

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE-BIOLOGIE

N° attribué par la bibliothèque

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

Année 2006

Les métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) dans la production des microalgues
sur différents milieux de culture : biodisponibilité,
bioaccumulation et impact physiologique

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Biologie Marine

Présentée

et soutenue publiquement par

Sindy GAGNEUX-MOREAUX

Le 30 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Composition du Jury

Rapporteurs	Madame Annick Manceau, <i>Professeur, Université du Maine</i> Monsieur Paco Bustamante, <i>Maître de Conférences, Université de La Rochelle</i>
Examineurs	Monsieur Joël Fleurence, <i>Professeur, Université de Nantes</i> Monsieur Patrick Lassus, <i>Chercheur, Ifremer, Nantes</i>
Invité	Monsieur Joël Radford-Knoery, <i>Chercheur, Ifremer, Nantes</i>

Directeurs de thèse : Messieurs Richard P. Cosson et Christophe Moreau

Remerciements

Quelqu'un m'a dit que cette page était totalement personnelle et qu'aucune convention ne pouvait définir cette partie. Alors j'ai voulu que cette page ne soit pas comme les autres pour qu'elle ressemble à ces quatre années de thèse qui seront toujours différentes des autres années de ma vie passée ou à venir...

J'aimerais pouvoir, pour remercier les personnes qui ont été impliquées de près ou de loin dans ce travail, leur écrire tout ce que nous avons pu partager, tout ce qu'ils m'ont apporté ou appris, mais il faut laisser quelques pages au récit scientifique... ! Je vais donc tenter de synthétiser cinq ans d'interactions avec des personnes enrichissantes, qu'elles appartiennent au monde de la recherche, étudiant ou au cercle d'amis.

Ce travail de thèse est l'aboutissement de mon cursus universitaire que je dois en partie à mon premier petit garçon qui m'a donné l'ambition et l'envie d'apprendre et de comprendre, à mon mari qui m'a accompagnée et aidée de très nombreuses fois, et à mes parents qui m'ont donné les moyens de réaliser ce projet. Je pense également à toutes les personnes de ma famille et à mes amis qui ont pu penser à nous et souhaité à cette histoire une fin heureuse.

Ce projet a pris corps après ma rencontre en stage de maîtrise avec mon directeur de thèse Richard Cosson, puis avec mon co-encadrant Christophe Moreau. Nous avons arpenté les domaines frontaliers de leurs spécialités respectives dans ce travail ce qui leur a demandé beaucoup d'attention et d'ouverture sur les thématiques de travail de l'autre. Nous avons appris en cinq ans à nous connaître, à nous comprendre et à nous intéresser à nos domaines de prédilection respectifs.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe EA-2663 de l'institut ISOMer dirigée par le professeur Jean-Michel Robert puis par le professeur Joël Fleurence qui m'ont accueillie en me donnant une place plus que concrète dans ce laboratoire.

Ce projet a également pu être réalisé grâce à une bourse de thèse qui m'a été attribuée par la Région Pays de la Loire et au financement d'une partie des expérimentations par le Syndicat MIXte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche de la Région Pays de la Loire (SMIDAP)

J'ai eu la chance de recevoir de précieux conseils et enseignements auprès de mes encadrants de thèse tout d'abord, puis auprès de Pierre Gaudin, Philippe Rosa, auprès de mes collègues doctorants -à l'époque, ils ont bien évolué depuis...- Jessica, Priscilla, Rozenn, Vona, Jean-Bernard, et bien sûr auprès des enseignants-chercheurs du laboratoire.

Pour des problèmes bien particuliers, j'ai bénéficié des connaissances et des compétences de Paco Bustamante, Jean-Louis Gonzalez, Joël Knoery, Annick Manceau, Guillaume Massé, Jean-Luc Mouget et Ricardo Riso. Grâce à eux notamment, certaines épines ont été retirées et des idées ont vu le jour...

Monsieur Franck Taraud et l'équipe de la station Ifremer de Bouin nous ont gentiment permis l'accès à leurs forages et nous les en remercions.

Le séjour à Monaco a également été très profitable, j'ai été agréablement accueillie dans l'équipe de Jean-Louis Teyssié et Michel Warnau. Ce fut l'occasion d'échanges très intéressants sur les méthodes et les techniques de travail mais également sur les points de vue scientifiques.

J'ai eu également la chance de faire mes premiers pas dans l'enseignement dans une équipe pédagogique compétente et dynamique, je profite de l'occasion pour remercier plus particulièrement Joseph Baudet et Christophe Moreau, ainsi que Madame Aumaille et Madame Jahan.

Dans ce travail de thèse, des stagiaires sont venues travailler avec moi sur des points précis et elles se sont impliquées dans le sujet, ont apporté des visions différentes et m'ont beaucoup appris sur l'encadrement et le travail en équipe.

*Et au bout de quatre années, ce manuscrit est né... Rien que lui tout seul fut une aventure... Et d'ailleurs, je tiens à saluer ceux qui m'ont aidée sur le côté très technique (formatage automatique, conventions, mise en page, impression...) et qui ont été source de motivation et d'entrain pendant ces semaines de rédaction, notamment Priscilla, Hélène et Jean-Bernard. Un petit clin d'œil à mon mari et mon fils qui ont classé ma *biblio*, et à mes encadrants qui m'ont relu et corrigée avec patience et efficacité.*

Alors pour terminer, je voudrais remercier les membres du jury qui ont accepté de participer avec Richard Cosson et Christophe Moreau à la scène finale de cette aventure : Annick Manceau, Paco Bustamante, Joël Fleurence, Patrick Lassus et Joël Knoery.

*A tous, je vous dis merci...
Sindy*

PS : J'avais promis une spéciale dédicace aux ordinateurs qui m'ont subie pendant ce travail. Je tiens à remercier mon ordinosauve du laboratoire et l'ordinateur portable de mon mari que je me suis sournoisement approprié. Une pensée à l'ordinateur relié au polarographe...

PPS : J'adresse une tendre pensée à celui ou à celle que je ne connais pas encore et qui pourtant aura partagé les six derniers mois de ma thèse.

Théo, tu auras marqué le début de mes études de biologie et cet inconnu (pour l'instant) leur fin. Merci à vous deux et à votre papa.

Signé d'une petite larme

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Chapitre I Etude bibliographique	5
---	----------

I-1 Les eaux souterraines salées	5
I-1.1 Présentation générale des eaux souterraines	5
I-1.2 Les eaux souterraines salées des marais le long de la baie de Bourgneuf (Loire-Atlantique et Vendée, France).....	15
I-1.3 Conclusion.....	23
I-2 Les métaux (cadmium, cuivre, plomb et zinc)	25
I-2.1 Généralités sur les métaux (Cd, Cu, Pb et Zn)	25
I-2.2 Théorie sur l'équilibre des formes métalliques dans les systèmes aquatiques.....	33
I-2.3 Etude de la spéciation des métaux.....	36
I-2.4 Etude de la capacité de complexation des eaux	40
I-2.5 Conclusion.....	44
I-3 Les cultures de microalgues	47
I-3.1 Les cultures de microalgues marines en aquaculture	47
I-3.2 Les microalgues utilisées dans cette étude	49
I-3.3 Conclusion.....	57
I-4 Notions de transfert des métaux dans une chaîne trophique courte	59
I-5 Conclusion.....	61

Chapitre II Cultures sur eaux souterraines salées non enrichies en métaux	63
--	-----------

II-1 Introduction	63
II-2 Matériel et méthodes	67
II-2.1 Prélèvement des eaux souterraines salées et de l'eau de mer	67
II-2.2 Caractéristiques physico-chimiques des eaux	68

II-2.3	Dosages des métaux par voltampérométrie à redissolution anodique à impulsions différentielles	70
II-2.4	Cultures d'algues : espèces utilisées, conditions de culture, suivi et dosages du matériel algal	79
II-2.5	Suivi des cultures et dosages biochimiques	81
II-2.6	Statistiques	83
II-3	Résultats	85
II-3.1	Caractéristiques des eaux souterraines salées et comparaison avec l'eau de mer côtière	85
II-3.2	Cultures des microalgues sur les différentes eaux souterraines salées et sur l'eau de mer enrichie	89
II-4	Discussion	113
II-4.1	pH, salinité et nutriments majeurs	113
II-4.2	Concentrations et biodisponibilité des métaux dans les eaux souterraines salées et l'eau de mer côtière	114
II-4.3	Production d'algues sur les eaux souterraines salées et sur eau de mer enrichie.	116
II-4.4	Accumulation des métaux dans les algues	120
II-5	Conclusion.....	123

Chapitre III Cultures sur eaux souterraines salées enrichies en métaux125

III-1	Introduction	125
III-2	Matériel et méthodes	127
III-2.1	Étude de la capacité de complexation de l'eau souterraine salée et de l'eau de mer	127
III-2.2	Protocole expérimental d'enrichissement en métaux de l'eau souterraine salée pour la culture de microalgues	128
III-2.3	Statistiques	130
III-3	Résultats	131
III-3.1	Capacités de complexation de l'eau souterraine salée et de l'eau de mer.....	131
III-3.2	Expériences d'enrichissement en métaux des eaux souterraines salées.....	139

III-4	Discussion	149
III-4.1	Complexation du cadmium	149
III-4.2	Complexation du cuivre	151
III-4.3	Complexation du plomb.....	153
III-4.4	Complexation du zinc.....	155
III-5	Conclusion	157

Chapitre IV Cultures en conditions contrôlées sur milieu artificiel159

IV-1	Introduction	159
IV-2	Mise au point du milieu artificiel	161
IV-2.1	Mise au point : méthode et composition du milieu artificiel DAM	161
IV-2.2	Résultats	165
IV-2.3	Conclusion et perspectives d'utilisation.....	173
IV-3	Cultures sur milieu artificiel DAM enrichi en métaux	175
IV-3.1	Matériel et méthodes	175
IV-3.2	Résultats	181
IV-3.3	Discussion	193
IV-4	Conclusion	197

Conclusions générales et perspectives199

Références bibliographiques.....203

Annexe 1	: Protocoles de dosages	I
Annexe 2	: Résultats des analyses en composantes principales dans l'étude des eaux souterraines salées utilisées pour les cultures de microalgues	VII
Annexe 3	: Articles	I

Liste des tableaux

Tableau I-1	Répartition de la réserve d'eau du globe dans les différents compartiments (d'après Gleick, 1993).....	5
Tableau I-2	Valeurs typiques de porosité (totale et efficace) et de conductivité hydraulique pour différentes roches (d'après Banton et Bangoy, 1997).....	7
Tableau I-3	Exemples de réactions de dissolution de certains minéraux avec l'eau (dans Sigg <i>et al.</i> , 1992)	11
Tableau I-4	Qualité physico-chimique des eaux souterraines salées pompées dans le marais de Bouin : gamme des valeurs déterminées et valeur médiane pour les 47 forages échantillonnés dans l'étude de Moreau (1996) (N org : azote organique, P org : phosphore organique)	18
Tableau I-5	Qualité physico-chimique des eaux souterraines salées pompées à la station Ifremer (Bouin, Polder du Dain) et sur la concession de F. Taraud (Bouin, Port des Brochets) (dans l'étude de Moreau, 1996). (N org : azote organique, P : org phosphore organique).....	21
Tableau I-6	Sources anthropiques de métaux dans l'océan (Nriagu et Pacyna, 1988)....	25
Tableau I-7	Concentrations moyennes en cadmium, cuivre, plomb et zinc dans les océans, dans les eaux côtières et dans des rivières.....	26
Tableau I-8	Pourcentages calculés de présence des espèces métalliques pour le cadmium, le cuivre, le fer, le plomb et le zinc dans un milieu d'eau de mer sans ligands organiques, à 25°C, pH=8,2 et 1 atm. (d'après Turner <i>et al.</i> , 1981)	35
Tableau II-1	Tableau récapitulatif des conditions d'analyse en DP-ASV pour le dosage des métaux labiles et totaux	77
Tableau II-2	Tableau récapitulatif des résultats de répétabilité et de sensibilité pour le dosage simultané du zinc, du cadmium du plomb et du cuivre en DP-ASV dans l'eau de mer ..	79
Tableau II-3	Clones des microalgues utilisées dans cette étude (nom, code « Nantes Culture Collection » (NCC), provenance).....	80
Tableau II-4	Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) pour le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc en SAA.....	83
Tableau II-5	Comparaison des caractéristiques des eaux étudiées	85
Eaux souterraines salées Ifremer brute (I), Ifremer traitée (IT) et Taraud (T) et de l'eau de mer côtière prélevée à Noirmoutier brute (C) ou enrichie pour les cultures d'algues (CE) Moyenne ± intervalle de confiance.		85
Tableau II-6	Concentrations en azote sous forme ammoniacale $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ($\text{NH}_{3,4}$) et concentrations d'ammoniac correspondantes (NH_3) calculées selon les équations de Johansson et Wedborg (1980)	86

Tableau II-7	Rapports des nutriments majeurs (azote/phosphore -N/P- et azote/silicium -N/Si-) dans les différentes eaux utilisées pour les cultures d'algues	87
Tableau II-8	Concentrations en métaux totaux dans les eaux étudiées.....	87
	Eaux souterraines salées Ifremer brute (I), Ifremer traitée (IT) et Taraud (T) et eau de mer côtière brute (C) ou enrichie (CE). Moyenne \pm intervalle de confiance.....	87
Tableau II-9	Consommation et rapport d'assimilation des sels nutritifs par les algues cultivées sur les différentes eaux.....	107
Tableau II-10	Effets induits sur les cultures (multiplication et teneurs en glucides, protéines et pigments dans les cellules algales) par la dilution avec de l'eau de mer côtière des eaux souterraines salées : eau souterraine salée Ifremer brute (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT) et eau souterraine salée Taraud (T). (NS : pas de différence).....	111
Tableau II-11	Teneurs en métaux accumulés dans les algues dans nos conditions de culture, comparaison à d'autres travaux réalisés sur eau souterraine salée.....	121
	(1) Etude SMIDAP (comm. pers.) (pâte d'algues de cultures sur eau souterraine salée) ; (2) Ballan-Dufrançais <i>et al.</i> , 1991 ; (3) Schintu <i>et al.</i> , 1999 (Etude sur eaux souterraines salées) ...	121
Tableau III-1	Estimation graphique des valeurs de capacités de complexation (CC) et des constantes de stabilité conditionnelle (K) de l'eau de mer côtière et l'eau souterraine salée pour le cuivre, le plomb et le zinc	138
Tableau III-2	Dosages de métaux totaux dans l'eau souterraine salée enrichie avant ou après la filtration – Pourcentages de métal par rapport à la quantité initiale de métal (témoin ou après l'ajout)	146
Tableau IV-1	Tableau comparatif de milieux artificiels décrits dans la littérature	162
Tableau IV-2	Préparation des solutions stocks et du milieu artificiel DAM, concentration finale des différents éléments ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).....	163
Tableau IV-3	Nombre de cycles de croissance atteints avec les différentes microalgues testées sur le milieu artificiel DAM	169
Tableau IV-4	Pourcentages des différentes espèces métalliques présentes dans le milieu artificiel DAM calculés grâce au modèle mathématique MOCO Ifremer	170
Tableau IV-5	Effets du cadmium ($0,5$ et $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), du cuivre ($0,75$ et $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), du plomb (4 et $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et du zinc (4 et $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sur les cultures d' <i>Haslea ostrearia</i> réalisées sur le milieu artificiel DAM	181
Tableau IV-6	Effets du cadmium ($0,5$ et $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), du cuivre ($0,75$ et $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), du plomb (4 et $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et du zinc (4 et $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sur les cultures de <i>Skeletonema costatum</i> réalisées sur le milieu artificiel DAM	182

Tableau IV-7	Effets du cadmium (0,5 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) et du cuivre (0,75 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sur les cultures de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> et de <i>Tetraselmis suecica</i> réalisées sur le milieu artificiel DAM	183
Tableau IV-8	Concentrations en cuivre dans les milieux, déterminées par DP-ASV.....	191
Tableau IV-9	Valeurs des capacités de complexation (CC) du plomb et des constantes de stabilité conditionnelle associées (log K) dans le milieu artificiel DAM et le milieu d'eau de mer enrichie.	191

Liste des figures

Figure I-1	Principaux types de porosité des aquifères (*roches ignées : résultant de la consolidation d'un liquide en fusion) (source : La Voie Verte, site WEB d'Environnement Canada : http://www.ec.gc.ca/water/fr/nature/grdwtr/f_gdwtr.htm).....	6
Figure I-2	Schéma représentant les nappes libres et captives (modifié, source : le BRGM, http://www.brgm.fr/brgm//divers/nappes.htm)	9
Figure I-3	Distributions des tailles des colloïdes et des particules présents dans les eaux (d'après Lead et Wilkinson, 2006).....	13
Figure I-4	Carte géologique simplifiée du Marais Breton et de la baie de Bourgneuf et localisation des forages (●) (dans Moreau, 1996).....	15
Figure I-5	Schéma de la circulation de l'eau, sur une radiale Ouest-Est, dans l'aquifère du marais de Bouin (dans Moreau, 1996)	17
Figure I-6	Coupes géologiques des forages de la station Ifremer (Bouin, Polder du Dain) et de la concession aquacole de F. Taraud (Bouin, Port des Brochets) (d'après les données du BRGM Pays de la Loire et du Service Hydrogéologique Départemental de la Vendée, dans Moreau, 1996).....	22
Figure I-7	Spéciation des métaux dans une eau de mer naturelle selon Batley et Florence (1976) modifiée par Skogerboe <i>et al.</i> (1980)	38
Figure I-8	Protocole de spéciation métallique d'après Nürnberg (1983).....	39
Figure I-9	Cas rencontrés pour l'étude de la capacité de complexation des eaux – Graphes : Réponses voltampérométriques en fonction de la concentration métallique ajoutée. D'après O'Shea et Mancy (1976)	41
Figure I-10	Type de graphe obtenu pour la détermination de la capacité de complexation ([CC]) où la concentration en métal labile ([M']) (ou le courant mesuré) est placé sur le graphe en fonction de la concentration en métal total ([M _T]).	42
Figure I-11	Influence des valeurs de constantes de stabilité conditionnelle K et de la concentration totale en ligands dans un modèle à un ligand (d'après Ruzic, 1982)	43
Figure I-12	Schéma de production de cultures en batch (d'après Lee et Tamaru (1993), cité dans Lavens et Sorgeloos (1996))	48
Figure I-13	Photographies de la diatomée <i>Haslea ostrearia</i> (longueur \cong 60 μ m). A : Vue valvaire (microscopie photonique, x 400), B : Vue valvaire, zoom sur une excréation de marennine à une extrémité (microscopie photonique, x 1000), C : Observation de valves du frustule au microscope électronique à balayage.....	50
Figure I-14	Photographie de la diatomée <i>Phaeodactylum tricornutum</i> : vue valvaire (microscopie optique, inverse de phase, x1000) (longueur \cong 32 μ m).....	52

Figure I-15	Photographies de la diatomée <i>Skeletonema costatum</i> . A : chaînes de trois et six cellules en vue cingulaire (microscopie photonique, x 400), B : détail des extensions externes des processus renforcés (microscopie électronique à balayage).....	54
Figure I-16	Photographie de la Prasinophycée <i>Tetraselmis suecica</i> (longueur \cong 14 μ m). A : observation de cellules fixées dans une solution formolée (microscopie optique, x1000), B : mise en évidence des quatre flagelles (microscopie optique, inverse de phase, x1000)....	56
Figure I-17	Schéma simple du transfert des métaux présents dans le milieu dans une chaîne trophique courte microalgues-bivalves	59
Figure II-1	Photographie du matériel de polarographie utilisé pour la voltampérométrie à redissolution anodique à impulsions différentielles.	71
Figure II-2	Schéma du principe d'une gamme en ajouts dosés.....	74
Figure II-3	Optimisation du potentiel de déposition pour le dosage simultané du cadmium (a), du cuivre (b), du plomb (c) et du zinc (d)	76
Figure II-4	Croissance d' <i>Haslea ostrearia</i> sur les eaux étudiées.....	89
Figure II-5	Concentrations (mg.L ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊗) (le pourcentage de phéopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules d' <i>Haslea ostrearia</i> cultivées sur les différentes eaux.	90
Figure II-6	Teneurs (pg.cell ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊗), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules d' <i>Haslea ostrearia</i> cultivées sur les différentes eaux.	91
Figure II-7	Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 80% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par L pour les cultures d' <i>Haslea ostrearia</i>	92
Figure II-8	Répartition des réplicats de cultures d' <i>Haslea ostrearia</i> (notée H1 à H4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre).	93
Figure II-9	Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 73% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par cellule pour les cultures d' <i>Haslea ostrearia</i>	94
Figure II-10	Répartition des réplicats de cultures d' <i>Haslea ostrearia</i> (notée H1 à H4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par cellule).....	94
Figure II-11	Croissance de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> sur les eaux étudiées.....	95
Figure II-12	Concentrations (mg.L ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊗) (le pourcentage de phéopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivées sur les différentes eaux.	96

Figure II-13	Teneurs (pg.cell ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊠), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivées sur les différentes eaux.	96
Figure II-14	Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 73% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par L pour les cultures de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	97
Figure II-15	Répartition des répliquats de cultures de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (notée P1 à P4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre)... ..	98
Figure II-16	Croissance de <i>Skeletonema costatum</i> sur les eaux étudiées.	99
Figure II-17	Concentrations (mg.L ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊠) (le pourcentage de phéopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de <i>Skeletonema costatum</i> cultivées sur les différentes eaux.	100
Figure II-18	Teneurs (pg.cell ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊠), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de <i>Skeletonema costatum</i> cultivées sur les différentes eaux.	101
Figure II-19	Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 75% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données de cultures de <i>Skeletonema costatum</i> (données physiologiques exprimées par L de culture).	101
Figure II-20	Répartition des répliquats de cultures de <i>Skeletonema costatum</i> (notée S1 à S4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre)....	102
Figure II-21	Croissance de <i>Tetraselmis suecica</i> sur les eaux étudiées.	103
Figure II-22	Teneurs (mg.L ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊠) (le pourcentage de phéopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de <i>Tetraselmis suecica</i> cultivées sur les différentes eaux... ..	103
Figure II-23	Teneurs (pg.cell ⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle <i>a</i> et phéopigments (⊠), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de <i>Tetraselmis suecica</i> cultivées sur les différentes eaux.	104
Figure II-24	Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 79% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par L de cultures de <i>Tetraselmis suecica</i>	105
Figure II-25	Répartition des répliquats de culture de <i>Tetraselmis suecica</i> (notée T1 à T4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre).	106
Figure II-26	Teneurs en cadmium et en cuivre des cellules algales cultivées sur les différentes eaux (en µg.g ⁻¹ de matière sèche).....	109

Figure III-1	Schéma du protocole d'enrichissement en métaux des eaux souterraines salées pour les cultures d' <i>Haslea ostrearia</i>	129
Figure III-2	Courbes de titration du cadmium pour l'eau de mer côtière turbide (□), peu turbide (◇) et filtrée (△)	132
Figure III-3	Courbes de titration du cadmium pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (□) et après filtration sur GF-F (△).....	132
Figure III-4	Courbes de titration du cuivre pour l'eau de mer côtière turbide (□), peu turbide (◇) et filtrée (△)	133
Figure III-5	Courbes de titration du cuivre pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (□) et après filtration sur GF-F (△)	134
Figure III-6	Courbes de titration du plomb pour l'eau de mer côtière turbide (□), peu turbide (◇) et filtrée (△)	135
Figure III-7	Courbes de titration du plomb pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (□) et après filtration sur GF-F (△)	135
Figure III-8	Courbes de titration du zinc pour l'eau de mer côtière turbide (□), peu turbide (◇) et filtrée (△)	136
Figure III-9	Courbes de titration du zinc pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (□) et après filtration sur GF-F (△).....	137
Figure III-10	Etude de la complexation du cadmium sur les particules retenues à environ 0,45 µm. Courbes de croissance de la diatomée <i>Haslea ostrearia</i> cultivée dans les différentes conditions de culture.	141
Figure III-11	Etude de la complexation du cuivre sur les particules retenues à environ 0,45 µm. Courbes de croissance de la diatomée <i>Haslea ostrearia</i> cultivée dans les différentes conditions de culture.	142
Figure III-12	Etude de la complexation du plomb sur les particules retenues à environ 0,45 µm. Courbes de croissance de la diatomée <i>Haslea ostrearia</i> cultivée dans les différentes conditions de culture.	143
Figure III-13	Etude de la complexation du zinc sur les particules retenues à environ 0,45 µm. Courbes de croissance de la diatomée <i>Haslea ostrearia</i> cultivée dans les différentes conditions de culture.	144
Figure III-14	Accumulation des métaux : cadmium (Cd), cuivre (Cu) ou zinc (Zn) dans les algues cultivées dans les différentes conditions.....	147
Figure IV-1	Croissance de la diatomée <i>Haslea ostrearia</i> sur le milieu artificiel DAM (---◆---) et le milieu d'eau de mer enrichie ES1/3 (---×---) sur six repiquages successifs. Moyenne ± intervalle de confiance.	165

Figure IV-2	Concentrations en glucides et en protéines dans les cellules d' <i>Haslea ostrearia</i> cultivées sur le milieu artificiel DAM et le milieu d'eau de mer enrichie ES1/3 au jour de filtration (densité maximale). Moyenne \pm intervalle de confiance.	166
Figure IV-3	Concentrations en caroténoïdes et en chlorophylle <i>a</i> dans les cellules d' <i>Haslea ostrearia</i> cultivées sur le milieu artificiel DAM et le milieu d'eau de mer enrichie ES1/3 au jour de filtration (densité maximale). Moyenne \pm intervalle de confiance.....	167
Figure IV-4	Estimation des concentrations de marennine externe et interne dans les cultures d' <i>Haslea ostrearia</i> sur milieu artificiel DAM (▨) et sur eau de mer enrichie ES1/3 (■). Moyenne \pm intervalle de confiance.	168
Figure IV-5	Etude de la complexation du cuivre et du zinc dans le milieu artificiel par la méthode voltampérométrique.....	171
Figure IV-6	Etude de la complexation du cadmium et du plomb dans le milieu artificiel par la méthode voltampérométrique.....	172
Figure IV-7	Complexation d'un ion Cu^{2+} avec deux molécules de 8-HQS (d'après El Hourch, 2002)	178
Figure IV-8	Pourcentage de métal ^{109}Cd (□, ■) ou ^{65}Zn (△, ▲) désorbé de la paroi algale par rapport à la quantité de métal total adsorbé et absorbé par les cellules d' <i>Haslea ostrearia</i> (□, △) et <i>Skeletonema costatum</i> (■, ▲).....	179
Figure IV-9	Cinétique d'accumulation (adsorption + absorption) du cadmium ^{109}Cd (□, ■) et du zinc ^{65}Zn (△, ▲) chez <i>Haslea ostrearia</i> (□, △) et <i>Skeletonema costatum</i> (■, ▲).....	186
Figure IV-10	Courbes de disparition du cadmium du milieu en fonction du temps dans les cultures de <i>Haslea ostrearia</i> (□) et de <i>Skeletonema costatum</i> (■) cultivées sur le milieu artificiel DAM enrichi en cadmium	187
Figure IV-11	Résultats de la coloration au bleu Alcian des cellules d' <i>Haslea ostrearia</i> .	189
Figure IV-12	Courbes de croissance d' <i>Haslea ostrearia</i> cultivées sur milieu artificiel avec ou sans ajout de marennine externe ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et avec ou sans ajout de cuivre ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$)..	190

Liste des abréviations

A.I.E.A. : Agence Internationale de l'Énergie Atomique

B.R.G.M. : Bureau des Recherches Géologiques et Minières

D.A.M. : Diatom Artificial Medium

E.D.T.A. : Ethylene DiaminoTétracétique Acid

Ifremer : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER

I.N.R.S. : Institut National de Recherche et de Sécurité

I.N.E.R.I.S. : Institut National de l'Environnement industriel et des RISques

R.N.O. : Réseau National d'Observation (Ifremer)

SMIDAP : Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche des Pays de la Loire

Introduction générale

En aquaculture, le nourrissage d'organismes aquatiques (zooplancton, bivalves, crustacés et certains poissons) est réalisé essentiellement à partir de cultures d'algues réalisées *in situ*. Ces cultures sont le plus souvent distribuées dans les bassins de grossissement directement en fin de croissance algale, mais les cellules peuvent être dans certaines conditions séparées de leur milieu et compactées sous forme de pâte qui est ensuite distribuée fraîche ou séchée. En dehors de l'aquaculture, des molécules extraites de certaines algues représentent un intérêt économique soutenu par de nombreuses applications en pharmacologie, en agro-alimentaire ou en cosmétologie. D'autres propriétés des algues sont exploitées pour l'épuration, la production de certaines énergies ou la remise en état de certains écosystèmes (Muller-Feuga, 2000). Les espèces algales sont choisies en fonction de l'application souhaitée pour ces cultures. Dans l'aquaculture, les caractéristiques retenues tiendront compte de la taille, de la digestibilité et de la valeur nutritionnelle de l'algue. La valeur nutritionnelle de l'algue dépend essentiellement de sa composition en protéines, en glucides et en acides gras. En pharmacologie ou en agro-alimentaire, l'extraction d'un composé spécifique (acides gras, pigments...) peut être la cible principale de la production de ces cultures, dans le respect des normes sanitaires ou alimentaires. La photopériode et l'intensité de l'éclairage, la température et la salinité, l'apport en nutriments ou en oligo-éléments (incluant les métaux) peuvent influencer la qualité des microalgues (Brown *et al.*, 1989). Le milieu de culture a donc un rôle important dans la qualité et le rendement des cultures algales. En mariculture, le milieu le plus utilisé pour ces cultures est à base d'eau de mer enrichie selon les travaux de Guillard (1982) : le milieu f/2. Borowitzka (1999) précise que dans la plupart des concessions aquacoles, les cultures d'algues représentent 30% du coût total de production. Il semble donc intéressant dans le cadre d'une meilleure rentabilité économique de ces exploitations de tenter de produire la meilleure qualité d'algue possible (culture fraîche ou pâte) à partir d'un milieu de culture à moindre coût.

Dans cette optique, la découverte, il y a 25 ans, d'une nappe captive d'eau souterraine salée peu profonde au niveau du marais Breton a permis, grâce à ses caractéristiques proches de celles de l'eau de mer et à sa richesse en nutriments majeurs et en oligo-éléments, un essor de l'aquaculture et notamment de l'ostréiculture dans la baie de Bourgneuf (Corlay et Le Rhun, 1986; Baud et Bacher, 1990; Baud *et al.*, 1991; Bacher et Baud, 1992). Dans cette région, l'algue la plus cultivée est la diatomée *Skeletonema costatum* (Barillé *et al.*, 2003).

Parallèlement à ces cultures d'algues en aquaculture, dans les claires ostréicoles du sud de la baie de Bourgneuf et autour de la baie de Marennes Oléron, des pics de développement naturel de la diatomée *Haslea ostrearia* sont observés et produisent un « verdissement » de la claire. Les huîtres affinées dans ces claires possèdent des branchies verdies par la marennine, le pigment produit par *H. ostrearia* (Ranson, 1937). Ce phénomène est difficile à contrôler ; le verdissement des branchies d'huîtres est pourtant intéressant puisque cela donne un intérêt économique supplémentaire à l'huître. C'est pourquoi la diatomée *Haslea ostrearia*, peu utilisée en aquaculture, a été cultivée sur les eaux souterraines salées dans la région de la baie de Bourgneuf pour verdir dans des conditions contrôlées des huîtres nommées « Huîtres Emeraudes © ». Ce concept a été développé au sein de l'entreprise SOPROMA à Bouin (actuellement en cessation d'activité).

Les eaux souterraines salées jouent donc un rôle important dans l'économie de la zone de la baie de Bourgneuf. Cependant, ces eaux sont riches en éléments traces et les travaux de thèse de Moreau (1996) mettent en avant leurs concentrations élevées en fer et en manganèse, mais également en cuivre et en zinc (de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$). Depuis, des études pilotées par la région Pays de la Loire (via le Syndicat MIXte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche des Pays de la Loire, SMIDAP) ont mis en évidence une accumulation potentielle de métaux dans les algues cultivées sur les eaux souterraines salées dans des proportions supérieures aux normes alimentaires autorisées ; ce fut le cas notamment en ce qui concerne le plomb (SMIDAP, comm. pers.) dans les cultures d'*H. ostrearia*. Les concentrations en plomb dans les eaux souterraines salées n'ont pas été déterminées dans les travaux précédents notamment à cause des limites de détection des méthodes spectrométriques de flamme ou de four dans de tels échantillons.

Il nous a donc paru intéressant de faire le point sur les concentrations en certains métaux dans les eaux souterraines salées ainsi que sur le comportement de ceux-ci dans l'eau et vis-à-vis des algues. Deux métaux essentiels, le cuivre et le zinc, ont été ciblés car ils sont présents en concentrations relativement élevées dans les eaux souterraines salées et ont un impact sur la croissance et le métabolisme des cellules algales quand ils sont présents en excès (Jensen *et al.*, 1974; Stauber et Florence, 1989; Giri et Chowdary, 1992). Deux métaux non essentiels, le cadmium et le plomb, ont été choisis par ailleurs. Le cadmium a un comportement dans les eaux salées très différent des trois autres métaux car il est présent essentiellement sous une forme libre ou facilement dissociable (Turner *et al.*, 1981; Millero et Hawke, 1992) et il est un compétiteur du zinc (Price et Morel, 1990). En outre, de nombreux travaux traitent du

problème du cadmium dans le transfert trophique algues / bivalves étant donné son occurrence dans des écosystèmes conchylicoles tels que la baie de Marennes-Oléron. Quant au plomb, il nous a paru intéressant de déterminer un ordre de grandeur de sa concentration dans les eaux souterraines salées et d'estimer sa biodisponibilité pour les algues. Les modèles d'algues pour ce travail ont été choisis en fonction de leur utilisation en aquaculture et en fonction de leur comportement, précédemment décrit dans la littérature, quand elles sont cultivées dans un milieu enrichi en métaux.

L'objectif principal de la thèse est l'étude du comportement de certains métaux traces (Cd, Cu, Pb, Zn) dans les milieux de cultures d'algues, notamment les eaux souterraines salées. Les travaux de cette thèse sont présentés dans ce manuscrit en quatre parties.

- Le premier chapitre est consacré à un état des connaissances autour de cette problématique. La présentation des eaux souterraines salées, leur origine et leurs caractéristiques, était nécessaire à la compréhension des comportements des métaux dans ces eaux. Dans une partie focalisée sur les métaux, sont exposés les caractéristiques générales des quatre métaux ainsi que les principes de spéciation des métaux et des phénomènes de complexation dans les milieux aquatiques. Pour terminer, les quatre algues sont présentées de façon à mettre en avant leurs différences et leur intérêt ; des notions de transfert trophique sont abordées.
- Dans le second chapitre, est exposée l'étude sur deux eaux souterraines salées provenant de forages dans le Marais Breton. Une comparaison est établie avec l'eau de mer côtière. Cette étude porte d'une part sur les concentrations en métaux et leur apparente biodisponibilité et d'autre part sur les cultures d'algues réalisées sur ces eaux.
- Le troisième chapitre rassemble les différentes expérimentations réalisées sur les eaux souterraines salées et l'eau de mer pour déterminer les propriétés complexantes de ces eaux et l'impact d'ajout de métaux dans différentes conditions sur les cultures d'algues.
- Pour tenter de répondre à des interrogations soulevées dans le cadre des expériences réalisées sur le milieu naturel, l'utilisation d'un milieu artificiel a permis de réaliser des expériences en conditions contrôlées sur des cultures d'algues. Dans un quatrième chapitre, sont exposées tout d'abord la mise au

point du milieu artificiel DAM, destiné à la culture d'*H. ostrearia* mais aussi utilisé pour d'autres microalgues, puis les expériences réalisées en conditions contrôlées.

Dans une partie « conclusions générales et perspectives », les principales conclusions de ce travail sont synthétisées. A la suite de ce bilan, des idées sont proposées pour approfondir les connaissances sur la spéciation des métaux dans les milieux étudiés et sur les processus d'assimilation des métaux au niveau des organismes.

Chapitre I Etude bibliographique

I-1 Les eaux souterraines salées

I-1.1 Présentation générale des eaux souterraines

I-1.1.a Les eaux souterraines dans la répartition de la réserve d'eau du globe

Les eaux souterraines représentent un faible pourcentage de la réserve d'eau du globe : moins de 1% d'après Schöeller (1962), 1,69% dont 55% serait des nappes d'eaux plus ou moins salées d'après Gleick (1993) (Tableau I-1). Plus de la moitié de l'eau souterraine se trouve à plus de 800 mètres de profondeur et donc par conséquent, difficile à exploiter (Musy, 2003).

Tableau I-1 Répartition de la réserve d'eau du globe dans les différents compartiments (d'après Gleick, 1993)

Réservoir	Fraction des réserves totales d'eau [%]	Fraction des réserves d'eau douce [%]
Eaux océaniques	96,5379	
Eaux souterraines totales	1,6883	
Nappes d'eau salée	0,9274	
Nappes d'eau douce	0,7597	30,0606
Eau du sol	0,0012	0,0471
Glaciers et couverture neigeuse permanente	1,7362	68,6972
Permafrost	0,0216	0,8564
Réserves d'eau dans les lacs	0,0127	
Marais	0,0008	0,0327
Rivières	0,0002	0,0061
Eau biologique	0,0001	0,0032
Eau atmosphérique	0,0009	0,0368
Réserves totales	100	
Réserves d'eau douce	2,5	100

I-1.1.b Définition de l'eau souterraine et des différents types de nappes

Une nappe d'eau souterraine est l'ensemble de l'eau présente dans la zone saturée d'un aquifère dont toutes les parties sont en liaison hydraulique. Le terme *aquifère* est défini dans le dictionnaire par « une formation rocheuse perméable ou constitué d'un matériau meuble dans laquelle l'eau peut circuler et former une nappe, par extension cette nappe d'eau » (Petit Larousse, 2003). Les matériaux perméables contiennent des interstices, des fissures ou des vides de dissolution (roches calcaires principalement) suffisamment grands et nombreux pour laisser l'eau circuler librement (Schöeller, 1962 ; Banton et Bangoy, 1997) (Figure I-1).

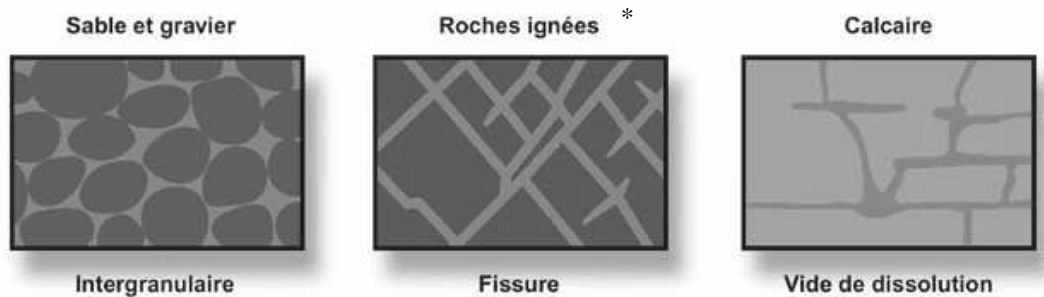


Figure I-1 Principaux types de porosité des aquifères (*roches ignées : résultant de la consolidation d'un liquide en fusion) (source : La Voie Verte, site WEB d'Environnement Canada : http://www.ec.gc.ca/water/fr/nature/grdwtr/f_gdwtr.htm)

Plusieurs classifications des nappes coexistent en fonction du cadre géologique ou hydrodynamique (Schöeller, 1962 ; Banton et Bangoy, 1997) :

- i. Cadre géologique selon la porosité et la perméabilité. La porosité totale est la quantité d'eau retenue par unité de roche saturée (elle est mesurée en pourcentage de roche totale). La porosité efficace correspond au volume d'eau qui peut s'écouler d'un matériau sous le seul effet de la gravité. Le contenu en eau dans le matériau détermine sa capacité de rétention. La conductivité hydraulique caractérise la perméabilité de la roche qui correspond à sa faculté à laisser circuler l'eau. La conductivité hydraulique est une vitesse ($m.s^{-1}$) égale au coefficient de proportionnalité K de la loi de Darcy calculé en fonction de la perméabilité intrinsèque du matériau, de la viscosité et de la masse volumique. En fonction des aquifères, la porosité et la perméabilité (Tableau I-2) vont varier ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques. On distinguera des nappes de perméabilité d'interstices, d'interstices et de fissures, de fissures et de chenaux, de fissures ou de réseaux de failles.

Tableau I-2 Valeurs typiques de porosité (totale et efficace) et de conductivité hydraulique pour différentes roches (d'après Banton et Bangoy, 1997).

En gras, sont notés les différents matériaux constituant la nappe d'eau souterraine salée du Marais Breton, objet de notre étude.

Roche	Porosité totale %	Porosité efficace %	Conductivité hydraulique K (m.s ⁻¹)
<u>Matériaux non consolidés selon leur texture</u>			
gravier	25-35	20-30	10 ⁻³ -1
sable grossier	25-35	20-30	10 ⁻⁴ -10 ⁻¹
sable moyen	30-40	25-35	10⁻⁵-10⁻²
sable fin	30-40	25-35	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴
sable limoneux	35-45	25-35	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁴
limon	35-45	15-25	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
limon argileux	45-55	5-10	10 ⁻¹¹ -10 ⁻⁸
argile	45-55	0-5	10⁻¹²-10⁻⁹
tourbe	60-80	45-70	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴
<u>Matériaux non consolidés selon leur origine</u>			
sable éolien	30-40	30-40	10 ⁻⁵ -10 ⁻²
loess	35-45	20-30	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
till glaciaire sableux	10-20	5-20	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁴
till glaciaire argileux	10-20	0-10	10 ⁻¹² -10 ⁻⁸
<u>Roches sédimentaires détritiques consolidées</u>			
grès	0-10	0-5	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁸
grès fissuré	10-20	5-10	10⁻⁹-10⁻⁷
grès décimenté	20-30	5-25	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵
marne	0-10	0-5	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁸
schistes	0-20	0-15	10 ⁻¹³ -10 ⁻⁹
<u>Roches carbonatées</u>			
roche massive	0-5	0-5	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁶
roche litée	5-15	5-10	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁴
craie	10-30	0-5	10 ⁻⁷ -10 ⁻³
roche fissurée	5-15	0-10	10⁻⁹-10⁻⁶
roche karstifiée	10-50	10-50	10 ⁻⁶ -10
<u>Roches cristallines (métamorphisées ou non)</u>			
roche non fissurée	<1	<1	10 ⁻¹⁴ -10 ⁻¹⁰
roche fissurée	0-5	<1	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁷
roche fracturée	5-10	0-10	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵
roche altérée	30-50	10-30	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴
<u>Roches volcaniques</u>			
basalte massif	0-5	0-5	10 ⁻¹¹ -10 ⁻⁶
basalte fissuré	10-20	5-15	10 ⁻⁶ -10 ⁻²
basalte altéré	20-35	10-30	10 ⁻⁴ -10 ⁻²
tuf	15-40	5-30	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁷

ii. Cadre géologique selon la nature du terrain

Dans les matériaux géologiques, deux types sont différenciés : les formations sédimentaires et les roches ignées (résultant de la consolidation de liquide en fusion) qui regroupent les formations intrusives (granite) et volcaniques (basalte). Les roches ignées sont plus présentes sur terre que les formations sédimentaires. Cependant, les formations sédimentaires sont plus étalées sur la croûte terrestre et sont, de part leurs propriétés, de meilleurs aquifères que les roches ignées. (Banton et Bangoy, 1997).

Les roches ignées sont principalement constituées d'oxygène (50%), de silicium (26%), d'aluminium (7,3%), de fer (4,1%), de calcium (3,2), de sodium (2,3%), de potassium (2,3%) et de magnésium (2,3%). Les principales réactions chimiques dans les roches ignées concernent donc les silicates et les oxydes de fer (Banton et Bangoy, 1997).

Dans les formations sédimentaires, deux types sont distingués : les formations sédimentaires détritiques (grès et argiles) et les formations sédimentaires organiques (calcaires). Les grès sont dominés par les silicates et les oxydes alors que les argiles sont caractérisées par les silicates et les échanges ioniques. Les formations sédimentaires organiques sont constituées de matériaux carbonatés calcaires et sont donc dominées par les équilibres carbonatés. (Banton et Bangoy, 1997)

iii. Cadre hydrodynamique

On distinguera les nappes libres, captives et semi-captives. L'aquifère est limité dans sa partie inférieure par une roche imperméable qui forme le substratum et dans sa partie supérieure par le toit qui peut être perméable (cas des nappes libres) ou imperméable (cas des nappes captives) (Figure I-2). Quand la roche sus-jacente est moins perméable que l'aquifère mais ne peut pas être considérée comme imperméable, ce sont des nappes semi-captives.

Dans le cas d'une nappe libre, la zone de saturation est la zone inférieure de l'aquifère dont tous les interstices sont saturés en eau. Cette eau est l'eau souterraine. Au dessus se situe la zone d'aération dans laquelle un mélange d'air et d'eau comble les interstices. Cette eau est l'humidité du sol. La nappe est réalimentée par la percolation de l'eau des précipitations et des cours d'eau et/ou l'invasion d'eau marine.

Le niveau piézométrique est le niveau où la pression exercée sur l'eau est égale à la pression atmosphérique. Dans le cas d'une nappe libre, le niveau piézométrique est égal au niveau supérieur de la nappe qui peut varier.

Dans le cas de nappes captives, étant donné le toit imperméable, la réalimentation en eau douce ou salée de la nappe s'effectue au niveau de zones de recharge. Dans ces zones, la nappe est généralement libre ou semi-captive. Le niveau piézométrique des nappes captives est plus élevé que le niveau supérieur de la nappe qui, lui, ne varie pas.

