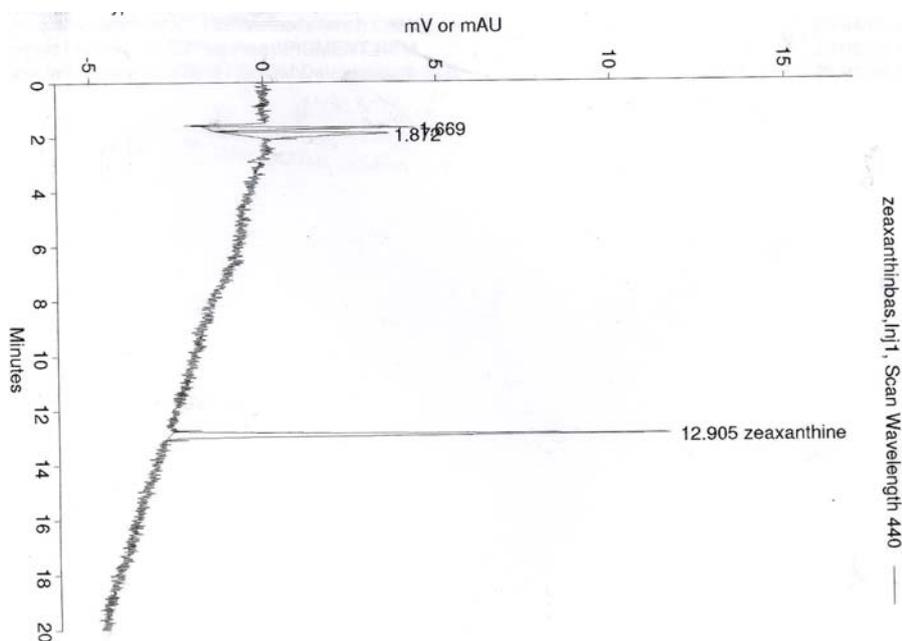


figure 9 : chromatogramme d'étalonnage de la zéaxanthine

Puis dans un second temps, les standards de mono-chlorophylle A, de divinyle-chlorophylle A et de zéaxanthine sont injectés sur la colonne C8 selon la méthode de BARLOW de la même façon que pour les autres standards :

zéaxanthine (0,768 mg/l) $Tr = 28,68 \text{ min } (\sigma = 0,034)$

transcanthaxanthine $Tr = 31,56 \text{ min } (\sigma = 0,094)$

divinyle-chlorophylle A (1,115 mg/l) $Tr = 38,13 \text{ min } (\sigma = 0,026)$

mono-chlorophylle A (1,277 mg/l) $Tr = 38,86 \text{ min } (\sigma = 0,065)$

VIII-2) Calcul des facteurs de réponse et des concentrations

La quantification des différents pigments est réalisée à partir des facteurs de réponse qui ont été établis par l'injection de quantités connues de standards de pigments.

Prenons le cas de la divinyle-chlorophylle A. Les concentrations croissantes des étalons sont les suivantes : 0,0233 mg/l ; 0,1115 mg/l et 0,233 mg/l.

La concentration initiale du pigment de la divinyle-chlorophylle A fourni par DHI® étant de 1,115 mg/l.

Sur un graphe (figure 10) sont tracées les aires des pics en fonction des concentrations du pigment.

Droite d'étalonnage de la divinyle-chlorophylle A

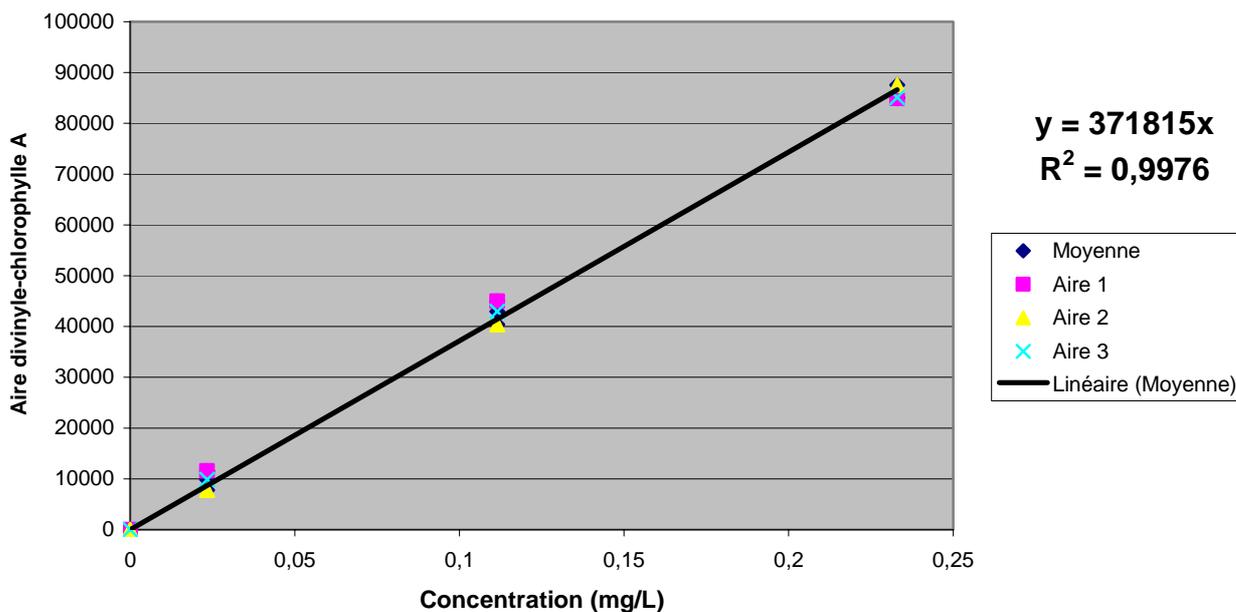


figure 10 : droite d'étalonnage de la divinyle-chlorophylle A

La pente de cette droite d'étalonnage indique le coefficient de réponse de la divinyle-chlorophylle A, ici on obtient 371815.