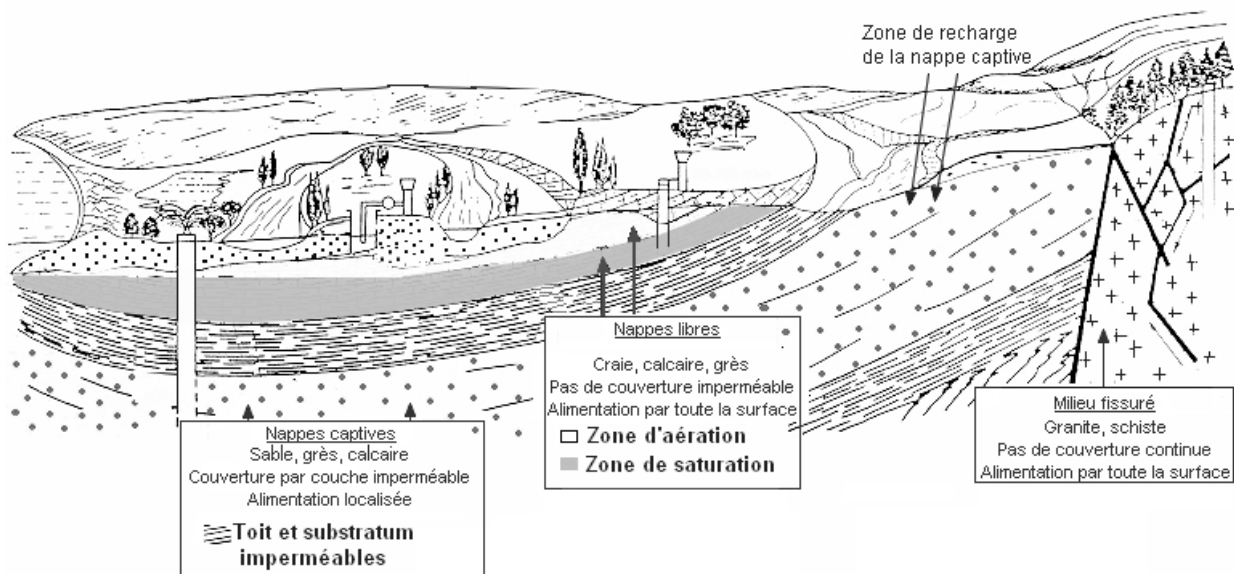


Figure I-2 Schéma représentant les nappes libres et captives (modifié, source : le BRGM, <http://www.brgm.fr/brgm//divers/nappes.htm>)

I-1.1.c Caractéristiques physico-chimiques des eaux souterraines

La composition des eaux naturelles et donc des eaux souterraines dépend de phénomènes biologiques (production, consommation et décomposition des organismes vivants), chimiques (l'altération des roches et la précipitation des minéraux) et physiques.

La température des eaux souterraines

La température des eaux souterraines dépend de la température du sol puisque les eaux tendent vers l'équilibre thermique avec le sol. Deux sources de chaleur principales sont à

considérer : la chaleur solaire et la géothermie. Deux zones dans le sol peuvent être distinguées (Schöeller, 1962) :

- une zone d'hétérothermie superficielle qui varie au fil du jour et des saisons en fonction de l'altitude, la latitude, la nature du sol, l'exposition du relief, la végétation et les précipitations (pluie, neige). Ces variations de température peuvent être ressenties jusqu'à 40 m de profondeur.
- une zone d'homothermie qui est traversée par les ondes de chaleur provenant de l'intérieur de la terre. Ce flux de chaleur est moins important que le flux solaire. Dans cette zone, la température est stable avec une oscillation de $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A ces sources principales de chaleur, s'ajoutent des sources secondaires telles que les réactions chimiques endo- ou exothermiques, les frottements et l'expansion de l'eau. Avec la variation de toutes les sources de chaleur, les eaux souterraines peuvent présenter des températures allant des sources froides (0° à 20°) aux sources hyperthermales (à partir de $35-45^{\circ}\text{C}$) suivant les classifications citées par Schöeller (1962). Bodelle et Margat (1980) précisent que la température de l'eau souterraine s'élève de 1°C quand on descend de 30 mètres dans un forage.

Le pH et l'alcalinité des eaux souterraines salées

Le pH caractérise la concentration en ions H^+ libres dans la solution. Le pH de l'eau souterraine est lié à la température, à la force ionique et au pouvoir tampon conféré par la présence des espèces essentiellement carbonatées. Il est maintenu dans les eaux souterraines à une valeur constante (entre 6 et 9 suivant les eaux) (Sigg *et al.*, 1992). La solubilité des oxydes, des carbonates et des silicates dépend du pH et ces minéraux participent également à l'équilibre acido-basique de l'eau. L'alcalinité de l'eau qui est la traduction de la capacité de l'eau considérée à neutraliser des acides est définie par les équations (Sigg *et al.*, 1992) :

$$\text{Alcalinité} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{OH}^-] + [\text{B}(\text{OH})_4^-] + [\text{NH}_3] - [\text{H}^+]$$

$$\text{Alcalinité} = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + 2[\text{Ca}^{2+}] + 2[\text{Mg}^{2+}] + 2[\text{Sr}^{2+}] - [\text{Cl}^-] - [\text{Br}^-] - [\text{F}^-] - 2[\text{SO}_4^{2-}] - [\text{NO}_3^-]$$

Ces équations montrent la dépendance de l'alcalinité aux concentrations en cations qui font augmenter sa valeur et en anions qui la diminuent. Ces équations soulignent également l'importance du rôle tampon des carbonates dans les eaux souterraines.

L'altération des roches : source des éléments contenus dans les eaux souterraines

La composition chimique des eaux souterraines dépend des phénomènes de dissolution et d'attaque chimique des substances contenues dans les aquifères. Par altération des roches, les minéraux vont être dissous et être la source de différents éléments enrichissant l'eau souterraine (Tableau I-3). Par ailleurs, les gaz présents dans les zones non saturées en eau sont susceptibles de se trouver en contact avec les eaux souterraines et d'être dissous : N₂, Ar, O₂, H₂, He, CO₂, NH₃ et CH₄ (Schöeller, 1962).

Tableau I-3 Exemples de réactions de dissolution de certains minéraux avec l'eau (d'après Lameyre, 1975 et Sigg *et al.*, 1992)

Anhydrite					
CaSO ₄			⇔	Ca ²⁺	+ SO ₄ ²⁻
Calcite					
CaCO ₃	+ H ₂ O		⇔	Ca ²⁺	+ HCO ₃ ⁻ + OH ⁻
CaCO ₃	+ H ₂ O	+ H ₂ CO ₃	⇔	Ca ²⁺	+ 2 HCO ₃ ⁻
Dolomite					
CaMg(CO ₃) ₂	+ 2 H ₂ O		⇔	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	+ 2 HCO ₃ ⁻ + 2 OH ⁻
Feldspath					
NaAlSi ₃ O ₈ (Plagioclase)	+ 5,5 H ₂ O		⇔	Na ⁺	+ OH ⁻ + 2 H ₄ SiO ₄ + Kaolinite Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄
NaAlSi ₃ O ₈ (Plagioclase)	+ 4,5 H ₂ O	+ H ₂ CO ₃	⇔	Na ⁺	+ HCO ₃ ⁻ + 2 H ₄ SiO ₄ + Kaolinite Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄
5 KAlSi ₃ O ₈ (Orthose)	+ 20 H ₂ O		⇔	4 K ⁺	+ 4 OH ⁻ + 8 H ₄ SiO ₄ + Illite (K,H ₃ O)Al ₂ (Si ₃ Al)O ₁₀ (H ₂ O,OH) ₂
KAlSi ₃ O ₈ (Orthose)	+ 8 H ₂ O		⇔	K ⁺	+ OH ⁻ + 3 H ₄ SiO ₄ + Gibbsite Al(OH) ₃
Micas					
3 K(Mg, Fe)3AlSi ₃ O ₁₀ (OH) ₂ (Biotite)	+ SiO ₂ (quartz)		⇔	Orthose + 3 (Mg,Fe) ₂ Si ₂ O ₆	+ 2 H ₂ O
2 KAl ₂ AlSi ₃ O ₁₀ (OH) ₂ (Muscovite)	+ SiO ₂ (quartz)		⇔	Orthose + Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	+ H ₂ O

Les formations géologiques retrouvées au niveau de Bouin (notre site d'étude décrit dans la partie suivante) ont été décrites dans la carte géologique de la baie de Bourgneuf réalisée par le BRGM (Machecoul XI-24, 1979) et listées ci-dessous :

- A la surface, des alluvions marines déposées lors de la dernière transgression (le « bri » composé d'argiles) comprennent des phyllosilicates : illite, kaolinite, montmorillonite et chlorite. Ces argiles vont apporter à l'eau de l'acide silicique et des éléments tels que l'aluminium, le calcium, le fer, le magnésium, le manganèse, le potassium et le sodium.
- Sous le bri, se trouvent des calcaires sableux et dolomitiques avec à certains endroits des sables et des dalles de grès siliceux. Ils vont apporter majoritairement de la silice et des carbonates. La matrice sableuse comporte des grains de quartz limpides, apparemment très altérés mais également des oxydes de fer, de l'opale et de la calcédoine (sources de silice). Au niveau de Bouin, ce sont des dalles de calcaire éocène glauconieux.

- Sous le calcaire, se trouve le socle composé de micaschistes à muscovite albitique ou non, avec ou sans grenat. La muscovite est un des minéraux les plus fréquents dans le mica blanc ; elle est source de potassium, d'aluminium et de silice. La muscovite est abondante dans les micaschistes du socle du marais Breton et la biotite primaire est très fine et rétrotransformée en chlorite ((Mg, Al, Fe)₆(Si, Al)₄O₁₀(OH)₈).

Les différents minéraux présents dans les roches vont donc apporter par des processus d'altération les éléments présents dans l'eau souterraine ce qui explique son enrichissement en certains éléments tels que le fer ou le manganèse.

L'altération des roches par attaque chimique repose sur plusieurs processus.

- L'hydratation, pénétration de l'eau dans les cristaux. Elle consiste en une perte de la cohésion des roches.
- L'hydrolyse, réaction importante dans l'attaque des silicates. Les éléments concernés par ce phénomène sont principalement les bases fortes. C'est la réaction d'un corps qui fixe les molécules d'eau et donne de nouveaux composants.
- Les réactions d'oxydoréduction. Les réactions d'oxydation concernent essentiellement les sulfures, les oxydes, les ions ferreux et manganés et les matières organiques contenues dans certains terrains (ex. tourbes). Les réactions de réduction sont présentes dans des aquifères avec un faible apport d'oxygène dissous. Dans ce cas, ce sont des oxydes, des sulfates, des nitrates et des nitrites qui sont réduits et produisent H₂, H₂S et CH₄, puis S, NO₂⁻, NH₄⁺, Fe²⁺ et Mn²⁺.
- Les attaques acides *via* le dioxyde de carbone, l'acide nitrique, l'acide nitreux, l'acide sulfurique et les acides organiques (issus de la décomposition des matières végétales).

Les particules organiques et inorganiques dans les eaux souterraines : les colloïdes

Les colloïdes sont des particules organiques ou inorganiques avec une structure et des propriétés supramoléculaires (changements conformationnels ou existence d'un champ électrique de surface).

Ces particules restent en suspension pendant un délai relativement long en absence d'agrégation. Ces particules ont une taille comprise entre 1 nm et 1 µm (Figure I-3). (Buffle, 2006 ; Lead et Wilkinson, 2006)

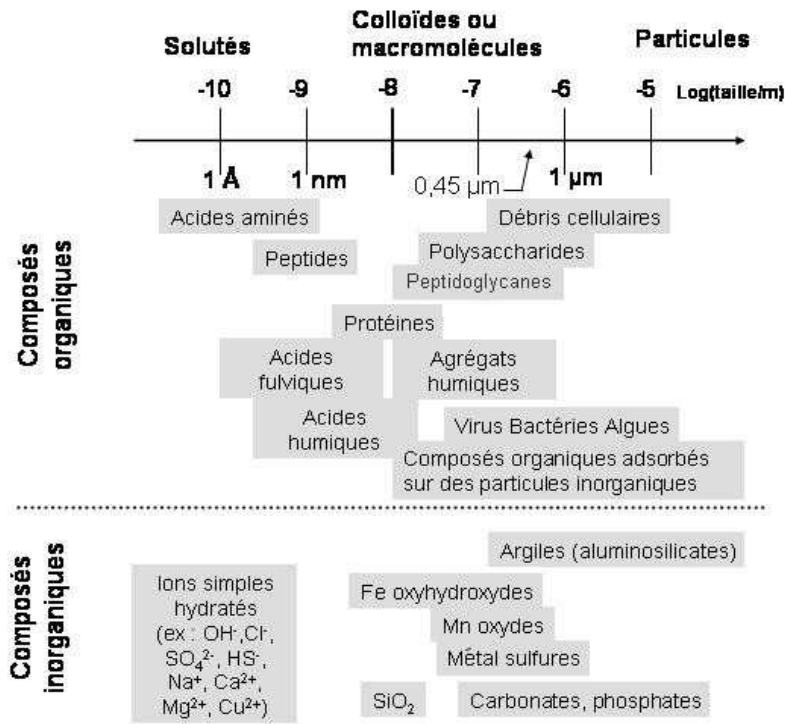


Figure I-3 Distributions des tailles des colloïdes et des particules présents dans les eaux (d'après Lead et Wilkinson, 2006)

La matière organique provient essentiellement de la dégradation du matériel biologique. Cette matière organique est présente dans les eaux des premières couches du sol. Ensuite, les matériaux traversés servent de filtre et retiennent ces particules. De plus, l'absence de lumière dans les aquifères y limite la production de matière organique. La présence de certaines bactéries est néanmoins notée et est importante dans les réactions d'oxydoréduction du fer et du manganèse (Lovley, 1991).

Les particules inorganiques dans les eaux souterraines sont des minéraux argileux, des oxydes et des hydroxydes (de Fe, Al, Mn) et des carbonates. En milieu aqueux, les oxydes présentent des surfaces hydratées qui sont le site de réactions chimiques. Ces sites sont amphotères : fixation des cations (Al³⁺, Fe³⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺) pour des valeurs de pH élevées ou adsorption d'anions (HPO₄²⁻, SO₄²⁻, B(OH)₄⁻, HCO₃⁻, F⁻) pour des valeurs de pH plus faibles (Sigg *et al.*, 1992). Les colloïdes vont donc jouer un rôle important dans la disponibilité des nutriments et la spéciation des métaux dans les eaux souterraines.

Les métaux traces dans les eaux souterraines

Comme il a été cité auparavant, les métaux présents dans les eaux souterraines comme le fer et le manganèse proviennent de l'altération de certaines roches. Les activités anthropiques influent sur les cycles biogéochimiques des métaux et sont une source potentielle d'augmentation des concentrations métalliques dans les eaux souterraines (Sigg *et al.*, 1992).

Les métaux sont présents dans les eaux souterraines sous forme hydratée ou associés aux différents éléments présents dans l'eau souterraine (oxydes, carbonates, ions chlorures...). Ces associations, ou dans certains cas les complexes, vont influencer la biodisponibilité des métaux. L'étude de la spéciation des métaux est présentée dans le paragraphe I-2 consacré aux métaux considérés dans cette étude.

I-1.1.d Les eaux souterraines salées

Les eaux souterraines salées peuvent être des intrusions d'eau marine dans des aquifères d'eau douce ou peuvent correspondre à des nappes d'eau de mer emprisonnée dans des sédiments perméables lors des transgressions marines passées. Ces dernières sont des nappes captives, qualifiées d'eaux fossiles parce qu'elles stagnent depuis un temps relativement long. Ces eaux sont en équilibre avec les roches constituant l'aquifère (Schöeller, 1962).

Des nappes d'eau souterraine salée issues de l'intrusion d'eaux marines dans un aquifère ou des nappes d'eaux fossiles emprisonnées sont très répandues sur les côtes de différents pays à travers le monde : Australie, Canada, Chine, Egypte, Etats-Unis d'Amérique, Inde, Indonésie, Israël, Japon, Maroc, Mexique, Philippines et plusieurs pays d'Europe (d'après Moreau, 1996). Quand ces eaux souterraines salées sont issues de l'intrusion d'eaux marines, cela pose en général un problème par rapport à la source en eau douce et potable. Quelques forages sont toutefois exploités pour les propriétés thermiques des eaux souterraines dans les circuits de refroidissement des industries ou de réchauffement en aquaculture, mais aussi en tant que source d'eau pour l'irrigation de cultures adaptées (eucalyptus, riz, exploitation de bois tropical) ou pour l'aquaculture (culture de microalgues, élevage de crevettes, piscicultures) (d'après Moreau, 1996).

I-1.2 Les eaux souterraines salées des marais le long de la baie de Bourgneuf (Loire-Atlantique et Vendée, France)

I-1.2.a Contexte géographique, géologique et socio-économique

La Baie de Bourgneuf est située au sud de l'estuaire de la Loire entre la Pointe de Saint Gildas et l'île de Noirmoutier, sur une surface de 340 km² (Haure et Baud, 1995).

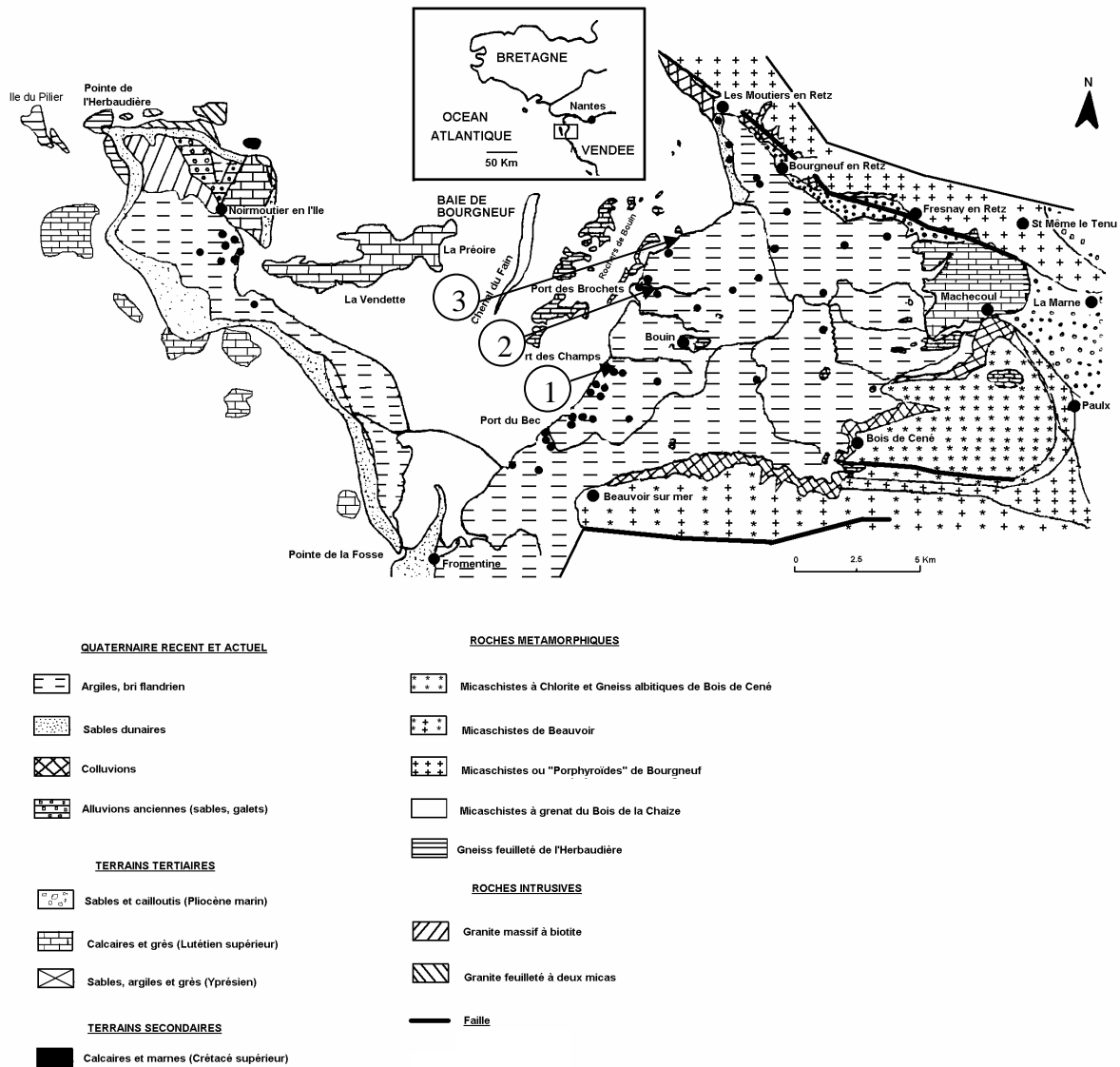


Figure I-4 Carte géologique simplifiée du Marais Breton et de la baie de Bourgneuf et localisation des forages (●) (dans Moreau, 1996).

1 : forage de la Station Ifremer Bouin, Polder Nord du Dain, 2 : forage de la concession aquacole de F. Taraud, 3 : site de la Coupelasse

A l'est de la baie, se situe le Marais Breton qui est une marge continentale très ancienne. A l'ère tertiaire, une zone affaissée dans le socle primaire existe déjà. Des dépôts de calcaires gréseux et de sables calcaires se forment pendant l'Éocène (ère Tertiaire, -55 à -37 millions d'années). Au Pliocène (ère Tertiaire, -5 à -2 millions d'années), la mer apporte des sables qui se disposent autour des marais en formant une ceinture. La dernière invasion marine a lieu pendant la transgression flandrienne à l'Holocène récent (il y a donc moins de 12 000 ans). Le Marais Breton est bordé par un plateau constitué de roches primaires métamorphiques (Corlay et Le Rhun, 1986). Une carte géologique simplifiée de cette zone est présentée Figure I-4.

Le Marais Breton a été le site de diverses activités économiques dont l'évolution historique a suivi les contraintes environnementales (envasement, tempêtes et inondations) mais aussi politiques puisqu'il se situait entre la Bretagne et la Vendée (dépendant du Royaume de France). Les marais salants qui avaient été développés dans cette zone ne fonctionnent quasiment plus sauf sur l'île de Noirmoutier. Les bassins réalisés pour ces marais salants ont ensuite servi à l'aquaculture (claires ostréicoles, aquaculture nouvelle). L'agriculture et la pêche côtière sont aussi des activités développées dans cette zone. Le tourisme a également été un axe de développement économique pour cette région (La côte de Jade, secteur de Pornic). (Corlay et Le Rhun, 1986; Clément, 1987)

I-1.2.b Découverte et caractéristiques des eaux souterraines salées dans le Marais Breton

Des études hydrologiques réalisées dans cette zone ont abouti à la découverte dans le début des années 1980 de l'existence d'une nappe d'eau souterraine salée située dans les calcaires éocènes ou les sables éocènes et pliocènes, sous les argiles flandriennes. Elle est limitée par un socle imperméable (schistes ou granite) et un toit imperméable (le « bri » flandrien). Le « bri » flandrien est dû à un dépôt, lors de l'Holocène, d'une vase fine marine à *Scrobicularia*. Ce sédiment argileux, bleu-gris à verdâtre, est peu perméable et riche en quartz, feldspaths, calcite, illite, kaolinite et montmorillonite. Cette nappe captive se situe à une faible profondeur (10 à 20m) et son niveau piézométrique est proche du sol (-1m). La nappe contient en partie des eaux fossiles emprisonnées lors des transgressions marines. La recharge de la nappe s'effectue à l'est du marais par l'infiltration des eaux de pluie et à l'ouest par l'invasion d'eaux marines (Figure I-5). L'eau souterraine possède des caractéristiques liées aux eaux fossiles, aux eaux continentales et aux eaux marines qui alimentent l'aquifère et avec lequel elles interagissent. Les calcaires apportent du calcium, du magnésium et des

carbonates et les roches du socle et du toit sont la source de silicates, de magnésium, d'azote ammoniacal dissous et de fer (Moreau, 1996).

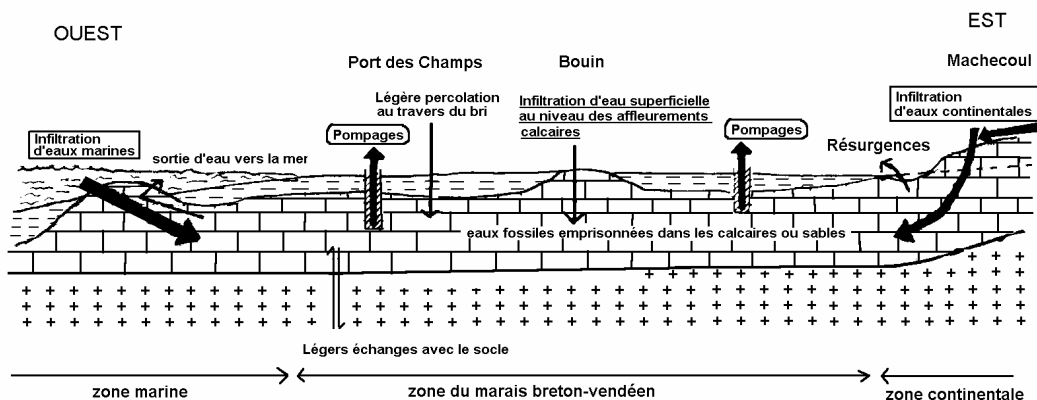


Figure I-5 Schéma de la circulation de l'eau, sur une radiale Ouest-Est, dans l'aquifère du marais de Bouin (dans Moreau, 1996)

Des recherches ont ensuite été menées par Ifremer, le BRGM (Bureau des Recherches Géologiques et Minières) et le service hydrogéologique départemental de la Vendée pour déterminer les ressources en eau souterraine salée et pour mettre ces ressources au service de l'aquaculture. Plusieurs forages ont été réalisés et ont permis de montrer des débits exploitables importants ($500 \text{ m}^3/\text{h}$) et des caractéristiques physico-chimiques intéressantes et variables d'un forage à l'autre. La salinité de ces eaux souterraines est proche de celle de l'eau de mer et leur température est constante autour de $14,5^\circ\text{C}$ toute l'année. Ces eaux sont également riches en éléments nutritifs (azote, phosphore, silice) et en fer dissous. Ces eaux sont néanmoins pauvres en oxygène dissous et sont chargées en azote sous forme ammoniacale. Une grande limpidité est observée et traduit la faible concentration en particules inorganiques et organiques dans ces eaux. (Bresson, 1988)

Une partie des travaux de thèse de Moreau (1996) a porté sur l'échantillonnage d'eaux provenant de 47 forages et l'analyse physico-chimique de ces eaux pour évaluer la variabilité de la composition de ces eaux sur une échelle spatiale et temporelle. Les intervalles de valeurs des variables physico-chimiques mesurées pour les eaux souterraines salées sont présentés dans le Tableau I-4, ainsi que la valeur médiane.

Tableau I-4 Qualité physico-chimique des eaux souterraines salées pompées dans le marais de Bouin : gamme des valeurs déterminées et valeur médiane pour les 47 forages échantillonnés dans l'étude de Moreau (1996) (N org : azote organique, P org : phosphore organique)

	Température (°C)	Salinité	pH	HCO ₃ ⁻ (mmol.L ⁻¹)	NH ₃ +NH ₄ ⁺ (μmol.L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻ (μmol.L ⁻¹)	N org (μmol.L ⁻¹)
Gamme des valeurs	12,7-14,5	5-37	6,8-8,5	3,05-14,22	4-9355	0-100	0-109
Médiane	13,6	31,5	7,1	8,89	322	2	27

	PO ₄ ²⁻ (μmol.L ⁻¹)	P org (μmol.L ⁻¹)	Si(OH) ₄ (μmol.L ⁻¹)	Cu total (μg.L ⁻¹)	Fe total (μg.L ⁻¹)	Mn total (μg.L ⁻¹)	Zn total (μg.L ⁻¹)
Gamme des valeurs	0-110	0-23	12-726	0-23,4	0-11,98	0,21-8,2	0,9-53,5
Médiane	20	3	247	1,7	2,28	0,73	4,1

La température la plus faible a été notée au niveau des forages situés sur l'île de Noirmoutier et cela a été relié à l'effondrement du « bri » superficiel pendant l'hiver 1991-1992 lors d'un trop fort pompage au niveau de plusieurs forages (Moreau, 1996). Pour les autres forages échantillonnés, la température se situait entre 13 et 14,5°C. Toutes les eaux échantillonnées dans cette étude peuvent être classées dans les eaux salées sauf une eau provenant d'un forage situé au nord du marais qui est classée dans les eaux saumâtres avec une salinité de 5. Les salinités mesurées dans les eaux provenant du polder du Dain, du Port des Champs et du Port du Bec sont proches de celle de l'eau de mer (30-35). Un gradient décroissant de salinité est noté de la côte vers l'intérieur des terres. Les eaux souterraines salées présentent un pH plus acide que celui de l'eau de mer et une alcalinité (traduite majoritairement par la concentration en HCO₃⁻ : valeur médiane 8,9 mmol.L⁻¹) bien supérieure à celle de l'eau de mer (2,4 mmol.L⁻¹).

Les concentrations en nutriments majeurs sont également plus élevées dans les eaux souterraines salées que dans l'eau de mer avec 6 fois plus d'azote inorganique (dont 80% sont sous forme ammoniacale) et jusqu'à 100 fois plus de phosphore et de silicium inorganiques dissous. Les concentrations en cuivre et en zinc dans les eaux souterraines salées sont du même ordre que celles mesurées dans l'eau côtière de Bourgneuf (0,5-3 μg Cu.L⁻¹ et 2,5-8 μg Zn.L⁻¹). Cependant, dans l'eau de certains forages, les concentrations en cuivre et en zinc sont 6 fois supérieures à celles de l'eau de mer. Les concentrations en fer et en manganèse sont également pour certains forages jusqu'à 6 fois supérieures à celles mesurées dans l'eau de mer (0,5-1,5 μg Fe.L⁻¹ et 0,5-1,5 μg Mn.L⁻¹). Un gradient croissant des concentrations en azote et en manganèse et un gradient décroissant de la concentration en fer existent entre les forages de la côte vers l'intérieur des terres. Les concentrations de plomb dans les eaux souterraines

salées sont inférieures aux valeurs seuil de détection de la méthode utilisée. Le cadmium n'a pas été analysé dans ces eaux.

La variabilité temporelle, à l'inverse de la variabilité spatiale, des caractéristiques physico-chimiques des eaux souterraines salées de la baie de Bourgneuf est faible à l'échelle de l'année. La composition de ces eaux peut être considérée comme stable au cours du temps (Moreau, 1996).

I-1.2.c Utilisation des eaux souterraines salées dans la Baie de Bourgneuf

Les eaux souterraines salées sont exploitées dans cette région pour leurs propriétés nutritives et leur stabilité thermique. Des travaux sur les cultures phytoplanctoniques ont montré un développement rapide des microalgues sur ces eaux. Ces cultures d'algues servent au nourrissage des bivalves élevés et affinés dans cette région (palourdes, huîtres) et à la production de pâtes d'algues à destination agroalimentaire, pharmaceutique ou cosmétologique (Bresson, 1988 ; Robert, 1990; Roy, 1992).

Les eaux souterraines salées pompées dans cette région ne sont pas pour la plupart des forages, utilisables directement dans les bacs où sont élevés les bivalves. La teneur élevée en fer, en manganèse et en phosphates, dans une eau anoxique à l'origine, provoque lors du pompage et de l'oxygénation partielle de l'eau la formation d'oxyhydroxydes de fer et de manganèse qui font précipiter avec eux entre autres des groupes phosphates. Ces précipités jaune orange, qui font partie de la fraction colloïdale inorganique, peuvent colmater les branchies des bivalves et des poissons mais ils ne sont pas gênants dans la culture de microalgues (Baud *et al.*, 1991). Dans ce cas, les cultures algales sont distribuées, dans les bassins d'élevage, diluées avec de l'eau de mer dans des circuits d'alimentation (Taraud, comm. pers.) ou séparées du milieu de culture (centrifugation ou filtration).

Au niveau de certains forages comme à la station Ifremer de Bouin, un traitement de l'eau souterraine salée permet son utilisation dans les bassins où sont élevés des bivalves ou des poissons. Dans ce cas, l'intérêt d'utiliser ces eaux est la température constante aux alentours de 14°C qui permet de tendre, pour les bivalves et les poissons, vers une croissance continue et constante (Bresson, 1988 ; Baud et Bacher, 1990; Baud *et al.*, 1991; Bacher et Baud, 1992). Le traitement des eaux souterraines salées consiste d'une part en l'oxygénation de l'eau qui permet d'augmenter la concentration en oxygène dissous, nécessaire pour la respiration des bivalves et des poissons, mais aussi de transformer une majeure partie de

l'azote ammoniacal présent à des concentrations trop élevées pour de tels élevages, en azote nitrique (nitrates NO_3^-). D'autre part le traitement inclut une étape de rétention des oxydes de fer (Baud *et al.*, 1991).

La découverte des eaux souterraines salées dans les marais le long de la baie de Bourgneuf a influencé les activités aquacoles avec le développement de nouveaux types de cultures. L'implantation de deux stations Ifremer (Noirmoutier et Bouin) a participé à ce développement. Parmi les nouvelles activités aquacoles, l'élevage des palourdes et des nurseries de palourdes et d'huîtres se sont développés avec les autres activités conchylicoles traditionnelles. La baie de Bourgneuf est actuellement le sixième bassin conchylicole français avec une production de 10000 tonnes d'huîtres (*Crassostrea gigas* Thunberg) par an et 2700 tonnes de moules (*Mytilus edulis* Linné et *M. galloprovincialis* Lamarck) par an (Barret, 2003). Parmi les activités de l'aquaculture nouvelle, le secteur de Bouin est le premier centre français de production de naissain prégrossi d'huîtres creuses en écloserie et également le premier site de production française de turbots (Pajot, 2006). Un autre exemple du développement de l'aquaculture nouvelle dans la région est la société Innoalg qui produit sur un mélange eau de mer/eau souterraine salée la diatomée *Odontella aurita* (Lyngbye) Agardh. Cette algue est commercialisée comme complément alimentaire pour sa richesse en acides gras oméga 3 C20 : 5(n-3).

I-1.2.d Caractéristiques des eaux souterraines salées provenant des forages de la station Ifremer de Bouin et de la concession aquacole Taraud

Dans cette étude, les eaux souterraines salées de deux forages différents ont été utilisées. Ces forages sont situés sur la commune de Bouin, l'un au niveau du Polder Nord du Dain à la station Ifremer et l'autre au niveau du Port des Brochets sur la concession aquacole de Monsieur F. Taraud (Figure I-4, page 15).

A la station Ifremer, l'eau souterraine salée est utilisée régulièrement pour des cultures de microalgues en gros volume, mais est également utilisée après traitement (exposé dans la partie précédente) dans des bacs (couloirs de 15 m^3) où sont élevées des huîtres. L'aquifère est constitué d'une alternance de bancs de grès et de sables verts, emprisonné entre un toit constitué d'argile grise (flandrienne) et un substratum constitué d'argiles vertes compactes et de sables gris dans la couche inférieure (Figure I-6, page 22). L'aquifère se situe entre 6,80 et 12,50 mètres de profondeur (source BRGM, d'après Moreau, 1996).

Sur la concession aquacole de F. Teraud, l'eau souterraine salée est utilisée également pour réaliser des cultures de microalgues en gros volume (bassin de 100 m³) pour le nourrissage d'huîtres juvéniles et pour le grossissement et l'affinage d'huîtres adultes. L'aquifère est à cet endroit constitué de calcaires, sous 7 mètres d'argiles bleu-gris (Figure I-6). La nappe est plus profonde et s'étend de 7 à 19 mètres de profondeur.

Les caractéristiques physico-chimiques de ces eaux diffèrent essentiellement au niveau de l'alcalinité (HCO₃⁻) et des concentrations d'azote sous forme ammoniacale et de phosphore inorganique dissous (Tableau I-5).

Tableau I-5 Qualité physico-chimique des eaux souterraines salées pompées à la station Ifremer (Bouin, Polder du Dain) et sur la concession de F. Teraud (Bouin, Port des Brochets) (dans l'étude de Moreau, 1996). (N org : azote organique, P : org phosphore organique)

	Température (°C)	Salinité	pH	HCO ₃ ⁻ (mmol.L ⁻¹)	NH ₃ +NH ₄ ⁺ (µmol.L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻ (µmol.L ⁻¹)	N org (µmol.L ⁻¹)
Forage Ifremer	13,8	33	7,1	10,10	478	2	33
Forage F. Teraud	13,5	31	7,2	6,38	94	3	22

	PO ₄ ²⁻ (µmol.L ⁻¹)	P org (µmol.L ⁻¹)	Si(OH) ₄ (µmol.L ⁻¹)	Cu total (µg.L ⁻¹)	Fe total (µg.L ⁻¹)	Mn total (µg.L ⁻¹)	Zn total (µg.L ⁻¹)
Forage Ifremer	32	0	244	0,1	2,33	0,33	3,9
Forage F. Teraud	12	1	211	0,1	2,60	0,48	2,1

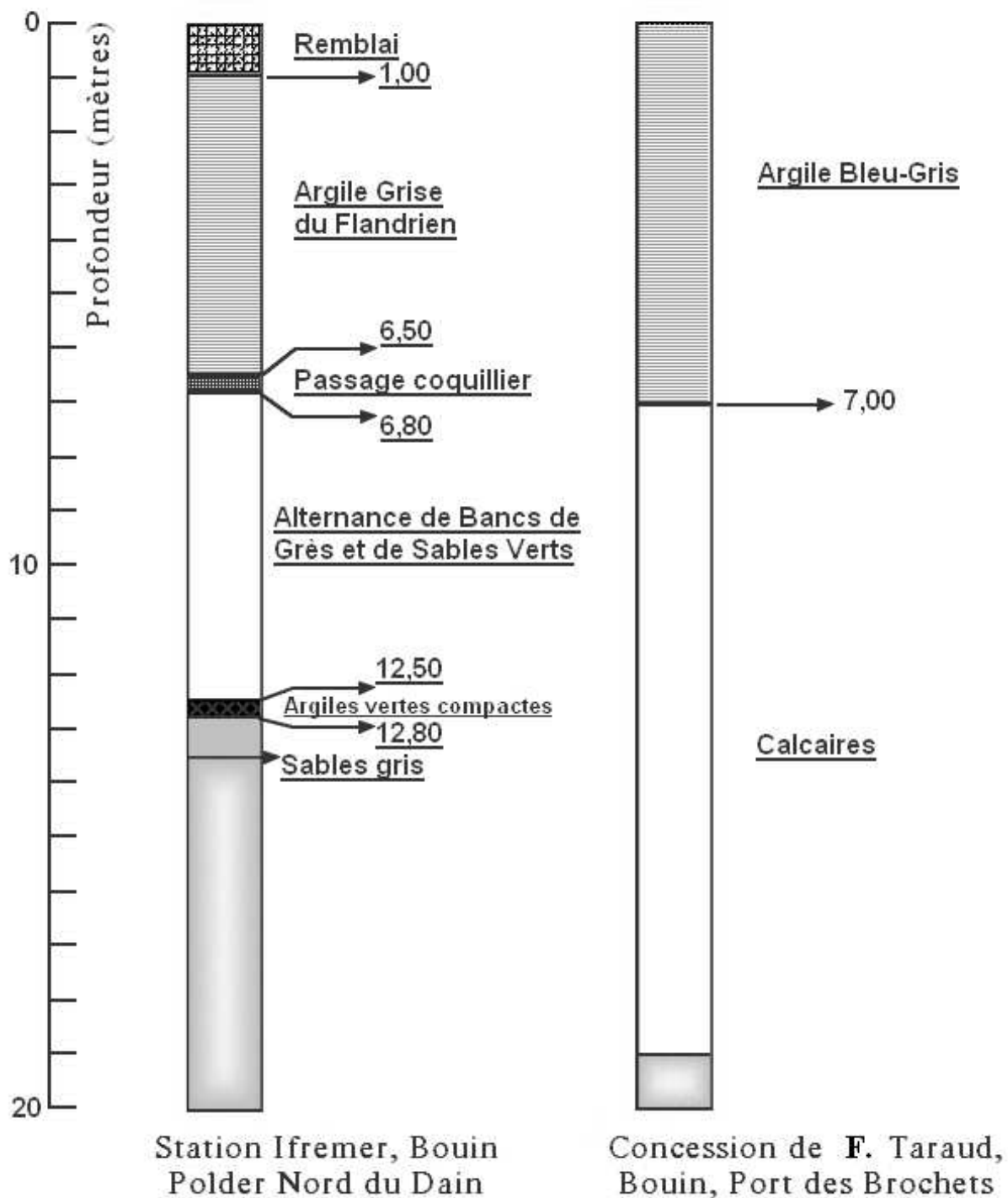


Figure I-6 Coupes géologiques des forages de la station Ifremer (Bouin, Polder du Dain) et de la concession aquacole de F. Teraud (Bouin, Port des Brochets) (d'après les données du BRGM Pays de la Loire et du Service Hydrogéologique Départemental de la Vendée, dans Moreau, 1996)

I-1.3 Conclusion

Les eaux souterraines ne représentent qu'une faible partie de la réserve d'eau du globe. Plus de 50% de ces eaux souterraines sont des nappes salées. Un faible pourcentage de ces nappes salées correspond à des eaux piégées dans des aquifères limités par des matériaux imperméables lors des dernières transgressions marines (eaux fossiles).

Au niveau de la baie de Bourgneuf, l'aquifère est une nappe captive salée (mélange d'eaux fossiles et d'eaux actuelles), emprisonnée entre un toit imperméable constitué essentiellement d'argiles (« bri » flandrien) et un substratum de schistes ou de granites. Les roches constituant l'aquifère sont majoritairement des calcaires et des grès, ce qui confère à la nappe un pouvoir tampon élevé dû à la présence de carbonates. La nappe est également riche en nutriments majeurs, en fer et en manganèse. La salinité est proche de celle de l'eau de mer et le pH varie aux alentours de 7. La recharge de la nappe s'effectue par des intrusions d'eau marine et par infiltration d'eau douce *via* le « bri ». Ce phénomène n'est pas réparti de façon homogène dans l'aquifère ce qui explique les différences de la qualité physico-chimique entre les différents forages.

La nappe salée de la baie de Bourgneuf est exploitée dans le cadre des activités aquacoles pour les cultures de microalgues et pour le maintien de la température des bassins d'élevage de bivalves ou de poissons. Les cultures de microalgues sont destinées au nourrissage des bivalves ou à la fabrication de pâte pour des utilisations agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Dans certains cas, l'eau souterraine salée subit un traitement pour pouvoir être utilisée notamment dans les bassins d'élevage. La qualité physico-chimique des eaux souterraines salées influence le rendement de la culture et la qualité des microalgues, ce qui concerne les apports nutritifs aux organismes qui les consomment, mais aussi leurs concentrations en certains éléments tels que les métaux qui doivent respecter les normes alimentaires.

I-2 Les métaux (cadmium, cuivre, plomb et zinc)

I-2.1 Généralités sur les métaux (Cd, Cu, Pb et Zn)

I-2.1.a Sources et concentrations de ces métaux dans les eaux naturelles

Les métaux sont présents naturellement dans les milieux, provenant des processus d'altération des roches. Les activités anthropiques entraînent des pollutions métalliques en concentrant dans des zones précises certaines espèces métalliques. Dans le Tableau I-6, sont récapitulés de façon globale les apports à l'océan de métaux d'origine anthropique. Dans la première partie du tableau, sont présentées les gammes de concentrations pour le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc dans les effluents issus des différentes activités anthropiques. Les concentrations en cadmium sont plus faibles que les concentrations des trois autres métaux. Les sources principales de cadmium sont l'exploitation des mines, les activités métallurgiques autres que la transformation du fer ou la fabrication de l'acier et les industries (métaux et chimie). Ces activités sont également les sources les plus importantes de cuivre, de plomb et de zinc. Le rejet des eaux usées et des eaux des circuits de centrales électriques est une source non négligeable de cuivre et de zinc. Dans la deuxième partie du tableau, sont présentés les flux vers l'océan en milliers de tonnes par an. Les apports atmosphériques de métaux à l'océan représentent également un flux important de métaux vers celui-ci. Les apports atmosphériques sont la source principale du plomb océanique.

Tableau I-6 Sources anthropiques de métaux dans l'océan (Nriagu et Pacyna, 1988)

	Concentration dans les effluents (ng.L ⁻¹)				Flux d'apports anthropogéniques à l'océan (10 ⁶ kg.an ⁻¹)		
	Cd	Cu	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb
Eaux usées							
centrales	0,002-0,02	0,05-0,2	0,01-0,08	0,1-0,5	0,18-1,8	4,5-18	0,9-7,2
non centrales	0,005-0,02	0,07-0,5	0,01-0,08	0,1-0,6	0,3-1,2	4,2-30	0,6-4,8
Rejets des centrales électriques	0,001-0,04	0,6-3,8	0,04-0,2	1-5	0,01-0,24	3,6-23	0,24-1,2
Mines	0,001-0,6	0,2-18	0,2-5	0,04-12	0-0,3	0,1-9	0,25-2,5
Activités métallurgiques							
Fer et acier	-	-	0,2-0,4	0,8-3,5	-	-	1,4-2,8
Autres non ferreux	0,004-1,8	1,2-8,5	0,5-3	1-10	0,01-3,6	2,4-17	1-6
Procédés de manufacture							
Métaux	0,02-0,07	0,4-1,5	0,1-0,9	1-5,5	0,5-1,8	10-38	2,5-22
Chimie	0,02-0,5	0,2-3,6	0,08-0,6	-	0,1-2,5	1-18	0,4-3
Papier	-	0,01-0,13	0,004-0,3	0,03-0,5	-	0,03-0,39	0,01-0,9
Produits du pétrole	0-0,04	0,002-0,2	0,003-0,4	0,01-0,8	-	0-0,06	0-0,12
Retombées atmosphériques	-	-	-	-	0,9-3,6	6-15	87-113
Relargage des boues d'épuration	-	-	-	-	0,08-1,3	2,9-22	2,9-16
Total					2,1-17	35-90	97-180

Pour donner une idée des concentrations environnementales de ces métaux, le Tableau I-7 récapitule quelques données issues de la littérature sur les valeurs déterminées dans les océans, les eaux côtières et les rivières.

Tableau I-7 Concentrations moyennes en cadmium, cuivre, plomb et zinc dans les océans, dans les eaux côtières et dans des rivières

Océans et eaux côtières	Cd (ng.L ⁻¹)	Cu (ng.L ⁻¹)	Pb (ng.L ⁻¹)	Zn (ng.L ⁻¹)	
Océan Arctique	5-18	50-185	4-26	-	Nürnberg, 1982
Océan Atlantique Nord	3-10	70-150	40-60	-	Nürnberg, 1982
Océan Pacifique	2-5	60-90	5-15	-	Nürnberg, 1982
Océan Pacifique (ng.kg ⁻¹)	0,001-0,01	-	-	-	Boyle et al., 1976
Mer de Weddell Nord (Océan austral)	17-54	100-200	3-13	-	Nürnberg, 1982
Baie de Narragansett, Rhode Island (Etats-Unis)	33-90	800-1760	27-66	1060-4648	Kozelka et Bruland, 1998
Eaux côtières belges et allemandes					
Métal dissous	15-100	-	50-350	-	Nürnberg, 1982
Métal particulaire (ng.kg ⁻¹)	8-170	-	100-4300	-	Nürnberg, 1982
Mer Méditerranée Ouest	19	140	62	-	Nürnberg, 1982
	8	90	30-40	-	Laumond et al., 1984
Côtes de la Mer de Ligurie (Mer Méditerranée)					
Métal dissous	5-30	-	50-300	-	Nürnberg, 1982
Métal particulaire (ng.kg ⁻¹)	10	-	5-150	-	Nürnberg, 1982
Estuaire de la Seine	50-70				Metzger et al., 2001
Pertuis charentais					
Métal dissous	0,001-0,005	-	-	-	Boutier et al., 2000
Métal particulaire (ng.kg ⁻¹)	230-570	-	-	-	Boutier et al., 2000
Rivières					
	Cd (µg.L ⁻¹)	Cu (µg.L ⁻¹)	Pb (µg.L ⁻¹)	Zn (µg.L ⁻¹)	
Concentration moyenne établie sur les valeurs des rivières réparties au niveau mondial					
Métal dissous	0,01	1,5	0,6	0,03	Martin et Windom, 1991
Métal particulaire (µg.g ⁻¹)	1,20	100	250	35	Martin et Windom, 1991
Rivière de Gediz (Turquie)	-	11	21	54	Akçay et al., 2003
Rivière de Buyuk Menderes (Turquie)	-	12	44	78	Akçay et al., 2003
La Seine (France)	0,03	1,7	0,18	0,61	Idlafkih et al., 1995
Moyenne des concentrations de La Dordogne et de la Garonne (France) Métal dissous (µg.L ⁻¹)	0,04	0,8	0,05	1,17	Kraepiel et al., 1997
La Dordogne (France) Métal particulaire (µg.g ⁻¹)	0,56	72	35	162	Kraepiel et al., 1997
La Garonne (France) Métal particulaire (µg.g ⁻¹)	2,24	49	48	247	Kraepiel et al., 1997
Estuaire de la Gironde (France) Métal particulaire (µg.g ⁻¹)	0,54	36	56	260	Kraepiel et al., 1997

Les concentrations métalliques décroissent des rivières vers les océans. Les concentrations sont inférieures au µg.L⁻¹ sauf pour certaines rivières qui supportent des activités industrielles importantes telles que les rivières de Gediz et de Buyuk Menderes en Turquie (Akçay *et al.*, 2003), la Seine (Idlafkih *et al.*, 1995) ou la Garonne (Kraepiel *et al.*,

1997) en France pour lesquelles les concentrations en métaux peuvent atteindre des dizaines de $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les concentrations métalliques dans la fraction particulaire sont moins importantes dans les eaux côtières que dans les rivières en raison de l'augmentation de la force ionique et de la salinité (Kraepiel *et al.*, 1997 ; Miramand *et al.*, 1998, Boutier *et al.*, 2000).

Les techniques analytiques permettant de déterminer des concentrations aussi faibles sont contraignantes et la plupart des études portant sur les métaux utilisent pour évaluer le niveau d'exposition dans certains écosystèmes :

- des indicateurs biologiques tels que le phytoplancton ou certains mollusques : dans l'Estuaire de la Loire et la Baie de Bourgneuf (France) (Amiard *et al.*, 1980; Amiard-Triquet *et al.*, 1983), dans l'Estuaire de la Gironde et la Baie de Marennes Oléron (Miramand *et al.*, 1998; Miramand *et al.*, 2002; Pigeot *et al.*, 2002 ; Bragigand *et al.*, 2004), dans l'estuaire du Guadalquivir (Espagne) (Martín-Díaz *et al.*, 2005),
- les teneurs dans les sédiments : dans la Baie de Hong-Kong (Wong *et al.*, 1995), dans la baie d'Izmir (Kucuksegin *et al.*, 2006), dans l'estuaire du Tage au Portugal (Correia Dos Santos *et al.*, 2001), la baie de San Francisco (Griscom *et al.*, 2000)

Le Réseau National d'Observation (R.N.O.) mis en place par l'Ifremer pour surveiller les pollutions inorganiques et organiques sur les côtes françaises réalise des dosages réguliers (4 fois par an) des contaminants dans les moules et les huîtres prélevées aux différentes stations surveillées pour évaluer les niveaux et les tendances des pollutions chimiques (Claisse, 2000).

I-2.1.b Le cadmium

Le cadmium est utilisé dans les revêtements anti-corrosion des métaux (acier, fonte, alliages de cuivre et aluminium - cadmiage) et dans les accumulateurs rechargeables (nickel-cadmium, argent-cadmium) où il constitue la borne négative. Il est également impliqué dans de nombreux alliages : dans les fusibles électriques, les bouchons de sécurité et les extincteurs automatiques (alliages à bas point de fusion), dans les roulements à billes spéciaux (alliage anti-friction), dans les câbles électriques (alliages à haute conductibilité), dans les barres pour réacteurs nucléaires (modérateurs de neutrons). Le cadmium sous forme minérale est

également utilisé dans les stabilisants pour plastique, dans les pigments colorants (peintures, plastiques, encres, émaux), dans les batteries alcalines, les cellules photoélectriques, et les substances luminescentes pour télévision (INRS, 1997).

L'apport de cadmium aux milieux côtiers provient en partie du compartiment atmosphérique (fumées et poussières des fonderies, des produits de l'incinération des matériaux recouverts de cadmium et des combustibles fossiles) et provient d'autre part des rivières et des fleuves (lessivages des terrains agricoles -engrais- et des terrils miniers -mines d'extraction du zinc-) (Eisler, 1985 ; Nriagu et Pacyna, 1988). La tendance générale des teneurs en cadmium dans les mollusques du littoral français (dans le cadre de la surveillance R.N.O.) est une évolution favorable puisque ces teneurs diminuent dans plus de 70 % des sites échantillonnés sur l'ensemble du littoral français, notamment dans les régions les plus contaminées (Baie de Seine, Loire, Bassin de Marennes-Oléron, Gironde, Adour et étang de Bages). Quelques augmentations des teneurs en cadmium sont observées dans les moules et les huîtres provenant de sites localisés en Méditerranée et de sites ponctuels en baie de Seine (Claisse et Beliaeff, 2000 ; Ifremer, 2006).

Dans le cas de la pollution de l'estuaire de la Gironde, les eaux de la Garonne proviennent en partie du bassin versant du Lot au niveau duquel était installée la mine d'extraction de zinc de Decazeville. Le lessivage des terrils est responsable d'un apport important (environ 400 kg.an^{-1}) de cadmium dissous dans l'estuaire. Des concentrations élevées de cadmium, bien que décroissantes depuis quelques années, sont observées dans l'estuaire et dans toutes les zones dépendantes du panache de la Gironde (Kraepiel *et al.*, 1997 ; Miramand *et al.*, 1998 ; Boutier *et al.*, 2000 ; Pigeot *et al.*, 2002). Dans l'estuaire, de nombreuses zones sont encore interdites de pêche à pied ou d'exploitation aquacole en raison de l'accumulation de cadmium dans les organismes. Le panache de la Gironde remonte vers le Nord le long des côtes dans le Pertuis Charentais et pénètre dans la Baie de Marennes Oléron. Les concentrations en cadmium dans les eaux de la baie sont de l'ordre de 40 ng.L^{-1} (Pigeot, comm. pers.). Les teneurs mesurées dans les organismes de la baie de Marennes Oléron sont élevées : par exemple pour l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la gamme des teneurs en cadmium dans les tissus est de 1,9 à $4,5 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche. A certains points de prélèvement ces teneurs sont donc proches de la teneur en cadmium limite tolérée par les normes alimentaires définie à $5 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ depuis 2002.

Les effets du cadmium sur les microalgues cités dans la littérature sont divers et parmi ces effets : (i) réduction du taux de croissance des populations algales (Berland *et al.*, 1976 ;

Brand *et al.*, 1986 ; Morelli et Scarano, 2001), (ii) allongement de la phase de latence, (iii) phase stationnaire de croissance précoce (Torres *et al.*, 1997), (iv) augmentation de la photosynthèse et de l'assimilation de carbone (Thompson et Couture, 1991).

Les processus de détoxication sont l'induction de phytochélatines (Hu *et al.*, 2001; Morelli et Scarano, 2001; Le Faucheur *et al.*, 2005), l'internalisation ou la précipitation des métaux dans des vésicules ou des granules (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991; Nassiri *et al.*, 1994; Nassiri et Ginsburger-Vogel, 1995b), l'excrétion de molécules chélatrices pour augmenter la complexation des métaux dans le milieu (Xue *et al.*, 1988). Les phytochélatines sont des polymères peptidiques composées par l'assemblage de motifs (Glu-Cys)_nGly (n = 2 à 11) synthétisés à partir du glutathion, considérées comme des métallothionéines de classe III. Des enzymes responsables de la synthèse des phytochélatines (les « phytochélatines synthases ») ont été identifiées chez les végétaux supérieurs et dans quelques microalgues dont *Phaeodactylum tricorutum*. La production ou le fonctionnement de ces enzymes pourrait dépendre de la présence de métaux tels que le cuivre ou le zinc (Loeffler *et al.*, 1989; Morelli et Scarano, 1995; Hirata *et al.*, 2001 ; Morelli et Scarano, 2001; Morelli et Scarano, 2004; Le Faucheur *et al.*, 2005; Wojcik *et al.*, 2005).

Quelques études tentent d'estimer l'impact de l'ingestion de cadmium *via* les produits de la mer notamment dans la zone Estuaire de la Gironde / baie de Marennes-Oléron (Miramand *et al.*, 2002 ; Bragigand *et al.*, 2004). Chez l'homme, le cadmium est préférentiellement accumulé dans le rein entraînant à partir d'un certain seuil des dysfonctionnements au niveau du néphron proximal et peut être à l'origine d'une insuffisance rénale.

I-2.1.c Le cuivre

Le cuivre est un métal largement utilisé notamment en raison de ses propriétés conductrices (électriques et thermiques). Il est utilisé en métallurgie pour la fabrication de nombreux alliages : avec l'étain (le bronze), avec le zinc (le laiton), avec le nickel ou un mélange cuivre-nickel-zinc, avec l'aluminium et le zinc, en joaillerie avec l'argent et l'or. Il est également utilisé dans la fabrication de matériels électriques (fils, enroulements de moteurs, dynamos, transformateurs), dans la plomberie, dans les équipements industriels, dans l'automobile et en chaudronnerie. Les dérivés du cuivre sont utilisés en tant que catalyseur (ex. fabrication du caoutchouc), en tant que pigment ou colorant (céramiques, verre, émaux, textiles, encres, peintures, photographie, pyrotechnie), en tant que biocide

(algicide, insecticide, peinture anti-fouling, antiseptique contre la prolifération des microorganismes dans les filets de pêche, bactéricide, herbicide, fongicide -ex. la bouillie bordelaise-) ou encore en tant qu'agent conservateur du bois (INERIS, 2005).

Le cuivre dans les écosystèmes côtiers provient essentiellement du rejet des eaux usées urbaines et industrielles (métallurgie, chimie) et du lessivage des sols agricoles et des terrils des mines. La surveillance mise en place au travers du R.N.O. a mis en évidence un grand nombre de sites présentant une tendance à des teneurs croissantes en cuivre des mollusques étudiés, principalement dans des régions agricoles, viticoles et/ou de navigation de plaisance, ce qui est corrélé aux principales sources de contamination en cuivre des eaux : les effluents de l'élevage industriel, le traitement des vignes et les peintures anti-salissures pour les navires de moins de 25 mètres (Claisse et Beliaeff, 2000). Depuis 2000, le niveau d'exposition des organismes au cuivre reste globalement constant (Ifremer, 2006).

Le cuivre est biodisponible pour les organismes sous le degré d'oxydation (I) ou (II), à partir de sels inorganiques ou des complexes organiques. Le cuivre est un métal essentiel nécessaire dans le métabolisme cellulaire. En cas de carence en cuivre, de multiples types d'anomalies apparaissent (stérilité du pollen chez les végétaux supérieurs ; interruption du processus de myélinisation, anémie, réduction de la croissance, problèmes cardio-vasculaires chez les animaux) (Scheinberg, 1991). Le cuivre est notamment un constituant de la plastocyanine (Raven *et al.*, 1999) et de plusieurs oxydases (Kieffer, 1991). Néanmoins, en excès, le cuivre peut induire un effet toxique qui peut se traduire par une réduction ou inhibition de la croissance des microalgues (Gavis *et al.*, 1981; Stauber et Florence, 1987; Franklin *et al.*, 2002; Yan et Pan, 2002), une augmentation de la photosynthèse (Côté, 1983; Thompson et Couture, 1991 ; Bossuyt et Janssen, 2004), une augmentation de la taille des cellules (Berland *et al.*, 1977 ; Rivkin, 1979 ; Stauber et Florence, 1987). D'autres auteurs ont montré une diminution de la photosynthèse et une augmentation de la consommation d'ATP (Cid *et al.*, 1995), une réduction des défenses de la cellule notamment envers l'H₂O₂ (Stauber et Florence, 1987). Les organismes ont développé, pour éviter la toxicité du cuivre, des mécanismes qui peuvent être complémentaires : (i) une excrétion régulée du cuivre ingéré en excès, (ii) un stockage du cuivre non pas sous forme ionique active mais lié à des métalloprotéines sous forme de co-facteur (par exemple les métallothionéines), (iii) une interaction zinc - cuivre (Scheinberg, 1991). La production de molécules excrétées dans le milieu, constituées de protéines et/ou de polysaccharides, augmente la complexation du cuivre dans le milieu et réduit sa biodisponibilité (Xue et Sigg, 1990 ; Gonzales-Davila *et al.*, 2000).

La précipitation dans des granules insolubles ou l'internalisation dans des vésicules permettent de neutraliser les effets négatifs du cuivre présent en excès dans la cellule (Balland-Dufrançais *et al.*, 1991; Nassiri *et al.*, 1996).

I-2.1.d Le plomb

Le plomb est utilisé dans l'imprimerie et dans la métallurgie (fonderie). Il est également utilisé dans la fabrication des accumulateurs au plomb, dans les batteries, dans certains pigments utilisés dans les peintures, certains traitements de surface et dans la fabrication de certains verres (cristal mais aussi verres optiques de précision pour lasers, rayons X et fibres optiques) (INRS, 1998). Le carbonate de plomb est utilisé pour la fabrication des ciments, mastics et céramiques ; le carbonate basique de plomb sert de catalyseur dans la préparation des polyesters, de constituant des céramiques vitreuses et des graisses lubrifiantes, de pigments dans les encres thermosensibles et de stabilisant dans les polymères (INERIS, 2003). Le plomb est également présent dans certains carburants, l'utilisation de ces carburants en France a été interdite en 2001 ce qui a induit une diminution progressive des flux de plomb atmosphérique (Métras, 2004).

Dans l'environnement, le plomb est majoritairement présent dans le compartiment atmosphérique et provient des fonderies, des industries de la métallurgie, de la combustion du charbon, de l'incinération des déchets et des gaz d'échappement des véhicules. C'est pourquoi le flux le plus important de plomb à l'océan provient de l'atmosphère. L'utilisation des essences sans plomb a été un des facteurs de la décroissance de l'exposition au plomb dans l'environnement. Au niveau de l'estuaire de la Loire, l'industrie du plomb tétraéthyle était bien implantée (entreprise Octel-France, Paimbœuf) et les concentrations en plomb dans les eaux estuariennes étaient relativement élevées. A partir de 1986, la production de plomb tétraéthyle a diminué jusqu'à l'arrêt de la production en 1991. Depuis les niveaux d'exposition au plomb dans l'estuaire de la Loire estimés dans le cadre du RNO *via* les teneurs métalliques dans les mollusques ont été divisé par deux. L'estuaire de la Seine est la seule zone montrant une augmentation des concentrations en plomb. (Claisse et Beliaeff, 2000 ; Ifremer, 2006)

La toxicité du plomb pour les microalgues se traduit comme pour les autres métaux étudiés ici par une réduction de la croissance et de la biomasse maximale, une réduction des processus de respiration et une augmentation de la photosynthèse et du volume cellulaire (Rivkin, 1979). Néanmoins, le plomb apparaît être moins toxique à concentration molaire

égale que le cuivre, par la formation de complexes avec les hydroxydes ou les silicates dans le milieu (Stauber et Florence, 1989) mais également par la compétition avec les autres métaux sur les sites d'adsorption à la surface de la cellule qui ont plus d'affinité pour les métaux essentiels (Cu, Zn) (Santana-Casiano *et al.*, 1995). Le plomb tout comme le cadmium et le cuivre peut induire la synthèse de phytochélatines (Morelli et Scarano, 2001).

I-2.1.e Le zinc

Le zinc est utilisé comme revêtement anti-corrosion (galvanoplastie, métallisation, certaines peintures) et revêtement protecteur dans le bâtiment. Il entre dans la composition de certains alliages (ex. laiton), de piles électriques et de pigments pour peinture. Il est également utilisé dans l'industrie textile et papier, dans les batteries en tant qu'électrolyte mais aussi comme conservateur du bois, engrais, fongicide et insecticides (INRS, 2002).

Les sources anthropiques de zinc dans les environnements estuariens et côtiers sont majoritairement des industries liées aux activités métallurgiques. Les concentrations en zinc dans les zones contaminées du littoral français tendent à rester constantes (Claisse et Beliaeff, 2000 ; Ifremer, 2006).

Le zinc est un métal essentiel impliqué dans le fonctionnement de nombreuses enzymes dont l'anhydrase carbonique nécessaire à la fixation et au transport du carbone dans les microalgues (Morel *et al.*, 1994 ; Yee et Morel, 1996 ; Lane et Morel, 2000), dans les protéines à doigt de zinc (facteurs de transcription de l'ADN), des phosphatases et des protéases (Coleman, 1998). Les études traitant de l'action du zinc sur les microalgues concernent leur croissance pour laquelle ce métal présente une concentration limitante dans l'environnement (Anderson et Morel, 1978; Brand *et al.*, 1983; Morel *et al.*, 1991; Morel *et al.*, 1994). Le zinc présent en excès dans le milieu peut également avoir des effets induits par sa toxicité dans les cellules : interférences avec les processus de division (Giri et Chowdary, 1992), réduction de la croissance des populations microalgales (Jensen *et al.*, 1974; Tadros *et al.*, 1990), augmentation de la production d'ATP, de l'activité de la chaîne de transport des électrons, augmentation de la concentration des thiols et du glutathion dans la cellule (Stauber et Florence, 1989). Contrairement au cuivre, le zinc se fixe aux thiols sans les oxyder ce qui n'influence pas la concentration en thiols dans la cellule (Stauber et Florence, 1989). Knauer *et al.* (1997) ont mis en évidence que le zinc tout comme le cuivre possédait un taux d'assimilation dans la cellule proportionnel à la concentration en métal libre et non en métal

total. L'affinité des sites d'adsorption à la surface de la cellule est plus grande pour le cuivre que pour le zinc, néanmoins la capacité d'absorption du zinc semble supérieure à celle du cuivre. Pour limiter les effets toxiques du zinc, une production d'exsudats capables de complexer le zinc a été montrée chez trois diatomées pendant la phase exponentielle de croissance (Imber *et al.*, 1984; Imber *et al.*, 1985). Morelli et Scarano (2001) ont montré que le zinc n'induisait pas la synthèse de phytochélatines comme le cadmium ou le plomb. Cependant, des modifications de l'ultrastructure de la cellule ont été mises en évidence par Smith (1983) : le zinc entraîne chez *Skeletonema costatum* la formation de tubules provenant de l'appareil de Golgi et de nombreuses cassures au niveau des membranes des chloroplastes et des mitochondries pour augmenter les surfaces membranaires capables de fixer du zinc.

I-2.2 Théorie sur l'équilibre des formes métalliques dans les systèmes aquatiques

Les métaux sont présents dans les eaux naturelles sous différentes formes chimiques en équilibre. En effet, les métaux interagissent avec les autres éléments présents dans l'eau et forment des interactions ou des liaisons avec ces éléments. L'étude de ces différentes espèces métalliques présentes dans un milieu donné est l'étude de la spéciation (Florence, 1982).

Les métaux ne sont pas assimilables par un organisme vivant sous toutes leurs formes. La théorie de l'ion libre (Sunda et Guillard, 1976) propose que l'espèce métallique assimilée par l'organisme soit la forme ionique libre. De nombreux auteurs ont modéré cette théorie en montrant que certaines formes métalliques, notamment des complexes inorganiques ou organiques, lipophiles pour la plupart, pouvaient être également assimilées (Bergsma et Konings, 1983; Phinney et Bruland, 1994; Tessier et Turner, 1995; Phinney et Bruland, 1997; Errecalde *et al.*, 1998). Il a été mis en évidence que les membranes biologiques ne sont pas perméables à certains complexes métalliques avec des ligands organiques non lipophiles naturels (acides humiques : Buffle *et al.*, 1977) ou synthétiques (EDTA, NTA : Sprague, 1968; Tessier et Turner, 1995 ; Sillanpaa et Oikari, 1996). La concentration en métal total dans un environnement ne peut donc pas permettre de prédire l'impact toxicologique et la bioaccumulation de ce métal dans les organismes. La détermination de la fraction biodisponible de métal, présente en équilibre dans le système, va permettre d'évaluer l'accumulation potentielle de métaux pour les organismes.

Les formes d'un métal dans un système aquatique dépendent de ses caractéristiques. Ringbom (1963), pour étudier la complexation en chimie analytique, sépare les cations en trois groupes : le groupe A contenant les cations avec une configuration de gaz noble (alcalin,

alcalino terreux et l'aluminium) s'associent avec les anions fluor et oxygène (K, Rb et Cs formeraient uniquement des ions hydratés), le groupe B contenant les cations avec une orbitale d complète qui vont majoritairement former des liaisons covalentes avec les ligands donateurs d'électrons, le groupe C contenant les métaux de transition avec une orbitale incomplète.

Turner *et al.* (1981) définissent les règles générales qui contrôlent la spéciation des éléments dans les eaux naturelles en se basant sur les classifications établies par Ahrlund (cité dans Turner *et al.*, 1981) pour les cations en fonction de leur type de liaisons avec des groupes donateurs. Deux groupes de cations se différencient. Les cations de type « a » forment des complexes *via* des interactions électrostatiques dont les plus fortes sont avec les éléments de la première colonne de donateurs d'électrons de la table périodique des éléments. Les cations de type « b » forment des complexes avec des donateurs plus lourds de la 2^{ème} à la 4^{ème} colonne de la table périodique *via* des liaisons de type covalent. A ces deux classes, s'ajoutent deux autres classes limites « a' » (dont Cu²⁺, Zn²⁺ et Pb²⁺) et « b' » (dont Cd²⁺ et Cu⁺). Turner *et al.* (1981) précisent que la spéciation du cadmium est dominée en « milieu eau de mer » par les complexes avec les chlorures alors qu'en eau douce, sa spéciation est variable comme pour Cu²⁺, Zn²⁺ et Pb²⁺. Dans ces groupes limites, les cations Cu²⁺ et Pb²⁺ sont les plus fortement complexés étant donné leur préférence pour les hydroxydes et les carbonates. Dans un système anoxique, le bisulfure, issu de la réduction du sulfate, devient un ligand majoritaire et lie fortement les cations de type « b » et les cations des classes limites « a' » et « b' ». L'acide carboxylique montre un comportement intermédiaire similaire aux carbonates et aux hydroxydes.

Turner *et al.* (1981) ont, à partir d'une base de données qu'ils ont compilée des travaux précédents, utilisé un modèle permettant de calculer la spéciation des composants majeurs et mis au point des équations supplémentaires pour calculer la spéciation de 58 autres composés dissous en eau douce et en eau de mer à 25°C et à 1 atm. Le Tableau I-8 montre un exemple de leurs calculs pour un milieu « eau de mer artificielle » à pH 8,2 sans ajout de matière organique pour les métaux qui nous intéressent dans cette étude. Le cadmium est majoritairement retrouvé associé aux ions Cl⁻. Le cuivre est associé majoritairement aux carbonates. Le plomb montre un comportement intermédiaire et les formes majoritaires sont le chlorure de plomb et le carbonate de plomb. En fonction de son degré d'oxydation, le fer est soit majoritairement libre (Fe²⁺) soit totalement sous forme d'un complexe hydroxyde de fer (Fe³⁺). Le zinc est retrouvé sous forme libre (46%), associé à des chlorures (35%) ou des

hydroxydes (12%). Ces mêmes tendances ont été démontrées entre autres par Nürnberg (1983). Millero et Hawke (1992) ont étudié le comportement des ions divalents dans l'eau de mer et ont mis en évidence l'association du cuivre aux carbonates, celle du cadmium aux chlorures, un comportement également intermédiaire pour le plomb, mais la présence de zinc essentiellement sous forme ionique libre.

Tableau I-8 Pourcentages calculés de présence des espèces métalliques pour le cadmium, le cuivre, le fer, le plomb et le zinc dans un milieu d'eau de mer sans ligands organiques, à 25°C, pH=8,2 et 1 atm. (d'après Turner *et al.*, 1981)

Cation	Libre	OH	F	Cl	SO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻
Cd ²⁺	3	*	*	97	*	*
Cu ²⁺	9	8	*	3	1	79
Fe ²⁺	69	2	*	20	4	5
Fe ³⁺	*	100	*	*	*	*
Pb ²⁺	3	9	*	47	1	41
Zn ²⁺	46	12	*	35	4	3

* forme présente dans un pourcentage <1%.

A ce système, il faut ajouter la présence des ligands inorganiques (ex. hydroxydes de fer ou de manganèse) et organiques (ex. acides fulviques ou humiques) dans les eaux de mer naturelles (Hart, 1981). Tessier et Turner (1995) estiment l'association à ces ligands naturels de 90% du cuivre et du zinc et de 50% du plomb. Dans les zones estuariennes et côtières, sont également présents les ligands d'origine anthropique tels que l'EDTA, les pesticides et les autres molécules issues des activités humaines (Sillanpaa et Oikari, 1996; Phinney et Bruland, 1997).

La spéciation d'un métal considéré dépend de ses propriétés, des ligands inorganiques et organiques en présence mais également de la salinité, de la force ionique, du pH, de la concentration en oxygène dissous, de la température et de la pression (Turner *et al.*, 1981; Nürnberg, 1983).

I-2.3 Etude de la spéciation des métaux

La spéciation chimique des métaux traces dans les eaux naturelles est une façon d'estimer leur biodisponibilité et leur réactivité pour les organismes dans ces écosystèmes. Une large variété de techniques est utilisée pour étudier cette spéciation des métaux (Varney *et al.*, 1984) : techniques voltampérométriques, équilibration avec des résines chélatantes, dialyse, ultrafiltration, filtration sur gel, adsorption sur une suspension de dioxyde de manganèse, bioessais avec des bactéries ou des microalgues. Les méthodes voltampérométriques ont été souvent utilisées pour étudier la complexation des métaux dans les eaux naturelles (Duinker et Kramer, 1977; Florence, 1982; Jardim et Allen, 1984; Bruland *et al.*, 2000; Nierop *et al.*, 2002). La technique la plus répandue est la voltampérométrie à redissolution anodique (ASV, Anodic Stripping Voltammetry) grâce à sa facilité d'utilisation et sa haute sensibilité (Hart, 1981; Nürnberg, 1983; Rollemberg *et al.*, 1999). Le principe de cette technique repose sur l'accrochage des espèces métalliques libres sur une électrode sous l'influence d'un potentiel électrique de dépôt, puis le décrochage progressif des différentes espèces métalliques lors d'un balayage des potentiels vers des valeurs plus positives. Les réactions d'oxydation lors du décrochage créent un courant spécifique et proportionnel à la concentration en espèces métalliques dont l'intensité est relevée en fonction du potentiel imposé. Les électrodes sont de différents types : goutte pendante, film, électrode tournante (or, platine, mercure déposé sur un disque de carbone le plus souvent).

L'étude de la spéciation revient à étudier les phénomènes de complexation des métaux avec les différents ligands présents dans l'eau. Les métaux complexés n'ont pas le même comportement vis-à-vis de l'électrode que les métaux sous forme ionique libre ou faiblement associés à d'autres ions. Les formes libres et labiles sont les espèces métalliques qui peuvent interagir avec l'électrode de travail en voltampérométrie, le terme labile se réfère à des complexes dont la vitesse de dissociation est plus grande que la vitesse de la réaction d'interaction du métal avec l'électrode. Un complexe dit inerte a une vitesse de dissociation trop lente pour que le métal puisse interagir avec l'électrode.

L'étude de la complexation par cette technique électrochimique est complexe surtout si on différencie les courants de diffusion du métal libre (D_M) et du métal complexé (D_{ML}), ($D_M \neq D_{ML}$). Les complexes labiles sont définis par Van Leeuwen (1999) comme étant des complexes pour lesquels les rapports des constantes des réactions association/dissociation sont si élevés qu'ils ne limitent pas le courant. Ces auteurs introduisent également la notion de « mobilité » qui se rapporte à la constante de transport physique qui dépend du rapport

D_{ML}/D_M ; la mobilité du complexe augmente avec la valeur du rapport des courants de diffusion.

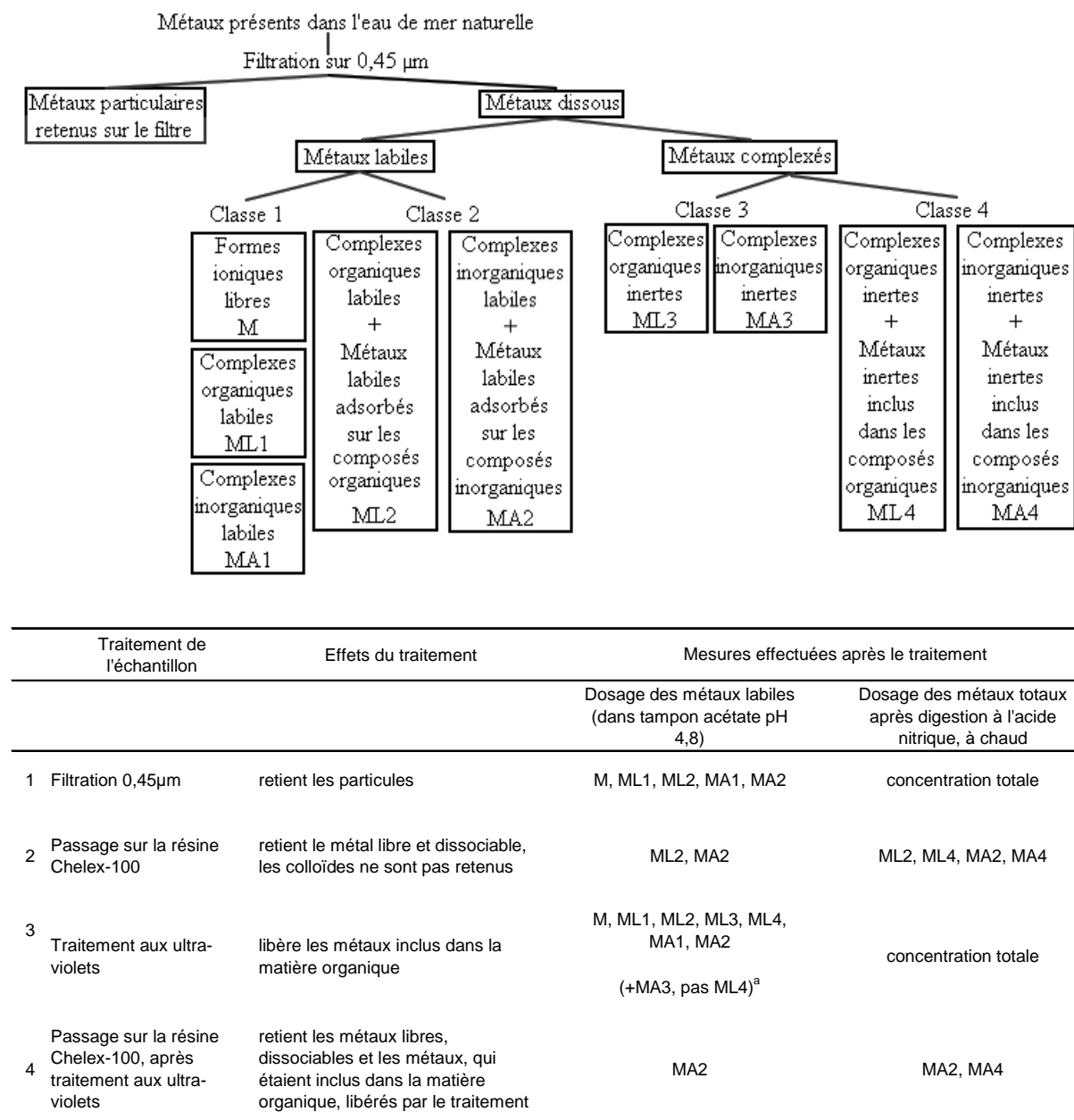
Plusieurs cas théoriques peuvent être pris en compte :

- Les complexes sont inertes. L'intensité I est directement proportionnelle à la concentration en métal libre puisque les complexes ne peuvent pas interagir avec l'électrode sur le temps relativement court de l'analyse.
- Les complexes sont labiles et $D_M = D_{ML}$. L'intensité I correspond à la somme de toutes les espèces métalliques (libres et complexées) : toutes les formes de métaux interagissent avec l'électrode de manière similaire.
- Les complexes sont labiles et $D_M \neq D_{ML}$. L'intensité I est une moyenne pondérée en fonction des courants de diffusion de toutes les espèces métalliques : toutes les formes de métaux interagissent avec l'électrode mais chaque espèce ne contribue pas de façon égale à l'établissement du courant.
- Les complexes ne sont ni totalement inertes, ni totalement labiles. Cela correspond à des équilibres lents. L'intensité I dépend de la diffusion et des constantes cinétiques d'association/dissociation. C'est le cas général et la situation la plus souvent rencontrée dans les systèmes naturels.

Les formes libres (ioniques) et labiles des métaux sont le plus souvent associées aux formes biodisponibles (Florence, 1982; Deaver et Rodgers, 1996). Cependant, certains complexes neutres et lipophiles sont également assimilables par les organismes comme il a été démontré pour le citrate ou le dithiocarbamate (Phinney et Bruland, 1997; Errecalde *et al.*, 1998). En outre, dans l'étude de la spéciation, il s'agit de formes de métaux en équilibre à un temps donné. La présence de matières particulaires, de sédiments ou d'organismes va modifier ces équilibres et déplacer les métaux d'une forme à une autre, au cours du temps.

Pour étudier la spéciation des métaux dans une eau de mer naturelle, Batley et Florence (1976) décrivent un protocole permettant d'obtenir 4 classes d'espèces métalliques, qui pour trois d'entre elles se subdivisent en deux (inorganique et organique), ce qui permet d'obtenir une classification avec 8 catégories d'espèces métalliques en comptant la fraction particulaire. Pour ce faire, ils appliquent à l'échantillon différents traitements (une résine chélatrice d'ions, le Chelex-100, et un traitement UV réalisé seul ou avant le passage sur la résine) pour isoler

les catégories d'espèces métalliques, puis ils dosent le métal labile dans un tampon acétate à pH 4,8 et le métal total après minéralisation à chaud avec de l'acide nitrique dans les différentes fractions. Le protocole est repris dans un schéma représentant les différentes catégories et un tableau représentant les catégories dosées en fonction du traitement et du type de dosage (Figure I-7). En général, dans les travaux utilisant ce type d'analyse, la fraction dissoute correspond à la fraction obtenue après filtration de l'échantillon sur 0,45 µm (Florence, 1982).



^a modification de Skogerboe *et al.* (1980)

Figure I-7 Spéciation des métaux dans une eau de mer naturelle selon Batley et Florence (1976) modifiée par Skogerboe *et al.* (1980)

Nürnberg (1982, 1983) a défini un protocole simplifié, schématisé sur la Figure I-8, pour déterminer dans les échantillons quatre catégories d'espèces métalliques : dans la fraction dissoute, (1) les formes ioniques et les complexes labiles, (2) les formes échangeables avec des protons, (3) les complexes inertes et dans la fraction particulaire, (4) les métaux adsorbés ou inclus dans les macromolécules, les sédiments et les organismes.

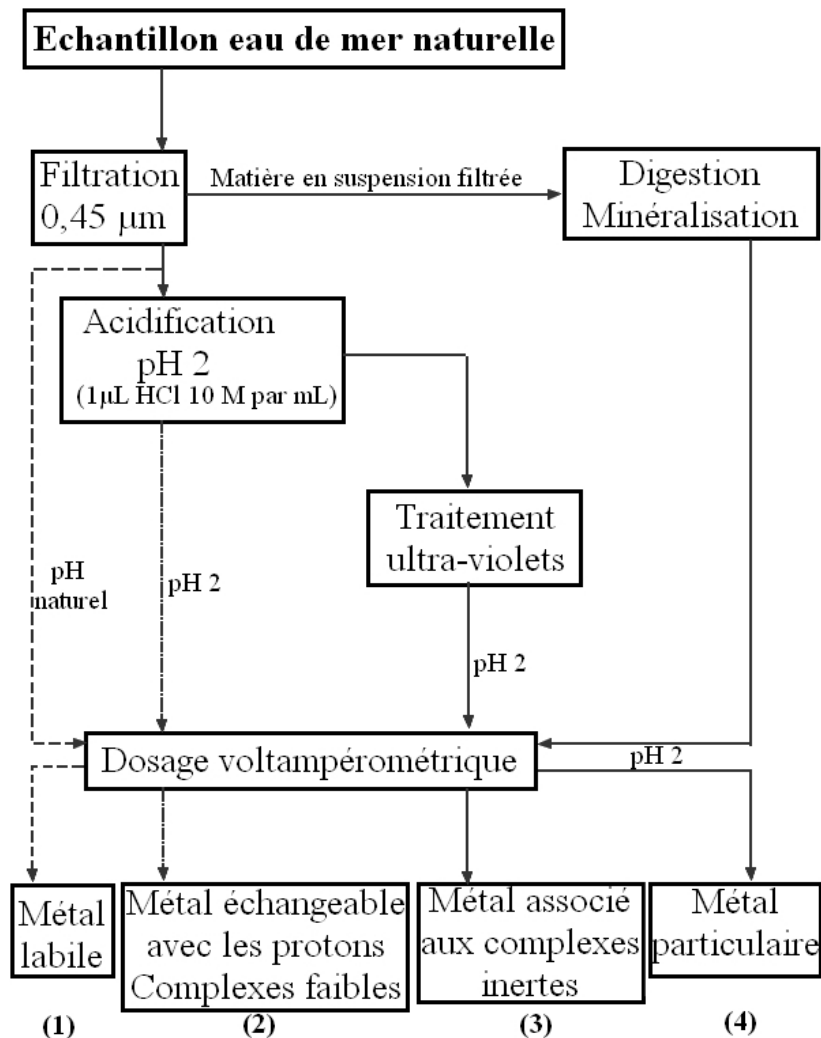


Figure I-8 Protocole de spéciation métallique d'après Nürnberg (1983)

Dans notre étude, les formes labiles et totales (complexes faibles et inertes) du cadmium, du cuivre, du plomb et du zinc ont été déterminées en suivant le protocole de Nürnberg (1983) par voltampérométrie à redissolution anodique en impulsions différentielles (DP-ASV, Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry). La technique a été utilisée pour le dosage des métaux dans les échantillons d'eaux naturelles et artificielles, dans les filtrats de cultures, dans les solutions issues de la désorption des métaux de la paroi microalgale à l'aide du complexant 8-HQS (acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique). Des tentatives de

dosages ont été réalisées sur les préparations de frustules isolés et sur les minéralisats d'algues.

De plus, les dosages de métaux labiles et totaux par DP-ASV ont permis de déterminer les capacités de complexation de différents milieux. Le principe et le protocole de détermination de la capacité de complexation sont détaillés dans le paragraphe suivant.

I-2.4 Etude de la capacité de complexation des eaux

I-2.4.a Principe et protocole

La capacité de complexation d'une eau ou d'un milieu est définie par Kramer (1986) comme la concentration en ligands capables de lier des ions métalliques sous la forme de complexes non labiles, dits inertes. La capacité de complexation pour une même eau sera différente pour chaque métal considéré (Nürnberg, 1983). Le cuivre est le métal le plus utilisé pour caractériser la capacité de complexation d'une eau naturelle (Jardim et Allen, 1984; Coale et Bruland, 1988, 1990; Jin et Gogan, 2000; Nierop *et al.*, 2002), mais le cadmium, le plomb et le zinc sont également utilisés (Buffle *et al.*, 1977; Imber *et al.*, 1985; Cao *et al.*, 1995). D'un ordre général, la capacité de complexation du cuivre dans une eau est plus importante que celle du plomb, elle-même plus importante que celle du zinc (Cao *et al.*, 1995). Le cadmium forme souvent peu de complexes inertes dans les eaux salées, les capacités de complexation de ce métal sont faibles. Deux méthodes sont utilisées pour déterminer cette capacité de complexation : la méthode directe (Duinker et Kramer, 1977) et la méthode par équilibration (Plasvic *et al.*, 1982 ; Nürnberg, 1983).

Dans les deux méthodes, le métal labile est déterminé pour l'échantillon, puis pour l'échantillon enrichi avec des concentrations croissantes en métal total. Les échantillons ne sont pas traités au préalable, ils sont analysés au pH naturel dans la plupart des cas. Le métal total dans les différents échantillons est également dosé après acidification et traitement aux ultra-violets. La méthode directe consiste en un ajout et un dosage immédiat du métal labile alors que la méthode par équilibration demande un temps d'équilibration après les ajouts de 12h. Ce temps permet aux réactions lentes d'atteindre l'équilibre. La méthode par équilibration prend en compte les complexes avec des constantes de formation faibles ce qui induit : (i) des capacités de complexation estimées dans la méthode par équilibration plus grandes que celles estimées dans la méthode directe parce que la concentration en ligands

considérés est plus élevée, (ii) des constantes apparentes de stabilité conditionnelle estimées par la méthode par équilibration inférieures à celles estimées par la méthode directe.

L'équilibre obtenu est dit conditionnel et non pas thermodynamique car elle est dépendante d'un ensemble de conditions définies (pH, force ionique, compétition entre ligands). En outre, l'ajout de métal peut affecter le comportement des ligands (toxicité, photodégradabilité et biodégradabilité) (Neubecker et Allen, 1983).

Les réponses voltampérométriques obtenues lors du dosage de métal labile et/ou les concentrations en métal labile déduites sont représentées sur un graphe en fonction des concentrations métalliques totales. Les graphes théoriques décrits par O'Shea et Mancy (1976) sont représentés dans la Figure I-9.

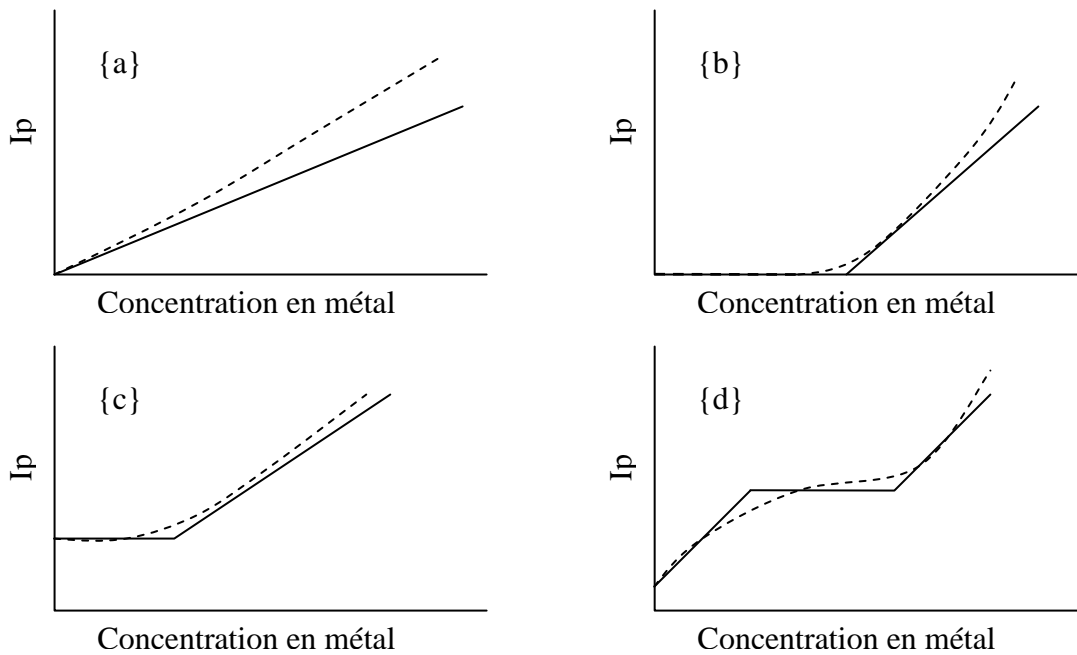


Figure I-9 Cas rencontrés pour l'étude de la capacité de complexation des eaux – Graphes : Réponses voltampérométriques en fonction de la concentration métallique ajoutée. D'après O'Shea et Mancy (1976)

I_p est l'Intensité du pic. {a} Présence de métal libre ou de complexes labiles, {b} Formation d'un complexe inerte de forte affinité pour le métal, {c} Présence d'un complexe inerte de faible affinité pour le métal, {d} Formation d'un complexe labile de forte affinité suivi de la formation d'un complexe inerte de plus faible affinité. (— courbe théorique, --- courbe obtenue expérimentalement)

Ces graphes théoriques prennent en compte la présence d'une seule classe de ligands. Plusieurs cassures dans les courbes de titration peuvent être observées et correspondent dans ce cas à plusieurs classes de ligands. Les classes de ligands sont caractérisées par des

constantes de stabilité différentes dont le rapport est au moins égal à 10 (Pizeta et Branica, 1997). Elles représentent donc des catégories de ligands dont l'affinité pour les métaux est plus ou moins grande et les associations métal/ligand plus ou moins fortes.

Dans le paragraphe suivant, sont exposées les méthodes de calcul de la concentration en ligands (la capacité de complexation) et la constante de stabilité conditionnelle associée à cette classe de ligands.

I-2.4.b Traitement des données dans le cadre de la détermination de la capacité de complexation des eaux

Pour déterminer les valeurs de capacité de complexation et les constantes de stabilité conditionnelle, ces valeurs peuvent être déduites du graphe ou être calculées à partir de linéarisation des données obtenues.

Méthode graphique (Pardo *et al.*, 1994) :

Les concentrations en métal labile mesurées (ou l'intensité mesurée) pour chaque ajout de métal effectué dans l'eau de mer naturelle sont placées sur un graphe en fonction de la concentration en métal total (Figure I-10).