Lors d'une injection d'un échantillon, l'aire du pic de la divinyle-chlorophylle A est calculée grâce au logiciel d'acquisition des données.

Voici ensuite le calcul détaillé réalisé sous EXCEL pour obtenir la concentration réelle de pigments :

$$\text{Concentration en } \mu\text{g/l} = \text{Aire du pic} * (1/371815) * (2/1000) * (1000/\text{volume filtré}) * 1000$$

Explications : (2/1000) : l'extraction se réalise dans 2 ml de méthanol.

(1000/volume filtré) : quantité d'eau de mer filtrée en ml.

1000 : conversion (mg en μg).

VIII-3) Perspectives à la calibration

C'est la première fois que le laboratoire est confronté à la calibration de la chaîne. J'ai donc effectué une recherche d'éventuels fournisseurs de pigments pour comparer le prix, le conditionnement et le choix des pigments proposés. Seul le fournisseur DHI[®] propose des standards de pigments purs conditionnés dans un solvant à une concentration donnée.

Le prix des standards achetés chez DHI[®] est relativement élevé, en moyenne 130 € le vial de 2,5 ml, nous avons donc procédé à l'achat de pigments sous forme de poudre pour préparer nous même des solutions pures de pigment à un coût beaucoup plus intéressant, par exemple un mg de chlorophylle B vaut environ 75 €.

Cela permettra d'avoir des quantités plus importantes de standards de pigment pour réaliser des essais lors de nouvelle validation de méthode mais aussi pour recalibrer la chaîne si nécessaire. En effet grâce à la droite d'étalonnage de chaque pigment, en connaissant l'air d'un pic, je peux remonter facilement à sa concentration exacte. Le laboratoire ne possédant pas de balance répondant à une démarche qualité satisfaisante, c'est un moyen relativement simple d'obtenir la concentration d'une solution pure de pigment.

Cependant tous les pigments étudiés ne sont pas commercialisés sous forme de poudre. Nous avons commandé de la lutéine et de la zéaxanthine chez le fournisseur Extrasynthèse[®] et du beta-carotène, de la chlorophylle A et B chez Sigma Aldrich[®].

IX) Problèmes rencontrés, solutions et idées d'amélioration

IX-1) Problèmes d'identification des pigments

- ✦ De la première à la dernière injection d'échantillons d'une même campagne, il y a parfois un léger décalage dans les temps de rétention. Cela traduit une petite dégradation de la colonne, la phase stationnaire n'a plus exactement les mêmes interactions avec la phase mobile et/ou les solutés. Il faut donc être très vigilant dans l'interprétation des chromatogrammes et pour confirmer l'identification d'un pic, il est toujours possible d'utiliser la librairie spectrale et l'analyse UV.
- ✦ La divinyle-chlorophylle A et la mono-chlorophylle A ont des temps de rétention très proches. Lorsque ces deux pigments sont présents dans un échantillon, le chromatogramme ne présente pas de difficultés : le premier pic correspond à la divinyle-chlorophylle A et le second à la mono-chlorophylle A. Quand seulement un des deux pigments est présent, il est parfois délicat d'affirmer un résultat sachant qu'un léger décalage du temps de rétention est possible. Dans ce cas, la superposition du chromatogramme en question avec celui de l'injection précédente où les deux pigments sont présents permet de conclure.
- ✦ Dans la méthode BARLOW, la lutéine et la zéaxanthine coéluent. La détection de la lutéine est possible grâce à la méthode WRIGHT mais ce pigment est quasiment absent des échantillons et selon une étude bibliographique, en zone oligotrophe, seule la zéaxanthine est présente majoritairement. En première approximation, on peut donc considérer que nos échantillons ne contiennent pas de lutéine.
- ✦ Les échantillons de la campagne ECOTEM 5 ont été extraits selon une méthode différente de celle des quatre autres campagnes et il ne reste malheureusement parfois pas assez de solution dans les vials pour permettre la seconde injection selon la méthode BARLOW. J'ai fait des essais en abaissant l'aiguille lors du prélèvement mais cela n'est pas suffisant pour permettre une bonne préparation de l'échantillon. De plus en diminuant trop la hauteur entre le fond du vial et l'aiguille, le risque de tordre et d'endommager l'aiguille est plus important.

IX-2) Problèmes techniques rencontrés sur la chaîne HPLC

- ✦ Montée en pression de la colonne et dépassement de la pression critique qui est de 4000 PSI (Pound per Square Inch, livre par pouce carré, il s'agit d'une unité anglo-saxonne et $1 \text{ PSI} = 6894 \text{ Pa} = 0,06894 \text{ bar}$). La chaîne se met en sécurité. J'ai donc proposé de changer les férules aux extrémités de la colonne. Elles assurent la connexion entre la colonne et le tubing, elles étaient usées et donc n'assuraient plus l'étanchéité.
- ✦ La précolonne était montée à l'envers. Sur les colonnes et les précolonnes, il y a une flèche qui indique le sens de circulation de la phase mobile. Lors de l'installation de la colonne, j'ai pu remarquer que la précolonne était montée à l'envers. Cette précolonne joue le rôle de filtre, le sens est donc très important. J'ai donc procédé au rétablissement de la flèche dans le sens de l'élution.