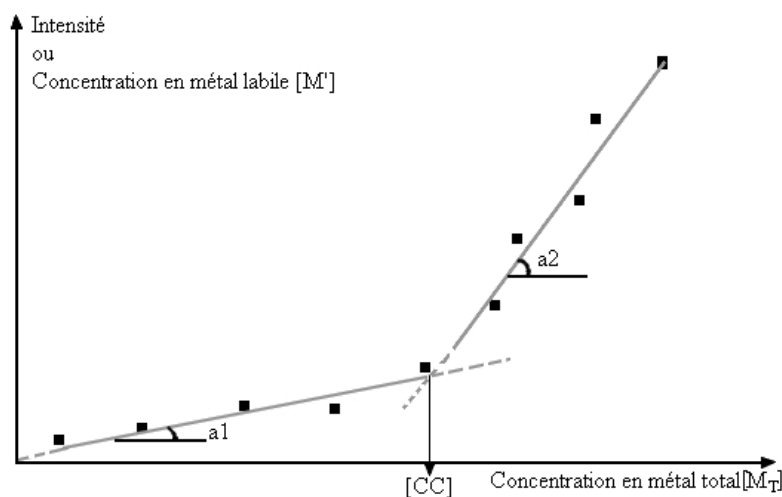


Figure I-10 Type de graphe obtenu pour la détermination de la capacité de complexation ($[CC]$) où la concentration en métal labile ($[M']$) (ou le courant mesuré) est placé sur le graphe en fonction de la concentration en métal total ($[M_T]$).

Dans ce modèle à un ligand, la capacité de complexation $[CC]$ correspondant à la concentration en ligands est déterminée au point d'inflexion de la courbe (valeur x du point

d'intersection des deux droites) et la constante de stabilité conditionnelle $K_{ML,M'}^{cond}$ est fonction des pentes des deux droites et de la concentration en ligands :

$$K_{ML,M'}^{cond} = (a_2 - a_1) / (a_1 * CC) \quad \text{avec } a_1 \text{ la pente de la première droite et } a_2 \text{ la pente de la deuxième droite}$$

La première droite représente la complexation des métaux par la classe de ligands alors que la deuxième droite traduit la saturation des sites de fixation des métaux et la présence de métal libre en excès.

Méthodes de linéarisation

Ruzic (1982) précise que les valeurs de capacité de complexation et de constante associée sont sous-estimées dans la méthode graphique et propose une théorie dans laquelle la concentration en ligands ($[L_T]$) et les constantes de stabilité conditionnelle sont calculées à partir de la transformation des courbes de titration en métal. Le rapport de métal labile / métal complexé est placé sur un graphe en fonction de la concentration en métal labile. A partir des équations à l'équilibre, l'équation de droite suivante est obtenue :

$$\frac{[M']}{[ML]} = \frac{[M']}{[L_T]} + \frac{1}{(K_{MLi,M'}^{cond}) (L_T)}$$

avec $\frac{1}{[L_T]}$ la pente de la droite et $\frac{1}{(K_{MLi,M'}^{cond}) (L_T)}$ l'ordonnée à l'origine.

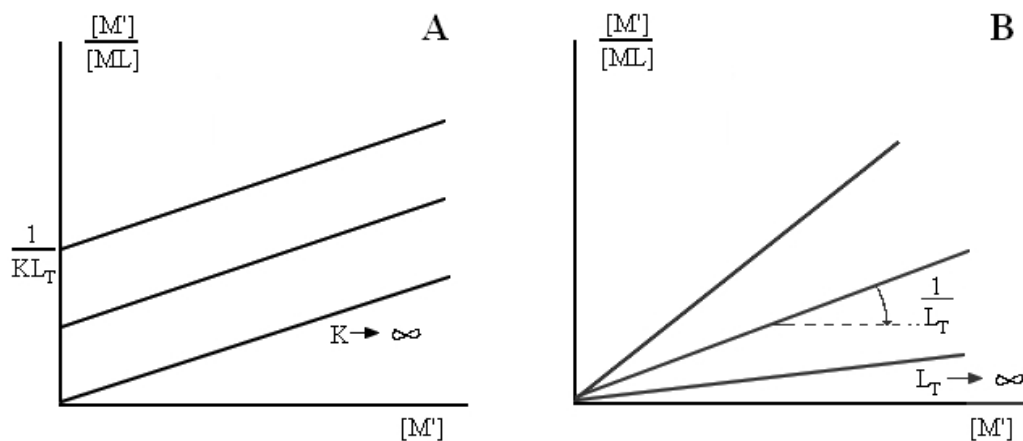


Figure I-11 Influence des valeurs de constantes de stabilité conditionnelle K et de la concentration totale en ligands dans un modèle à un ligand (d'après Ruzic, 1982)

$[M']$: métal labile, $[ML]$: métal lié.

Dans un modèle à un ligand, une seule droite est obtenue sur ce type de graphe. L'influence de la constante de stabilité conditionnelle et de la concentration totale en ligand est présentée sur la Figure I-11. Une pente de droite faible traduit une concentration élevée en ligands et un point d'ordonnée à l'origine proche de 0, une constante de stabilité conditionnelle très élevée.

Dans un modèle à deux ligands, cette droite s'incurve et les concentrations en ligands ainsi que les constantes de stabilité conditionnelle sont définies à partir des deux asymptotes pouvant être tracées au niveau de la courbure. Dans plusieurs cas, la détermination de la première classe de ligands L1 est difficile (Rue et Bruland, 1995; Wells *et al.*, 1998).

Une autre méthode est la linéarisation de Scatchard dans laquelle le rapport entre la concentration en métal complexé et la concentration en métal labile est placé sur un graphe en fonction de la concentration en métal complexé (Mantoura et Riley, 1975; Kozelka et Bruland, 1998). L'équation de la droite obtenue :

$$\frac{[ML]}{[M']} = - (K_{MLi.M'}^{cond}) ([ML]) + (K_{MLi.M'}^{cond}) ([L_T])$$

avec $- (K_{MLi.M'}^{cond})$ la pente de la droite et $(K_{MLi.M'}^{cond}) ([L_T])$ l'ordonnée à l'origine

Dans un modèle à un ligand, une seule droite est obtenue. Dans un modèle à 2 ou plusieurs ligands, cette droite ne s'incurve pas, des cassures de droite sont observées et un nombre de droites égal au nombre de classes de ligands peuvent être tracées. Cette méthode semble donc plus précise pour déterminer L1 (Rue et Bruland, 1995; Wells *et al.*, 1998). Cependant, dans cette méthode, l'impact des concentrations en métal labile les plus faibles prennent plus d'importance. Il y a donc une forte influence dans les pentes de droites des valeurs les plus faibles ayant également une incertitude plus élevée. C'est pourquoi dans plusieurs études, les deux méthodes de linéarisation sont utilisées en complément (Rue et Bruland, 1995; Kozelka et Bruland, 1998; Wells *et al.*, 1998).

I-2.5 Conclusion

La connaissance des concentrations totales en métaux dans une eau naturelle ou un milieu de culture ne suffit pas à prévoir l'impact de ces métaux sur les organismes. Le comportement des métaux est dépendant non seulement du type et de la concentration en molécules complexantes mais aussi de facteurs physiques tels que la température, la force

ionique ou la pression. Les résultats des déterminations de capacité de complexation ou des concentrations en métal labile (qui est associée à la fraction de métaux biodisponible pour les organismes) sont donc étroitement liés aux conditions dans lesquelles ont été menées les expérimentations. Néanmoins, cet outil permet de pointer les différences entre des milieux ou des eaux d'origine différente et de poser des hypothèses sur la potentielle carence ou toxicité d'un métal envers un organisme et l'accumulation métallique qui peut en résulter et qui peut ensuite se répercuter dans la chaîne trophique.

I-3 Les cultures de microalgues

I-3.1 Les cultures de microalgues marines en aquaculture

Plus de 40 espèces différentes de microalgues sont cultivées dans des systèmes intensifs, principalement pour le nourrissage d'organismes commercialisés tels que les mollusques bivalves (aux stades de larves, post-larves et adultes), les larves de décapodes, des copépodes, des rotifères. Ces espèces de microalgues appartiennent à plusieurs classes (Bacillariophycées, Haptophycées, Prasinophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Chlorophycées, Cyanophycées, Xanthophycées) (Chretiennot-Dinet *et al.*, 1986 ; Lavens et Sorgeloos, 1996). Les espèces les plus fréquentes en mariculture sont les diatomées *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, les flagellés *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Tetraselmis suecica* et les chlorophycées *Chlorella spp.* (Chretiennot-Dinet *et al.*, 1986 ; Coutteau et Sorgeloos, 1992 ; Lavens et Sorgeloos, 1996).

Les paramètres les plus importants qui contrôlent la croissance des populations de microalgues sont la lumière, la température, la turbulence et les caractéristiques du milieu de culture : les nutriments (quantité et qualité), le pH et la salinité. Les optima de ces paramètres vont varier d'une espèce à une autre en fonction de ses besoins. Les cultures semi-intensives de phytoplancton supposent des biomasses plus importantes que dans le milieu naturel ; les besoins en macronutriments et en éléments traces sont donc plus importants. C'est pourquoi les milieux de culture à base d'eau de mer sont enrichis ; d'après Lavens et Sorgeloos (1996), la méthode d'enrichissement de l'eau de mer la plus répandue est l'utilisation des solutions d'enrichissement f/2 de Guillard (1982). Dans ces solutions, sont apportés au milieu de culture de l'azote, du phosphore et du silicium inorganiques dissous, des métaux traces et des vitamines.

Plusieurs méthodes de cultures existent : les cultures en batch, en mode semi-continu et en mode continu. Les cultures en batch consistent en une seule inoculation de cellules dans un petit volume de milieu enrichi (type tube à essai). Quand la population algale a atteint son maximum d'abondance en cellules, les algues sont transférées dans un volume plus grand contenant du nouveau milieu enrichi (type flacon erlenmeyer 250 mL) et ainsi de suite jusqu'à des plus grands volumes (types bassin de 25000 litres) (Figure I-12).

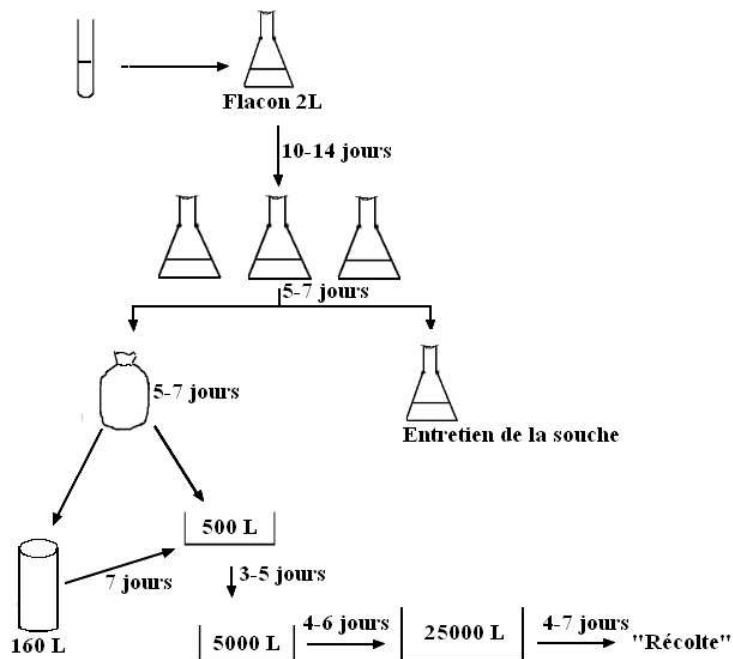


Figure I-12 Schéma de production de cultures en batch (d'après Lee et Tamaru (1993), cité dans Lavens et Sorgeloos (1996))

Les cultures en mode continu consistent en un apport régulier de milieu de culture dans le contenant, l'excès de culture est continuellement pompé (principe des photobioréacteurs). Ce système permet d'obtenir des populations dont la densité en cellules et les caractéristiques biochimiques sont constantes. L'inconvénient est le coût de l'installation et sa complexité. La technique des cultures en mode semi-continu est intermédiaire. Dans le schéma de production de cultures en batch, une fois l'étape de la culture en gros volume (25000L par exemple) atteinte, une partie de cette culture est utilisée et un nouvel apport de milieu enrichi est réalisé pour ajuster le volume ce qui fait repartir la croissance de la population. Le rendement est donc plus élevé que pour des cultures en batch, telles que décrites dans la Figure I-12. Les inconvénients sont surtout les problèmes de contamination, de compétiteurs et d'accumulation de matière organique. (Lavens et Sorgeloos, 1996)

Dans la plupart des cas de nourrissage, il n'est pas nécessaire de séparer les algues du milieu de culture. Dans le cas de la fabrication de pâte d'algues, les cellules sont récupérées classiquement par centrifugation, mais cela peut également être réalisé par filtration, ultrafiltration, tamisage, floculation (flottaison ou sédimentation des cellules) (Barnabé, 1989).

Le coût de l'enrichissement du milieu représente entre 10 à 30% du coût total de la culture (Borowitzka, 1999). C'est pourquoi l'eau souterraine salée peut présenter un avantage. Effectivement, l'eau souterraine salée, naturellement riche en nutriments majeurs et en oligo-éléments, peut être utilisée sans enrichissement pour les cultures de microalgues (Baud et Bacher, 1990; Baud *et al.*, 1991). La plupart des cultures d'algues utilisées pour le nourrissage des bivalves sont réalisées en cultures en mode semi-continu (Taraud, comm. pers.).

Au laboratoire, les cultures d'algues sont réalisées dans une chambre thermostatée : la photopériode, l'éclairement et la température sont contrôlées. Les eaux souterraines salées, des milieux à base d'eau de mer enrichie (ES, ES1/3 -Provasoli, 1968; Robert, 1983-) et un milieu artificiel ont été utilisés pour les cultures d'algues dans cette étude.

I-3.2 Les microalgues utilisées dans cette étude

Les algues sélectionnées pour cette étude sont utilisées en aquaculture notamment au niveau de la baie de Bourgneuf. *Skeletonema costatum* est cultivée dans plusieurs concessions dans le marais Breton pour le nourrissage des bivalves adultes (Barillé *et al.*, 2003). Cette diatomée est dans les 20 premières algues utilisées pour le nourrissage des bivalves juvéniles et des adultes de par le monde derrière *Tetraselmis suecica* et avant *Phaeodactylum tricornutum* (Coutteau et Sorgeloos, 1992 ; Lavens et Sorgeloos, 1996). *P. tricornutum* et *T. suecica* sont utilisées dans le nourrissage des juvéniles et des adultes (Baud et Bacher, 1990; Coutteau et Sorgeloos, 1992 ; Lavens et Sorgeloos, 1996). *Haslea ostrearia* intervient dans le verdissement des branchies d'huîtres. (Ranson, 1937; Robert, 1992; Robert *et al.*, 2002)

Par ailleurs, *Haslea ostrearia* et *Skeletonema costatum* sont des diatomées possédant un frustule siliceux à deux valves alors que *Phaeodactylum tricornutum* est une diatomée avec un frustule peu silicifié, à une seule valve. *Tetraselmis suecica* est une prasinophycée ; une thèque organique, et non un frustule siliceux, enveloppe la cellule algale. Ces différences morphologiques sont susceptibles d'intervenir dans les besoins nutritifs de la microalgue et dans l'accumulation des métaux (Martin-Jézéquel et Lopez, 2003)

I-3.2.a *Haslea ostrearia* Simonsen (1974)

Emb. Chromophytes, Cl. Bacillariophycées, O. Bacillariales, S.O. Bacillariioneae, F. Naviculaceae (Tomas, 1997)

Diatomée pennée (Figure I-13). Cette algue est solitaire et tychopélagique. Elle se développe en formant un biofilm à la surface du sédiment, puis en phase de sénescence, est

remise en suspension dans la colonne d'eau. Les frustules sont naviculoïdes en vue valvaire et rectangulaires à angles arrondis en vue cingulaire. La longueur de la valve varie entre 60 et 110 μm et la largeur entre 8 et 10 μm (Rincé, 1993). Elle est responsable du verdissement des huîtres (Ranson, 1927; Ranson, 1937; Robert, 1983; Robert, 1992; Robert *et al.*, 2002), ce qui lui confère son intérêt économique dans la production d'huîtres vertes. Les différentes souches utilisées lors de cette étude ont été isolées à partir de prélèvements effectués dans des claires ostréicoles près de Bouin (Vendée, France).

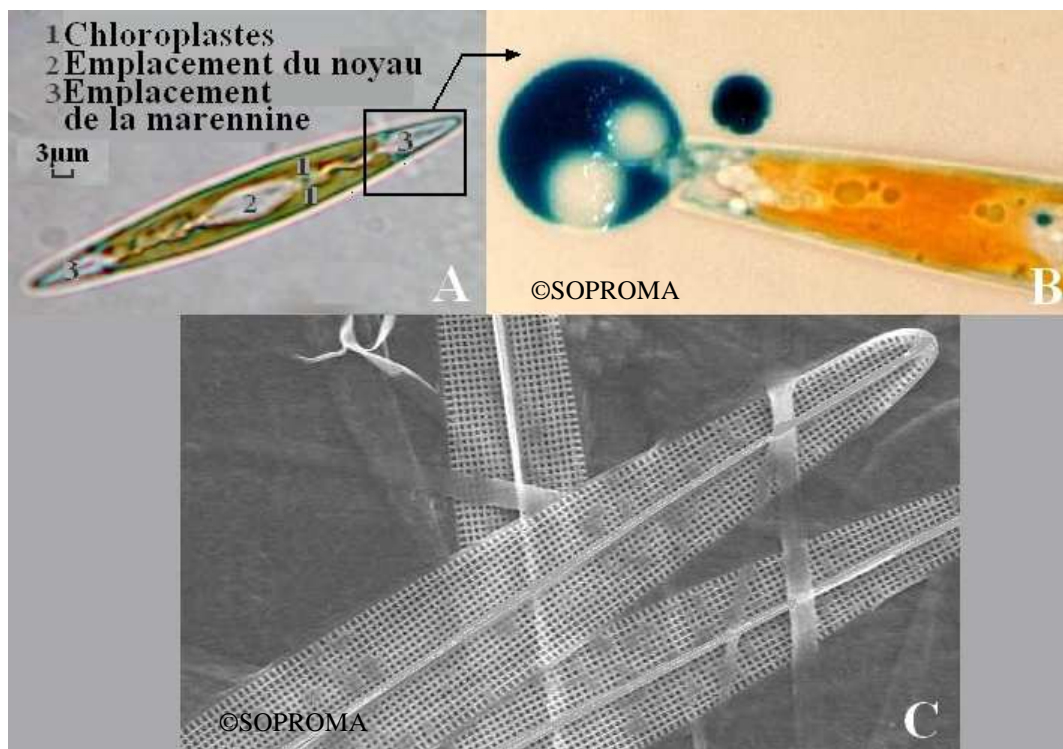


Figure I-13 Photographies de la diatomée *Haslea ostrearia* (longueur \cong 60 μm). A : Vue valvaire (microscopie photonique, x 400), B : Vue valvaire, zoom sur une excrétion de marennine à une extrémité (microscopie photonique, x 1000), C : Observation de valves du frustule au microscope électronique à balayage

Photos B et C issues du site de la société Soproma (<http://perso.orange.fr/soproma/pate.htm> consulté le 04/09/2006)

Peu d'études ont été menées sur *H. ostrearia*, notamment en ce qui concerne la toxicité des métaux vis-à-vis cette espèce. La plupart des études sont en relation avec la marennine produite par la cellule, pour étudier les fonctions de ce pigment et/ou pour le caractériser (Neuville et Daste, 1971; Nassiri *et al.*, 1998; Robert *et al.*, 2002 ; Pouvreau, 2006; Pouvreau *et al.*, 2006a). Certaines études se sont intéressées au développement de l'algue dans le milieu naturel dans le cadre du nourrissage d'huîtres et de leur verdissement (Ranson, 1937 ; Robert, 1992; Barillé *et al.*, 1994; Turpin *et al.*, 1999).

Joux-Arab *et al.* (1998) ont cultivé *H. ostrearia* en batch sur une eau de mer enrichie. L'ajout de cuivre ($30 \mu\text{g.L}^{-1}$) a entraîné une augmentation du cuivre associé à des composés solubles dans la cellule. Il est possible que des phytochélatines induites par le cuivre soient présentes dans le cytosol et complexent sous forme soluble le cuivre dans *H. ostrearia* (Arab-Joux, 1999). L'étude de la tolérance d'*H. ostrearia* a également été menée par Minier *et al.* (1998) en suivant l'activité estérasique des cellules ; la gamme de cuivre ajouté au milieu (Aquil modifié sans métaux, sans EDTA) était de $0,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à $10000 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ils ont pu montrer une diminution de la sensibilité de la souche en fonction de l'âge de la culture (IC50 obtenues : $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $160 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $290 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $380 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour des cultures respectivement âgées de 6, 10, 12 et 17 jours). Ils mettent en avant deux hypothèses pour expliquer ce phénomène : (i) les estérases dans les cellules en fin de cultures sont différentes ou moins sensibles, (ii) le cuivre est complexé par des métabolites secondaires synthétisés et excrétés par la diatomée (les cultures âgées sont de couleur vert foncé) et peut-être à la source du mucus formant un tapis au fond des flacons de cultures, ce qui entraîne la réduction de la biodisponibilité du cuivre dans les cultures plus anciennes. Lors de leurs expériences avec ajout d'EDTA ou de marennine dans le milieu, ils ont pu mettre en évidence une diminution de la toxicité du cuivre vis-à-vis de l'algue. La marennine est peut-être capable de complexer le cuivre. Koussih (1995) a montré dans ses travaux de thèse que des molécules, majoritairement des polysaccharides, étaient excrétées pendant la phase exponentielle de croissance d'*H. ostrearia*. Cette matière organique dissoute excrétée par les cellules augmente la complexation du cuivre dans le milieu de culture.

En comparaison aux autres algues utilisées dans notre étude, Ettajani et Pirastru (1992) et Ettajani *et al.* (1992) ont mis en évidence une plus grande sensibilité au cuivre et à l'argent chez *H. ostrearia* que chez *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*, autres algues utilisées dans notre étude. Dans les cultures d'*H. ostrearia* en présence de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre, la densité en cellules et les concentrations en marennine, pigments, azote et carbone particuliers sont fortement diminuées par rapport au témoin alors que des concentrations inférieures favorisent le taux de croissance et la production des cellules. L'accumulation du cuivre dans les cellules suit une courbe exponentielle en fonction de la concentration de cuivre dans le milieu.

Lors de la division des diatomées, les deux valves se séparent et la nouvelle valve synthétisée est la plus petite, ce qui provoque une diminution de la taille des cellules filles à chaque division. Khoshmanesh *et al.* (1996) ont réalisé un modèle mathématique traitant de l'accumulation du cadmium chez des algues vertes. Ils ont mis en évidence que

l'accumulation du cadmium est proportionnelle au nombre de sites d'adsorption présents sur la cellule, ce nombre de sites étant proportionnel à la surface totale de la cellule (Khoshmanesh *et al.*, 1997). Ils ont donc modifié leur modèle en exprimant l'accumulation du cadmium par unité de surface cellulaire et non pas par unité de masse. L'accumulation du métal dans une cellule peut donc varier en fonction du rapport surface/volume, de petites cellules vont accumuler plus de métal que de grandes cellules (Yan et Pan, 2002). Pour rester dans des conditions semblables entre les expérimentations et travailler avec des cellules d'une taille relativement équivalente, il a fallu utiliser, tout au long de ce travail de thèse, différents clones d'*H. ostrearia*, tout en prenant en compte la variabilité des réponses due à l'utilisation de souches différentes.

I-3.2.b *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (1897)

Emb. Chromophytes, Cl. Bacillariophycées, O. Bacillariales, S.O. Bacillarioneae, F. Phaeodactylaceae (Tomas, 1997)

Diatomée pennée (Figure I-14) constituée de cellules coloniales en chaîne ou isolées pouvant être rencontrée sous différentes formes : triradiée, fusiforme ou à contours elliptiques. Le frustule est composé d'une seule valve et il est peu silicifié. Cette microalgue est utilisée en conchyliculture pour la nourriture des moules, des huîtres ou des palourdes, notamment pour les stades juvéniles. Les souches utilisées ont été isolées à partir de prélèvements effectués dans la baie de Bourgneuf (Loire-Atlantique, Vendée, France).

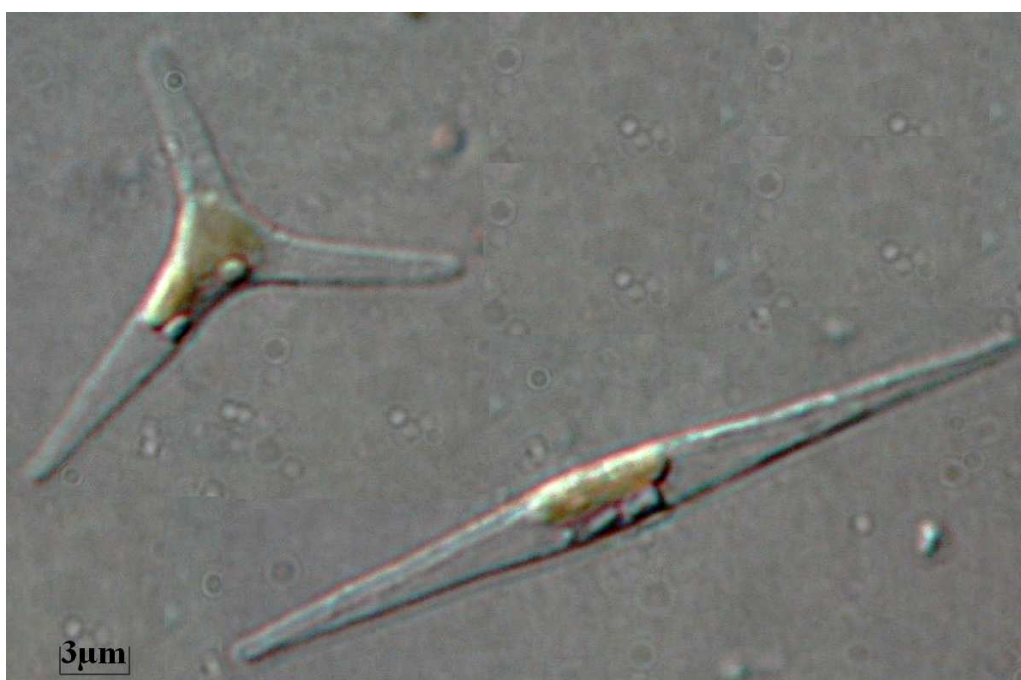


Figure I-14 Photographie de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* : vue valvaire (microscopie optique, inverse de phase, x1000) (longueur \cong 32 μ m).

De nombreux travaux ont été menés sur *P. tricornutum* notamment sur l'adsorption, l'accumulation et la séquestration des métaux. Cette diatomée apparaît, dans les différents travaux, très résistante à la toxicité des métaux. Braek *et al.* (1980) montrent que la résistance de *P. tricornutum* au cadmium est plus importante que celle de *Thalassiosira pseudonana* et de *Skeletonema costatum*, pourtant citée par Brand *et al.* (1986) comme étant une diatomée très résistante au cadmium et au cuivre. Cid *et al.* (1995, 1996) ont déterminé une concentration en cuivre létale égale à 1 mg.L^{-1} ($\approx 15 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). A une concentration en cuivre de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, le taux de croissance de *P. tricornutum* est diminué de 50%, l'activité photosynthétique est réduite de 50% à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. A ces concentrations, ils ont montré une augmentation de l'activité peroxydase dans les cellules ainsi que des dommages membranaires. A des concentrations inférieures ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$), ils ne mettent pas d'effets toxiques en évidence mais une diminution de la concentration en ATP qui pourrait traduire une consommation d'énergie nécessaire pour « neutraliser » l'excès de cuivre. Morelli et Scarano (2004) ont également mis en évidence des désordres membranaires induits par une exposition prolongée à une concentration élevée de cuivre ($10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) et une synthèse précoce de phytochélatines.

Les phytochélatines ont été très étudiées chez *P. tricornutum* notamment en présence de cadmium dans le milieu. Le cadmium est le premier inducteur de la synthèse de phytochélatines (Morelli et Scarano, 2001). Le cadmium apparaît être moins toxique pour *P. tricornutum* que le cuivre ; les IC 50 sont plus élevées. En effet, Torres *et al.* (1997) ont noté une diminution du taux de croissance des cultures de *P. tricornutum* réalisées sur eau de mer non enrichie à partir de 5 mg.L^{-1} de cadmium, une réduction de ce taux à 50% à 10 mg.L^{-1} et à 70% à 100 mg.L^{-1} , ainsi qu'une synthèse de métallothionéines de classe III, à laquelle appartiennent les phytochélatines. L'augmentation de la concentration en cadmium dans le milieu induit un raccourcissement de la phase exponentielle de croissance, la population atteint la phase plateau de croissance plus rapidement. Kudo *et al.* (1996) montrent que la concentration intracellulaire en cadmium augmente en fonction de la concentration extérieure. Néanmoins, dans les expériences menées par Torres *et al.* (1998), le cadmium se trouvait majoritairement intracellulaire dans des cellules exposées jusqu'à 25 mg.L^{-1} de cadmium et au-delà de cette concentration, la part de cadmium adsorbée sur la cellule devient majoritaire par rapport à la part intracellulaire ; ce phénomène est apparemment induit par la toxicité du cadmium pour la cellule.

Morelli et Scarano (2001) ont étudié la toxicité du plomb et du zinc (0 à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de métal ajouté aux cultures réalisées sur eau de mer enrichie) qui entraînent une réduction du taux de croissance de *P. tricornutum*. Cette réduction du taux de croissance en présence de plomb a également été montrée par Jensen *et al.* (1974). Le plomb tout comme le cadmium et le cuivre induit la production de phytochélatines, le zinc par contre ne l'induit pas (Morelli et Scarano, 2001). L'assimilation du zinc dans *P. tricornutum* a été décrite par Davies (1973) : le zinc est rapidement adsorbé à la surface de la cellule et est ensuite acheminé dans la cellule *via* un transport diffusif contrôlé dont le taux est proportionnel au gradient de concentration entre le milieu et le zinc fixé au niveau de la paroi.

I-3.2.c *Skeletonema costatum* (Greville, 1865) Cleve (1873)

Emb. Chromophytes, Cl. Bacillariophycées, O. Biddulphiales, S. O. Coscinodiscinae, F. Thalassiosiraceae (Tomas, 1997)

Diatomée centrique coloniale (Figure I-15). Les cellules algales sont réunies en file par l'emboîtement des digitations terminant les expansions externes des processus renforcés. Les valves sont plus ou moins bombées et discoïdes, le diamètre de la valve mesure entre 10 et 20 μm . Cette espèce est commune et abondante dans le phytoplancton néritique et pélagique et se rencontre souvent dans les estuaires avec une forte biomasse (Rincé, 1993).

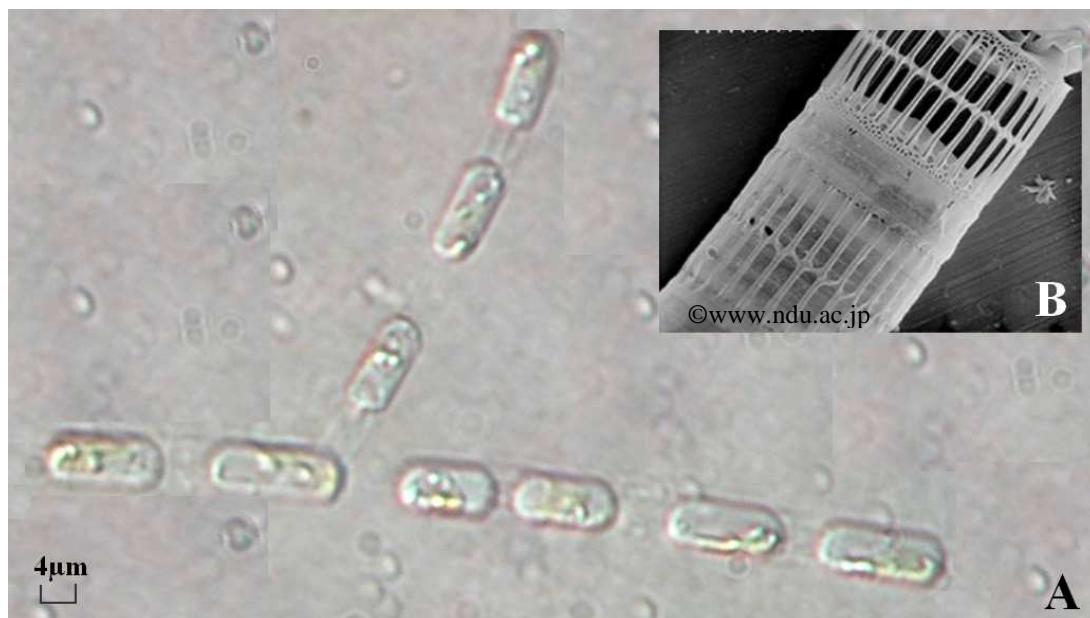


Figure I-15 Photographies de la diatomée *Skeletonema costatum*. A : chaînes de trois et six cellules en vue cingulaire (microscopie photonique, x 400), B : détail des extensions externes des processus renforcés (microscopie électronique à balayage).

Cette diatomée est largement utilisée dans le nourrissage des bivalves cultivés en baie de Bourgneuf. Les souches utilisées ont été isolées à partir de prélèvements effectués dans la baie de Bourgneuf (Loire-Atlantique, Vendée, France).

Le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc sont responsables d'une diminution du taux de croissance des populations de *S. costatum* (Berland *et al.*, 1977; Rivkin, 1979; Brand *et al.*, 1986 ; Nassiri *et al.*, 1997; Perrein-Ettajani *et al.*, 1999). Le cuivre apparaît plus toxique que le cadmium pour *S. costatum* (Berland *et al.*, 1976; Brand *et al.*, 1986 ; Nassiri *et al.*, 1997). Le cuivre induit le plus souvent un allongement de la phase de latence de croissance. Morel *et al.* (1978) associent ce phénomène à un blocage de la première division cellulaire, physiologiquement différente des divisions suivantes. Néanmoins, la toxicité du cuivre dans les phénomènes de division cellulaire se poursuit après la phase de latence et un blocage partiel des divisions a été noté traduit par un allongement de l'axe perivalvaire ou un accroissement du volume cellulaire (Berland *et al.*, 1977; Rivkin, 1979). Le blocage de la division cellulaire pourrait provenir d'une inhibition de l'assimilation du silicium dans la cellule (Morel *et al.*, 1978). Le silicium serait impliqué en tant que régulateur de la division cellulaire (Sullivan et Volcani, 1976 ; Henrotte *et al.*, 1988). Pour réduire la toxicité du cadmium et du zinc en réduisant leur concentration cytosolique, ces métaux sont stockés dans des granules intravacuolaires où ils sont associés à de l'azote et du soufre ; l'azote et le soufre suggèrent la présence de protéines chélatrices de type phytochélatines (Nassiri et Ginsburger-Vogel, 1995a, b).

La présence de plomb dans le milieu induit une réduction du taux de croissance, de la biomasse maximale et du processus de respiration cellulaire, mais une augmentation de la photosynthèse et du volume cellulaire (Rivkin, 1979). Comme nous l'avons déjà signalé, le zinc peut provoquer des modifications ultrastructurales des cellules avec l'apparition de tubules issus de l'appareil de Golgi et de nombreuses cassures des membranes des chloroplastes et des mitochondries, pour augmenter la surface membranaire capable de fixer le zinc en excès (Smith, 1983). Une concentration en zinc de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ induit une réduction du taux de croissance (Jensen *et al.*, 1974).

Perrein-Ettajani *et al.* (1999) ont pu mettre en évidence une différence de comportement entre le cadmium et le cuivre. Alors que le cuivre se trouve facilement désorbé des cellules algales en présence d'un complexant après une durée d'exposition, le cadmium semble fortement lié à la paroi ou intracellulaire. Gélabert *et al.* (2005) ont montré l'existence à la

surface de *S. costatum* d'un mucilage superposé au frustule composé de polysaccharides et de protéines pouvant fixer le plomb et le cadmium sur des fonctions carboxyliques. Imber *et al.* (1985) ont mis en évidence une production d'exsudats synthétisés et excrétés par *S. costatum* augmentant la complexation du zinc dans le milieu pour réduire sa biodisponibilité.

I-3.2.d *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (1959)

Emb. Chlorophycophytes, Cl. Prasinophycées, O. Chlorodendrales, F. Chlorodendraceae (Tomas, 1997)

Prasinophycée (Figure I-16) mobile possédant 4 flagelles de taille égale insérés dans une dépression antérieure, elle est ovoïde et comprimée latéralement. La cellule est enveloppée dans une thèque organique. La souche utilisée a été isolée à partir d'un prélèvement effectué au Croisic (Loire-Atlantique, France).

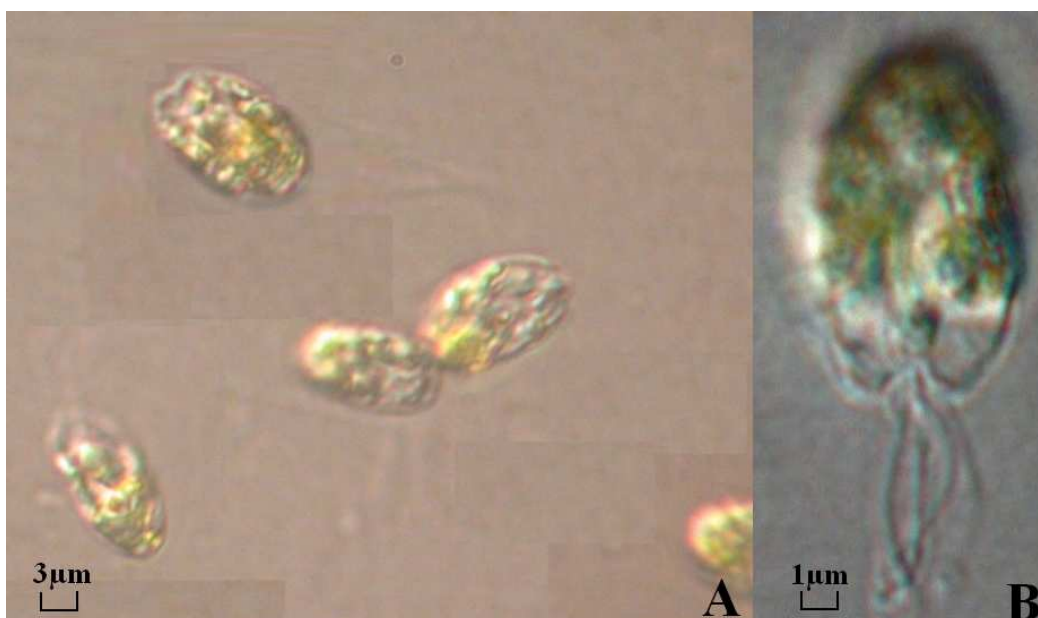


Figure I-16 Photographie de la Prasinophycée *Tetraselmis suecica* (longueur \cong 14 μ m). A : observation de cellules fixées dans une solution formolée (microscopie optique, x1000), B : mise en évidence des quatre flagelles (microscopie optique, inverse de phase, x1000).

Les études sur la toxicité métallique vis-à-vis de *T. suecica* ont principalement concernées le cadmium. Comme pour les autres algues, le cadmium et le cuivre entraînent une réduction du taux de croissance mais les teneurs en glucides, en protéines et en pigments ne sont pas affectées (Perrein-Ettajani *et al.*, 1999). Le cadmium et le cuivre sont majoritairement accumulés dans la phase insoluble dans des vésicules de stockage, denses aux électrons, riches en azote et en soufre qui supposent l'implication de phytochélatines (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991 ; Nassiri *et al.*, 1994; Nassiri et Ginsburger-Vogel, 1995a ; Perrein-

Ettajani *et al.*, 1999 ; Pérez-Rama *et al.*, 2001). Le cadmium n'induit pas, jusqu'à une concentration de 5 mg.L^{-1} , de modifications majeures dans l'ultrastructure de la cellule, mises à part la multiplication et l'abondance croissante de vésicules denses dans le cytoplasme. Par contre, à partir de $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, le cuivre réduit la motilité des cellules et induit une perte de matière organique ; une concentration en cuivre égale à $500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ inhibe totalement la croissance et entraîne une désorganisation totale de la cellule (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991; Nassiri *et al.*, 1994 ; Nassiri *et al.*, 1996). En plus des vésicules, le cadmium et le cuivre sont également stockés dans la matrice extracellulaire recouvrant la paroi, le cuivre entraîne un épaissement de la paroi et une excrétion de la matière organique (Nassiri *et al.*, 1994 ; Nassiri *et al.*, 1996). Un allongement de la phase de latence a été observé en présence de cadmium dans les cultures de *T. suecica* sans effet ensuite sur les phases exponentielle et stationnaire de croissance ce qui suggère une phase d'acclimatation de l'algue à la présence du cadmium dans le milieu (Nassiri *et al.*, 1996).

I-3.3 Conclusion

Les microalgues choisies pour cette étude présentent des caractéristiques différentes au niveau morphologique et métabolique. L'accumulation des métaux n'est pas semblable d'une microalgue à l'autre. Roméo et Gnassia-Barelli (1985) avaient déjà noté que l'espèce était un facteur plus important que la classe dans les phénomènes d'accumulation de métal et soulignait l'importance de la paroi cellulaire. Les besoins nutritionnels diffèrent sensiblement d'une espèce microalgale à l'autre ; leur valeur nutritionnelle et leur potentialité à stocker des métaux diffèrent aussi. Ces principales différences sont susceptibles de se répercuter sur les consommateurs et notamment d'influencer l'accumulation des métaux au niveau de ce deuxième maillon.

I-4 Notions de transfert des métaux dans une chaîne trophique courte

La Figure I-17 est un schéma simplifié (ne prenant pas en compte les complexes lipophiles évoqués page 33) du transfert des métaux du milieu au consommateur primaire dans une chaîne trophique courte. La fraction biodisponible pour la microalgue ou le bivalve (dans le cas de la voie directe d'assimilation) est associée au métal labile, opposé au métal complexé considéré comme non biodisponible tel qu'il a été défini auparavant. La concentration en métal labile est en équilibre avec celle du métal complexé en fonction des constantes d'association et de dissociation des différents ligands. L'adsorption et l'assimilation des métaux par les organismes vont modifier ces équilibres ainsi que le rejet dans le milieu de molécules complexantes. L'équilibre des formes métalliques dans le milieu a été discuté dans les paragraphes précédents.

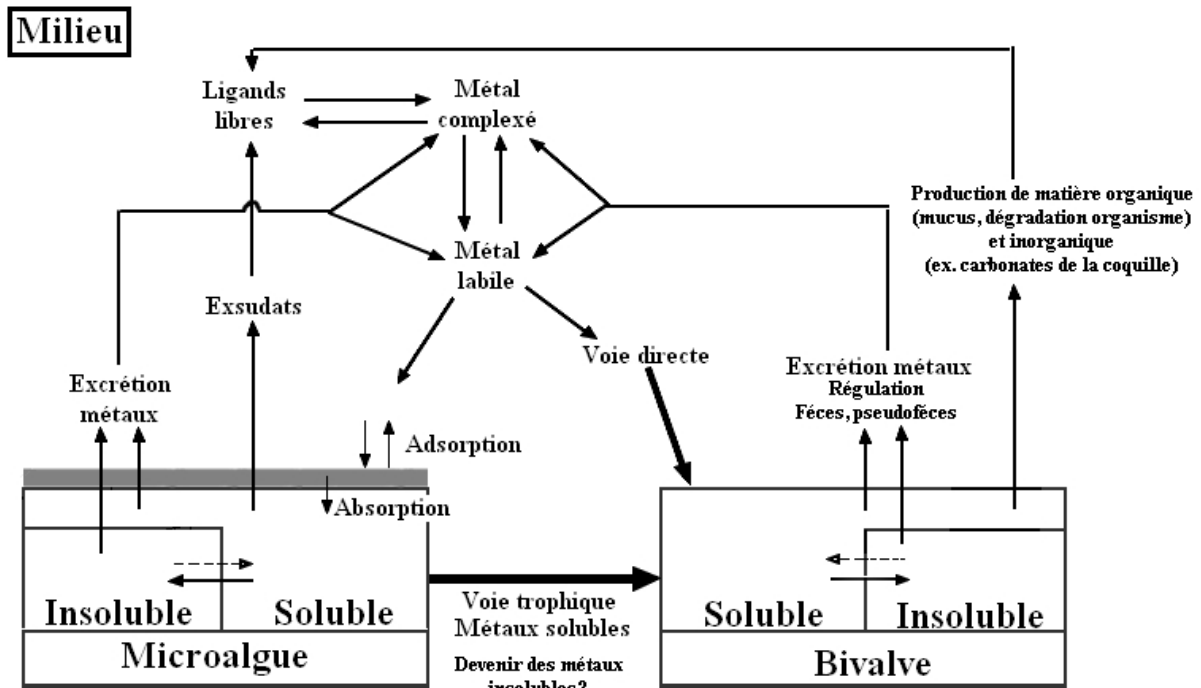


Figure I-17 Schéma simple du transfert des métaux présents dans le milieu dans une chaîne trophique courte microalgues-bivalves

L'accumulation des métaux dans le deuxième maillon d'une chaîne trophique marine peut s'effectuer en suivant deux voies distinctes :

- la voie directe, les métaux peuvent passer directement de l'eau à l'organisme au niveau des surfaces exposées généralement par des phénomènes de diffusion. Robinson et Ryan (1986) ont étudié les interactions entre le cadmium présent dans l'eau et les tissus de la palourde américaine *Mercenaria mercenaria*. Ils ont pu montrer qu'il y avait une réelle accumulation de cadmium dans les tissus et ce en fonction du tissu concerné. Le taux de cadmium accumulé était plus élevé pour le rein que pour les autres organes (branchie, manteau, glande digestive, glande péricardique et le muscle adducteur). Dans la plupart des études de transfert des métaux dans la chaîne trophique, la part de transfert direct du milieu à l'organisme consommateur est évaluée (Martoja *et al.*, 1988; Ettajani *et al.*, 2001 ; Rainbow *et al.*, 2004).
- la voie trophique, les métaux accumulés dans les microalgues sont assimilés lors du processus de digestion. Dans ce cas, plusieurs paramètres sont à prendre en considération pour déterminer le facteur d'assimilation des métaux par les bivalves *via* la voie trophique. Outre les caractéristiques physiologiques des consommateurs (ex. taux de filtration, sélection des particules) qui vont définir ce taux d'assimilation, les formes sous lesquelles les métaux sont stockés dans les microalgues vont influencer cette assimilation (Ng *et al.*, 2005). Les métaux précipités sous formes de granules dans les cellules algales ne sont quasiment pas assimilables par le consommateur (Perrein-Ettajani *et al.*, 1999 ; Ettajani *et al.*, 2001). De même, les processus de digestion (temps de digestion, pH des solutions dans le tube digestif) vont intervenir dans la désorption des métaux associés aux parois algales et dans la solubilisation des métaux cytosolubles (Wang, 2002). Ces phénomènes sont à la base des hypothèses expliquant les différences d'assimilation des métaux chez les consommateurs en fonction des microalgues dont ils se nourrissent.

La spéciation des métaux dans les eaux et la répartition des métaux dans les algues (adsorption, absorption, métaux cytosolubles ou insolubles) vont donc intervenir dans l'assimilation des métaux dans les différents éléments de la chaîne trophique. Il est donc intéressant de connaître ces paramètres pour étudier le transfert des métaux le long de la chaîne trophique.