- ⊕ Changement de la valve de sélection des solvants qui s'est montrée défectueuse. Les analyses ont dû être interrompues pendant une semaine. Des fuites à l'arrière de l'échantillonneur sont apparues, en fait le circuit de nettoyage ne se vidait plus dans le réservoir dit «poubelle» mais par une voie inutilisée en fonctionnement normal. De plus, la préparation des échantillons ne se réalisait pas correctement, l'arrivée de méthanol ne se faisant plus. Rapidement, il a fallu se résoudre au changement de la vanne. Thermo[®] nous a envoyé un devis qui a été accepté par l'IRD. Le délai de livraison de deux jours fut très apprécié car la période des congés approchait. La mise en place de la valve de sélection neuve, pièce très sensible et délicate, fut réalisée par nos soins. Après des essais de vérification, j'ai pu constater que tout fonctionnait normalement.

IX-3) Entretien et conseils

- ⊕ Filtrer les solvants à base de sels (solution d'acétate d'ammonium dans mon cas).
- ⊕ Dégazer les solvants à l'hélium tous les jours pendant au moins 15 minutes.
- ⊕ Nettoyer de temps en temps les crépines aux ultrasons dans de l'acide chlorhydrique à 20 %. Les crépines se situent dans les bouteilles de solvant, elles arrêtent les particules et se comportent ainsi comme des filtres, les pores peuvent se boucher d'impuretés et la phase mobile est difficilement acheminée à la pompe.
- ⊕ Nettoyer et conditionner la colonne lorsqu'elle n'est pas utilisée avec le solvant de rinçage. Les sels endommagent la colonne lorsqu'ils sont utilisés en permanence et en quantité.
- ⊕ Purger les voies des solvants régulièrement pour éviter les bulles d'air dans la pompe.
- ⊕ Rincer les seringues et les boucles d'injections.
- ⊕ Surveiller la durée de vie des lampes du détecteur.
- ⊕ Minimiser les longueurs de tubing pour éviter les pertes de charges au minimum.
- ⊕ Ne pas utiliser de capuchons de vials usés pour ne pas altérer le prélèvement par la seringue.

IX-4) Perspectives, idées

- ⊕ Lors de la visite d'un commercial de la société Thermo[®], ce dernier nous a signalé que le laboratoire de chimie de la pyrotechnie Saint Nicolas de Brest possède la même chaîne d'analyse HPLC que notre laboratoire. La pyrotechnie dépend de la Marine Nationale et analyse essentiellement des poudres. J'ai donc demandé et proposé de visiter ce laboratoire. Il me semblait intéressant de partager l'expérience des deux laboratoires. Nous avons pu discuter et échanger nos modes de fonctionnement et également confronter nos éventuelles difficultés. A cette occasion, on nous a recommandé le système «manucard avec colonne lichrocart» qui apporte une facilité de montage et de démontage des colonnes. Il n'y a plus besoin de clé et/ou de pinces. De plus, l'espérance de vie des colonnes est augmentée.

- ✦ Achat d'un nouveau logiciel de pilotage de la chaîne plus convivial et flexible et accessible depuis plusieurs ordinateurs à la fois. Cela permettrait d'accroître la productivité du laboratoire. La société Thermo® propose le logiciel Chromquest. L'interface de ce logiciel simplifie les opérations quotidiennes et permet aux utilisateurs un contrôle des instruments à distance. Il est aussi possible de créer des méthodes et des ordres en temps réel depuis le bureau.
- ✦ Amélioration des conditions de pesée dans le laboratoire : salle réservée, table antivibratoire, calibration et suivi régulier de la balance.
- ✦ Identifier et quantifier les pigments par des méthodes spectroscopiques : la spectrophotométrie (absorption de la lumière) ou la fluorescence (fluorimétrie). Des comparaisons ont montré que les mesures traditionnelles non séparatives fournissaient des résultats comparables à ceux de l'HPLC pour la majorité des eaux naturelles. Ces deux méthodes peuvent être utilisées indifféremment pour mesurer les pigments. Cependant, la spectrophotométrie est moins sensible que la fluorimétrie et exige donc la filtration d'un plus grand volume d'eau, ce qui représente un handicap en zone oligotrophe.
- ✦ Adopter une démarche qualité au laboratoire de chimie marine et à long terme à tout le centre IRD de Bretagne. Il s'agit d'acquiescer un objectif stratégique dans un esprit de constante amélioration continue et permanente. Bien des entreprises privées ont depuis plusieurs années élaborées des systèmes d'assurance qualité, de certification, d'accréditation permettant d'éliminer les erreurs, de régler des conflits et de réussir l'adéquation entre l'offre et la demande. C'est un peu différent pour l'IRD car l'institut n'a pas réellement de clients mais la certification et l'accréditation sont des instruments utilisables pour moderniser l'administration publique. Cela permettrait au laboratoire de chimie marine d'accomplir ses travaux avec efficacité et d'être crédible auprès de ses collaborateurs.

Voici les premières étapes à réaliser au niveau du laboratoire :

- établir des documents décrivant toutes les procédures analytiques utilisées,
- valider statistiquement ces méthodes d'analyse,
- réaliser des documents décrivant toutes les procédures de calibration et d'entretien des instruments de mesure,
- rédiger les documents sur les aspects sécurité, d'entretien des locaux, de gestion informatique, d'archivage des documents, etc.
- mettre en place un cahier des charges et des descriptions de fonction pour chaque collaborateur.

Tous ces documents seront rassemblés dans le Manuel d'Assurance Qualité du laboratoire. Tout le personnel du centre devra être acteur de cette démarche qualité. Un responsable qualité sera nommé pour veiller au maintien du système et assurer les audits internes. Il sera subordonné par le directeur du centre qui lui apportera son soutien.

A long terme, l'assurance qualité s'appliquera autant aux tâches du laboratoire qu'à celle de l'informatique ou du secrétariat.

Enfin, il serait possible de proposer un sujet de stage à un étudiant escomien ayant suivi l'option Qualité Sécurité Environnement en dernière année en vue d'obtenir un plan de travail pour une démarche qualité dans le laboratoire de chimie marine.

X) Conclusion

L'objectif de mon stage était de traiter les échantillons des cinq campagnes du programme ECOTEM et d'analyser les chromatogrammes obtenus par HPLC. L'étude de la distribution des pigments phytoplanctoniques lors de ces campagnes permet d'évaluer la production primaire dans le Canal du Mozambique.

Pour cela, deux méthodes d'analyses HPLC ont été nécessaires à la séparation et à la détermination des pigments parmi les différents échantillons. Après une calibration de la chaîne d'analyse par des standards de pigments, une quantification des pigments a été donnée sous forme de concentration, en microgramme par litre d'eau de mer ($\mu\text{g/l}$). Des histogrammes sont alors effectués sous EXCEL pour une meilleure visualisation et interprétation des résultats (histogramme ANNEXE 6 p. 49).

Puis, grâce à la composition pigmentaire d'un milieu donné, il est possible de déterminer sa flore phytoplanctonique et de remonter au niveau le plus haut du réseau trophique afin d'étudier l'écosystème des grands pélagiques, notamment le thon et l'espadon.

Les méthodes HPLC donnent de très bons résultats en routine et offrent quelques perspectives. Les limites de cette technique restent le temps d'analyse relativement assez long et l'usage de grande quantité de solvants qu'il faut recycler par la suite. J'ai pu apprécier la collaboration, le travail en équipe et la solidarité nécessaire à une bonne progression du programme ECOTEM.

Personnellement, ce stage fut très enrichissant scientifiquement, techniquement mais aussi humainement. J'ai découvert le monde de l'océanographie. Cette discipline a la particularité d'être à cheval sur plusieurs domaines comme la physique, la biologie, la géologie et la chimie. Des interactions très fortes existent entre ces domaines et j'ai pu apprécier la complémentarité de tous ces milieux pour contribuer en particulier au développement des pays du Sud.

J'ai eu l'occasion d'accompagner mon maître de stage quelques jours à l'université de Brême en Allemagne pour apprendre la technique de prélèvement et d'analyse de l'hélium dans l'eau de mer.

Enfin, j'ai la chance de participer à une campagne en mer lors du programme EGEE 2 en septembre dans le golfe de Guinée. C'est une expérience qui sera, je pense, inoubliable et très enrichissante. A bord, je vais effectuer des prélèvements d'eau de mer pour quantifier les sels nutritifs et l'hélium.

XI) Lexique

Autotrophe : se dit d'une espèce biologique (phytoplancton ou bactérie) produisant elle-même sa matière organique à partir de sels minéraux ; la photosynthèse est réalisée par des espèces autotrophes.

par opposition à **Hétérotrophe :** se dit d'un organisme qui tire son énergie de la dégradation des macromolécules déjà fabriquées.

Benthique : qualifie les organismes et les processus ayant un lien avec le fond de la mer. Le domaine benthique se divise en deux parties selon la présence de lumière permettant le développement d'algues.

Biocénose : association équilibrée de plusieurs espèces dans une région donnée.

Diatomé : algue microscopique unicellulaire avec des membranes siliceuses (deux coquilles externes ornés et rapportables).

Eucaryotes : se dit des êtres vivants qui ont des cellules dont le noyau est séparé du cytoplasme par une membrane nucléaire.

Halieutique : terme générique désignant les activités, les méthodes qui ont trait à la pêche.

Necton : se dit des animaux nageurs qui vivent dans la mer.

Oligotrophe : 80 à 90 % du Pacifique tropical est oligotrophe, avec une couche de surface épuisée en sels nutritifs sur plusieurs dizaines de mètres d'épaisseur. La seule forme d'azote présente en abondance dans cette couche oligotrophe est le diazote.

Otolithe : corps solide minéral de l'oreille interne qui joue un rôle dans l'équilibration du sujet.

Pélagique : qualifie les organismes vivant et se nourrissant en haute mer. Associé à la surface ou aux profondeurs moyennes des masses d'eau. N'est pas lié au fond de la mer. Beaucoup de poissons pélagiques se nourrissent de plancton.

Procaryote : se dit des organismes unicellulaires dont le noyau est morphologiquement peu distinct du cytoplasme.

Sclérochronologie : science qui évalue l'âge des poissons.