I-5 Conclusion

Les eaux souterraines salées diffèrent des eaux marines par leur richesse en nutriments et en oligo-éléments. Les eaux souterraines de la baie de Bourgneuf présentent des caractéristiques proches de celles de l'eau de mer permettant la culture de microalgues. Cependant, on peut s'attendre à des variations de la spéciation des métaux dans les eaux souterraines salées par rapport à l'eau de mer en raison de la présence de molécules inorganiques telles que les oxydes de fer ou de l'absence de molécules organiques de type acides humiques. Les caractéristiques particulières de ces eaux risquent donc d'avoir un impact sur les cultures de microalgues : sur leur croissance, sur leur qualité biochimique et sur l'accumulation de métaux dans les cellules.

Les eaux souterraines salées provenant de deux forages situés près de Bouin (en Vendée) ont été utilisées pour réaliser des cultures de microalgues et pour comparer différentes variables (croissance, production de glucides, de protéines et de pigments, accumulation de métal) entre ces cultures et des cultures réalisées sur un milieu enrichi à base d'eau de mer. L'objectif de ce travail était de faire le point sur les variations observées de ces variables pour quatre espèces d'algues en fonction du milieu de culture.

Chapitre II Cultures sur eaux souterraines salées non enrichies en métaux

II-1 Introduction

Les nappes d'eau souterraine salée du pourtour de la baie de Bourgneuf sont utilisées pour la culture de microalgues en gros volume. A la station Ifremer de Bouin et sur la concession aquacole de F. Taraud, des cultures de *Skeletonema costatum* sont réalisées dans des bassins en béton d'une contenance de 100 m³, directement approvisionnés en eau souterraine salée. Les cultures sont réalisées en mode semi-continu, le bassin est vidé de deux tiers à intervalles réguliers et remplis de nouveau avec l'eau souterraine salée (F. Taraud, comm. pers.). Les algues ainsi cultivées sont soit concentrées par centrifugation, soit diluées avec de l'eau de mer avant d'alimenter les bassins d'élevages de mollusques.

Les concentrations élevées de nutriments majeurs et d'oligo-éléments dans les eaux souterraines salées permettent un bon développement des microalgues sans enrichissement supplémentaire (Baud et Bacher, 1990; Bacher et Baud, 1992; Sauriau *et al.*, 1997; Barillé *et al.*, 2003). Dans les cultures d'algues sur eau de mer, un enrichissement est nécessaire, les solutions f/2 d'enrichissement de Guillard (1982) sont le plus communément utilisées (Lavens et Sorgeloos, 1996). De part l'accessibilité de la ressource (faible profondeur de la nappe) et les concentrations naturelles en nutriments majeurs et en oligo-éléments des eaux souterraines salées, le coût des cultures d'algues sur ces eaux est donc moins élevé que celui des cultures sur eau de mer. Néanmoins, les concentrations relativement élevées en métaux soulèvent des interrogations quant à leur bioaccumulation dans les cellules algales. Dans le cadre de l'activité de la société SOPROMA (1992-2002) installée au Port des Brochets à Bouin, des cultures d'*Haslea ostrearia* étaient réalisées pour fabriquer une pâte d'algue. Cette pâte était utilisée pour verdir des huîtres *via* la marennine synthétisée par la diatomée, ces huîtres répondaient à l'appellation « Huîtres Emeraudes © ». La pâte était également commercialisée en cosmétologie pour ses activités anti-irritantes et raffermissantes (Site de la Soproma, <http://perso.orange.fr/soproma/pate.htm>). Des études réalisées par le Syndicat Mixte pour le

Développement de l'Aquaculture et de la Pêche (SMIDAP) à la demande de la Région des Pays de la Loire ont mis en évidence dans les cellules d'*Haslea ostrearia* cultivées sur l'eau souterraine salée provenant du forage de la SOPROMA, des teneurs en certains métaux, dont le plomb, supérieures à celles tolérées selon les normes alimentaires en vigueur (SMIDAP, comm. pers.).

Moreau (1996) a mis en évidence l'influence sur les cultures de la richesse en fer et en manganèse contenus dans ces eaux. Le cuivre et le zinc avaient également été montrés comme « abondants » dans ces eaux. Les difficultés de dosage des métaux dans les matrices salées amènent le plus souvent à utiliser des techniques d'extraction impliquant des seuils de détection relativement élevés. C'est pourquoi le plomb n'avait pu être quantifié dans les eaux.

Dans cette étude, il nous paraissait intéressant d'étudier des cellules microalgales cultivées sur eaux souterraines salées pour faire un point sur l'accumulation des métaux dans les cellules par rapport à la concentration de métaux dans ces eaux.

La société SOPROMA étant en cessation d'activité, l'accès au forage n'a pas été possible. Le forage le plus proche de celui-ci se trouve sur la concession aquacole de F. Taraud. Ce forage était l'un de ceux échantillonnés dans l'étude de Moreau (1996). Pour cette étude, nous avons pu avoir accès à ce forage et obtenir l'eau nécessaire aux expérimentations. Pour avoir un point de comparaison, l'eau souterraine salée de la station Ifremer a été utilisée. Ce forage était également l'un de ceux échantillonnés par Moreau (1996). A la station Ifremer, l'eau souterraine salée brute mais également l'eau souterraine salée traitée, destinée à l'alimentation des bassins d'élevage d'huîtres, ont été prélevées.

Dans ces eaux souterraines salées, nous nous sommes intéressés aux deux métaux essentiels le cuivre et le zinc, et aux deux métaux comme non-essentiels le cadmium et le plomb. Le cuivre et le zinc sont des métaux importants dans le métabolisme cellulaire : co-enzymes, catalyseurs de réactions enzymatiques, éléments structuraux de certaines métalloprotéines.

Le cadmium et le plomb sont considérés non-essentiels n'ayant pas de fonction biologique associée dans les cellules. Le cadmium est un métal le plus souvent sous forme labile dans les eaux salées, donc potentiellement biodisponible. Au niveau cellulaire, le cadmium substitue le zinc sur les sites protéiques entraînant le plus souvent une inactivation

de la protéine concernée (Price et Morel, 1990). Dans les études précédentes sur les cultures sur eaux souterraines salées, la teneur en plomb dans les cellules était pour certains échantillons supérieure à celle tolérée par la législation en vigueur.

Le choix des microalgues retenues pour cette étude s'est porté sur des espèces largement utilisées en aquaculture : *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*. Les cultures de la diatomée *Haslea ostrearia* sont moins fréquentes, mais représentent un intérêt économique pour la région Pays de La Loire en ostréiculture (verdissement des branchies d'huîtres), en cosmétologie et en industrie pharmaceutique par les activités biologiques de la marenne.

Dans ce chapitre, nous proposons, dans un premier temps, d'étudier les caractéristiques physico-chimiques (pH, salinité, alcalinité, concentrations en nutriments majeurs et en métaux) des eaux souterraines salées échantillonnées et de les comparer à celles de l'eau de mer. La technique de voltampérométrie à redissolution anodique à impulsions différentielles permet des dosages directs dans les eaux (sans extraction préalable). La sensibilité et la précision de la méthode sont définies dans cette étude. Dans un second temps, des cultures de microalgues sont réalisées sur les eaux souterraines salées et sur l'eau de mer en conditions contrôlées (température, intensité lumineuse, volume). Les variables qui nous permettent de caractériser les cultures (densité en cellules, teneurs en caroténoïdes, en chlorophylle *a* et phéopigments, en glucides et en protéines, teneurs en métaux) sont analysées et mises en relation avec les variables physico-chimiques caractérisant les eaux. L'objectif de cette étude est de relier la qualité des cellules microalgales produites aux qualités de l'eau utilisée pour leur culture : eaux souterraines salées ou eau de mer enrichie.

II-2 Matériel et méthodes

II-2.1 Prélèvement des eaux souterraines salées et de l'eau de mer

Les eaux souterraines salées ont été prélevées à la concession aquacole de Monsieur F. Taraud (Port des Brochets, Bouin, Vendée) et à la station Ifremer (Polder Nord du Dain, Bouin). Comme il a été décrit précédemment dans le chapitre I, à la station Ifremer, la production de microalgues est réalisée avec de l'eau souterraine brute tandis que l'eau utilisée dans les bacs où sont élevées les huîtres subit un traitement. Les eaux avant et après traitement ont été collectées. L'eau de mer a été prélevée sur la côte ouest de l'île de Noirmoutier. Comme les cultures expérimentales d'algues sur eau de mer ne permettent généralement pas d'obtenir des biomasses importantes ; l'eau de mer a été enrichie avec les solutions décrites dans la confection du milieu f/2 (Guillard, 1982) de façon à obtenir des concentrations en nutriments majeurs du même ordre de grandeur que celles mesurées dans les eaux souterraines salées.

Chaque type d'eau utilisée pour les cultures microalgales a été prélevé dans une bonbonne de 60L en polypropylène préalablement nettoyée à l'aide d'un détergent et rincé 3 fois avec l'eau de prélèvement.

Les eaux destinées aux analyses (dosage de métaux et des sels nutritifs) ont été prélevées dans des bouteilles en polypropylène préalablement nettoyées avec de l'acide chlorhydrique 6N pendant 48h, puis rincées 3 fois avec de l'eau ultra-pure et 3 fois avec l'eau prélevée. Les échantillons destinés au dosage des métaux totaux ont été acidifiés sur place à pH 2 avec 1mL/1L d'acide chlorhydrique HCl 36% (11,6 N) ; ils ont été conservés à l'abri de la lumière à température ambiante. Les échantillons d'eau destinés au dosage des métaux labiles ont été prélevés dans des flacons de 2L qui ont été nettoyés avec un mélange acide, HCl 1N et HNO₃ 0,5N, pendant 48h et rincés 3 fois à l'eau ultra-pure puis avec l'eau prélevée. Ces échantillons ont été stockés à 4°C à l'obscurité en attendant l'analyse effectuée dans les 24 heures suivantes.

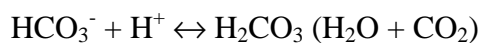
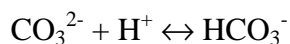
Les échantillons destinés au dosage de l'azote sous forme ammoniacale ont été traités sur place en ajoutant immédiatement les réactifs et conservés à température ambiante et à l'obscurité. Ceux destinés au dosage des autres nutriments (azote sous forme nitrique et nitreuse, phosphore et silice inorganiques dissous) ont été placés dans une enceinte isotherme

de type glacière immédiatement après le prélèvement, puis dès le retour au laboratoire, ils ont été placés au congélateur à -20°C jusqu'aux analyses.

II-2.2 Caractéristiques physico-chimiques des eaux

La **température** a été mesurée *in situ* avec un thermomètre à mercure (précision 0,1°C) La **salinité** a été mesurée par conductimétrie.

Les dosages du **pH** et de l'**alcalinité due aux carbonates** ont été réalisés au laboratoire. L'alcalinité due aux carbonates est le nombre de milliéquivalents d'ions hydrogène neutralisés par 1kg d'eau de mer quand les ions carbonates et hydrogénocarbonates sont convertis en dioxyde de carbone dissous selon les réactions :



La méthode utilisée pour déterminer l'alcalinité due aux carbonates est celle décrite par Strickland et Parsons (1972) adaptée aux eaux souterraines salées par Moreau (1996). Les concentrations en dioxyde de carbone dissous (H_2CO_3), en carbonates (CO_3^{2-}) et en hydrogénocarbonates (HCO_3^-) sont calculées à partir de l'alcalinité due aux carbonates en suivant les équations de Hansson (1973) et de Mehrbach *et al.* (1973) qui permettent de calculer les constantes de dissociation de l'acide carbonique dans l'eau de mer.

Le pH d'un échantillon d'eau de volume connu est mesuré, puis de l'acide chlorhydrique 0,05 N est ajouté jusqu'à ce que le pH de l'échantillon se stabilise entre 2,8 et 4. En fonction du volume de l'échantillon et du volume d'acide ajouté, des valeurs de pH initial et final, de la température et de la salinité, les concentrations en CO_3^{2-} , HCO_3^- et H_2CO_3 sont calculées à partir de l'activité en ions hydrogène dans l'échantillon prélevé et des constantes d'équilibre entre les différentes formes du carbone.

L'**azote ammoniacal** est dosé par la méthode de Koroleff (1969, *in* Aminot, 1983) basée sur la réaction de Berthelot (1859), modifiée par Grasshof et Johannsen (1972, *in* Aminot, 1983). Les réactifs ont été ajoutés immédiatement après le prélèvement pour quantifier la concentration en azote ammoniacal avant toute modification physico-chimique induite par le contact avec l'air atmosphérique. Les échantillons ont été conservés à l'obscurité à température ambiante.

Le principe du dosage repose sur la présence en milieu alcalin ($8 < \text{pH} < 11,5$) d'une monochloramine formée par l'association de l'azote ammoniacal et du chlore présent dans l'échantillon. Cette monochloramine réagit avec le phénol et l'acide dichloroisocyanurique pour donner un bleu d'indophénol dont la densité optique est proportionnelle à sa concentration et donc à la concentration d'azote sous forme ammoniacale dans l'échantillon. Cette relation linéaire est valable dans la gamme de $0,1$ à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Moreau, 1996). La coloration est maximale après 6 heures et stable plusieurs jours. La gamme étalon a été réalisée avec une solution de chlorure d'ammonium NH_4Cl , diluée à différentes concentrations dans une solution de NaCl de même salinité que les échantillons. Les dilutions éventuelles des échantillons ont été réalisées avec la solution de NaCl utilisée pour la préparation de la gamme.

Le calcul des concentrations en ammoniac NH_3 en fonction de la concentration en azote sous forme ammoniacale $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ est réalisé en suivant les équations de Johansson et Wedborg (1980) qui prennent en compte la salinité, le pH et la température de l'eau analysée :

$$\% \text{NH}_3 = \frac{100}{(1 + 10^{\log k_1 - \text{pH}})}$$

$$\text{avec } \log k_1 = -0,467 + (0,00113 * \text{salinité}) + (2887,9 * \frac{1}{\text{température } ^\circ\text{K}})$$

Les échantillons d'eau pour les **dosages d'azote nitrique (NO_3^-) et nitreux (NO_2^-), de phosphore et de silicium inorganiques dissous** ont été décongelés juste avant l'analyse. Ces dosages ont été réalisés à l'aide d'un autoanalyseur SKALAR en suivant les techniques colorimétriques décrites par Strickland et Parsons (1972) et Aminot (1983) dont la validité d'utilisation pour les eaux souterraines salées a été vérifiée par Moreau (1996).

Le **dosage de l'azote nitreux** a été réalisé selon la méthode de Shinn (1941) modifiée par Bendschneider et Robinson (1952). Les nitrites sont diazotés avec une solution de sulfanilamide, puis le diazoïque réagit avec le chlorhydrate de N-naphtyléthylènediamine pour fournir un colorant azoïque dont la densité optique peut être mesurée à 543 nm . La gamme étalon a été réalisée avec une solution de nitrites (à partir de NaNO_2 anhydre) de 0 et $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La concentration d'azote nitreux dans l'eau de mer est faible par rapport aux autres formes d'azote.

L'**azote nitrique** a été réduit sous forme d'azote nitreux par passage sur une colonne Cd-Cu selon la méthode décrite par Wood *et al.* (1967) ce qui permet de doser l'azote N-NO_2^-

+N-NO₃⁻ (la concentration en azote nitreux est déduite pour obtenir la concentration en azote nitrique). La gamme étalon réalisée à partir de nitrate de potassium (KNO₃) anhydre s'étend de 0 et 40 μmol.L⁻¹.

Le **phosphore inorganique dissous** a été dosé par la méthode de Murphy et Riley (1962) et le **silicium inorganique dissous** suivant la méthode de Mullin et Riley (1955) adaptées par Strickland et Parsons (1972).

Le **phosphore inorganique dissous** dans l'eau de mer est essentiellement présent sous la forme d'ions orthophosphates (majoritairement HPO₄²⁻ et PO₄³⁻). Les ions orthophosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium en milieu acide pour former un complexe jaune (le phospho-molybdate d'ammonium), qui par réduction en présence d'acide ascorbique, donne un complexe bleu phosphomolybdique. La densité optique a été mesurée à 885 nm. La gamme étalon a été réalisée avec une solution de phosphate de potassium (KH₂PO₄). La relation DO-concentration est linéaire entre 0,03 et 5 μmol.L⁻¹. L'ajout d'antimonyl tartrate de potassium et l'utilisation d'un bain-marie à 40°C permettent de réduire le temps de réaction.

Le **silicium inorganique dissous** dans l'eau de mer est majoritairement présent sous la forme d'acide orthosilicique Si(OH)₄. Le silicium inorganique dissous réagit en milieu acide avec les ions molybdates pour former également un complexe jaune (l'acide silico-molybdique) qui, réduit en présence d'acide ascorbique, donne un complexe bleu. Pour éviter une interférence avec les phosphates, de l'acide oxalique est ajouté. La densité optique a été mesurée à 810 nm. La gamme étalon a été réalisée avec une solution de métasilicate de sodium de 0 à 360 μmol.L⁻¹.

Pour ces dosages, la salinité est un paramètre important. L'eau qui sert de référence pour le réglage du zéro (réglage de la ligne de base) est une solution de NaCl correspondante à la salinité des échantillons. Cette solution a été également utilisée pour réaliser les solutions étalons et les dilutions des échantillons.

II-2.3 Dosages des métaux par voltampérométrie à redissolution anodique à impulsions différentielles

II-2.3.a Matériel

Les analyses en DP-ASV ont été effectuées avec un analyseur polarographique EG & G PAR M394 relié à un appareil EG & G PARC MODEL SMDE 303A constituée de trois électrodes (Figure II-1) :

- Une électrode à goutte de mercure pendante, à la surface de laquelle vont se dérouler les réactions d'oxydo-réduction. Les courants résultant de ces réactions d'oxydo-réduction sont enregistrés *via* cette électrode de mercure.
- Une électrode de référence Ag / AgCl, qui contrôle le potentiel imposé à l'électrode à goutte de mercure. Cette électrode est impolarisable et n'intervient pas dans les courants électriques créés dans la solution.
- Une contre-électrode en platine, qui dévie, de l'électrode de référence, le courant créé par les réactions d'oxydo-réduction. Le courant s'établit donc entre l'électrode à goutte de mercure et la contre-électrode.

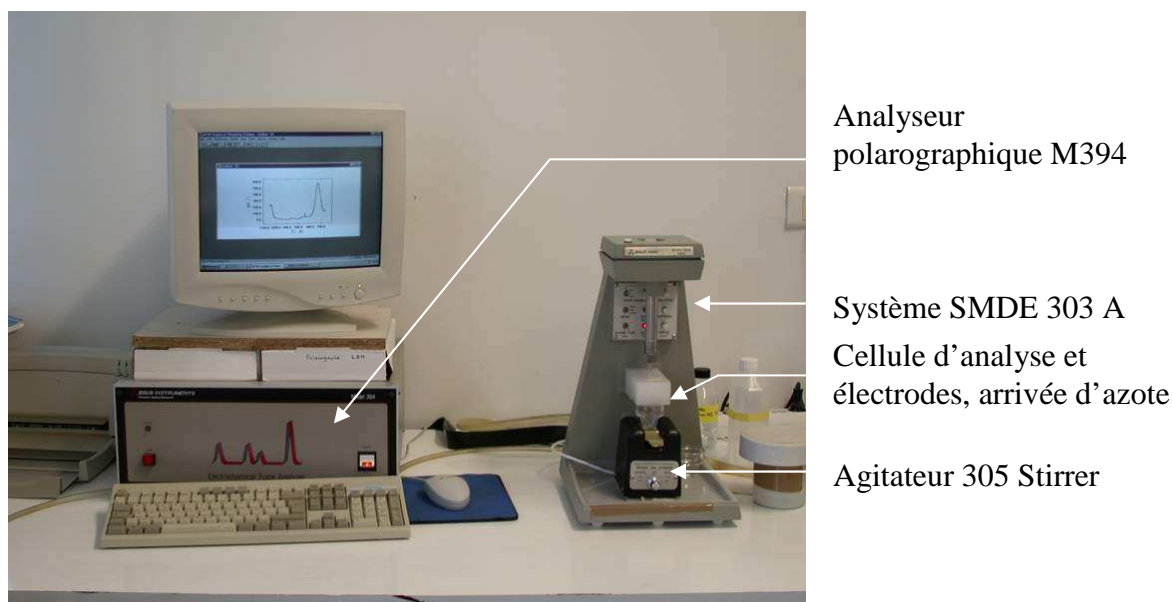


Figure II-1 Photographie du matériel de polarographie utilisé pour la voltampérométrie à redissolution anodique à impulsions différentielles.

La cellule de mesure est une cellule thermostatée d'une contenance de 13 mL, un groupe réfrigérant (Bioblock Scientific) maintient la cellule à une température de 20°C. L'agitation dans la cellule est assurée par un barreau aimanté et un agitateur magnétique (EG & G PAR Model 305 Stirrer) contrôlé par le logiciel d'analyse EG & G M394 (Analytical Voltammetry Software, version 2.01). L'arrivée d'azote dans la cellule est également contrôlée par le logiciel.

Les variations de courant enregistrées au niveau de la goutte de mercure sont traitées *via* l'analyseur polarographique et le logiciel d'analyse.

II-2.3.b Principe de la voltampérométrie à redissolution anodique à impulsions différentielles (DP-ASV)

L'analyse des métaux dans les échantillons d'eau de mer en DP-ASV avec une électrode à goutte de mercure pendante peut se diviser en trois étapes :

- Etape de pré-électrolyse ou de concentration : un potentiel négatif est imposé à l'électrode de mercure ; le métal présent dans la solution agitée est réduit à la surface de la goutte de mercure en produisant un amalgame métal-mercure. La quantité de métal concentré sur la goutte est proportionnelle à la quantité totale de métal dans l'échantillon. L'agitation permet de réduire la couche de diffusion autour de la goutte de mercure et entretient cette proportionnalité.
- Etape d'équilibration : elle consiste en un temps de repos (sans agitation) toujours avec un potentiel imposé négatif, elle permet une répartition homogène des métaux à la surface de la goutte.
- Etape de redissolution : un balayage de potentiel vers des valeurs positives permet par oxydation de remettre en solution les métaux fixés, à des valeurs de potentiels spécifiques à chaque métal, voire à chaque espèce d'un même métal. La réaction d'oxydation produit un courant. L'intensité de ce courant est enregistrée en fonction du potentiel, un voltampérogramme est obtenu avec en abscisse l'échelle de potentiel (V) et en ordonnée l'intensité du courant (nA). Les pics sont spécifiques de chaque espèce métallique réactive et leur hauteur est proportionnelle à leur concentration initiale.

Avant la concentration sur la goutte, un bullage d'azote est effectué pour chasser l'oxygène présent dans la solution qui est susceptible d'interagir avec la goutte de mercure et donc d'interférer dans la mesure.

La tension imposée en impulsions différentielles permet un accroissement de la sensibilité de la méthode par rapport au mode normal. Une impulsion modulée est surimposée à chaque valeur de potentiel dispensée pendant le balayage. A chaque impulsion, deux

courants sont mesurés, l'un en début de l'impulsion et l'autre juste avant la fin de l'impulsion. Les deux intensités mesurées sont comparées et la modification de courant entre ces deux instants devient le signal. Cette méthode permet d'éliminer le courant capacitif « parasite » qui n'est pas dû à la réaction d'oxydo-réduction et donc améliore la résolution et la sensibilité de l'analyse. De la fréquence (Hz) donnée à ces impulsions dépendent la résolution et la sensibilité de l'analyse : une fréquence élevée favorise la sensibilité de la méthode (augmentation de la hauteur des pics) mais diminue la résolution (les pics sont plus larges), une fréquence plus basse diminue la sensibilité mais augmente la résolution (les pics sont plus étroits, la discrimination entre les pics est meilleure). Il faut donc choisir une valeur d'amplitude adaptée au type d'analyse ou d'échantillon.

La fenêtre de potentiel pour l'analyse de métaux avec une électrode à goutte de mercure vs une électrode de référence Ag/AgCl se situe aux environs de $-1,2\text{V}$ jusqu'à $-0,05\text{V}$. Cette fenêtre d'analyse varie en fonction de la solution électrolytique : pH et types d'ions présents. Vers les valeurs négatives, le mercure s'associe aux ions H^+ (pour les échantillons acidifiés) et aux ions Na^{2+} (espèce majoritaire dans l'eau de mer). Vers les valeurs positives, le potentiel d'oxydation du mercure est atteint et il est mis en solution.

II-2.3.c Protocole utilisé

Le **dosage des métaux totaux** dans les eaux souterraines salées a été effectué en DP-ASV sur des échantillons acidifiés *in situ* et traités aux ultraviolets pendant 12 heures. L'acidification à $\text{pH} = 2$ (apport d'ions H^+) permet la libération des cations associés à des contre-ions ou adsorbés sur des ligands inorganiques ou organiques. Le traitement aux ultraviolets atteint la structure des ligands et libèrent les cations inclus dans ces complexes (Florence et Batley, 1980, Skogerboe *et al.*, 1980, Nürnberg, 1983, Achterberg et van den Berg, 1994).

Le **dosage des métaux labiles** dans les eaux souterraines salées a été effectué sur des échantillons non traités conservés à l'obscurité et à 4°C , dans les 24 heures après le prélèvement. Pour le dosage, la température est rééquilibrée à 20°C dans la cellule thermostatée avant les premières analyses.

La procédure analytique est ensuite identique. La cellule d'analyse et les électrodes sont nettoyées à l'acide chlorhydrique 1N et rincés à l'eau ultra-pure entre chaque échantillon ; dix mL d'échantillon sont injectés dans la cellule. Les paramètres utilisés pour l'analyse ont été

déterminés par les calibrations effectuées sur les différents types d'eau à analyser et sont récapitulés dans le Tableau II-1 (page 77). L'analyse est répétée 3 à 4 fois puis une gamme en ajouts dosés est réalisée sur chaque échantillon pour tenir compte d'un effet matrice (impact des éléments, autres que les métaux dosés, présents dans l'échantillon sur le signal voltampérométrique) différent entre les eaux étudiées. Cette gamme est obtenue en enregistrant les réponses voltampérométriques suite à plusieurs ajouts successifs d'une solution étalon d'une concentration connue du métal à quantifier dans la cellule (Figure II-2). Les ajouts sont calculés de façon à obtenir dans la cellule une concentration métallique connue du même ordre de grandeur que la concentration attendue dans l'échantillon. Une droite est tracée passant par les valeurs de hauteur de pics (exprimées en nA) en fonction de la concentration en métal ajouté dans la cellule, en prenant $0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ comme valeur arbitraire initiale pour la concentration du métal dans l'échantillon. La pente a de la droite permet de calculer la concentration réelle du métal considéré dans l'échantillon : $[\text{Métal}]_{\text{échantillon}} = I_X / a$.

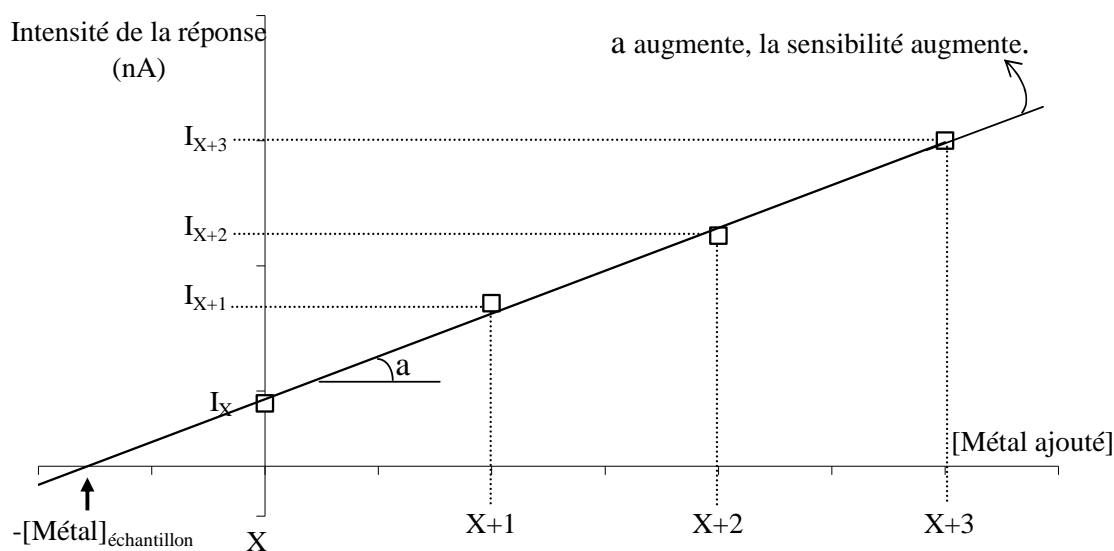


Figure II-2 Schéma du principe d'une gamme en ajouts dosés.

X : la concentration inconnue en métal dans l'échantillon, $X+1$, $+2$ et $+3$: les différents ajouts de métal (concentration connue), I : intensité de la réponse voltampérométrique, a : la pente de la droite de régression

Les solutions étalon de métaux utilisées ont été préparées à partir d'une solution de métal à 1g.L^{-1} (Prolabo, solution étalon standard SAA) diluée dans une solution d' HNO_3 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. A partir de ces solutions, des solutions métalliques mixtes (Cd, Cu, Pb et Zn) à différentes concentrations sont réalisées. Les concentrations sont déterminées en fonction de celles attendues dans les échantillons analysés.

II-2.3.d Calibrations de la méthode et détermination des seuils de détection et de quantification

Détermination du temps de bullage d'azote

Comme il a été mentionné auparavant, la présence d'oxygène dans la cellule d'analyse provoque des interférences dans les mesures. L'injection d'azote dans la cellule d'analyse permet de chasser l'oxygène et d'éliminer la majeure partie de ces interférences. Différents temps de bullage d'azote ont été testés pour évaluer l'impact sur la mesure de façon à trouver la valeur optimale tout en réduisant le temps total de l'analyse. Pour une première analyse de l'échantillon, un temps de bullage inférieur à 240 s. induit des perturbations du signal se traduisant par une augmentation du bruit et donc d'une diminution de la sensibilité de la méthode. Un temps de bullage supérieur à 240 s. n'a pas entraîné d'amélioration de la sensibilité de la méthode justifiant son emploi. Nous avons donc retenu un temps de bullage de 240 s. pour la première analyse de l'échantillon. Après ce premier bullage et cette première analyse, la cellule thermostatée reste en place pour les analyses suivantes. L'entrée d'oxygène dans la cellule d'analyse est limitée et le temps de bullage efficace peut être plus court. La durée du bullage d'azote pour les mesures suivantes sur un même échantillon a été recherchée. Un temps de bullage de 60 s. s'est avéré suffisant.

Détermination du potentiel optimal de dépôt

Pour déterminer la valeur optimale du potentiel initial de dépôt, la courbe figurant l'intensité du pic en fonction de la valeur de potentiel de dépôt est tracée pour le zinc, le cadmium, le plomb et le cuivre dans le contexte d'un dosage simultané des 4 métaux. (Figure II-3) et ce pour les deux protocoles de dosages : les dosages des métaux labiles (échantillon à pH naturel) et des métaux totaux (échantillon acidifié à pH 2 et traité aux ultraviolets).

Pour réaliser un dosage simultané des 4 métaux en DP-ASV, le potentiel de dépôt doit être inférieur au potentiel redox du zinc qui possède le potentiel le plus négatif parmi les 4 métaux. Sur les courbes, on remarque qu'à partir de $-1,2\text{V}$ et jusqu'à approcher le potentiel redox du métal, les valeurs d'intensité sont relativement stables. Quand le potentiel de dépôt est proche du potentiel redox du métal, l'intensité du signal décroît puis devient nulle (les ions métalliques ne s'accrochent plus à la goutte pour des valeurs de potentiel de dépôt supérieures à la valeur de leur potentiel redox). Pour des potentiels de dépôt inférieurs à $-1,2\text{V}$, les valeurs d'intensité présentent plus de variabilité due aux interférences liées à l'accrochage de H^+ ou Na^+ . En fonction de ces résultats, nous avons choisi un potentiel de déposition de $-1,2\text{V}$

qui permet d'obtenir une sensibilité correcte pour le zinc et de limiter la variabilité due aux interférences avec les ions H^+ et Na^+ pour l'analyse des échantillons d'eaux à pH naturel ou acidifié.

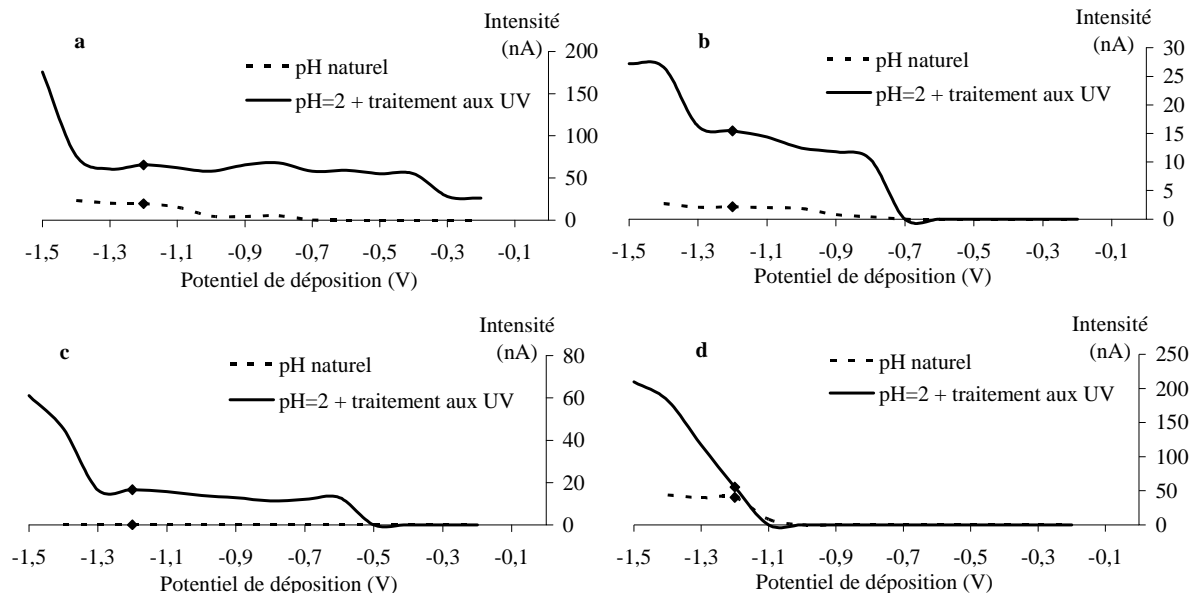


Figure II-3 Optimisation du potentiel de dépôt pour le dosage simultané du cadmium (a), du cuivre (b), du plomb (c) et du zinc (d) (◆ potentiel imposé de -1,2V)

Détermination du temps de dépôt

L'accrochage d'ions métalliques à la goutte de mercure pendant la phase de dépôt est croissant en fonction du temps jusqu'à un certain plateau (saturation de la goutte ou épuisement des ions métalliques dans la couche de diffusion). Plus le temps de dépôt est long, plus la sensibilité de la méthode sera grande. Cependant, imposer un potentiel à un échantillon induit des modifications de l'équilibre physico-chimique initial de cet échantillon et donc de la spéciation des éléments (Varney *et al.*, 1984; Sanz-Medel, 1998; Wells *et al.*, 1998). De plus, il faut également limiter dans le temps la durée totale de l'analyse pour limiter la variabilité due à la méthode.

C'est pourquoi un temps de dépôt de 60 s. a été choisi pour les dosages des métaux totaux. L'acidification et le traitement aux ultraviolets sont réalisés pour obtenir majoritairement des métaux sous forme ionique libre. L'impact d'un potentiel imposé sur la spéciation des métaux est donc très limité. Un temps de 60 s. permet d'obtenir une sensibilité

suffisante pour les concentrations métalliques rencontrées dans nos échantillons et de limiter le temps total de l'analyse.

Par contre, pour le dosage des métaux labiles, il est nécessaire de raccourcir au maximum le temps de déposition pour limiter les modifications des équilibres entre les formes des métaux. Un temps de 30 s. s'est avéré suffisant pour obtenir un signal correct. Nous avons choisi la valeur minimale car l'effet d'une tension imposée sur les échantillons n'a pas pu être quantifié.

Le Tableau II-1 présente les valeurs retenues selon le protocole (métaux labiles ou totaux) pour les différents paramètres inhérents aux analyses.

Tableau II-1 Tableau récapitulatif des conditions d'analyse en DP-ASV pour le dosage des métaux labiles et totaux

Paramètre	Valeur utilisée	
	<u>Dosage du métal total</u>	<u>Dosage du métal labile</u>
Protocoles		
Temps de bullage	240 secondes (1 ^{ère} analyse) 60 secondes (analyses suivantes)	
Temps de déposition	60 secondes	30 secondes
Temps d'équilibration	30 secondes	
Potentiel initial	-1,2 V	
Potentiel final du balayage	-0,15 à -0,8 V	
Vitesse de balayage	6 mV.s ⁻¹	
Amplitude de l'impulsion	50 mV	
Potentiel de déposition		
Zinc	-1,05 V	-1,12 V
Cadmium	-0,73 V	-0,75 V
Plomb	-0,51 V	-0,55 V
Cuivre	-0,27 V	-0,29 V

Dosage simultané de quatre métaux

Pour valider l'utilisation de la méthode pour le dosage simultané des 4 métaux, l'incidence d'ajouts d'un métal sur l'intensité du pic caractéristique de ce métal et sur l'intensité des autres pics a été évaluée. Seul le pic d'intensité correspondant au métal ajouté augmente, aucune incidence significative sur la hauteur des autres pics n'a été mise en évidence. Cependant, des modifications de la ligne de base notamment au niveau des pics de zinc et de cuivre (en limites de la fenêtre d'analyse) ont été observées.

Détermination de la sensibilité de la méthode

Le protocole pour déterminer les caractéristiques de la méthode (sensibilité, répétabilité, précision) est décrit dans les travaux de Riso *et al.* (1997a, b). Un échantillon d'eau de mer filtrée sur une membrane en fibre de verre (Whatman GF-F) de vide de maille équivalent à 0,45 μm est acidifié à pH 2 et traité aux ultraviolets. Il est ajouté à l'eau de mer 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre et de zinc et 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium et de plomb. Ce même échantillon est analysé 10 fois dans les mêmes conditions expérimentales. Avec les valeurs d'intensité obtenues, le **coefficient de variation** (CV%) est calculé et correspond à la **répétabilité** de la méthode, il doit être inférieur à 5%. La moyenne (μ) et l'**écart-type** (θ) de ces 10 mesures sont calculés. Une gamme en ajouts dosés est ensuite réalisée sur ce même échantillon et la droite figurant l'intensité (nA) en fonction de la concentration en métal ajouté ($\mu\text{g.L}^{-1}$) est tracée comme sur la Figure II-2.

La **pen**te en $\text{nA.L.}\mu\text{g}^{-1}$ de cette droite traduit la **sensibilité** de la méthode (une augmentation de la valeur de la pente \propto indique une augmentation de la sensibilité). Les **limites de détection** (LD) et de **quantification** (LQ), présentées dans le Tableau II-2 sont calculées de la manière suivante (Riso *et al.*, 1997a; Riso *et al.*, 1997b; El Hourch, 2002) :

Répétabilité de la méthode	$\text{CV}\% = 100 * \theta / \mu$	(Le coefficient de variation n'a pas de dimension.)
Limite de détection	$y_{\text{LD}} = 3 * \theta$	en nA
	$\text{LD} = y_{\text{LD}} / a$	en $\mu\text{g.L}^{-1}$
Limite de quantification	$y_{\text{LQ}} = 10 * \theta$	en nA
	$\text{LQ} = y_{\text{LD}} / a$	en $\mu\text{g.L}^{-1}$

Tableau II-2 Tableau récapitulatif des résultats de répétabilité et de sensibilité pour le dosage simultané du zinc, du cadmium du plomb et du cuivre en DP-ASV dans l'eau de mer
CV% : répétabilité, LQ : limite de quantification, LD : limite de détection

	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
<i>Eau de mer pH naturel-Dosage Métal Labile</i>				
CV%	0,93	2,40	18,47 ^a	4,36 ^b
LD (µg.L ⁻¹)	0,06	0,44	0,34	-
LQ (µg.L ⁻¹)	0,21	1,46	1,12	-
<i>Eau de mer acidifié à pH=2 et traitée aux ultra-violets-Dosage Métal total</i>				
CV%	0,85	0,5	0,45	4,58 ^b
LD (µg.L ⁻¹)	0,08	0,22	0,17	-
LQ (µg.L ⁻¹)	0,28	0,74	0,57	-

^aA pH naturel, le plomb présent à l'état de traces est majoritairement associé à des complexes inertes. La valeur élevée du coefficient de variation est due à une grande variabilité autour des valeurs d'intensité quasi-nulles.

^b Le zinc est en limite de la fenêtre d'analyse de l'électrode de mercure, l'analyse est plus variable pour ce métal ; les gammes en ajouts dosés sont difficilement réalisables. Le dosage du zinc nécessite le plus souvent d'effectuer l'analyse à pH = 4-5.

II-2.4 Cultures d'algues : espèces utilisées, conditions de culture, suivi et dosages du matériel algal

II-2.4.a Les espèces microalgales

Toutes les microalgues utilisées dans cette étude proviennent du Centre de Ressources Biologiques de Nantes (CRB, World Data Centre for Microorganisms WDCM 856 - ISOMer). Ces microalgues y sont entretenues sur le milieu d'eau de mer enrichie f/2 (Guillard, 1982), exceptée *Haslea ostrearia* entretenue sur le milieu d'eau de mer enrichie ES de Provasoli (1968) modifié par Robert (1983), nommé ES 1/3. Le Tableau II-3 récapitule les noms, les codes et l'origine des clones utilisés dans cette étude.

Tableau II-3 Clones des microalgues utilisées dans cette étude (nom, code « Nantes Culture Collection » (NCC), provenance)

Genre, espèce	Code NCC	Provenance
<i>Haslea ostrearia</i>	NCC 143	Baie de Bourgneuf (44-85), claire ostréicole
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	NCC 45	Baie de Bourgneuf (44-85), eau de mer côtière
<i>Skeletonema costatum</i>	NCC 52	Baie de Bourgneuf (44-85), eau de mer côtière
<i>Tetraselmis suecica</i>	NCC 62	Le Croisic (44), eau de mer côtière

D'après les travaux de Moreau (1996), *Haslea ostrearia* ne se développe pas sur l'eau souterraine salée brute provenant de la station Ifremer (Bouin). Dans ces mêmes travaux, *Phaeodactylum tricornutum* et *Skeletonema costatum* ont présenté une bonne croissance sur ces eaux. Ettajani *et al.* (2001) ont réalisé leurs cultures de *Tetraselmis suecica* sur cette eau souterraine salée.

II-2.4.b Les conditions de culture

Tous les récipients utilisés pour les cultures ont été préalablement nettoyés à l'acide chlorhydrique 6N et rincés à l'eau ultra-pure. Les milieux d'eau de mer enrichie sont préparés, distribués dans les différents flacons, puis stérilisés à l'autoclave (1 bar, 120°C).

Les eaux souterraines salées ne peuvent pas être stérilisées par autoclavage car elles forment des précipités, ayant pour origine leur richesse en éléments nutritifs et en oligo-éléments, notamment en fer. Les flacons vides et bouchés avec des bouchons en coton cardé, ont été stérilisés par autoclavage. Ils ont été ensuite remplis sous la hotte à flux laminaire pour limiter les contaminations.

Toutes les manipulations ont été ensuite réalisées dans des conditions stériles sous la hotte à flux laminaire.

Avant d'être inoculées pour les expériences, les microalgues ont été acclimatées en un ou deux repiquages sur les milieux utilisés (eau de mer enrichie, eaux souterraines salées).

Les souches algales ont été inoculées à raison de 5000 cellules.mL⁻¹. Les flacons de culture ont été placés à 19°C, sur une étagère distante de 30 cm de trois tubes blancs Philips TLD 30 W / 86₅, New Generation. Les microalgues ont reçu un éclaircissement moyen de 100 μmoles de photons.m⁻².s⁻¹ avec une photopériode lumière / obscurité de 14h / 10h.

II-2.5 Suivi des cultures et dosages biochimiques

II-2.5.a Numération cellulaire et détermination du taux de division

Les algues ont été comptées tous les jours à partir du début de la phase exponentielle jusqu'au premier jour de la phase stationnaire de croissance. Le comptage a été effectué sur lames hématimétriques de type Nageotte pour *Haslea ostrearia* et de type Neubauer pour les 3 autres espèces algales en accord avec leur taille respective et leur nombre. Après homogénéisation par agitation, une fraction de la culture a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur dans des conditions stériles et disposée sur la lame. Entre 400 et 500 cellules ont été comptées par lame pour obtenir une précision de 10 % sur les estimations de biomasse (Lund *et al.*, 1958, *in* Sournia, 1978).

Le taux de division K (en nombre de divisions par jour, div.jour⁻¹) a été calculé à l'aide de la formule de Guillard (1973) :

$$K = [3,32 / (t_2 - t_1)] * [\log_{10} (N_2 / N_1)]$$

Avec t_1 et t_2 les temps initial et final de la phase exponentielle

N_1 la biomasse au temps t_1

N_2 la biomasse au temps t_2

II-2.5.b Dosages des glucides, des pigments et des protéines

Lorsque la croissance de la population algale a atteint sa phase stationnaire, les cultures ont été filtrées afin de récupérer les cellules algales et de réaliser les dosages biochimiques. Le volume prélevé dépend de la biomasse de la culture et de l'analyse à effectuer. L'objectif recherché est de rester dans la gamme de sensibilité de chaque méthode analytique. En fin de phase stationnaire de croissance, pour le dosage des glucides et des protéines, 5 mL de culture par filtre sont suffisants. Le dosage des pigments par la méthode spectrophotométrique nécessite une biomasse plus importante ; entre 20 et 50 mL ont été filtrés selon les cultures. Les cultures homogénéisées ont été filtrées sur des membranes en fibre de verre (Whatman GF-F 25 mm) pour le dosage des glucides et des protéines et sur des membranes en fibre de verre de plus grand diamètre (GF-F 47 mm) pour le dosage des pigments.

Les glucides totaux et les protéines totales ont été quantifiés suivant les techniques respectives de Dubois *et al.* (1956) et de Lowry *et al.* (1951). Les protocoles sont présentés en annexe 1.

Le dosage des glucides totaux selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) est basé sur la réaction des composés glucidiques avec le phénol et l'acide sulfurique concentré qui, après 10 min, produit un complexe orangé, stable 6 heures, dont la densité optique est lue à 490 nm. La gamme étalon a été réalisée avec une solution de D-Glucose.

Le dosage des protéines totales selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) est basé sur la réduction des ions cuivriques (Cu^{2+}) du sulfate de cuivre au niveau des liaisons peptidiques. Il se forme alors un complexe entre les ions cuivreux (Cu^+) et les acides aminés (cystéine, tryptophane, tyrosine) qui réduit alors l'acide phosphotungstomolybdique (réactif de Folin Ciocalteu) et produit une solution d'une coloration bleue qui apparaît progressivement. La densité optique de cette solution bleue est lue à 780 nm après un temps de réaction de 1h30 à l'obscurité. La coloration n'est pas stable dans le temps. La gamme étalon a été réalisée avec une solution d'albumine sérique de bovin.

Le dosage des pigments a été effectué en suivant les méthodes spectrophotométriques et les équations de Lorenzen (1967) et de Richards et Thompson (1952). Les différentes absorbances mesurées avant et après acidification permettent de calculer les concentrations en chlorophylle *a*, en phéopigments et en caroténoïdes dans la culture. Après une extraction des pigments dans de l'acétone 90%, réalisée à 4°C, à l'obscurité, pendant une nuit, la densité optique du surnageant est mesurée à 4 longueurs d'ondes différentes (750 nm, 665 nm, 510 nm, 480 nm). Les concentrations en chlorophylle *a* et en phéopigments totaux sont calculées selon les équations de Lorenzen (1967) et les concentrations en caroténoïdes totaux selon les équations de Richards et Thompson (1952), présentées dans le protocole en annexe 1.

II-2.5.c Dosage des métaux accumulés par les cellules

Pour les dosages des métaux bioaccumulés par les algues, les cultures ont été filtrées sur des membranes Sartorius en nitrate de cellulose, 0,8 μm de vide de maille, préalablement séchées à l'étuve et pesées. Les membranes ont ensuite été placées de nouveau à 60°C pour sécher le matériel algal et déterminer le poids de matière sèche. Elles ont ensuite été introduites dans des tubes en polypropylène avec 1 mL d'acide nitrique 70 % pour l'étape de minéralisation. Les dosages de métaux ont été effectués sur les minéralisats au Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM) à l'Université de La Rochelle. Le cuivre et le zinc

ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) de flamme (VARIAN Spectr AA 250 Plus). Le cadmium et le plomb ont été dosés par SAA de four (HITACHI Z5000 Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer). Un mélange de nitrate de palladium et de nitrate de magnésium a été utilisé comme modificateur de matrice dans les dosages réalisés au four pour éliminer les interférences provenant des éléments atomisés autres que le métal à doser. Une gamme étalon a été établie et des échantillons certifiés (IAEA 140, *sea plant homogenate*) ont été préparés et analysés en suivant le même protocole pour vérifier la méthode. La limite de détection a été calculée à partir de l'écart-type des mesures effectuées sur 8 blancs (8 membranes nues préparées et analysées en suivant le même protocole).

Tableau II-4 Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) pour le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc en SAA

	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
LD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,01	0,41	0,29	0,69
LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,03	1,36	0,97	2,30

II-2.6 Statistiques

Les traitements statistiques utilisés dans ce travail ont été réalisés à l'aide des logiciels SigmaStat (version 2.03) et XL-Stat. Les groupes de données ont été analysés en utilisant des analyses de variance (ANOVA) après avoir vérifié la normalité de la distribution et l'homogénéité des variances. Quand les ANOVA mettaient en évidence des différences entre les groupes, des tests *a posteriori* de type test t de Bonferroni et test de Tukey ont été utilisés. Pour certaines séries de données, des tests non paramétriques (analyse de variance de Kruskal-Wallis, test *a posteriori* de Dunn's) ont été réalisés quand la distribution ne suivait pas une loi normale ou que les variances n'étaient pas homogènes. Pour tous les tests, un seuil de significativité de $\alpha = 0,05$ a été appliqué.

Pour les analyses en composantes principales (ACP), certaines données ne correspondaient pas à une distribution normale. Les corrélations ont donc été calculées en suivant le méthode de Spearman et les ACP ont été construites avec cette méthode à l'aide du logiciel XL-Stat. La significativité des coefficients de corrélation a été testée à l'aide du logiciel SigmaStat.

II-3 Résultats

II-3.1 Caractéristiques des eaux souterraines salées et comparaison avec l'eau de mer côtière

II-3.1.a Salinité, pH, alcalinité due aux carbonates et concentration en sels nutritifs

Pour alléger les commentaires :

- l'eau souterraine salée Ifremer brute est notée eau Ifremer brute (I),
- l'eau souterraine salée Ifremer brute diluée avec de l'eau de mer côtière est notée eau Ifremer diluée (I/2),
- l'eau souterraine salée d'Ifremer traitée est notée eau Ifremer traitée (IT),
- l'eau souterraine salée prélevée sur la concession de Monsieur F. Taraud est notée eau Taraud (T),
- l'eau de mer côtière brute est notée eau côtière (C),
- l'eau de mer côtière enrichie avec les solutions de f/2 de Guillard (1982) est nommée eau côtière enrichie (CE).

Les résultats des différents dosages effectués sur les eaux souterraines salées et l'eau de mer sont récapitulés dans le Tableau II-5.

Tableau II-5 Comparaison des caractéristiques des eaux étudiées

Eaux souterraines salées Ifremer brute (I), Ifremer traitée (IT) et Taraud (T) et de l'eau de mer côtière prélevée à Noirmoutier brute (C) ou enrichie pour les cultures d'algues (CE) Moyenne \pm intervalle de confiance.

	I	IT	T	C	CE
pH	7,31	8,16	7,12	8,03	8,11
Salinité	31,4	32,4	29,5	34,3	34,3
Alcalinité due aux carbonates ($\mu\text{mol.L}^{-1}$):					
$\text{H}_2\text{CO}_3, \text{HCO}_3^-, \text{CO}_3^{2-}$	9,32	9,30	5,99	2,74	9,84
Azote inorganique ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)					
Forme ammoniacale ($\text{NH}_4^+ - \text{NH}_3$)	324,00 \pm 0,15	14,20 \pm 7,00	84,70 \pm 9,40	22,50 \pm 6,10	100
Nitrites (NO_2^-) + Nitrates (NO_3^-)	0,39 \pm 0,51	284,61 \pm 18,17	1,62 \pm 0,41	5,32 \pm 0,02	0,89 \pm 0,32
Phosphore inorganique dissous ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	13,92 \pm 0,8	11,51 \pm 0,91	14,18 \pm 0,54	0,28 \pm 0,06	10
Silicium inorganique dissous ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	234 \pm 14	260,20 \pm 26,52	214,87 \pm 9,08	6,05 \pm 3,25	200

Le pH des eaux souterraines salées brutes est plus faible d'un point que celui de l'eau de mer. L'eau Ifremer traitée présente un pH proche de celui de l'eau de mer. Les espèces carbonatées sont plus abondantes dans les eaux souterraines salées que dans l'eau de mer. L'alcalinité due aux carbonates est de 2 fois (dans l'eau Taraud) à 3 fois (dans l'eau Ifremer brute) supérieure à celle mesurée dans l'eau de mer. Les sels nutritifs sont également en concentrations supérieures dans les eaux souterraines salées. Les eaux Ifremer, brute et traitée, sont plus riches en azote et en silicium que l'eau Taraud. L'eau Taraud est l'eau la plus riche en phosphore inorganique dissous.

Tableau II-6 Concentrations en azote sous forme ammoniacale $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ($\text{NH}_{3,4}$) et concentrations d'ammoniac correspondantes (NH_3) calculées selon les équations de Johansson et Wedborg (1980)

Eaux souterraines salées Ifremer brute (I), Ifremer brute diluée (I½), Ifremer traitée (IT) et Taraud (T) et eau côtière brute (C) ou enrichie (CE)

	$\text{NH}_{3,4}(\mu\text{mol.L}^{-1})$	$\text{NH}_3(\mu\text{mol.L}^{-1})$	% NH_3
I	324	1,98	0,6
I½	173	1,66	1,0
IT	14	0,58	4,1
T	85	0,34	0,4
C	22	0,68	3,1
CE	100	3,70	3,7

La concentration en NH_3 la plus élevée est obtenue pour l'eau côtière enrichie et la plus faible pour l'eau Taraud. Les pourcentages les plus élevés de NH_3 par rapport à $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ sont obtenus pour l'eau de mer côtière et l'eau Ifremer traitée qui présentent également les pH les plus élevés. La concentration en NH_3 dans l'eau Ifremer brute diluée est diminuée de 16% alors que la concentration en $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ est diminuée de 47%.

Conformément à ce qui a pu être évoqué dans l'étude bibliographique, la température des eaux souterraines salées se situe entre 14°C et $14,7^\circ\text{C}$; elle est restée dans cette gamme de valeurs lors des différents prélèvements.

L'eau de mer côtière a été enrichie de façon à obtenir une eau dont la teneur en N, P et Si corresponde à l'ordre de grandeur des concentrations observées pour les eaux souterraines salées. L'azote a été ajouté sous la forme ammoniacale pour se rapprocher des eaux souterraines non traitées,

Les rapports N/P et N/Si des différentes eaux étudiées sont présentés dans le Tableau II-7. Les rapports N/P et N/Si pour les eaux Ifremer brute et traitée sont élevés et proches l'un de l'autre. L'eau Taraud possède une quantité plus importante de phosphore et de silicium dissous inorganiques par rapport à l'azote que les autres eaux.

Tableau II-7 Rapports des nutriments majeurs (azote/phosphore -N/P- et azote/silicium -N/Si-) dans les différentes eaux utilisées pour les cultures d'algues

Eaux souterraines salées Ifremer brute (I), Ifremer traitée (IT) et Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE)

	rapport N/P	rapport N/Si
I	23	1,4
IT	25	1,2
T	6	0,4
CE	10	0,5

II-3.1.b Concentrations en métaux labiles et totaux

Le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc ont été dosés dans les différentes eaux par DP-ASV, à pH naturel pour déterminer les concentrations en métaux labiles et à pH acide, suivi d'un traitement aux ultraviolets pour déterminer les concentrations en métaux totaux. Les concentrations en métaux labiles et totaux ainsi que les pourcentages de métaux labiles par rapport aux métaux totaux sont présentés dans le Tableau II-8.

Tableau II-8 Concentrations en métaux totaux dans les eaux étudiées

Eaux souterraines salées Ifremer brute (I), Ifremer traitée (IT) et Taraud (T) et eau de mer côtière brute (C) ou enrichie (CE). Moyenne \pm intervalle de confiance.

		I	IT	T	C	CE
Cadmium ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	total	0,08	$0,20 \pm 0,20$	$0,12 \pm 0,04$	$0,80 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,01$
	labile	$0,1 \pm 0,9$	$0,20 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,10$	<0,08
	% labile	100	100	50	100	< 72
Cuivre ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	total	$1,9 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,1$	$17,4 \pm 0,3$
	labile	$1,4 \pm 0,7$	$0,2 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,4$	$0,2 \pm 2,8$	$6,8 \pm 1,0$
	% labile	75	22	70	6	39
Plomb ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	total	$1,0 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	<0,17	$0,8 \pm 0,1$
	labile	<0,3	<0,3	<0,3	<0,2	<0,3
	% labile	<34	<12	<29	-	<42
Zinc ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	total	$5,9 \pm 1,3$	< 2,3	< 2,3	$14,4 \pm 2,0$	$11,4 \pm 0,6$
	labile	$4,4 \pm 2,4$	<1,0	<1,0	8 ± 8	<1,0
	% labile	75	-	-	56	<8

Le cadmium présente des valeurs faibles proches des limites analytiques de la méthode. L'analyse de l'eau Ifremer brute et traitée a montré une grande variabilité qui est traduite par des valeurs des intervalles de confiance importants. Cependant, pour les autres eaux, ces

intervalles de confiance sont faibles. Les concentrations en cadmium total et labile sont similaires dans les cinq eaux dosées. Les pourcentages de cadmium labiles dans toutes les eaux sont supérieurs à 50%. Pour les eaux Ifremer et l'eau de mer côtière, le cadmium est totalement présent sous forme labile.

Les concentrations en cuivre total dans les eaux souterraines salées sont inférieures à celles de l'eau de mer côtière. La concentration en cuivre total dans l'eau Ifremer traitée est diminuée de 50% par rapport à celle de l'eau Ifremer brute. A l'inverse, l'enrichissement de l'eau de mer provoque une augmentation non négligeable de la concentration en cuivre total. Les concentrations en cuivre labile les plus faibles sont relevées pour l'eau Ifremer traitée et l'eau de mer côtière. L'eau de mer enrichie présente une concentration en cuivre labile supérieure à celles mesurées dans les eaux Ifremer, l'eau Taraud et l'eau de mer non enrichie. Les pourcentages de cuivre labile par rapport au cuivre total les plus élevés sont observés pour les eaux souterraines Taraud et Ifremer brute. Le traitement de l'eau Ifremer brute entraîne une diminution du pourcentage de métal labile par rapport au métal total. La proportion de métal labile par rapport au métal total la plus faible est notée pour l'eau de mer côtière. Après l'enrichissement de l'eau de mer, la proportion de métal labile est 6 fois supérieure à la valeur initiale.

La concentration en plomb total la plus faible est observée pour l'eau de mer non enrichie. L'enrichissement de l'eau de mer provoque une augmentation de la concentration en plomb total. Cependant, la concentration en plomb total dans l'eau de mer enrichie est légèrement inférieure à celle des eaux souterraines salées. Les concentrations en plomb total sont du même ordre de grandeur dans l'eau Taraud et l'eau Ifremer brute. Le traitement de l'eau Ifremer entraîne une augmentation de la concentration en plomb total. La concentration en plomb labile est inférieure au seuil de quantification de la méthode pour toutes les eaux. Le pourcentage de plomb labile par rapport au plomb total est inférieur à 42% pour les eaux souterraines salées et l'eau de mer enrichie.

Les limites de détection pour le zinc sont élevées en raison de la technique utilisée. Les concentrations en zinc total observées pour l'eau Ifremer brute, l'eau de mer et l'eau de mer enrichie sont supérieures à celle observée pour l'eau Taraud et pour l'eau Ifremer traitée. La concentration en zinc labile la plus élevée est observée pour l'eau Ifremer brute. La concentration en zinc labile dans l'eau de mer présente un intervalle de confiance trop important pour que cette valeur puisse être considérée comme différente de celles des autres

eaux. Dans l'eau Ifremer brute et l'eau de mer enrichie, les pourcentages de zinc labile par rapport au zinc total sont supérieurs à 50%.

II-3.2 Cultures des microalgues sur les différentes eaux souterraines salées et sur l'eau de mer enrichie

Les cultures de microalgues ont été réalisées sur 4 eaux : l'eau Taraud (T), l'eau Ifremer brute (I) et traitée (IT) et l'eau de mer enrichie (CE). D'après les travaux de Moreau (1996), *Haslea ostrearia* ne se développe pas sur l'eau Ifremer brute, les cultures d'*H. ostrearia* ont été donc réalisées sur l'eau Ifremer brute diluée au demi avec de l'eau de mer côtière. Pour pouvoir comparer les cultures des quatre algues sur les trois eaux souterraines, toutes les algues ont été cultivées sur les trois eaux souterraines salées diluées au 1/2 avec de l'eau de mer côtière. Une synthèse des résultats obtenus pour les cultures sur les eaux diluées est présentée dans la partie II-3.2.g.

II-3.2.a Cultures d'*Haslea ostrearia*

La diatomée *H. ostrearia* ne s'est effectivement pas développée sur l'eau souterraine d'Ifremer brute. Les résultats obtenus pour les cultures d'*H. ostrearia* sur l'eau Ifremer brute diluée avec de l'eau de mer (1/2) sont présentés dans les graphes ci-dessous et sont commentés et comparés avec les résultats obtenus sur les autres eaux souterraines non diluées. La culture d'*H. ostrearia* sur l'eau Ifremer traitée présente une croissance (densité en cellules) significativement supérieure ($p < 0,001$) à celle observée sur les 3 autres eaux (Figure II-4).

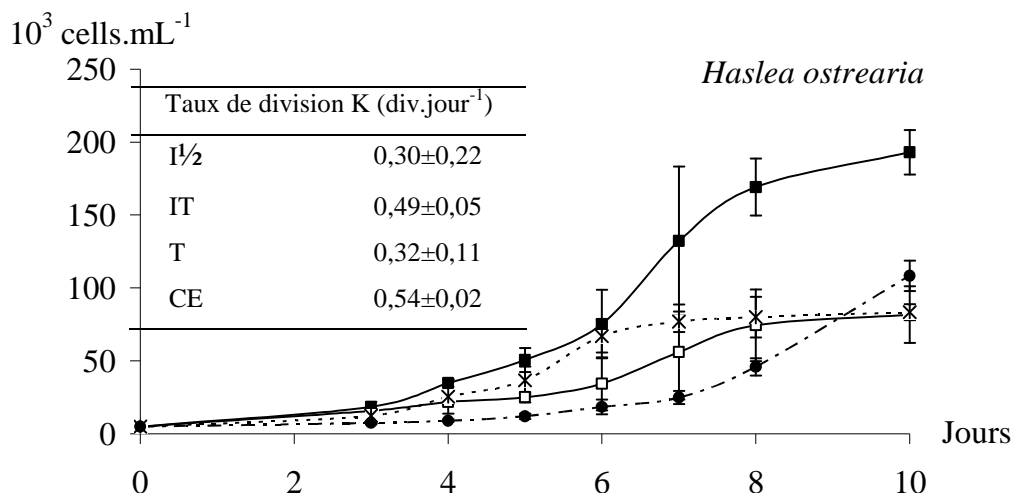


Figure II-4 Croissance d'*Haslea ostrearia* sur les eaux étudiées (10^3 cellules.mL⁻¹) et taux de division K (divisions.jour⁻¹).

(-□-) eau souterraine salée Ifremer brute diluée au 1/2 (I^{1/2}), (-■-) eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), (-✱-) eau souterraine salée Taraud (T) et (-●-) eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance

Le développement de la microalgue sur l'eau de mer enrichie est significativement plus faible que celui observé pour les 3 autres types d'eau jusqu'au huitième jour. Au dernier jour, les densités en cellules ne sont pas significativement différentes. Les concentrations en pigments et en protéines sont également significativement plus élevées dans les cultures réalisées sur eau Ifremer traitée (Figure II-5). Cette meilleure croissance est confirmée par un taux de division 1,5 fois supérieur et une plus grande activité photosynthétique puisque la teneur dans les cellules en chlorophylle *a* est jusqu'à 2 fois plus élevée dans les cellules cultivées sur l'eau Ifremer traitée que dans les cellules cultivées sur l'eau Taraud et l'eau de mer enrichie (Figure II-6). Les concentrations en glucides et en protéines par cellule sont équivalentes sur les 4 types d'eaux testés, à l'exception d'une concentration en glucides plus élevée dans les cellules cultivées sur l'eau Ifremer brute diluée au 1/2.

Haslea ostrearia

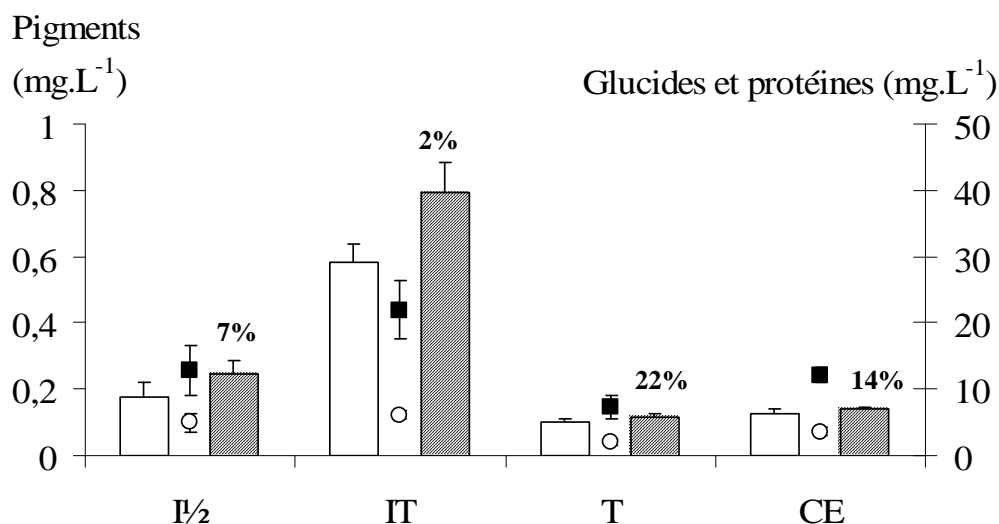


Figure II-5 Concentrations (mg.L⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle *a* et pheopigments (▨) (le pourcentage de pheopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules d'*Haslea ostrearia* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer diluée au 1/2 (I^{1/2}), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Le rapport [Pheopigments / (Pheopigments + Chlorophylle *a*)] permet d'estimer le stade de sénescence de la culture lors de la filtration à la phase stationnaire de la croissance. Les cultures d'*H. ostrearia* sur eau Ifremer brute diluée et traitée présentent des pourcentages de pheopigments inférieurs à ceux trouvés dans les cultures sur l'eau Taraud ou sur l'eau de mer

enrichie, ce qui suggère un meilleur état physiologique des cellules cultivées sur l'eau Ifremer brute diluée ou traitée.

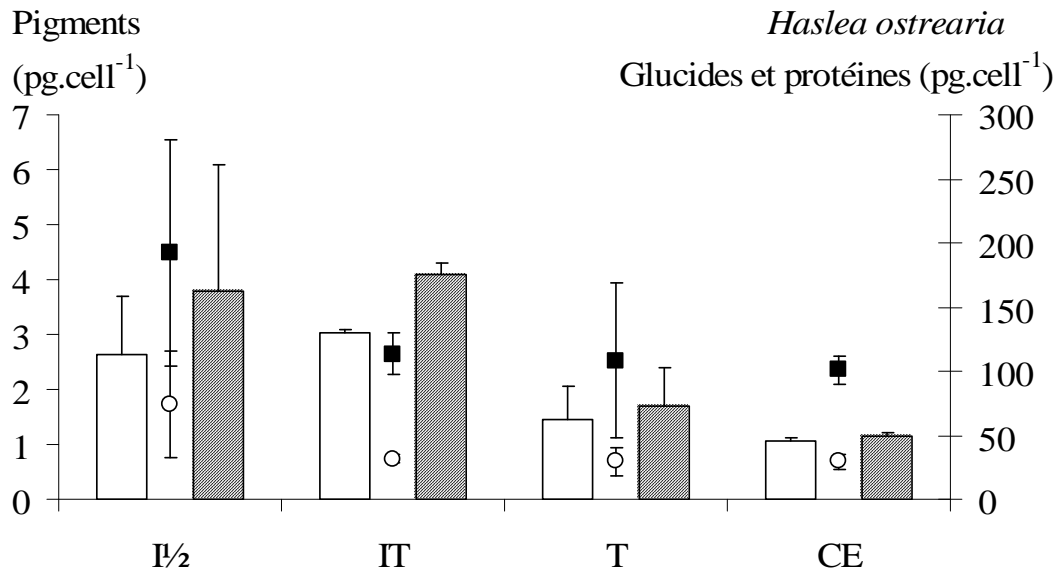


Figure II-6 Teneurs (pg.cell⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle *a* et phéopigments (▨), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules d'*Haslea ostrearia* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer diluée au 1/2 (I/2), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Pour relier les variables physiologiques mesurées (densité en cellules, concentrations en pigments, en glucides et en protéines) aux caractéristiques physico-chimiques des eaux, des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées : une première série en prenant en compte les données de pigments, de glucides et de protéines exprimées par litre de culture et une deuxième série en considérant ces données exprimées par cellule. Dans un cas la production globale de la culture est considérée et dans l'autre, la production au niveau individuel est analysée. Dans tous les cas, les différences sont expliquées par les trois premiers axes pour plus de 90%. Les ACP ont été réalisées en prenant en compte ces trois axes (F1-F2, F1-F3 et F2-F3), tous les résultats sont présentés dans l'annexe II mais seuls les résultats principaux sont présentés et développés dans ce chapitre.

Sur la Figure II-7, des corrélations entre les différents variables apparaissent. Ces corrélations ont ensuite été testées selon la méthode de Spearman. La valeur du coefficient de corrélation (r) ainsi que sa significativité (p) sont notées entre parenthèses dans les commentaires.

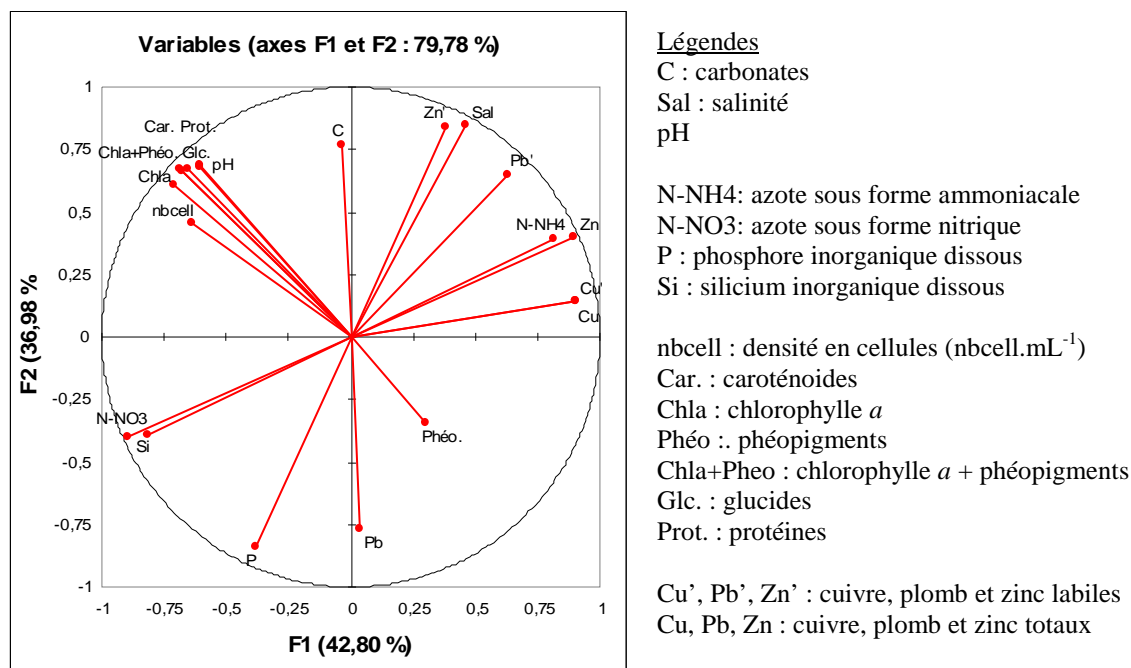


Figure II-7 Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 80% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par L pour les cultures d'*Haslea ostrearia*.

Des corrélations positives entre la densité en cellules et les concentrations en caroténoïdes ($r = 0,87$; $p = 0,006$), en chlorophylle *a* ($r = 0,57$; $p = 0,022$), en protéines ($r = 0,75$; $p < 0,001$) et en glucides ($r = 0,56$; $p = 0,023$) dans les cultures sont mises en évidence dans ce graphe. La densité en cellules des cultures est corrélée positivement à la concentration en silicium inorganique dissous ($r = 0,56$; $p = 0,024$), au pH ($r = 0,88$; $p < 0,001$) et à la concentration en carbonates ($r = 0,69$; $p = 0,003$). Elle est corrélée négativement à l'azote sous forme ammoniacale ($r = -0,56$; $p = 0,024$) et à la concentration en plomb total dans le milieu ($r = -0,69$; $p = 0,003$).

L'axe F1 est principalement expliqué par la forme d'azote présente dans les eaux qui différencie les cultures réalisées sur l'eau Ifremer traitée des cultures réalisées sur l'eau Ifremer brute diluée et sur l'eau de mer enrichie. Sur l'axe F2, les cultures réalisées sur l'eau Taraud sont en relation avec la concentration en phosphore inorganique dissous et le plomb alors que les autres cultures sont en relation avec la salinité, la concentration en espèces carbonatées et le pH (Figure II-8).

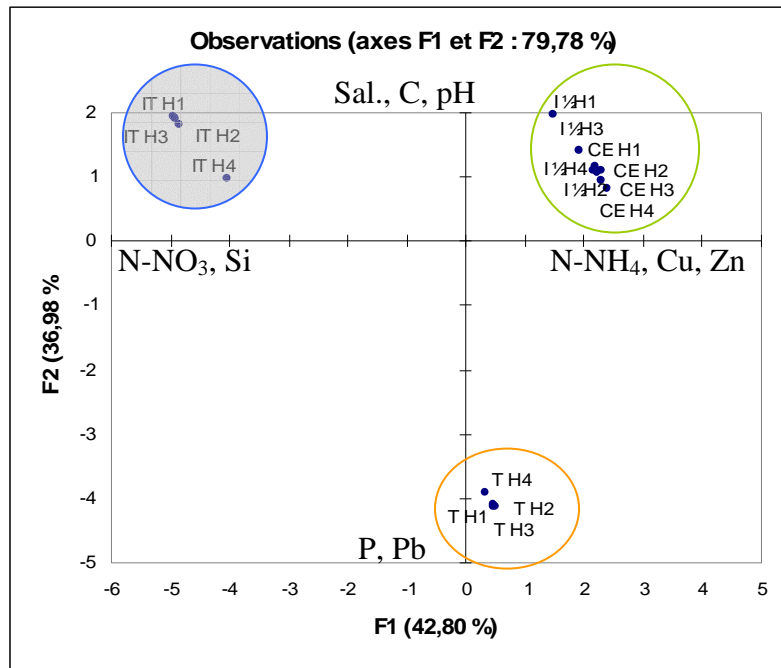


Figure II-8 Répartition des réplicats de cultures d'*Haslea ostrearia* (notée H1 à H4) sur les différents eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre).

Eau souterraine salée Ifremer brute diluée au 1/2 (I $\frac{1}{2}$), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE) La zone ombrée correspond au maximum de la production globale des cultures.

Les ACP réalisées sur les données exprimées par cellule sont également présentées en annexe. Sur la Figure II-9, sont présentés les axes F1 et F2 avec la répartition des variables sur ces axes explicatifs.

Sur la Figure II-10, les cultures se différencient le long de ces axes de la même façon que la première ACP avec néanmoins une séparation des cultures réalisées sur l'eau Ifremer brute diluée et celles réalisées sur l'eau de mer enrichie en deux groupes distincts avec la mise en évidence de l'impact sur les cellules algales de la présence d'azote en fonction notamment des teneurs en caroténoïdes, en chlorophylle *a* et phéopigments, en glucides et en protéines produits par les cellules.

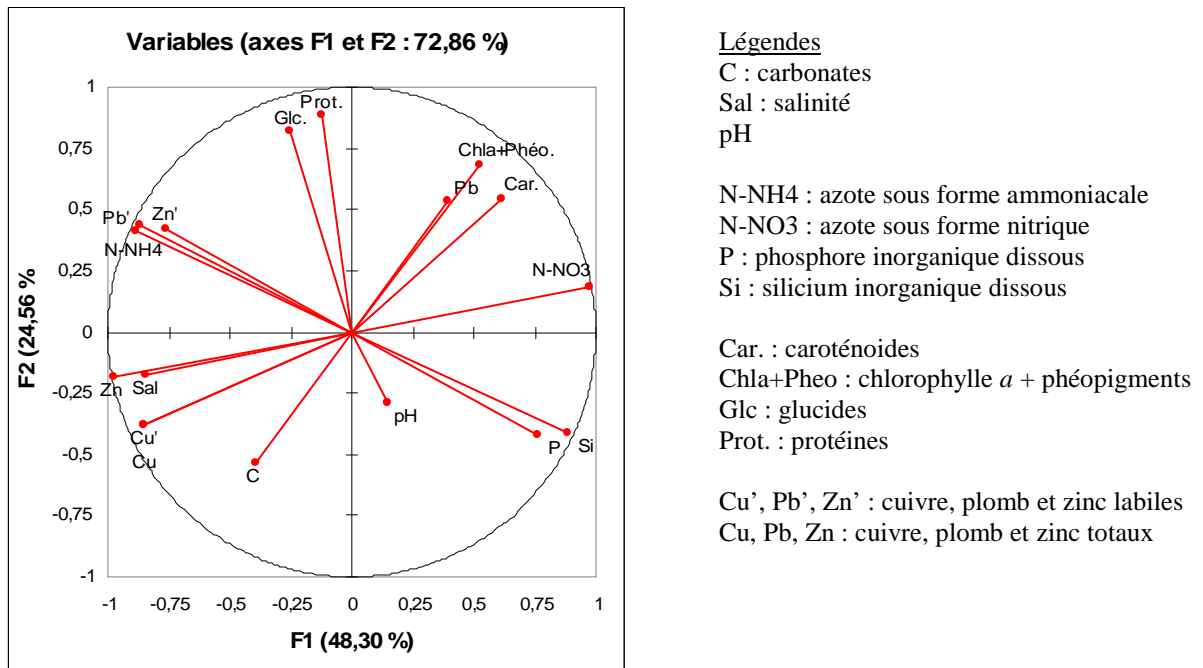


Figure II-9 Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 73% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par cellule pour les cultures d'*Haslea ostrearia*.

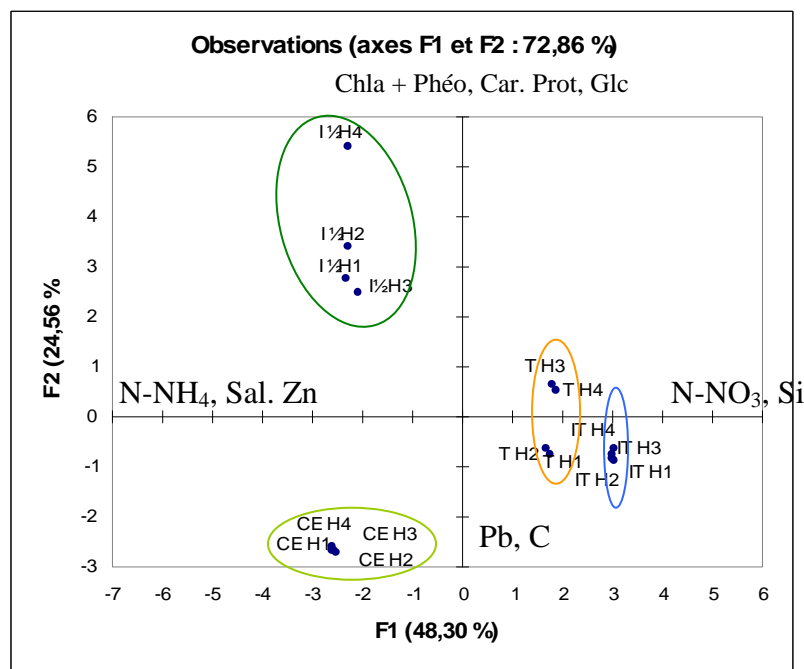


Figure II-10 Répartition des répliqués de cultures d'*Haslea ostrearia* (notée H1 à H4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par cellule).

Eau souterraine salée Ifremer brute diluée au 1/2 (I^{1/2}), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE) La zone ombrée correspond au maximum de la production globale des cultures.

II-3.2.b Cultures de *Phaeodactylum tricornutum*

Les plus fortes densités en cellules sont obtenues lorsque *Phaeodactylum tricornutum* est cultivée sur l'eau Taraud. Viennent ensuite les cultures réalisées avec l'eau de mer côtière enrichie (Figure II-11). La densité en cellules des cultures de *P. tricornutum* obtenue avec l'eau Ifremer traitée est 2 à 3 fois inférieure à celles observées avec l'eau Ifremer brute et avec l'eau Taraud. Cependant, d'après la Figure II-12, les concentrations en pigments observées dans les cultures de *P. tricornutum* sur l'eau Ifremer traitée sont significativement plus élevées (5 fois) que celles observées pour les cultures sur les trois autres eaux. Dans le cas des cultures réalisées avec l'eau Ifremer traitée, la concentration en phéopigments en fin de culture est nulle, les cellules ne sont donc pas en phase sénescence ou en cours de dégradation. Le taux de division est également plus élevé dans ces cultures. Les concentrations en protéines et en glucides semblent aussi supérieures, mais cette observation n'est pas statistiquement vérifiée.

Sur la Figure II-13, nous observons que les teneurs en pigments, en glucides et en protéines sont plus élevées dans les cultures sur l'eau Ifremer, notamment lorsque cette eau est traitée. Les plus faibles teneurs sont observées pour les cultures sur l'eau Taraud.

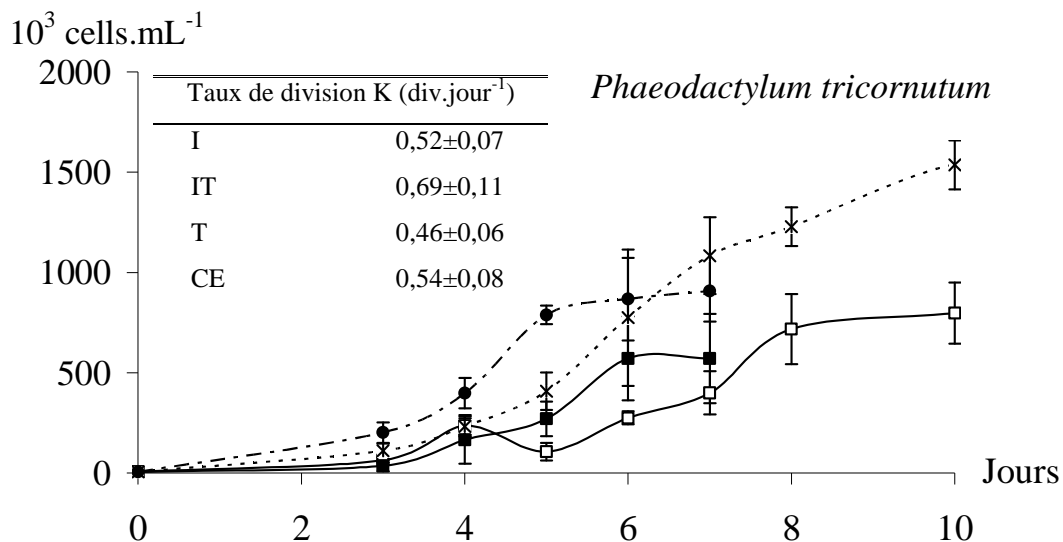


Figure II-11 Croissance de *Phaeodactylum tricornutum* sur les eaux étudiées (10³cellules.mL⁻¹) et taux de division K (divisions.jour⁻¹).

(□) eau souterraine salée Ifremer brute (■), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), (✱) eau souterraine salée Taraud (T) et (●) eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance

Phaeodactylum tricornutum

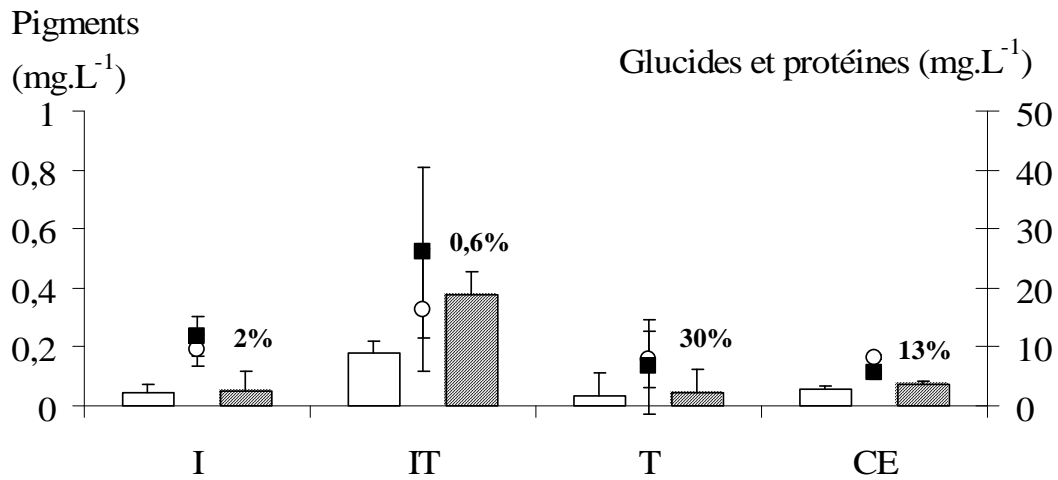


Figure II-12 Concentrations (mg.L⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle *a* et phéopigments (▨) (le pourcentage de phéopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de *Phaeodactylum tricornutum* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Phaeodactylum tricornutum

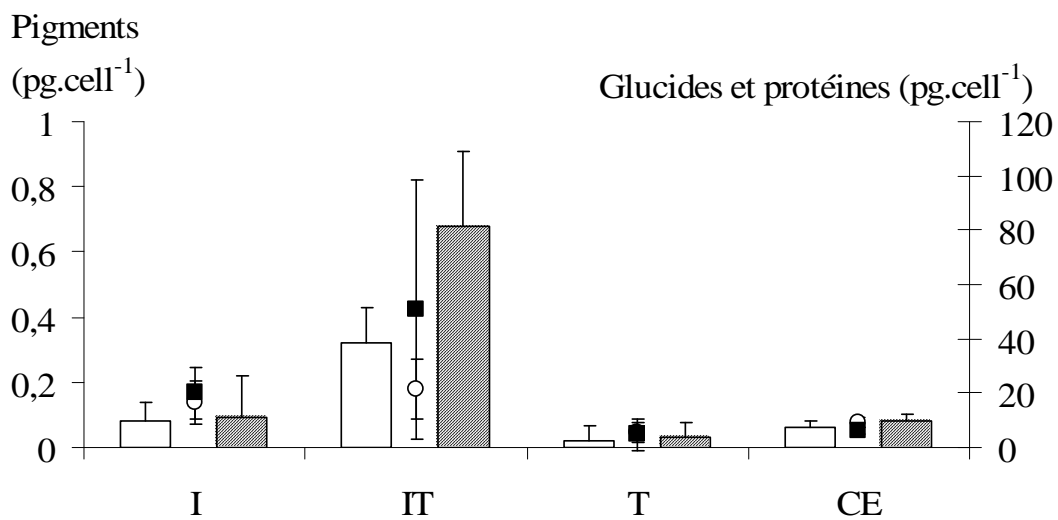


Figure II-13 Teneurs (pg.cell⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle *a* et phéopigments (▨), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de *Phaeodactylum tricornutum* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Les résultats des ACP qui ont été réalisées de la même façon que pour les cultures d'*H. ostrearia* sont présentés dans la Figure II-14 pour la répartition des variables le long des axes F1 et F2 et la Figure II-15 pour la répartition des cultures sur les axes explicatifs pour l'ACP réalisée avec les données de pigments, de glucides et de protéines exprimées par litre de culture. De la même façon, les analyses complètes ont été placées en annexe II.

Des corrélations positives très significatives ($p < 0,001$) sont observées entre les variables physiologiques (glucides, pigments et protéines) alors que la densité en cellule n'est pas corrélée significativement à ces variables ou alors de façon négative (densité en cellules *versus* concentrations en protéines : $r = -0,70$; $p = 0,002$). La concentration en cuivre total dans le milieu est corrélée négativement avec les concentrations en glucides ($r = -0,59$; $p = 0,01$) et en protéines ($r = -0,61$; $p = 0,01$).

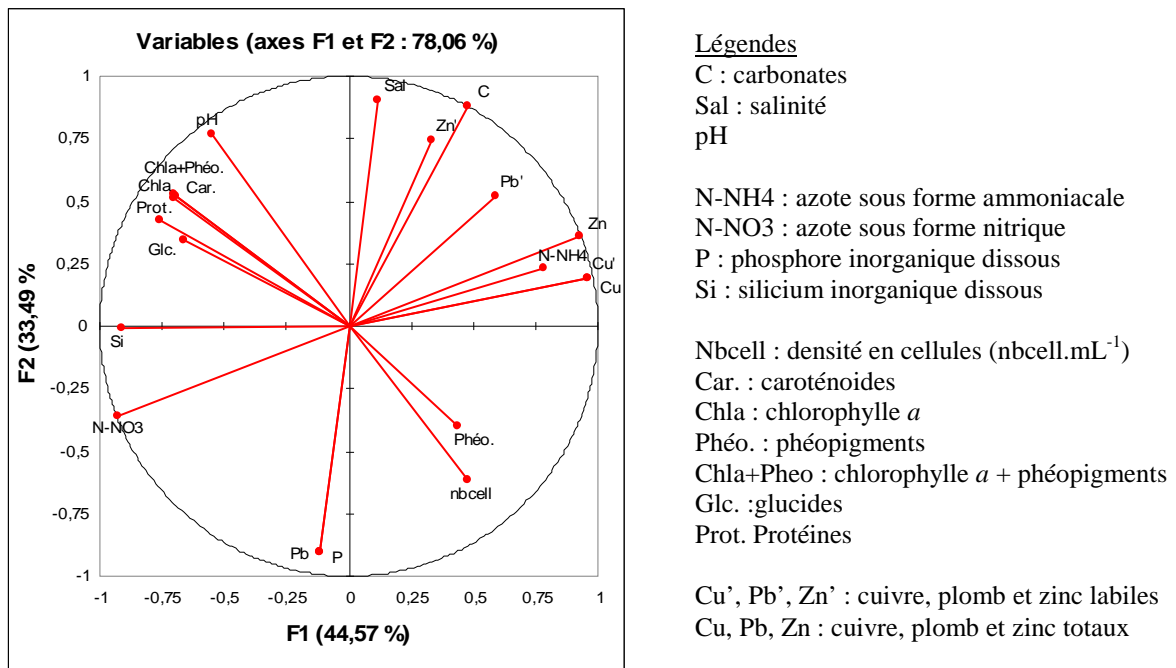


Figure II-14 Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 73% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par L pour les cultures de *Phaeodactylum tricornutum*.

La répartition des cultures sur les eaux souterraines salées et l'eau de mer enrichie par rapport aux axes explicatifs F1 et F2 est présentée sur le Figure II-15. L'axe F1 est expliqué principalement par la forme d'azote présente dans l'eau, ainsi que la concentration en silicium inorganique dissous et en cuivre. Selon cet axe, les cultures réalisées avec l'eau Ifremer traitée se différencie des cultures réalisées sur l'eau Ifremer brute et sur l'eau de mer enrichie.

L'axe F2 est expliqué par la concentration en phosphore inorganique dissous et en plomb d'une part, par la salinité, le pH et la concentration en espèces carbonatées d'autre part. Selon cet axe F2, les cultures réalisées sur l'eau Taraud sont séparées des autres cultures sur l'axe F2 en fonction de la concentration en phosphore inorganique dissous et en plomb.