Taxie : réaction à un stimulus. En l'occurrence, pour THETIS, il s'agit d'étudier comment se comportent les thons face à des dispositifs de concentrations de poissons qui sont des étapes dérivantes mises à l'eau par les pêcheurs pour favoriser la concentration des thons situés au dessous. En effet, ils ont tendance à s'agréger sous ces dispositifs. Le but est de comprendre ce qui pousse les thons à adopter ce comportement.

Taxonomie : science de la classification et plus particulièrement, de la classification des formes vivantes.

Upwelling : système de courant ascendant faisant remonter vers la surface des eaux froides inférieures. Ce phénomène peut provoquer des modifications de la faune marine.

XII) Bibliographie

AMINOT Alain, KEROUEL Roger. *Hydrologie des écosystèmes marins, paramètres et analyses.* Edition Ifremer. Plouzané : Ifremer Brest, 2004, 336 p.

BARLOW R.G., CUMMINGS D.G., GIBB S.W. 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*, 1997, vol. 161, pp. 303-307.

GERAULT A. *Les pigments chlorophylliens en tant que traceurs en océanographie. Etude bibliographique sur l'état de l'art, applications possibles.* EPSHOM/CMO, laboratoire de chimie océanographique. Brest EPSHOM, 1996, 72 p.

JEFFREY S.W., MANTOURA R.F.C., WRIGHT S.W. *Phytoplankton pigments in oceanography : guidelines to modern methods.* UNESCO, Paris, 1997, 661 p.

LABASQUE Thierry, LE SAINT Stéphane, LE GALL Davy, et al. *Dosage des pigments phytoplanktoniques par chromatographie liquide haute pression (CLHP). Présentation et validation de la méthode développée au laboratoire de chimie océanographique de l'EPSHOM.* 11 EPSHOM/CMO/LCO. Brest, EPSHOM, 1999, 38 p.

ROZEC Elodie. *Mise au point et optimisation d'un dosage de pigments phytoplanktoniques par chromatographie liquide haute performance : rapport de stage, IUT Génie Biologique, Option Génie de l'environnement.* Brest : laboratoire de chimie océanographique de l'EPSHOM, 2003, 22 p.

WRIGHT S.W., JEFFREY S.W., MANTOURA R.F.C., et al. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, vol. 77, pp. 183-196.

Sites Internet visités:

Club des argonautes. *Océanographie opérationnelle [en ligne].* Disponible sur : <<http://www.clubdesargonautes.org>>.

COUDRE Christian. *Planctonologie [en ligne].* Disponible sur : <<http://perso.wanadoo.fr/christian.coudre/index.html>>.

IRD. *L'institut de Recherche pour le Développement [en ligne].* Disponible sur : <<http://www.ird.fr>>.

IFREMER. *L'institut français de recherche pour l'exploitation de la mer [en ligne].* Disponible sur : <<http://www.ifremer.fr>>.

LEVIN'S Shula. *Solid Phase Extraction [en ligne].* Disponible sur : <http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE/spe_index.html>.

Université de Paris Sud, CNRS. *Les dinoflagellés [en ligne].* Disponible sur : <<http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/dinoflagelles.htm>>.

Université Pierre et Marie Curie. *La photosynthèse [en ligne].* Disponible sur : <<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/01-organismes.htm>>.

ANNEXE 1 : photos de scènes de campagne ECOTEM



scène de chalutage



photos de fous sur l'île Europa

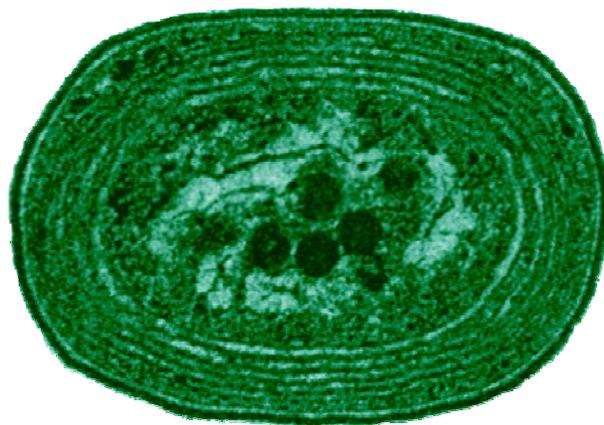
ANNEXE 2 : photos de phytoplanctons



Diatomée caractéristique d'une eau de très bonne qualité, vue au microscope.



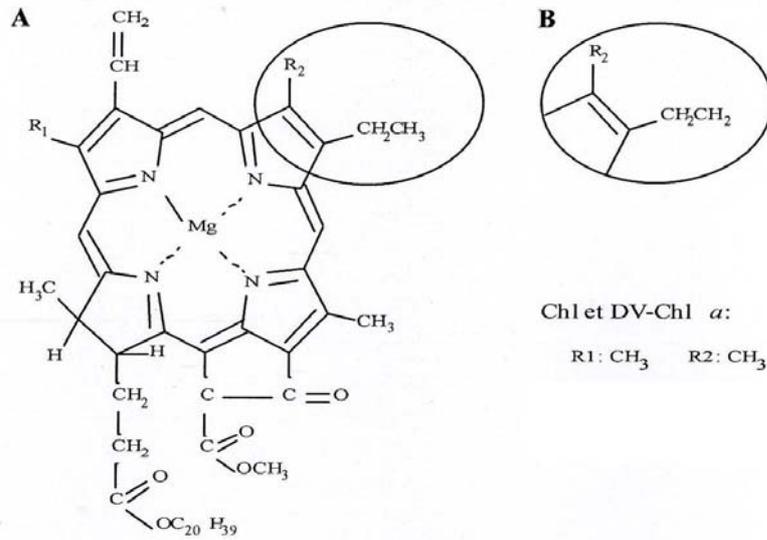
Les dinoflagellés possèdent deux flagelles de compositions et de fonctionnalités différentes qui assurent leurs mouvements.