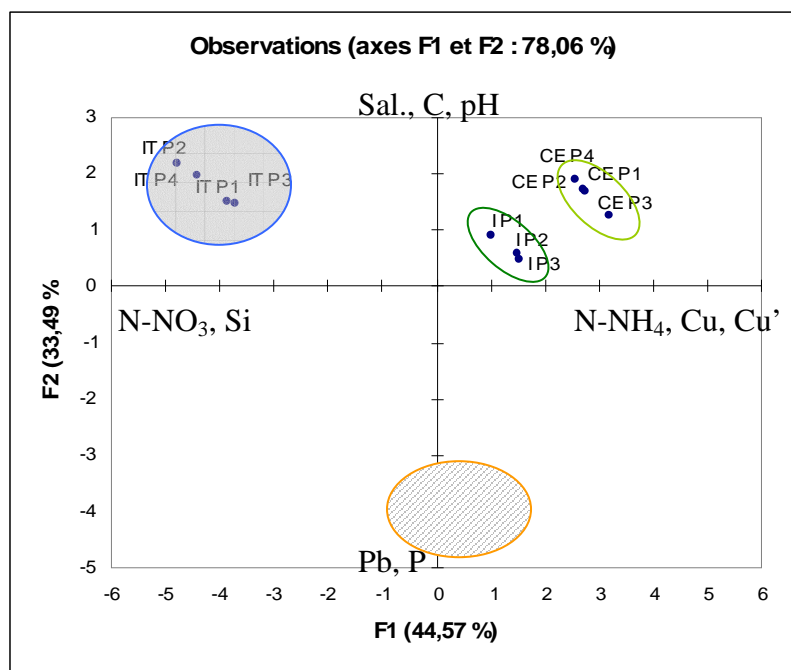


Figure II-15 Répartition des réplicats de cultures de *Phaeodactylum tricornutum* (notée P1 à P4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre).

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE) La zone hachurée correspond au maximum de densité en cellules, la zone grisée au maximum de la production globale de la culture (pigments, glucides et protéines).

Les résultats des ACP utilisant les données physiologiques exprimées par cellule sont présentés en annexe. Ces résultats suscitent les mêmes commentaires que ceux cités pour l'ACP sur les données physiologiques exprimées par litre de culture.

II-3.2.c Cultures de *Skeletonema costatum*

Les cultures de *Skeletonema costatum* présentent également une croissance plus importante sur l'eau Ifremer, notamment lorsque cette eau n'est pas traitée (Figure II-16). La densité en cellules dans la culture sur l'eau Ifremer brute est significativement supérieure à

celles observées pour les cultures sur l'eau Taraud et sur l'eau de mer enrichie. Le taux de division dans la culture sur eau de mer est très élevé, comme le montre la très courte phase exponentielle, observable sur la courbe de croissance. La courbe de croissance de *S. costatum* cultivée sur l'eau Ifremer traitée présente une longue phase plateau et, pour cette culture, la concentration en phéopigments est plus élevée que celles mesurées dans les autres cultures. La filtration des cultures pour en récupérer les microalgues a été effectuée le même jour pour toutes les eaux. Cependant, en observant l'allure de la courbe représentant la cinétique de croissance, la filtration des cultures réalisées sur l'eau Ifremer traitée semble être intervenue trop tardivement dans le cycle de croissance. Par ailleurs, le pourcentage de phéopigments par rapport à la chlorophylle *a* dans les cultures de *S. costatum* est très élevé par rapport à celui calculé pour les cultures des trois autres algues sur les mêmes eaux (Figure II-17). La concentration en phéopigments est supérieure à la concentration en chlorophylle *a* dans les cultures de *S. costatum*. Les pourcentages de phéopigments par rapport à la chlorophylle *a* varient entre 70% et 85%.

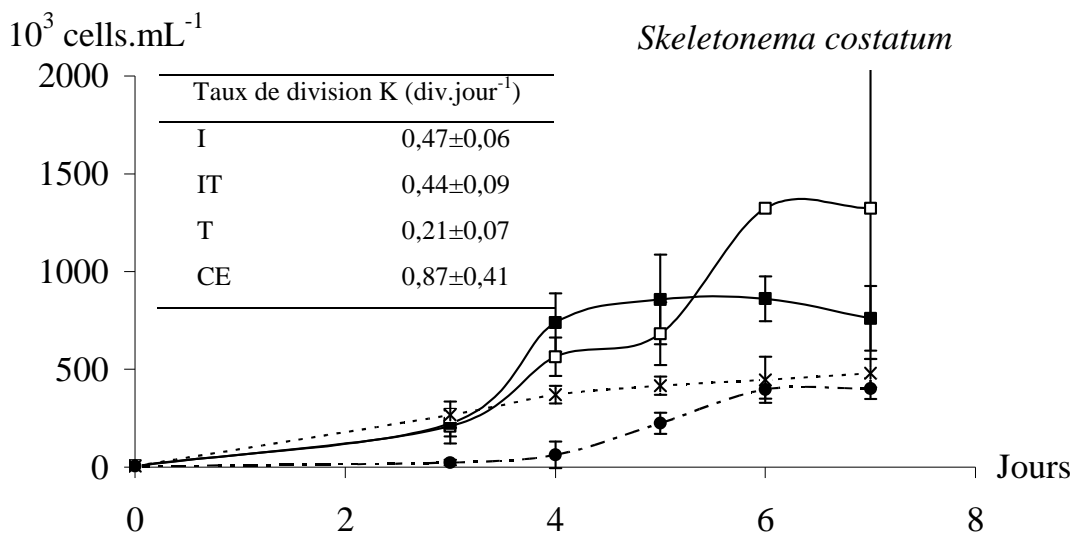


Figure II-16 Croissance de *Skeletonema costatum* sur les eaux étudiées (10^3 cellules.mL⁻¹) et taux de division K (divisions.jour⁻¹).

(-□-) eau souterraine salée Ifremer brute (-■-), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), (-×-) eau souterraine salée Taraud (T) et (-●-) eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Skeletonema costatum

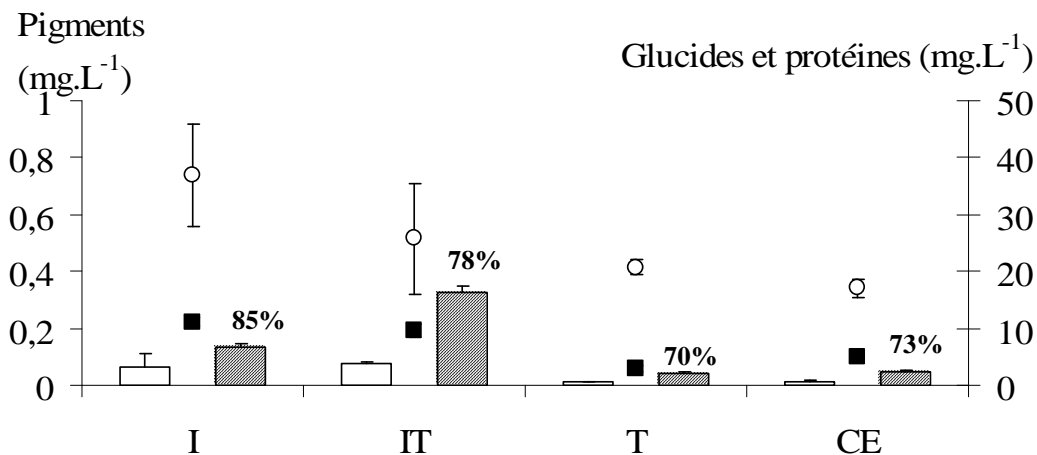


Figure II-17 Concentrations (mg.L⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle *a* et phéopigments (▨) (le pourcentage de phéopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de *Skeletonema costatum* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

La concentration en chlorophylle *a* + phéopigments mesurée pour les cultures réalisées sur l'eau Ifremer traitée est supérieure à celle mesurée pour les cultures réalisées sur l'eau Ifremer brute, elle-même supérieure à celle mesurée pour les cultures sur l'eau Taraud et sur l'eau de mer enrichie (Figure II-17). Les concentrations en protéines et en glucides les plus élevées sont observées pour les cultures sur l'eau Ifremer brute et sur l'eau Ifremer traitée. Les teneurs en chlorophylle *a* + phéopigments sont également supérieures dans les cellules provenant des cultures sur l'eau Ifremer traitée. Les teneurs en glucides les plus élevées sont observées pour les cellules cultivées sur l'eau Taraud (Figure II-18).

Les résultats de l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par litre de culture sont présentés sur la Figure II-19. Une corrélation positive existe entre la concentration en silicium dissous inorganique et les paramètres physiologiques des cultures (caroténoïdes, chlorophylle *a*, glucides et protéines, $p < 0,001$). La densité en cellules des cultures est positivement corrélée aux concentrations en pigments, glucides et protéines dans les cultures ($p < 0,01$). La densité en cellules est également corrélée positivement à la concentration en phosphore inorganique dissous ($r = 0,66$; $p = 0,01$) et négativement à la concentration en cuivre ($r = -0,68$; $p = 0,007$).

Skeletonema costatum

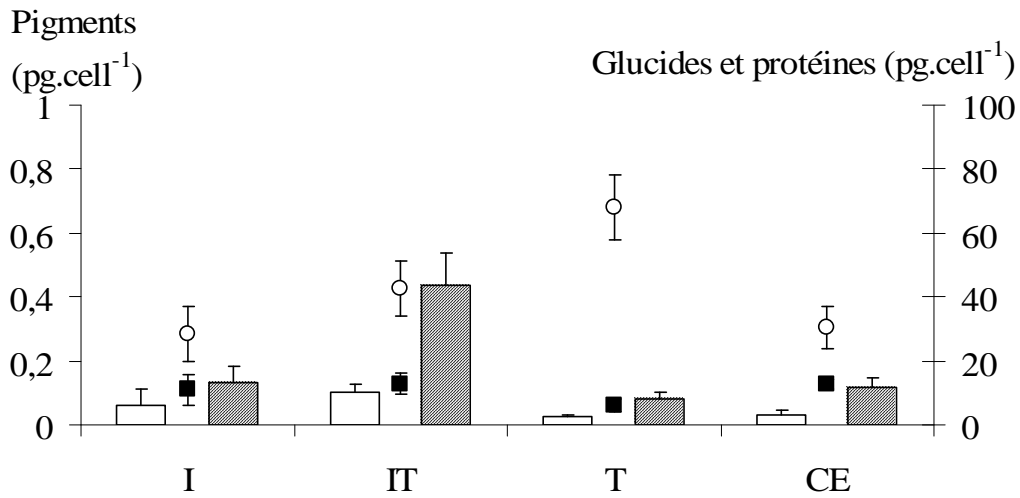


Figure II-18 Teneurs ($\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$) en caroténoïdes (\square), chlorophylle *a* et phéopigments (\boxtimes), glucides (\circ) et protéines (\blacksquare) dans les cellules de *Skeletonema costatum* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne \pm intervalle de confiance.

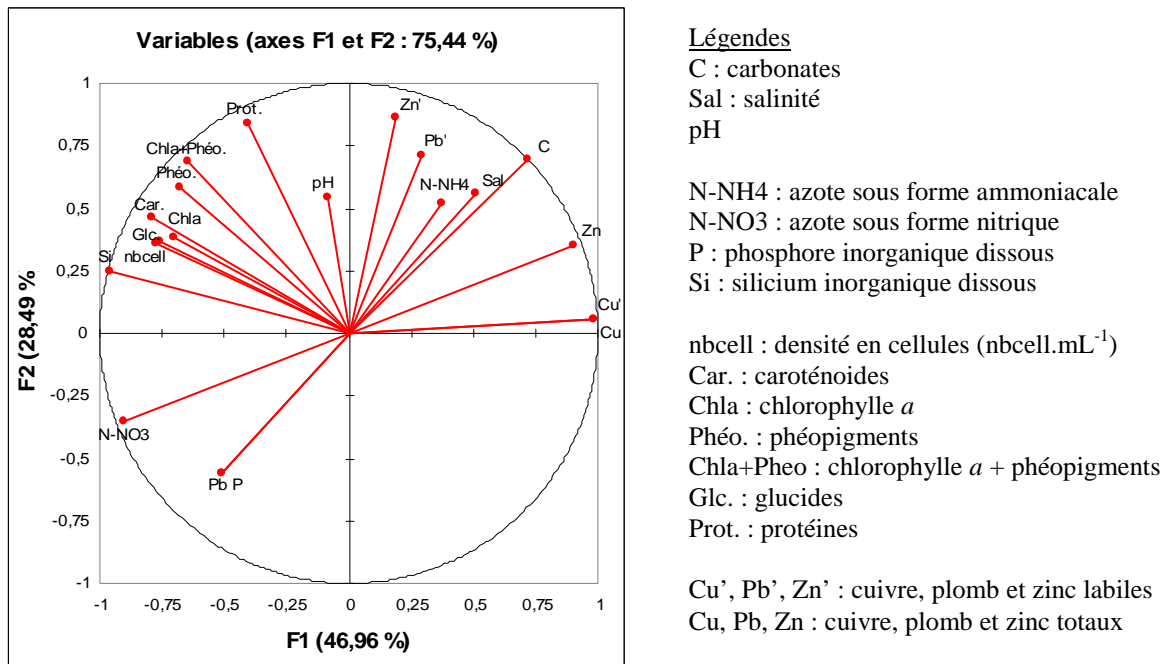


Figure II-19 Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 75% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données de cultures de *Skeletonema costatum* (données physiologiques exprimées par L de culture).

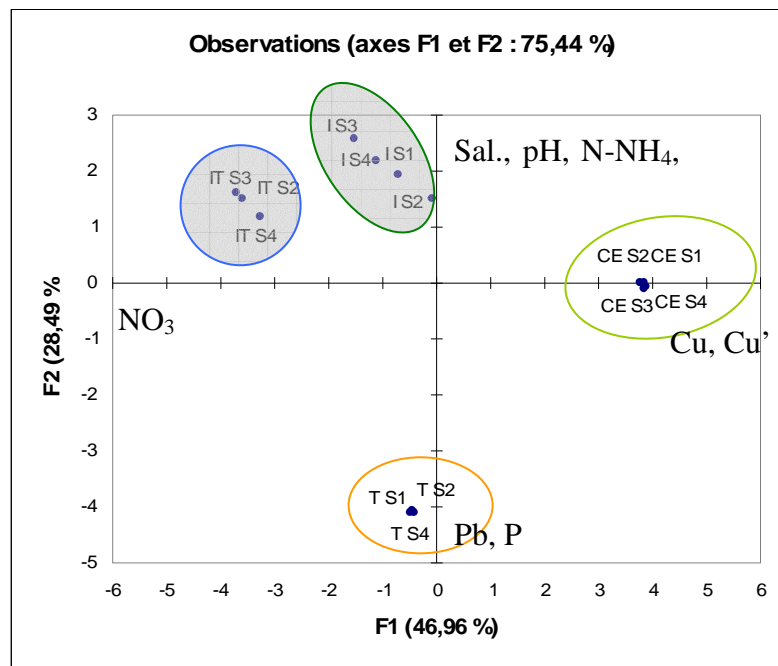


Figure II-20 Répartition des répliquats de cultures de *Skeletonema costatum* (notée S1 à S4) sur les différents eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre).

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE) Les zones grisées correspondent au maximum de densité en cellules et de production globale (pigments, glucides et protéines) de la culture.

Les répliquats de cultures se répartissent sur les axes F1 et F2 en fonction de l'eau utilisée comme pour les deux premières espèces (Figure II-20). L'axe F1 différencie les eaux en fonction de la concentration en silicium dissous inorganique et l'axe F2 en fonction de leur salinité et de leurs concentrations en phosphore inorganique dissous et en plomb total.

Les ACP réalisées avec les données physiologiques exprimées par cellule mettent en évidence une importance du pH pour les cultures avec une corrélation positive entre le pH et les teneurs intracellulaires en pigments (caroténoïdes : $r = 0,55$; $p = 0,04$, chlorophylle *a* + phéopigments : $r = 0,77$; $p < 0,001$) et en protéines ($r = 0,68$; $p = 0,06$).

II-3.2.d Cultures de *Tetraselmis suecica*

Les cultures de *Tetraselmis suecica* présentent, sur les 4 milieux testés, une phase de latence plus longue que celles observées pour les cultures des autres algues sur les mêmes milieux (Figure II-21). La densité en cellules la plus élevée est obtenue pour les cultures sur l'eau Ifremer traitée puis sur l'eau Ifremer brute.

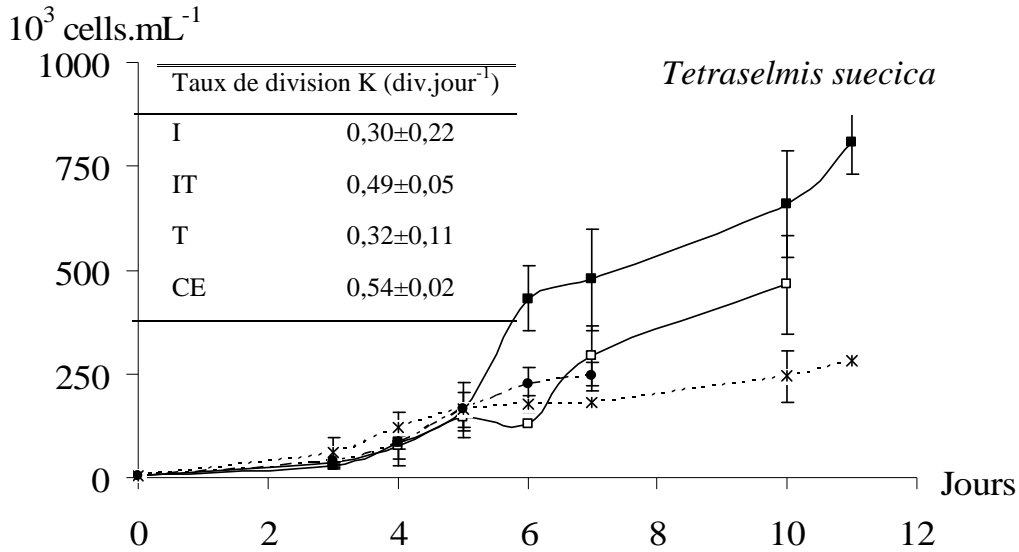


Figure II-21 Croissance de *Tetraselmis suecica* sur les eaux étudiées (10^3 cellules.mL⁻¹) et taux de division K (divisions.jour⁻¹).

(-□-) eau souterraine salée Ifremer brute (-■-), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), (-✱-) eau souterraine salée Taraud (T) et (-●-) eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Les concentrations en pigments, en protéines et en glucides exprimés par rapport au volume de culture (Figure II-22) sont significativement plus élevées sur les eaux Ifremer brute et traitée. Les concentrations en pigments, en protéines et en glucides mesurées pour les cultures sur l'eau Taraud ne sont pas statistiquement différentes de celles mesurées pour les cultures sur l'eau de mer enrichie.

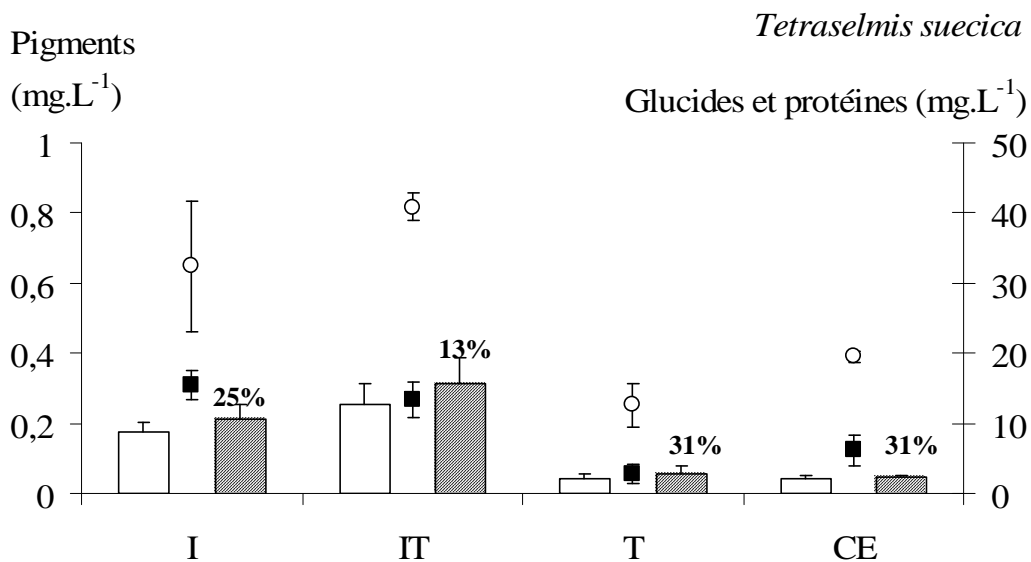


Figure II-22 Teneurs (mg.L^{-1}) en caroténoïdes (\square), chlorophylle *a* et phéopigments (\square) (le pourcentage de phéopigments apparaît en gras au-dessus de la barre d'histogramme), glucides (\circ) et protéines (\blacksquare) dans les cellules de *Tetraselmis suecica* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Les teneurs en glucides et en protéines sont significativement plus élevées dans les cellules cultivées sur l'eau Ifremer brute. La teneur en pigments photosynthétiques (chlorophylle *a* + phéopigments) semble également plus élevée dans les cellules cultivées sur l'eau Ifremer brute mais cette tendance n'est pas statistiquement vérifiée (Figure II-23). Les teneurs en glucides, protéines et pigments présentent des valeurs équivalentes dans les cellules de *T. suecica* cultivées sur les 3 autres eaux : l'eau Ifremer traitée, l'eau Taraud et l'eau de mer enrichie.

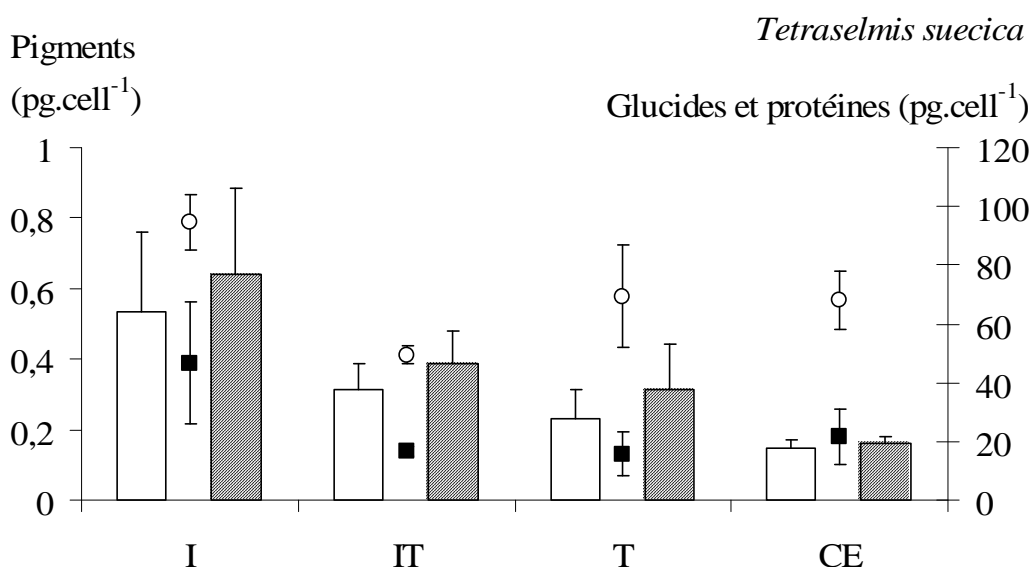


Figure II-23 Teneurs (pg.cell⁻¹) en caroténoïdes (□), chlorophylle *a* et phéopigments (▨), glucides (○) et protéines (■) dans les cellules de *Tetraselmis suecica* cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne ± intervalle de confiance.

Les ACP réalisées sur les données exprimées par litre de culture sont présentées sur la Figure II-24. La densité en cellules dans les cultures de *T. suecica* est corrélée positivement avec les concentrations en pigments (chlorophylle *a* : $r = 0,65$; $p = 0,007$, caroténoïdes : $r = 0,74$; $p = 0,001$), en glucides ($r = 0,92$; $p < 0,001$) et en protéines ($r = 0,68$; $p = 0,005$) dans les cultures. Elle est également corrélée positivement avec la concentration en silicium dissous inorganique ($r = 0,61$; $p = 0,01$) et le pH ($r = 0,79$; $p < 0,001$). Les tests de corrélation de Spearman n'ont pas mis en évidence de corrélation entre la densité en cellules et la forme d'azote, néanmoins la concentration en chlorophylle *a* est corrélée positivement à la concentration en azote nitrique dans le milieu ($r = 0,60$; $p = 0,02$). Les concentrations en pigments et en glucides dans les cultures sont corrélées négativement avec la concentration en

cuiivre total (chlorophylle *a* : $r = -0,81$; $p < 0,001$, caroténoïdes : $r = -0,70$; $p = 0,003$, protéines : $r = -0,53$; $p = 0,04$).

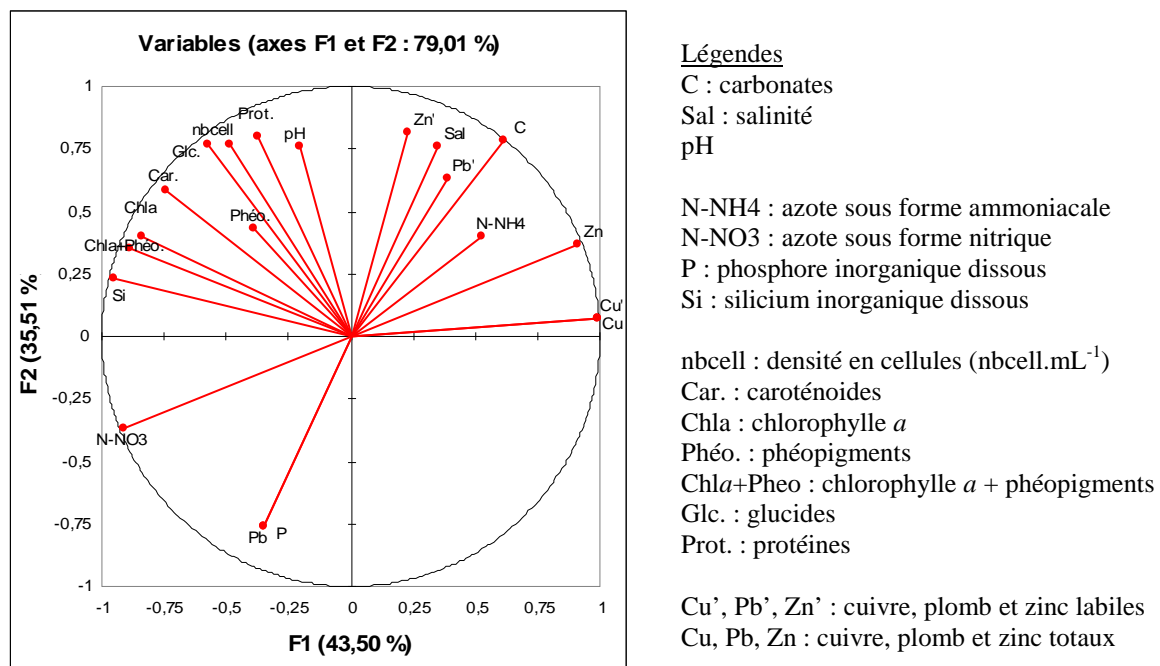


Figure II-24 Graphes présentant les axes F1 et F2 explicatifs à 79% et la corrélation des différentes variables avec ces axes dans l'ACP réalisée sur les données physiologiques exprimées par L de cultures de *Tetraselmis suecica*

Les réplicats de cultures de *T. suecica* se répartissent sur ces axes F1 et F2 en fonction du type d'eau utilisée pour les cultures. Les variables qui contribuent majoritairement à l'axe F1 sont le cuivre labile et total, le silicium inorganique dissous et l'azote nitrique. Celles qui contribuent majoritairement à l'axe F2 sont la salinité, la concentration en carbonates, en phosphore inorganique dissous et en plomb total. Les cultures se placent sur ces axes en fonction des ces variables (Figure II-25).

Les analyses réalisées avec les données exprimées par cellule montrent à nouveau l'importance du pH. Une corrélation positive est mise en évidence entre la concentration en phosphore inorganique dissous et les teneurs intracellulaires en caroténoïdes ($r = 0,67$; $p = 0,006$) et en chlorophylle *a* + phéopigments ($r = 0,71$; $p = 0,002$) de *T. suecica*.

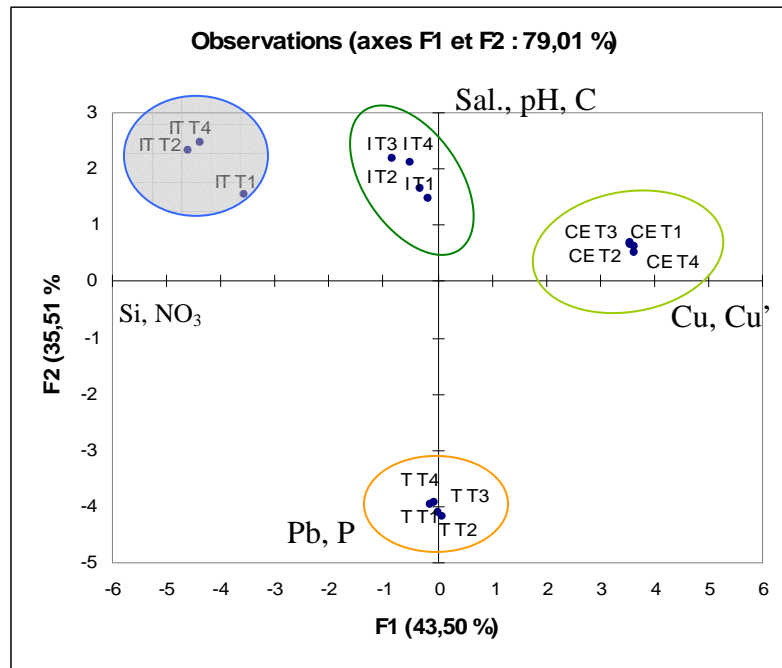


Figure II-25 Répartition des répliquats de culture de *Tetraselmis suecica* (notée T1 à T4) sur les différentes eaux en fonction des axes F1 et F2 (données exprimées par litre).

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE) La zone grisée correspond au maximum de densité en cellules et de production globale (pigments, glucides et protéines) de la culture.

II-3.2.e Consommation des sels nutritifs

Les sels nutritifs sont dosés dans les eaux avant l'inoculation des algues, puis dans le filtrat des cultures en début de phase stationnaire de croissance pour estimer la consommation des nutriments par les microalgues.

La consommation d'azote, de phosphore et de silicium inorganiques dissous est résumée pour chaque algue sur les quatre types d'eau dans le Tableau II-9.

Tableau II-9 Consommation et rapport d'assimilation des sels nutritifs par les algues cultivées sur les différentes eaux.

Eau souterraine salée Ifremer (I), eau souterraine salée Ifremer diluée (I½), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraud (T) et eau de mer côtière enrichie (CE)

		Consommation de silicium inorganique dissous en 10 ⁻¹⁴ mol.cell ⁻¹	Consommation de phosphore inorganique dissous en 10 ⁻¹⁴ mol.cell ⁻¹	Consommation d'azote inorganique dissous en 10 ⁻¹⁴ mol.cell ⁻¹	rapport N/P	rapport N/Si
<i>Haslea ostrearia</i>						
	I½	135	12	205	17	2
	IT	127	6	148	25	1
	T	53	19	125	7	2
	CE	167	9	82	10	0,5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>						
	I	3	2	55	28	18
	IT	-	6	160	25	-
	T	-	1	6	6	-
	CE	7	1	24	24	3
<i>Skeletonema costatum</i>						
	I	17	1	32	27	2
	IT	-	2	38	25	-
	T	-	3	18	6	-
	CE	28	2	24	12	1
<i>Tetraselmis suecica</i>						
	I	2	4	97	24	49
	IT	-	2	61	28	-
	T	-	8	47	6	-
	CE	-	4	25	6	-

- : la différence entre les concentrations initiale et finale dosées n'est pas suffisante pour déterminer une valeur consommée. Cela est en partie dû à la variabilité de la méthode de dosage dans des échantillons contenant une forte concentration en silicium dissous inorganique.

La consommation en silicium inorganique dissous est importante dans les cultures d'*H. ostrearia*. Les autres algues ont une consommation moindre, dans l'ordre décroissant de consommation : *S. costatum*, *P. tricornutum* et *T. suecica*. Pour les 3 diatomées, la consommation de silicium inorganique dissous est plus élevée dans les cultures sur eau de mer enrichie que sur les eaux souterraines salées. Les cultures d'*Haslea ostrearia* sur l'eau Taraud présentent une consommation en silicium inorganique dissous 2 à 3 fois plus faible

que celle des cultures sur les trois autres types d'eau. L'incertitude sur cette valeur est cependant élevée.

La consommation en phosphore inorganique dissous la plus élevée est observée pour les cultures d'*H. ostrearia*, puis dans l'ordre décroissant pour *T. suecica*, *P. tricornutum* et *S. costatum*. La consommation de phosphore est plus importante dans les cultures sur l'eau Taraud à l'exception de *P. tricornutum*. La consommation de phosphore pour *P. tricornutum* est de 3 à 6 fois plus élevée dans les cultures sur l'eau Ifremer traitée que sur les trois autres eaux.

La consommation en azote est plus importante dans les cultures d'algues réalisées sur l'eau Ifremer, traitée pour *P. tricornutum* et *S. costatum*, et brute pour *H. ostrearia* et *T. suecica*.

Les rapports d'assimilation N/P sont de l'ordre de 17 à 28 sur l'eau Ifremer et de 6-7 sur l'eau Taraud pour les quatre algues. Les cultures sur eau de mer enrichie présentent de rapports d'assimilation plus variables d'une espèce à une autre.

II-3.2.f Bioaccumulation des métaux dans les algues cultivées sur les eaux souterraines salées et l'eau de mer enrichie

Dans cette étude, les conditions de culture n'ont pas permis d'obtenir des biomasses importantes à filtrer, la masse de microalgues utilisée pour les dosages de métaux ne dépasse pas 40 mg de matière sèche. Les méthodes de dosage du plomb et du zinc ont des limites de détection relativement élevées ce qui n'a pas permis de déterminer avec précision les teneurs en plomb et en zinc dans les algues. Celles-ci sont donc exprimées par rapport à la limite de détection calculée lors des dosages. Les résultats détaillés des dosages de cadmium et de cuivre dans les 4 algues et les 4 conditions de cultures sont présentés sur la Figure II-26.

Toutes les cultures d'*H. ostrearia* et de *T. suecica* ainsi que toutes les cultures réalisées sur l'eau Ifremer brute et l'eau de mer enrichie avec les 4 algues présentent des teneurs en cadmium inférieures à $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche. Les cultures de *P. tricornutum* sur l'eau Ifremer traitée présentent une teneur en cadmium élevée ($>2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) avec une grande incertitude sur cette valeur due à la variabilité entre les réplicats. Les cultures de *S. costatum* sur l'eau Ifremer traitée et sur l'eau Taraud présentent également des teneurs en cadmium relativement élevées (entre $0,5$ et $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Les teneurs en cuivre dans les cultures d'*H. ostrearia* et *P. tricornutum* ne sont pas significativement différentes selon l'eau utilisée. Les cultures de *S. costatum* présentent des teneurs en cuivre plus élevées quand elles sont réalisées sur l'eau de mer enrichie. Les cultures de *T. suecica* présentent des teneurs en cuivre plus faibles quand elles sont réalisées sur l'eau Ifremer traitée. Les 4 espèces n'accumulent pas identiquement le cuivre. L'ordre décroissant des teneurs est : *S. costatum*, *P. tricornutum*, *T. suecica* et *H. ostrearia*.

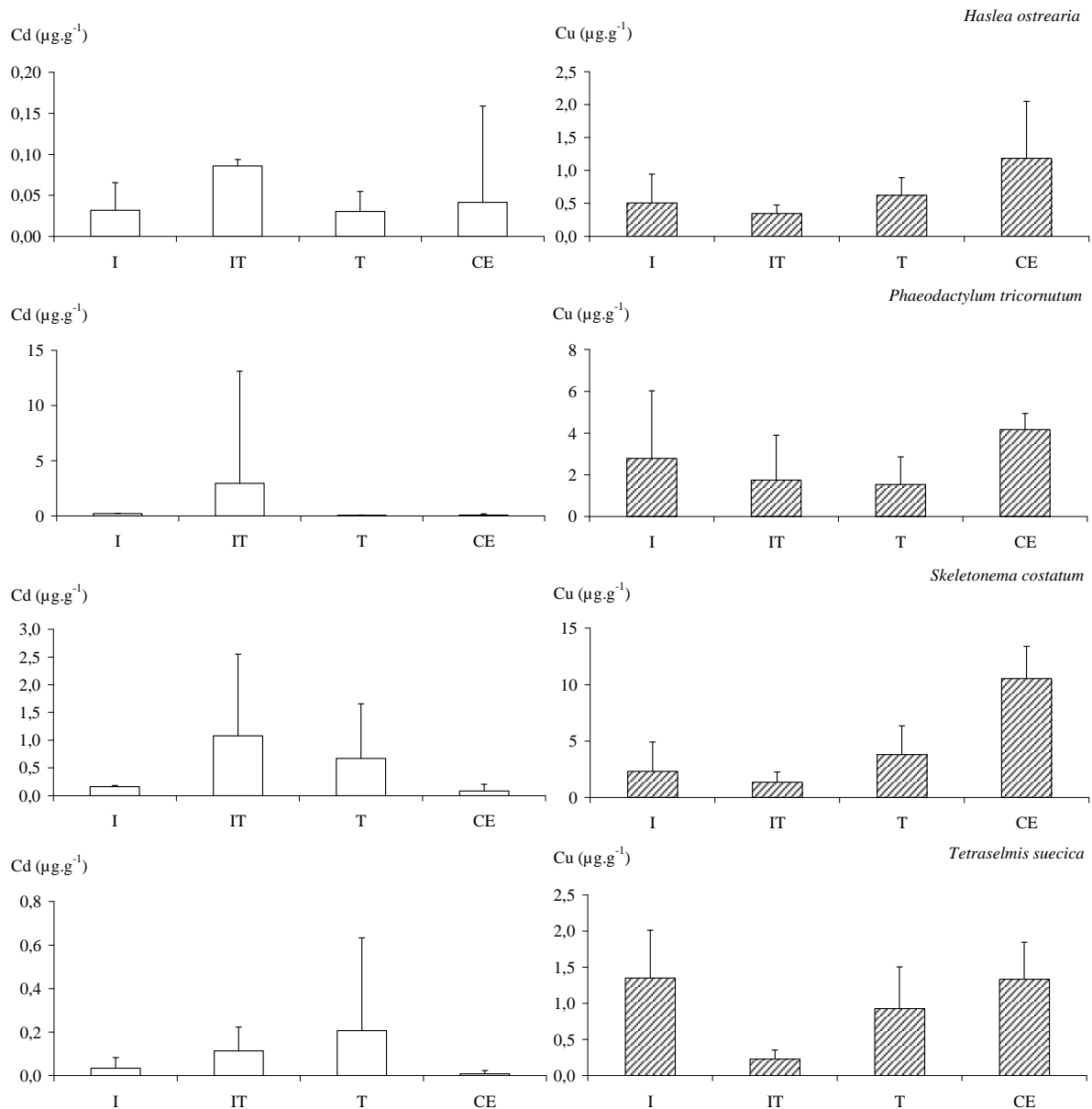


Figure II-26 Teneurs en cadmium et en cuivre des cellules algales cultivées sur les différentes eaux (en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche).

Eau souterraine salée Ifremer brute (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT), eau souterraine salée Taraut (T) et eau de mer côtière enrichie (CE). Moyenne \pm intervalle de confiance.

Les concentrations en plomb et en zinc dans les microalgues n'ont pas pu être déterminées en raison de la limite de détection et de la masse d'algue dont nous disposions pour l'analyse. La limite de détection pour le plomb dans nos conditions d'analyse nous permet de dire qu'une teneur en plomb dans les échantillons d'algue supérieure à $5 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche aurait été détectée et quantifiée. Les teneurs en plomb de nos échantillons n'ayant pas été détectées, elles semblent donc être inférieures à $5 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche.

II-3.2.g Résultats obtenus sur les eaux souterraines salées diluées avec de l'eau de mer côtière

Les résultats exposés auparavant ne traitent que des eaux utilisées pures, à l'exception d'*Haslea ostrearia* qui ne se développe pas sur l'eau Ifremer brute et pour laquelle les résultats sur l'eau Ifremer brute diluée ont été présentés. Les expériences contenaient un lot de flacons avec l'eau souterraine pure et un lot de flacons avec l'eau souterraine diluée avec de l'eau de mer. Ces résultats n'ont pas été présentés avec les autres car ils apportent moins de renseignements que de difficultés à la lecture des graphes et des tableaux.

Les effets de la dilution des eaux souterraines salées avec de l'eau de mer ($\frac{1}{2}$) sont présentés dans le Tableau II-10.

La dilution de l'eau souterraine Ifremer brute n'entraîne pas de diminution de la croissance de la population de *P. tricornutum*, *S. costatum* et *T. suecica*. Les teneurs en glucides sont pour les trois algues 1,5 à 2 fois moins élevées dans les cultures l'eau Ifremer brute diluée que dans celles sur l'eau Ifremer brute non diluée. Les teneurs en protéines ne sont pas affectées par la dilution à l'exception de *T. suecica*. Les teneurs en pigments pour les cultures de *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica* sont de 1,3 à 3,6 fois plus faibles quand les cultures sont réalisées sur l'eau Ifremer brute diluée alors que les teneurs en phéopigments et en caroténoïdes sont plus élevées dans les cultures de *P. tricornutum* réalisées sur l'eau Ifremer brute diluée que dans celles réalisées sur l'eau Ifremer brute non diluée.

Tableau II-10 Effets induits sur les cultures (multiplication et teneurs en glucides, protéines et pigments dans les cellules algales) par la dilution avec de l'eau de mer côtière des eaux souterraines salées : eau souterraine salée Ifremer brute (I), eau souterraine salée Ifremer traitée (IT) et eau souterraine salée Taraud (T). (NS : pas de différence)

Résultats de la dilution		I	IT	T
<u>Multiplication algale</u>				
<i>Haslea ostrearia</i>		-	2 fois moins	NS
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		NS	NS	3 fois moins
<i>Skeletonema costatum</i>		NS	NS	NS
<i>Tetraselmis suecica</i>		NS	2 fois moins	1,6 fois moins
<u>Teneurs en glucides</u>				
<i>Haslea ostrearia</i>		-	NS	1,7 fois plus
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		1,5 fois moins	2 fois moins	1,3 fois plus
<i>Skeletonema costatum</i>		2 fois moins	2 fois moins	NS
<i>Tetraselmis suecica</i>		1,5 fois moins	NS	NS
<u>Teneurs en protéines</u>				
<i>Haslea ostrearia</i>		-	NS	NS
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		NS	2 fois moins	NS
<i>Skeletonema costatum</i>		NS	2 fois moins	2 fois moins
<i>Tetraselmis suecica</i>		1,5 fois moins	NS	1,2 fois moins
<u>Teneurs en pigments (Chlorophylle a (Chl a) / phéopigments (Phéo.) / caroténoïdes (Car.))</u>				
<i>Haslea ostrearia</i>	Chl a	-	NS	1,8 fois moins
	Phéo.		20 fois plus	
	Car.		NS	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Chl a	NS	1,6 fois moins	NS
	Phéo.	2 fois plus	2,2 fois moins	3 fois plus
	Car.	1,5 fois plus	NS	2 fois plus
<i>Skeletonema costatum</i>	Chl a	2,1 fois moins	1,7 fois moins	2 fois moins
	Phéo.	3,6 fois moins	2,6 fois moins	
	Car.	2,1 fois moins	NS	
<i>Tetraselmis suecica</i>	Chl a	2 fois moins	1,2 fois moins	1,5 fois moins
	Phéo.	1,3 fois moins	2 fois moins	
	Car.	1,7 fois moins	1,2 fois moins	

La densité en cellules d'*Haslea ostrearia* et de *Tetraselmis suecica* cultivées sur l'eau Ifremer traitée diluée avec de l'eau de mer est 2 fois moins élevée que celle observée pour les mêmes espèces cultivées sur l'eau Ifremer traitée non diluée. Cette baisse de multiplication cellulaire n'est pas associée à une diminution des teneurs en glucides et en protéines. Les cultures de *Phaeodactylum tricornutum* et de *Skeletonema costatum* ont un taux de division similaire sur l'eau Ifremer traitée diluée et non diluée. Les teneurs en glucides, en protéines et en pigments mesurées dans les cellules de *P. tricornutum* et de *S. costatum* cultivées sur l'eau Ifremer traitée diluée sont deux fois plus faibles que celles mesurées dans les cellules de ces mêmes espèces cultivées sur cette eau non diluée.

Les cultures de *Phaeodactylum tricornutum* et *Tetraselmis suecica* sur l'eau Taraud diluée présentent des densités en cellules en fin de culture plus faibles que sur l'eau brute, respectivement 3 fois moins et 1,6 fois moins. Les cultures d'*Haslea ostrearia* et de *Skeletonema costatum* présentent des densités en cellules en fin de culture similaires sur l'eau Taraud diluée ou brute. Les cellules d'*Haslea ostrearia*, de *Phaeodactylum tricornutum* et de *Tetraselmis suecica* présentent des teneurs en glucides plus élevées dans les cultures sur l'eau Taraud diluée que dans celles sur l'eau Taraud brute. Les cellules de *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica* présentent des teneurs en protéines plus faibles dans les cultures sur l'eau Taraud diluée que dans celles sur l'eau Taraud brute.

II-4 Discussion

II-4.1 pH, salinité et nutriments majeurs

La comparaison des valeurs des variables physico-chimiques des eaux souterraines salées pompées à la station Ifremer et sur la concession aquacole de F. Taraud obtenues dans les travaux de Moreau (1996) et la présente étude montre une variation de la composition des eaux dans le temps. Dans le cas de l'eau souterraine salée prélevée à la station Ifremer Bouin, des diminutions de 0,2 de la valeur du pH et de 1,6 de la valeur de salinité sont à noter. Les températures relevées pendant les prélèvements sont plus élevées que celles relevées dans l'étude de Moreau (1996). Les concentrations en carbonates, en azote, phosphore et silicium inorganiques dissous ont également diminuées entre les deux études. Une modification de la nappe d'eau souterraine salée à cet endroit peut être liée à une variation de la réalimentation de la nappe d'eau, en fonction de la contribution respective des intrusions marines et des précipitations aux apports (SCE, 1999; S.E.-C.G.V., 2004). Une diminution de certaines de ces valeurs est également observée pour l'eau pompée sur la concession de F. Taraud. Cet appauvrissement est moins important et ne concerne pas les concentrations en phosphore et silicium inorganiques dissous. Néanmoins, l'eau Ifremer demeure plus riche que l'eau Taraud notamment en carbonates et en azote inorganique dissous. Les concentrations en cuivre dans les eaux sont très différentes entre les deux études : les concentrations en cuivre dans cette étude sont vingt fois supérieures à celles déterminées dans l'étude de Moreau (1996). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence : (i) lors des étapes de prélèvement, de préparation et de dosage des échantillons dans notre étude, une contamination des échantillons a pu augmenter la concentration en cuivre, (ii) les méthodes de dosages utilisées lors des deux études sont différentes. Pourtant, la plupart des études de comparaison des méthodes extraction/SAA ou voltampérométrie montrent que les résultats obtenus par les deux méthodes concordent (Nürnberg, 1982; Bruland *et al.*, 1985). Cependant, Bruland et Franks (1979) ont montré que dans le cas d'eaux naturelles, l'acidification ne suffisait pas à libérer tout le cuivre complexé et seulement 60% du cuivre était extrait et dosé (protocole Chelex-100 et dithiocarbamate). Ceci a également été mis en évidence par Florence (1982).