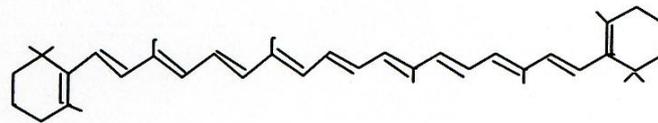
Ultrastructure d'un *Prochlorococcus* en microscopie électronique à transmission. La cellule bactérienne est entourée d'une paroi sous laquelle on observe les thylakoïdes enroulés en couches successives et qui sont le siège de la photosynthèse.

ANNEXE 3 : Structures chimiques de pigments

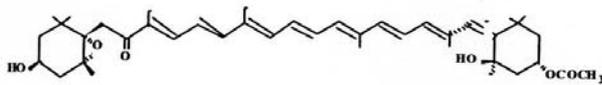
Structures de la mono-chlorophylle A (A) et de la divinyle-chlorophylle A (B) :



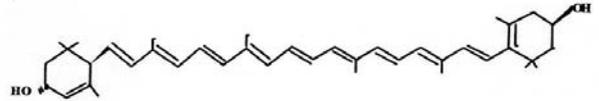
Structures de pigments rencontrés durant les analyses :



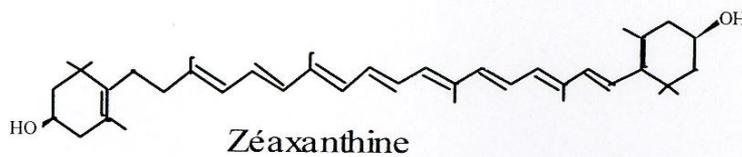
beta-carotène



Fucoxanthine



Lutéine



Zéaxanthine

ANNEXE 4 : photos de prélèvement et de filtration d'eau de mer



prélèvement dans des flacons plastiques



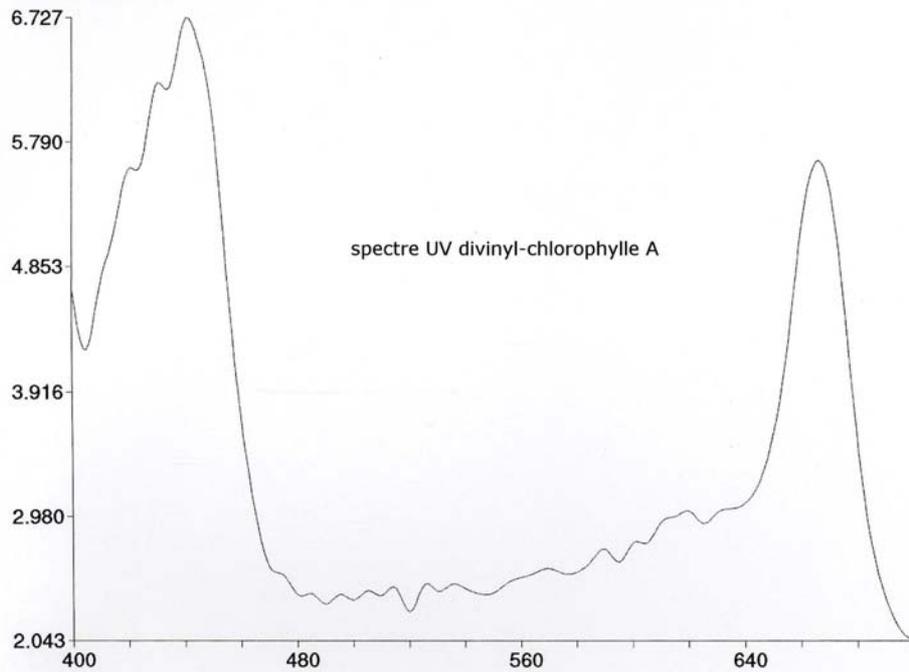
rampe de filtration

ANNEXE 5 : Comparaison de spectres UV

Spectres UV de la divinyle-chlorophylle A et de la mono-chlorophylle A

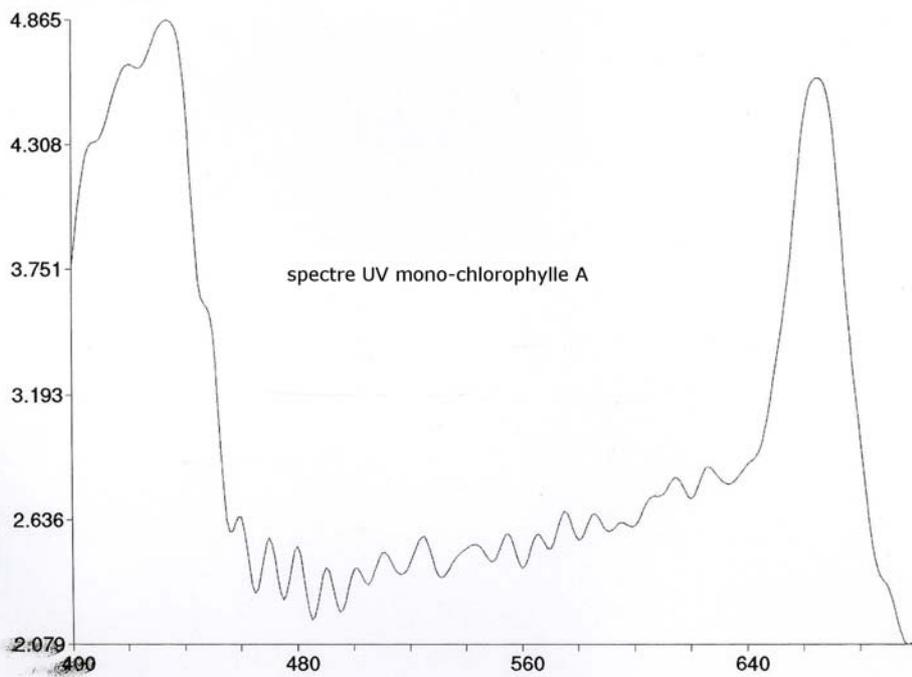
1: C:\TSP\EPSHOM\Data\etalondivAhaut1\etalondivAhaut1,Inj1.AQR (BR)

Scan at 38.515 min



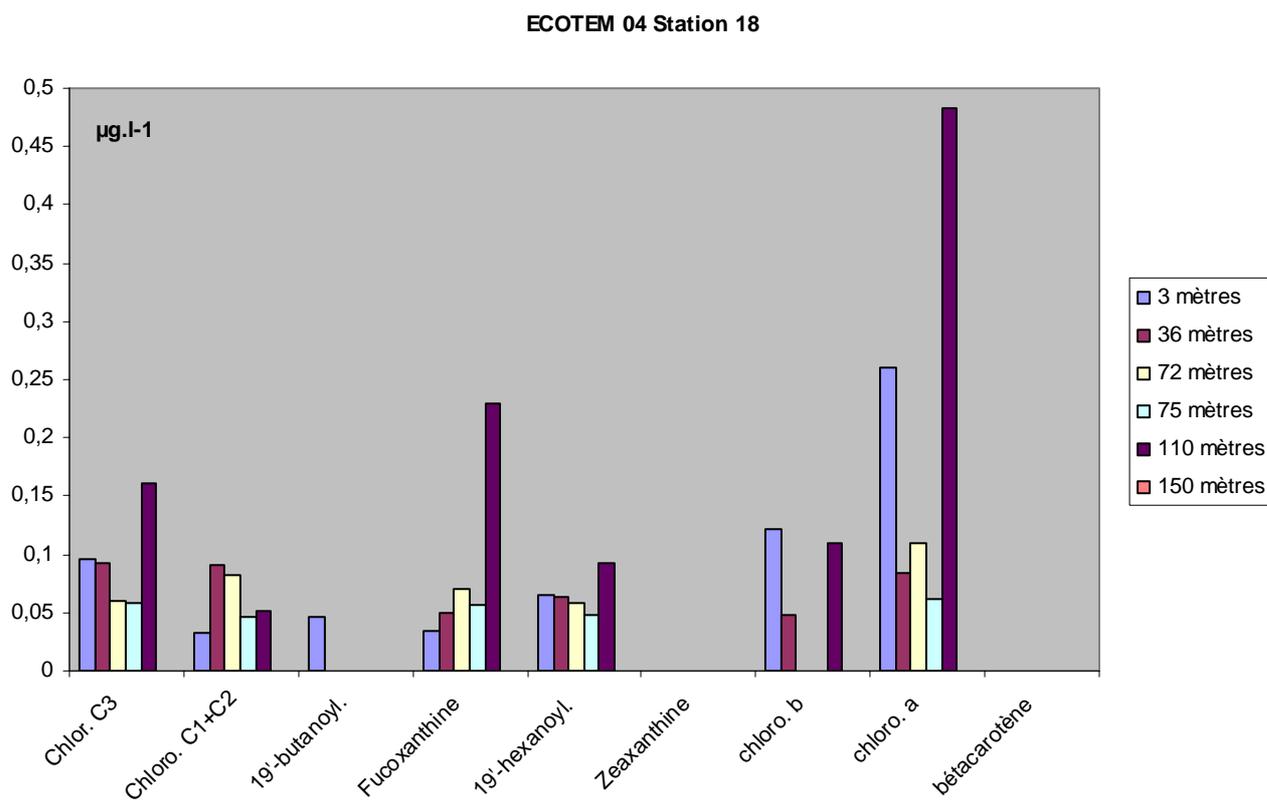
1: C:\TSP\EPSHOM\Data\EtalonmonoAmoy2\monoAmoy2,Inj1.AQR (BR)

Scan at 38.774 min



Favorite Spectra

ANNEXE 6 : Exemple d'un histogramme de résultats



Histogramme des six échantillons de la station 18 d'ECOTEM 4
Concentration des différents pigments en fonction de la profondeur

Sommaire

I) INTRODUCTION GENERALE.....	1
II) L'INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)	2
II-1) PRESENTATION GENERALE	2
II-2) L'IRD, CENTRE DE BRETAGNE	2
II-3) L'US 025 : INTERVENTIONS A LA MER ET OBSERVATOIRES OCEANIQUES.....	5
III) INTRODUCTION AU SUJET.....	6
III-1) PROGRAMME ECOTEM	6
III-2) GENERALITES SUR LE PHYTOPLANCTON	9
IV) ANALYSE DES PIGMENTS.....	12
IV-1) INTRODUCTION.....	12
IV-2) PRELEVEMENT ET CONDITIONNEMENT EN MER.....	14
IV-3) CONSERVATION DES FILTRES.....	14
IV-4) EXTRACTION DES PIGMENTS.....	14
V) CHAINE D'ANALYSE HPLC	16
V-1) MATERIEL.....	16
V-2) INSTALLATION	17
V-3) MISE EN ROUTE.....	17
VI) PREMIERE EXPERIMENTATION : PURIFICATION DES PIGMENTS PHYTOPLANCTONIQUES.....	18
VI-1) OBJECTIFS DE LA PURIFICATION	18
VI-2) BIBLIOGRAPHIE, CHOIX DE LA METHODE	18
VI-3) MODE OPERATOIRE	19
VI-4) RESULTATS.....	25
VII) MESURE DES PIGMENTS	26
VII-1) BIBLIOGRAPHIE.....	26
VII-2) METHODE DE WRIGHT.....	27
	50

VII-3) METHODE DE BARLOW	28
VIII) CALIBRATION DE L'APPAREILLAGE	34
VIII-1) STANDARDS DE PIGMENTS	34
VIII-2) CALCUL DES FACTEURS DE REPONSE ET DES CONCENTRATIONS	35
VIII-3) PERSPECTIVES A LA CALIBRATION	37
IX) PROBLEMES RENCONTRES, SOLUTIONS ET IDEES D'AMELIORATION	38
IX-1) PROBLEMES D'IDENTIFICATION DES PIGMENTS.....	38
IX-2) PROBLEMES TECHNIQUES RENCONTRES SUR LA CHAINE HPLC.....	38
IX-3) ENTRETIENS ET CONSEILS.....	39
IX-4) PERSPECTIVES, IDEES	39
X) CONCLUSION	41
XI) LEXIQUE	42
XII) BIBLIOGRAPHIE	43
ANNEXE 1 : PHOTOS DE SCENES DE CAMPAGNE ECOTEM	44
ANNEXE 2 : PHOTOS DE PHYTOPLANCTONS.....	45
ANNEXE 3 : STRUCTURES CHIMIQUES DE PIGMENTS	46
ANNEXE 4 : PHOTOS DE PRELEVEMENT ET DE FILTRATION D'EAU DE MER	47
ANNEXE 5 : COMPARAISON DE SPECTRES UV	48
ANNEXE 6 : EXEMPLE D'UN HISTOGRAMME DE RESULTATS	49

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Claude ROY, Directeur du centre IRD de Brest, pour m'avoir accueillie dans son centre.

Je remercie Monsieur Yves GOURIOU, Directeur de l'Unité de Service «Interventions à la mer et observatoire océanique», pour son accueil et son soutien.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur François BAURAND, mon maître de stage et Responsable du laboratoire de chimie marine, pour m'avoir suivie et guidée tout au long de ces mois. Sa disponibilité, sa confiance et son ouverture aux discussions argumentées m'ont permis de trouver tout le soutien qui m'était nécessaire au cours de mon stage.

Je remercie chaleureusement Emmanuel pour son accueil au sein de l'équipe et sa bonne humeur au quotidien dans le laboratoire.

Je remercie également tous les scientifiques et chercheurs qui ont participé au projet.

Enfin, mes remerciements s'adressent à l'ensemble du personnel du centre que j'ai côtoyé et qui a rendu mon stage très agréable aussi bien scientifiquement qu'humainement.

Abréviations utilisées dans le rapport

CNEXO : Centre National pour l'**EX**ploitation des **O**céans.

COB : Centre **O**céanologique de **B**retagne.

CTD : sonde mesurant la **C**onductivité, la **T**empérature et la **D**ensité.

DOM-TOM : **D**épartement d'**O**utre **M**er et **T**erritoires d'**O**utre **M**er.

ECOTEM : **E**COlogie **T**rophique dans les **E**cosystèmes **M**arins.

EPSHOM : Etablissement **P**rincipal du **S**ervice **H**ydrographique et **O**céanographique de la **M**arine.

ESCOM : Ecole Supérieure de **C**himie **O**rganique et **M**inérale.

HPLC : Chromatographie **L**iquide **H**aute **P**erformance.

IFREMER : Institut **F**rançais de **R**echerche pour l'**E**xploitation de la **M**ER.

IRD : Institut de **R**echerche pour le **D**éveloppement.

IUEM : Institut **U**niversitaire **E**uropéen de la **M**er.

LASAA : **L**aboratoire de **S**chlérochronologie des **A**nimaux **A**quatiques.

LEMAR : Laboratoire des Sciences de l'**E**nvironnement **M**ARin.

LPO : Laboratoire de **P**hysique des **O**céans.

ORSTOM : Office de la **R**echerche **S**cientifique et **T**echnique **O**utre-**M**er.

PSI : Pound per Square Inch (livre par pouce carré).

SHOM : Service **H**ydrographique et **O**céanographique de la **M**arine.

THETIS : **T**Hons tropicaux et **E**cosystèmes **p**élagiques, **T**axies, Interactions et **S**tratégies d'exploitation.

Tr : Temps de rétention.

TSP : Thermo Separation **P**roducts.

UBO : Université de **B**retagne **O**ccidentale.

UR : Unité de **R**echerche.

US : Unité de **S**ervice.