Le pourcentage d'ammoniac (NH_3) par rapport à la totalité d'azote inorganique sous forme ammoniacale ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) est plus élevé pour l'eau Ifremer traitée et l'eau de mer, notamment quand elle est enrichie. La différence la plus importante entre ces eaux et les autres est le pH plus élevé qui influence fortement l'équilibre des formes ammoniacales

(Abeliovich et Azov, 1976). Cependant, en fonction des concentrations totales en azote sous forme ammoniacale dans les eaux, les concentrations en ammoniac NH_3 les plus élevées sont observées pour l'eau de mer enrichie et l'eau Ifremer brute.

Redfield (1934) a déterminé les rapports des nutriments majeurs dans une eau de mer qu'il qualifie de *moyenne* et de leur assimilation par le phytoplancton : $\text{N/P} = 16/1$ et $\text{N/Si} = 1/1$. Les eaux Ifremer brute et traitée présentent des rapports de sels nutritifs supérieurs à ceux décrits par Redfield pour cette eau de mer moyenne. Pour l'eau Taraud et l'eau de mer enrichie, les rapports sont déséquilibrés avec un enrichissement, relatif à l'azote, en phosphore et en silicium par rapport à l'eau de mer de référence de Redfield, ce qui se traduit par des rapports inférieurs à la moyenne. Ces eaux sont donc susceptibles de favoriser la culture de microalgues qui ont des besoins accrus en phosphore et en silicium, ce qui rejoint nos observations sur les cultures d'algues que nous avons réalisées dans cette étude sur les eaux souterraines salées.

II-4.2 Concentrations et biodisponibilité des métaux dans les eaux souterraines salées et l'eau de mer côtière

La biodisponibilité d'un métal, traduite du pourcentage de métal labile, est globalement plus élevée pour le cadmium que pour les trois autres métaux étudiés. Dans les eaux Ifremer et dans l'eau de mer côtière, le cadmium est presque totalement présent sous forme labile. Le cadmium s'associe préférentiellement aux ions Cl^- dans les eaux salées (Turner *et al.*, 1981 ; Millero et Hawke, 1992). Cette association est faible et la dissociation est rapide, c'est pourquoi la fraction labile obtenue en DPASV est aussi élevée. L'eau de mer enrichie et l'eau Taraud présente des pourcentages plus faibles pour la fraction labile. D'autres associations plus fortes se produisent dans ces eaux. Moreau (1996) a montré que les concentrations en fer et en manganèse étaient plus élevées dans l'eau Taraud. Les précipités d'hydroxydes ou d'oxyhydroxydes de fer mais également de manganèse sont susceptibles d'adsorber des métaux traces (Dzombak et Morel, 1990; Stumm et Morgan, 1996). Ce phénomène peut expliquer la diminution de la fraction labile de cadmium dans l'eau Taraud. Pour l'eau de mer enrichie, plusieurs types de complexants ont pu être introduits avec les solutions d'enrichissement qui viennent s'ajouter au nombre de ligands déjà présents dans l'eau de mer (inorganiques et organiques).

L'eau de mer côtière, enrichie ou non, présente une fraction labile de cuivre plus faible que celles mesurées dans les eaux souterraines salées. Il en est de même pour l'eau Ifremer

traitée. L'élévation du pH suite au traitement pourrait être la principale raison de cette plus grande complexation de cuivre. L'eau de mer a un pouvoir complexant pour le cuivre bien supérieur néanmoins à l'eau Ifremer traitée. Le cuivre a tendance à s'associer facilement à la matière organique (acides humiques par exemple) présente dans l'eau de mer mais quasi absente, comme nous l'avons vu auparavant, dans les eaux souterraines salées pompées dans le marais breton (Bresson, 1988). La différence observée entre les pourcentages de cuivre labile par rapport au cuivre total de l'eau de mer côtière et de cette même eau enrichie ne peut pas être due à une disparition de ligands potentiels. L'enrichissement de l'eau de mer a provoqué une augmentation non négligeable de la concentration en cuivre. L'augmentation de la concentration totale en cuivre est certainement responsable d'une saturation des sites de fixation du cuivre de certains ligands présents. Les équilibres sont alors déplacés vers une augmentation de la concentration de cuivre libre ou faiblement lié, d'où l'augmentation de la fraction labile de cuivre dans l'eau de mer enrichie. (Ruzic, 1982; Pardo *et al.*, 1994; Devez, 2004).

En outre, le cuivre possède un comportement similaire dans les eaux Ifremer brute et Taraud avec une faible complexation (plus de 2/3 du cuivre est labile). La concentration élevée en carbonates, un pH proche de 7 et la quasi absence de matière organique semblent privilégier des associations faibles avec les carbonates. La concentration totale en cuivre dans l'eau Ifremer traitée est divisée par deux par rapport à l'eau Ifremer brute. Une partie du traitement consiste en la rétention d'une partie des précipités formés par les oxyhydroxydes de fer notamment (Baud *et al.*, 1991). Le cuivre est probablement adsorbé en partie sur ces oxydes et donc est retenu lors de cette filtration.

Les concentrations en plomb total sont plus élevées dans les eaux souterraines que dans l'eau de mer. L'enrichissement semble également être une source de plomb puisque l'eau de mer enrichie présente une concentration en plomb total bien supérieure à l'eau non enrichie. Par ailleurs, l'eau Ifremer traitée présente également un enrichissement en plomb par rapport à l'eau Ifremer brute, sans doute attribuable au traitement.

Les concentrations en zinc sont plus faibles dans les eaux souterraines salées que dans l'eau de mer. L'eau Ifremer brute contient plus de zinc que l'eau Taraud. Le traitement de l'eau Ifremer entraîne tout comme pour le cuivre une rétention du zinc et donc une diminution de sa concentration dans l'eau traitée. D'après Ferris *et al.* (2000), les oxyhydroxydes de fer peuvent adsorber à leur surface plusieurs métaux traces-cations. Dans la présente étude, une adsorption du cuivre et du zinc sur ces précipités est mise en évidence pour l'eau Ifremer.

Tang et Morel (2006) montrent que dans le cas d'une culture phytoplanctonique sur une eau riche en oxydes de fer, la fraction de métaux traces associés aux oxydes de fer en fin de culture était négligeable par rapport à la fraction associée aux cellules algales. Les constantes d'affinité des métaux pour les sites d'adsorption des oxydes de fer sont plus faibles que pour les sites présents à la surface algale. A cette donnée, s'ajoute le flux entrant de métaux dans la cellule. L'équilibre est donc déplacé des oxydes vers la microalgue. Ceci amène à deux conclusions : (i) les métaux dosés à partir des filtres des cultures de microalgues sont majoritairement les métaux contenus dans ou sur les cellules, la partie adsorbée sur les oxydes également retenus est négligeable, (ii) les métaux adsorbés à la surface des (oxy-)hydroxydes sont dissociables et donc biodisponibles pour les microalgues. Il reste à déterminer si cette fraction métallique est dosée en DP-ASV dans la détermination des métaux labiles. Ceci va dépendre de la vitesse de dissociation des métaux adsorbés et de leur capacité à réagir avec l'électrode de mercure dans le temps de mesure défini dans la méthode.

II-4.3 Production d'algues sur les eaux souterraines salées et sur eau de mer enrichie

Les densités en cellules obtenues sur les eaux souterraines salées sont le plus souvent supérieures à celles obtenues sur l'eau de mer enrichie. La production de protéines et de glucides totaux des cultures cultivées sur les eaux souterraines salées est également supérieure ou égale à celle obtenue sur l'eau de mer enrichie. L'utilisation de ces eaux souterraines salées est donc très intéressante, les cultures produites sont comparables à celles obtenues sur des milieux d'eau de mer enrichie voire meilleures et le coût de culture est amoindri puisque ces eaux n'ont pas besoin d'être enrichies avant leur utilisation. Ceci avait déjà été mis en évidence au début des années 80 après la découverte de ces nappes dans la région de la Baie de Bourgneuf avec les travaux de Bresson (1988), Baud et Bacher (1990), Baud *et al.* (1991), Bacher et Baud (1992).

Cette étude nous permet néanmoins de comparer, pour quatre espèces d'algues utilisées en aquaculture, la croissance et la qualité des cultures sur des eaux souterraines salées provenant de forages différents. Pour *Haslea ostrearia*, *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*, l'eau souterraine salée pompée à la station Ifremer soutient les densités en cellules les plus élevées. Bien que l'abondance des cellules de *Phaeodactylum tricorutum* ne soit pas la plus importante dans les cultures sur l'eau Ifremer traitée, les résultats des dosages biochimiques pour les cultures de *P. tricorutum* montrent une meilleure production de cette diatomée sur cette eau. En comparant les graphes pour chaque algue présentant la production

de la culture (mg.L^{-1}) en pigments, en protéines et en glucides, il apparaît que les 4 algues produisent ces composés dans des concentrations du même ordre de grandeur. Plus finement, une culture d'*H. ostrearia* produit sur l'eau Ifremer traitée au moins 2 fois plus de pigments que les autres espèces. De même, les cultures de *S. costatum* et *T. suecica* sont les plus riches en glucides totaux. La production de protéines totales est plus importante dans les cultures d'*H. ostrearia*. Pour les 3 espèces : *P. tricornutum*, *S. costatum* et *T. suecica*, les cultures produisent plus de glucides que de protéines, alors que les cultures d'*H. ostrearia* produisent plus de protéines que de glucides. Cet ordre est retrouvé sur les 4 eaux testées.

Les résultats de ces expériences permettent de mettre en avant les besoins spécifiques de chaque espèce en sels nutritifs et leur sensibilité notamment à certains métaux. Les paramètres récurrents mis en évidence dans les analyses en composantes principales influençant la culture des quatre algues et permettant de caractériser les types d'eau sont la salinité, le pH et la concentration en carbonates, la concentration et la source d'azote, la concentration en silicium et phosphore inorganiques dissous. Pour toutes les algues, l'eau Ifremer traitée et l'eau Taraud ont été reliées à des variables de façon constante :

- l'eau Ifremer traitée est corrélée à la concentration en silicium inorganique dissous et en azote inorganique dissous sous forme nitrique,
- l'eau Taraud est corrélée à la concentration en phosphore et en plomb total,
- l'eau de mer enrichie est corrélée à la concentration en cuivre,
- l'eau Ifremer brute est corrélée à la concentration en azote inorganique sous forme ammoniacale (sauf dans le cas de *T. suecica*).

Les cultures d'*H. ostrearia* ont une croissance majoritairement influencée par la concentration en silicium inorganique dissous ainsi que par la concentration en carbonates et par le pH. Neuville et Daste (1971), Robert (1992), Koussih (1995) et Moreau (1996) avaient déjà noté les importants besoins en silicium de cette diatomée. La toxicité de l'azote ammoniacal à des concentrations telles que celles de l'eau Ifremer brute a également été mise en évidence dans cette étude. Moreau (1996) a défini pour *H. ostrearia* une concentration optimale d'azote sous forme ammoniacale ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) comprise entre 110 et 130 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et un seuil toxique entre 150 et 160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. L'eau Ifremer brute contient 320 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'azote inorganique dissous sous forme ammoniacale, et, diluée avec de l'eau de mer, la concentration est de 170 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Cette dernière valeur est proche du seuil toxique défini par Moreau (1996) pour *H. ostrearia*. Dans notre étude, *H. ostrearia* s'est bien développée sur

l'eau Ifremer brute diluée. D'après Natarajan (1970), la toxicité dépend de la concentration en ammoniac NH_3 dans le milieu et donc de l'équilibre entre les formes NH_3 et NH_4^+ . La concentration en NH_3 la plus élevée est observée dans l'eau de mer enrichie ($3,70 \mu\text{mol.L}^{-1}$) puis dans l'eau Ifremer brute ($1,98 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $1,66 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans l'eau Ifremer brute diluée au demi). Nous n'avons pas observé d'inhibition de la croissance lors des cultures d'*H. ostrearia* sur eau de mer enrichie malgré la concentration en NH_3 . Néanmoins, un allongement de la phase de latence a été observé. Au cours d'une culture, les variables évoluent, le pH augmente mais les concentrations en nutriments majeurs diminuent ; ceci peut expliquer la croissance d'*H. ostrearia* sur une eau de mer enrichie qui contient une concentration en NH_3 élevée. Pour les deux autres diatomées de cette étude, la concentration optimale et le seuil de toxicité définis par Moreau (1996) sont plus élevés : respectivement $2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $8000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour *P. tricornutum* et $250-300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour *S. costatum*. L'eau Ifremer traitée avec un pH plus élevé et une source d'azote sous forme de nitrates est plus favorable au développement de *H. ostrearia* en terme de production de la culture (abondance et production totale de pigments, de glucides et de protéines). La qualité des cellules provenant de cultures sur l'eau Ifremer traitée n'est néanmoins pas différente de celle des cellules provenant de cultures sur l'eau Ifremer brute diluée. La concentration en cuivre est une variable importante dans la caractérisation des eaux comme les analyses en composantes principales ont pu le mettre en évidence. Dans le cas d'*H. ostrearia*, aucune incidence positive ou négative n'a été observée. Par contre, une corrélation négative entre la concentration en plomb total et l'abondance des cellules dans les cultures a pu être mise en évidence ce qui peut supposer une sensibilité d'*H. ostrearia* au plomb.

Dans le cas de *P. tricornutum*, l'absence de corrélation entre le nombre de cellules et la production globale de la culture (pigments, glucides et protéines) mise en évidence dans les analyses en composantes principales est expliquée par une production de chlorophylle *a* 5 fois supérieures dans les cultures sur l'eau Ifremer traitée que sur les autres eaux, avec une densité en cellules deux fois moindre. L'assimilation de l'azote chez la diatomée *Chaetoceros affinis* a été décrite par Rodier (1984) comme se déroulant en trois étapes : (i) l'absorption de l'azote de l'environnement vers l'intérieur de la cellule, (ii) la réduction de la forme azotée au degré d'oxydation (-III) (sauf pour l'ammonium), (iii) l'incorporation par amination dans les squelettes carbonés dérivés de la photosynthèse pour la synthèse des acides aminés. L'azote peut être accumulé dans la cellule entre la phase d'absorption et celle de l'assimilation. Cresswell et Syrett (1981) ont mis en évidence que le nitrate n'était pas assimilé par *P.*

tricornutum en absence de lumière et que cette assimilation nécessitait les processus de la photosynthèse, des molécules d'ATP et du CO₂. Flores *et al.* (2005) précisent, dans leur revue sur l'assimilation du nitrate chez les cyanobactéries, que l'assimilation est dépendante de la photosynthèse en mettant en avant le rôle du complexe ferrédoxine-NADPH en tant que donneur d'électron. L'augmentation des teneurs en chlorophylle *a* des cellules de *P. tricornutum* cultivées sur l'eau Ifremer traitée peut donc être expliquée par les besoins énergétiques nécessaires pour l'absorption et la réduction des nitrates, forme d'azote présente dans l'eau Ifremer traitée.

Une sensibilité au cuivre a pu être mise en évidence pour *P. tricornutum*, *S. costatum* et *T. suecica*. La concentration en cuivre est corrélée négativement avec les concentrations en pigments, glucides et protéines chez *P. tricornutum* et *T. suecica*, tandis que pour *S. costatum*, elle est corrélée négativement avec la densité en cellules. Berland *et al.* (1977) et Rivkin (1979) ont montré chez *S. costatum* une augmentation de la taille des cellules en présence de cuivre et de plomb dans le milieu. Le cuivre intervient dans les phénomènes de division cellulaire et peut, présent en excès, bloquer la division cellulaire ce qui explique l'allongement de l'axe perivalvaire des cellules (Berland *et al.*, 1977). Morel *et al.* (1978) avancent l'hypothèse d'un blocage au niveau de la première division cellulaire, apparemment physiologiquement différente des suivantes, en présence de cuivre ce qui allonge la phase de latence, ce blocage ne concernerait pas les divisions suivantes. La phase de latence est plus longue (4 jours) pour les cultures de *S. costatum* sur eau de mer enrichie (milieu qui contient le plus de cuivre dans notre étude) que pour celles réalisées sur les autres eaux (3 jours). En phase stationnaire de croissance, la densité en cellules des cultures sur eau de mer enrichie est proche de celle des cultures sur eau Taraud et les concentrations en pigments, en glucides et en protéines ne sont pas différentes. Le cuivre a pu dans un premier temps interférer dans le cycle cellulaire puis dans un deuxième temps être régulé pour limiter ses effets sur le métabolisme et le cycle cellulaire par des phénomènes de compartimentation cellulaire (Nassiri, 1995) ou de complexation par des exsudats (Imber *et al.*, 1984; Imber *et al.*, 1985). La densité en cellules est, dans le cas de *S. costatum*, également corrélée à la concentration en phosphore. Pirastru (1994) a trouvé un rapport d'assimilation azote/phosphore de 10/1 pour *S. costatum* cultivée sur une eau souterraine salée provenant de la même région. Rouillard et Robert (1992) ont noté, dans des cultures de *S. costatum* réalisées sur un milieu enrichi en phosphore par rapport à l'azote, une augmentation des teneurs en glucides intracellulaires contre une diminution des teneurs en protéines et en lipides. Myklestad (1977) a également

mis en évidence une plus grande production de glucides par rapport aux protéines lorsque le rapport N/P du milieu est inférieur à 10 pendant la phase exponentielle de croissance ; il montre également des diminutions du taux de croissance et de l'assimilation de l'azote pour les cultures de *S. costatum* sur un milieu dont le rapport N/P est supérieur à 10. Cette tendance est retrouvée dans les cultures réalisées dans cette étude sur l'eau Taraud *versus* les trois autres eaux et dans l'étude de Pirastru (1994) sur *S. costatum* cultivée sur eau souterraine salée provenant de la baie de Bourgneuf. Une autre particularité observée dans les cultures de *S. costatum*, par rapport aux autres algues cultivées, est la concentration élevée de phéopigments par rapport à la chlorophylle *a*. Les échantillons sont préparés de la même façon pour les 4 espèces et seule *S. costatum* présente des pourcentages de phéopigments aussi élevés. Suzuki et Fujita (1986) ont montré que les chlorophylles des cellules de *S. costatum* subissaient une plus grande dégradation que celles de *Chaetoceros socialis* et *Prorocentrum minimum* supposant une plus grande activité des chlorophyllases dans les extraits préparés de *S. costatum*. Ils ont également mis en évidence une plus grande dégradation des chlorophylles quand les échantillons sont filtrés et non centrifugés.

Les résultats des ACP réalisées sur les données des quatre algues mettent en avant une corrélation positive entre la concentration en silicium dissous inorganique et la densité en cellules (pour *H. ostrearia*, *S. costatum* et *T. suecica*) ou les paramètres physiologiques des cultures (caroténoïdes, chlorophylle *a*, glucides et protéines) (pour *S. costatum*). Le silicium inorganique dissous en plus d'être un élément essentiel dans la biosynthèse du frustule des diatomées serait également impliqué dans le cycle cellulaire et notamment dans les mécanismes de division ce qui expliquerait le résultat obtenu pour *T. suecica*, une prasinophycée à thèque organique. Un enrichissement en silicium du milieu pourrait favoriser les divisions cellulaires dans les cultures algales (Sullivan et Volcani, 1976 ; Henrotte *et al.*, 1988).

II-4.4 Accumulation des métaux dans les algues

Les teneurs en métaux des microalgues obtenues dans cette étude sont comparées à des études réalisées avec les mêmes microalgues dans des conditions proches des nôtres (Tableau II-11). Il apparaît que les algues cultivées dans nos conditions expérimentales présentent des teneurs en métaux inférieures ou égales aux teneurs trouvées dans la littérature. Les teneurs en métaux dans *Haslea ostrearia* sont inférieures à celles déterminées dans la pâte d'algues de cette espèce en 2000 (SMIDAP, comm. pers.). Les conditions de culture étaient, malgré

l'utilisation d'eau souterraine salée provenant de la région de Bourgneuf, différentes des nôtres puisqu'il s'agissait de cultures en grands volumes, non stériles avec un processus de concentration des algues pour préparer la pâte qui a été analysée.

D'après les normes, la teneur tolérée en cadmium dans les microalgues est égale à 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ (masse de matière sèche). *H. ostrearia* et *T. suecica* ne présentent pas des teneurs en cadmium supérieures au seuil toléré. *P. tricornutum* présente des teneurs relativement élevées en cadmium dans l'eau souterraine Ifremer traitée. *S. costatum* présente quant à elle une teneur en cadmium plus élevée que le seuil toléré sur l'eau souterraine salée Ifremer traitée, presque 7 fois plus élevée que la même souche cultivée sur l'eau souterraine salée Ifremer brute. Les teneurs en cuivre les plus élevées sont, pour toutes les espèces, retrouvées pour les cultures sur eau de mer côtière enrichie. L'enrichissement de cette eau apporte environ 5 fois la concentration mesurée dans les eaux souterraines salées. La teneur tolérée en plomb dans les microalgues est égale à 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$. Aucune des algues ne présente des teneurs en plomb dépassant la norme à partir des calculs réalisés sur les limites de détection.

Tableau II-11 Teneurs en métaux accumulés dans les algues dans nos conditions de culture, comparaison à d'autres travaux réalisés sur eau souterraine salée.

(1) Etude SMIDAP (comm. pers.) (pâte d'algues de cultures sur eau souterraine salée) ; (2) Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991 ; (3) Schintu *et al.*, 1999 (Etude sur eaux souterraines salées)

	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
<i>Haslea ostrearia</i>				
Présente étude	0,03-0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,4-1,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 0,46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 3,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Littérature	0,18-0,56 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (1)	15,92-30,05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (1)	0,52-10,63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (1)	45,2-172,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (1)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>				
Présente étude	0,06-5,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1,5-4,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 13,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
<i>Skeletonema costatum</i>				
Présente étude	0,08-1,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1,3-10,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 3,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
<i>Tetraselmis suecica</i>				
Présente étude	0,008-0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,4-1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 0,55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	< 5,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Littérature		5,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (2)		1-2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (3)

D'après les résultats de notre étude, 2 groupes apparaissent : *S. costatum* et *P. tricornutum* qui accumulent de 2 à 10 fois plus de cadmium, 3 fois plus de cuivre, 6 fois plus de plomb et de 3 à 6 fois plus de zinc qu'*H. ostrearia* et *T. suecica*. Ces 2 groupes ne soutiennent pas l'hypothèse d'un éventuel rôle du frustule des diatomées dans l'accumulation des métaux. Par contre, le transport des métaux dans les cellules algales se déroule en deux temps : une phase d'adsorption des métaux sur des groupements à la surface des cellules, puis

par un transport facilité ou actif, une absorption dans les cellules (Stauber et Florence, 1989 ; Morelli et Scarano, 1995). D'autre part, les modes de régulation des métaux développés dans les microalgues sont divers, de la séquestration dans des vésicules comme *T. suecica* (Nassiri *et al.*, 1994) à l'excrétion de substances chélatrices dans le milieu pour modifier la spéciation et donc la biodisponibilité des métaux (Imber *et al.*, 1985 ; Gonzales-Davila *et al.*, 1995; Vasconcelos *et al.*, 2002).

Une accumulation de métaux dans les microalgues cultivées sur eau souterraine salée n'a pas été montrée comme systématique. De plus, les teneurs en métaux dans les cellules d'*H. ostrearia* sont faibles par rapport à *P. tricornutum* et *S. costatum* et les teneurs en cadmium et en plomb sont inférieures à celles qui ont été observées dans les expériences de l'étude dirigée par le SMIDAP. Les conditions de culture et le type d'échantillon analysé étant différents, il serait intéressant de déterminer l'impact de certains facteurs sur l'accumulation des métaux en comparant nos conditions de culture à celles précédemment utilisées : (i) le rapport surface des parois des récipients /volume de milieu de culture est très différent entre un flacon de 250 mL et un bac de 600 litres ; la différence d'adsorption des métaux sur les parois serait à quantifier, ainsi que les variations de concentration d'O₂ et de pénétration de la lumière dans l'épaisseur de la colonne d'eau, ce qui influeraient sur la croissance et donc sur les processus d'accumulation, (ii) l'apport de métaux extérieurs à la culture lors des processus de centrifugation serait également à comparer à l'apport très faible noté dans le système de filtration utilisé dans notre étude, (iii) la quantité de précipités d'oxydes de fer récupérée dans les deux techniques serait également à comparer. Ces différentes pistes pourraient éventuellement apporter des explications à la différence entre les résultats obtenus dans les deux études.

II-5 Conclusion

Dans ce travail, les résultats précédents sur les cultures de microalgues sur eaux souterraines salées ont été confirmés. Les eaux souterraines sont effectivement riches en nutriments majeurs et permettent d'obtenir des biomasses algales intéressantes. La sensibilité des algues pour le cuivre a pu être mise en évidence sauf pour *Haslea ostrearia*, contrairement à ce qui a été décrit précédemment dans la littérature pour cette diatomée. Cette apparente résistance est accompagnée d'une accumulation très faible de métal dans la diatomée *H. ostrearia*. *Phaeodactylum tricornutum* et *S. costatum* présentent les plus grandes capacités d'accumulation des métaux sur les quatre milieux. La concentration totale en cuivre, trois fois supérieure dans l'eau de mer enrichie par rapport aux eaux souterraines salées, n'a pas induit une accumulation trois fois supérieure dans les microalgues. L'accumulation en cuivre sur les différents milieux suit le même profil pour les quatre algues avec une accumulation plus élevée dans les cellules cultivées sur l'eau de mer enrichie, puis sur l'eau Ifremer brute et l'eau Taraud, la plus faible étant notée dans les cellules cultivées sur l'eau Ifremer traitée. Cela peut en partie s'expliquer par les concentrations en cuivre total car elles sont dans cet ordre décroissant, mais les facteurs de concentration ne sont pas équivalents pour toutes les eaux. Les proportions de cuivre labile par rapport au cuivre total apportent des informations supplémentaires en montrant que la biodisponibilité du cuivre dans l'eau de mer enrichie est moindre par rapport à celle dans les eaux souterraines salées. La biodisponibilité du cuivre apparaît donc sensiblement différente en fonction de l'eau. Dans la partie suivante, nous allons étudier la complexation des métaux dans l'eau souterraine salée par rapport à l'eau de mer pour valider cette hypothèse pour le cuivre et déterminer si les mêmes observations pouvaient être faites pour les trois autres métaux.

Les capacités d'accumulation des métaux des quatre algues seront ensuite étudiées dans le quatrième chapitre pour tenter d'identifier les principales caractéristiques de ces algues responsable de ce phénomène et d'expliquer les différences observées.

Chapitre III Cultures sur eaux souterraines salées enrichies en métaux

III-1 Introduction

Dans le chapitre précédent, il a été mis en évidence une différence d'accumulation des métaux dans les algues en fonction des eaux utilisées pour leur culture. Cette différence n'a pas pu être totalement expliquée par les concentrations totales des différents métaux dans les milieux utilisés pour les cultures. La quantification du cuivre sous forme labile amène à l'hypothèse d'une biodisponibilité de celui-ci plus importante dans les eaux souterraines salées que dans l'eau de mer. Il nous a donc semblé intéressant dans une première partie de ce chapitre d'étudier la spéciation du cuivre, et des trois autres métaux, dans ces eaux dans l'optique d'apporter des éléments de réponse aux questions soulevées par les études précédentes en ce qui concerne l'accumulation de plomb dans les cultures d'*Haslea ostrearia* et dans notre étude en ce qui concerne les variations de facteurs de concentration des métaux en fonction des eaux. Dans un premier temps, une étude de la capacité de complexation de l'eau souterraine salée pompée à la station Ifremer et de l'eau de mer côtière a été réalisée par la technique voltampérométrique. Dans un second temps, des cultures de microalgues ont été utilisées dans le cadre de bioessais pour estimer l'impact de la complexation des métaux dans l'eau souterraine salée sur leur toxicité pour les algues. L'objectif de ces cultures en bioessais a été l'étude de la complexation des métaux par les précipités de phosphates de fer qui se forment en quelques heures après le pompage, dus à l'oxygénation rapide des eaux ramenées à la surface. La diatomée *H. ostrearia* a été utilisée pour réaliser ces bioessais.

III-2 Matériel et méthodes

III-2.1 Étude de la capacité de complexation de l'eau souterraine salée et de l'eau de mer

Les flacons en polypropylène ainsi que les piluliers, la verrerie de laboratoire et les accessoires (ex. cônes des micropipettes automatiques) nécessaires dans ces expériences ont préalablement été nettoyés dans un bain mixte d'acide chlorhydrique 1 mol.L^{-1} et d'acide nitrique $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Ils ont ensuite été rincés trois fois à l'eau ultra-pure et une fois avec l'échantillon.

III-2.1.a Prélèvement des eaux et préparation des échantillons

L'eau souterraine salée utilisée dans ces expériences a été prélevée à la station Ifremer (Bouin, Polder du Dain) dans des flacons en polypropylène de 2 L. Les précipités dus à l'oxygénation de l'eau se sont formés rapidement et ont sédimenté au fond des flacons. Avant de répartir l'eau en plusieurs échantillons de 50 mL dans des piluliers, l'eau contenue dans le flacon a donc été homogénéisée par agitation. Une partie de l'eau souterraine salée a été filtrée sur des membranes en fibre de verre Whatman GF-F 47 mm (équivalent à $0,45 \mu\text{m}$ de vide de maille) de façon à exclure ces précipités d'oxydes de fer.

L'eau de mer a été prélevée dans la baie de Bourgneuf à La Coupelasse (Baie de Bourgneuf, Vendée) (ce site est indiqué sur la carte de la baie Figure I-4, page 15). A cet endroit, l'eau est riche en matière en suspension (Haure et Baud, 1995; Haure *et al.*, 1996). Une partie de l'eau a été collectée à l'aide de flacons en polypropylène 2 L dans les premiers centimètres de la colonne d'eau pour avoir des échantillons d'eau peu turbide et une autre partie a été collectée après brassage de l'eau dans cette même zone pour avoir des échantillons d'eau plus turbide. Un autre flacon d'eau a été collecté pour être filtrée sur des membranes en fibre de verre Whatman GF-F afin d'éliminer la fraction particulaire. L'eau de mer de forte turbidité, l'eau de mer de faible turbidité et l'eau de mer filtrée sur GF-F ont été analysées pour comparer leur capacité de complexation à celle de l'eau souterraine salée.

III-2.1.b Protocole des titrations métalliques pour la détermination de la capacité de complexation

La détermination de la capacité de complexation est réalisée par la méthode d'équilibration en voltampérométrie à redissolution anodique en impulsions différentielles

(DP-ASV) selon la méthode de Plasvic *et al.* (1982). Les différentes eaux collectées ont été réparties dans des piluliers de 50 mL. A ces échantillons, ont été ajoutées des quantités croissantes de métal sur une gamme de 0 à 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les ajouts de métaux sont réalisés avec des solutions tamponnées à pH = 6,5 avec un tampon acétate, nous avons vérifié qu'à ce pH les ajouts de métaux ne modifient pas le pH naturel des eaux étudiées. L'introduction d'un tampon dans les solutions métalliques apporte un biais expérimental mais la variation de pH successive à l'ajout d'une solution métallique non tamponnée aurait une incidence plus grande sur la spéciation métallique (Batley et Florence, 1980). Les échantillons subissent une période d'équilibration de 48 heures, à l'obscurité et à 4°C pour limiter le développement des organismes présents dans les échantillons non filtrés. Après cette période d'équilibration, les réponses voltampérométriques des différents échantillons sont enregistrées en suivant la procédure décrite dans la partie « Matériel et méthodes » du chapitre II (II-2.3). Sur chaque échantillon, une gamme en ajouts dosés est réalisée pour déterminer les concentrations équivalentes en métal labile.

III-2.1.c Graphiques et calculs

Les gammes en ajouts dosés n'ont pas permis de calculer les concentrations en métal labile des échantillons. Les réactions de complexation des métaux ajoutés lors des gammes avec les ligands présents étaient trop rapides pour permettre l'obtention de droites étalons. Les linéarisations de Ruzic et de Scatchard n'ont donc pas pu être réalisées. Les concentrations en ligands et les constantes de stabilité conditionnelle associées ont été déterminées graphiquement suivant la technique de Pardo *et al.* (1994).

III-2.2 Protocole expérimental d'enrichissement en métaux de l'eau souterraine salée pour la culture de microalgues

L'eau souterraine salée utilisée dans ces expériences a été prélevée sur la concession aquacole de Monsieur F. Taraud en suivant le protocole décrit dans le chapitre précédent dans des bonbonnes en polypropylène de 60 L. Les précipités dus à l'oxygénation de l'eau se sont formés rapidement. Avant de prélever l'eau nécessaire pour les cultures d'algues, l'eau dans la bonbonne a donc été homogénéisée par agitation.

Les cultures ont été réalisées dans des flacons de 250 mL contenant 150 mL de milieu. Le protocole de répartition et de traitement de l'eau souterraine salée utilisé pour étudier

l'impact de la présence des précipités sur les concentrations en métaux et leur toxicité sur *H. ostrearia* est présenté sur la Figure III-1.

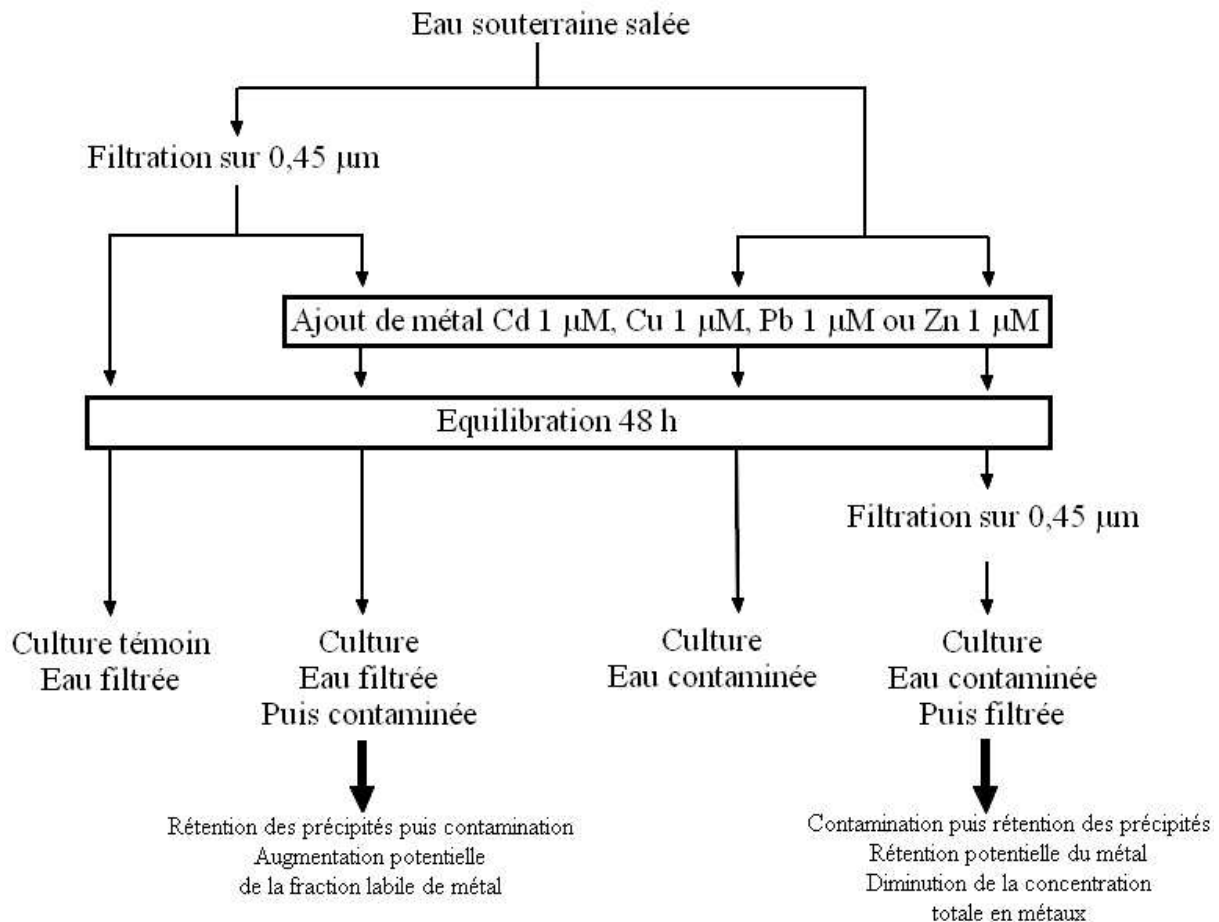


Figure III-1 Schéma du protocole d'enrichissement en métaux des eaux souterraines salées pour les cultures d'*Haslea ostrearia*

L'eau souterraine salée a été utilisée non filtrée et filtrée, soit avant ou après l'ajout du métal dans le milieu (après la période d'équilibration). Les cellules algales ont ensuite été inoculées à raison de $5000 \text{ cellules.mL}^{-1}$ sous la hotte à flux laminaire. Les flacons ont été placés dans une chambre de culture thermostatée, à 19°C avec une photopériode lumière/obscurité de 14h/10h, sous un éclairage de $100 \mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Des cultures réalisées sur l'eau de mer non enrichie ont servi de référence. Les cultures sur eau de mer non enrichie ne permettent pas d'obtenir des biomasses importantes mais un enrichissement aurait entraîné un apport en métal (cf Chap. II) et une modification de la spéciation des métaux dans ce milieu.

Après l'ajout de l'inoculum algal, la densité en cellules a été évaluée par comptage sur lames hématimétriques jusqu'à la phase stationnaire de croissance. Le dosage des métaux a été réalisé sur les résidus retenus sur la membrane lors de la filtration des eaux avant les cultures et sur les cultures en fin de croissance en suivant les protocoles de préparation des membranes et de dosage décrit dans le chapitre II. Pour le dosage des métaux dans les algues, 50 mL de culture ont été filtrés par échantillon. Dans les milieux initiaux (J0) et les jus de cultures (le filtrat obtenu après la rétention des algues sur la membrane) à J10, le dosage des sels nutritifs majeurs a été effectué avec l'autoanalyseur Skalar et les métaux totaux ont été dosés par DP-ASV après acidification à pH = 2 et traitement aux ultraviolets.

III-2.3 Statistiques

Les traitements statistiques utilisés dans ce travail ont été réalisés à l'aide du logiciel SigmaStat (version 2.03). Les groupes de données ont été analysés en utilisant des analyses de variance (ANOVA) après avoir vérifié la normalité de la distribution et l'homogénéité des variances. Quand les ANOVA mettaient en évidence des différences entre les groupes, le test *a posteriori* de Tukey a été utilisé. Pour une série de données, une analyse de variance suivie d'un test *a posteriori* non paramétriques (Kruskall-Wallis, test *a posteriori* de Dunn's) ont été réalisés car la distribution ne suivait pas une loi normale. Pour tous les tests, un seuil de significativité de $\alpha = 0,05$ a été appliqué.

III-3 Résultats

III-3.1 Capacités de complexation de l'eau souterraine salée et de l'eau de mer

Le potentiel de complexation des métaux de l'eau souterraine salée d'Ifremer brute a été comparé à celui de l'eau de mer côtière. Pour chaque métal (Cd, Cu, Pb et Zn), les courbes de titration de l'eau de mer dans les trois conditions (turbide, peu turbide et filtrée) et celles de l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer (filtrée ou non sur GF-F) sont présentées sur deux graphes distincts. Les gammes en ajouts dosés réalisées sur les échantillons pour déterminer les concentrations en métal labile n'ont pas donné de résultats satisfaisants avec des droites de régression fiables. Les concentrations élevées des gammes en ajouts dosés pour les derniers points introduisaient un biais dû à la saturation de la goutte de mercure. Une modification des paramètres d'analyse en DP-ASV aurait entraîné de fortes modifications des valeurs du signal (une réduction du temps de déposition aurait réduit significativement l'intensité du signal). C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec les valeurs d'intensité du signal voltampérométrique pour établir les courbes de titration en gardant les mêmes paramètres d'analyse pour tous les échantillons. L'adéquation des réponses voltampérométriques avec les concentrations en métal labile a été vérifiée pour chaque condition au moins pour les premières concentrations de la titration. Ceci implique que les concentrations en ligands et les constantes de stabilité conditionnelle ont été déterminées graphiquement (ces valeurs sont présentées en synthèse dans le Tableau III-1, page 138).

III-3.1.a Le cadmium dans l'eau de mer côtière et l'eau souterraine salée brute Ifremer

Les courbes de titration du cadmium dans les deux types d'eau ne présentent pas de rupture de pente ce qui traduit une absence de ligands dans ces eaux capables de former des complexes inertes avec le cadmium. Les intensités mesurées pour les pics de cadmium sont du même ordre de grandeur. Dans le cas de l'eau de mer, la turbidité n'influence pas les réponses voltampérométriques des dosages de cadmium. Les droites de la titration ne sont pas différentes (Figure III-2).

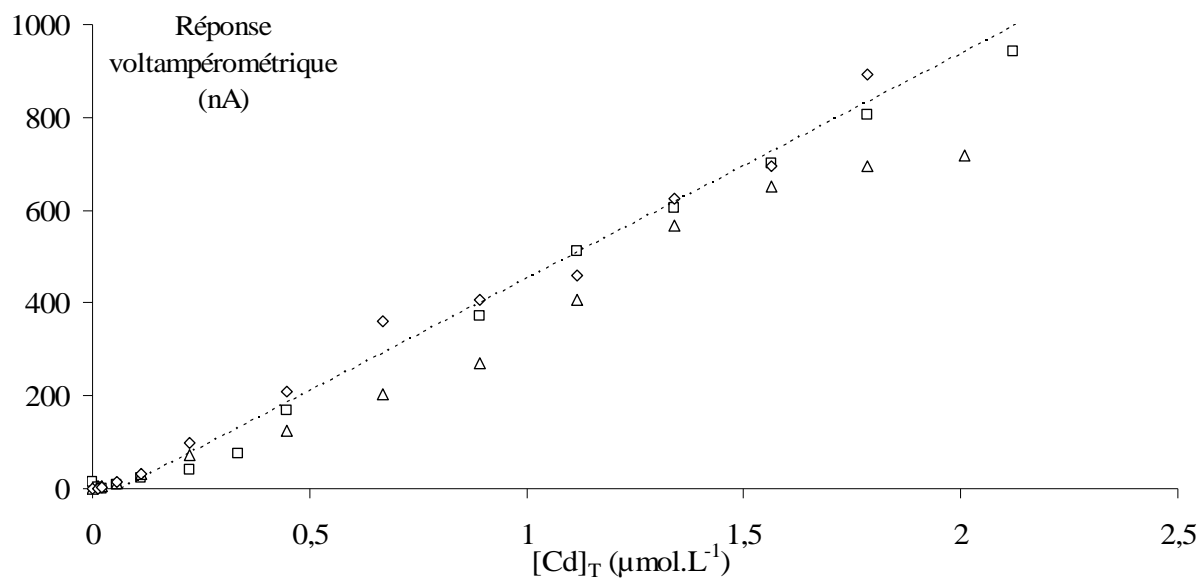


Figure III-2 Courbes de titration du cadmium pour l'eau de mer côtière turbide (□), peu turbide (◇) et filtrée (△)

Dans le cas de l'eau souterraine salée Ifremer, la courbe de titration de l'eau filtrée est caractérisée par une pente plus faible que celle de l'eau brute (Figure III-3).

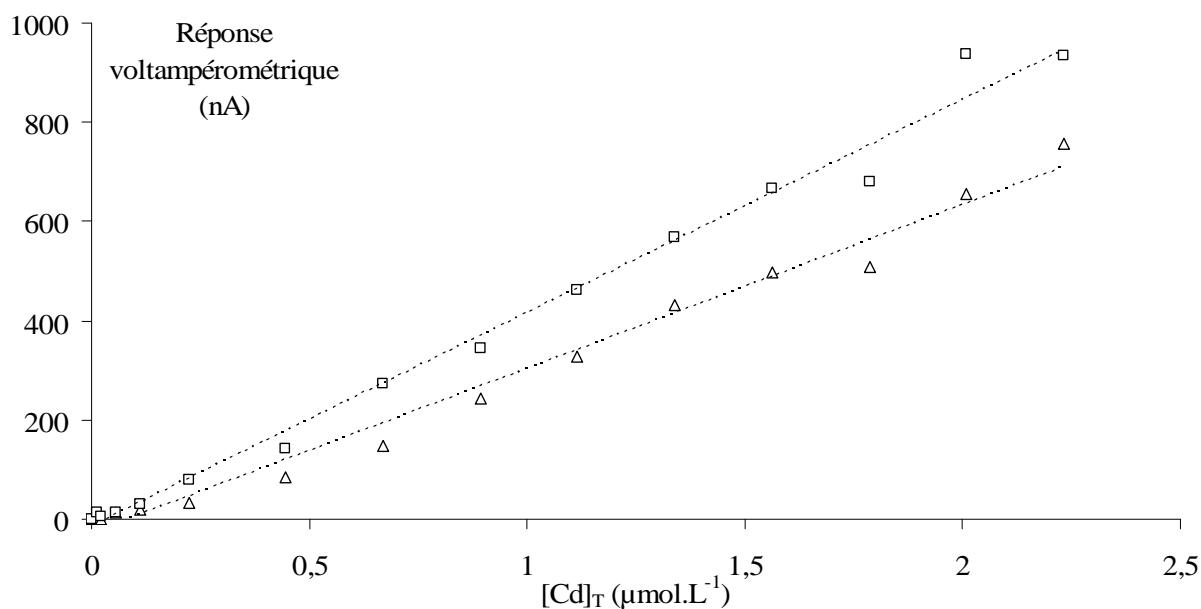


Figure III-3 Courbes de titration du cadmium pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (□) et après filtration sur GF-F (△)

III-3.1.b Le cuivre dans l'eau de mer côtière et l'eau souterraine salée bruteIfremer

Les courbes de titration du cuivre dans les deux types d'eau présentent des profils différents. Les dosages voltampérométriques de cuivre dans l'eau de mer côtière turbide correspondent à des intensités très faibles (quasi nulles jusqu'à $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) qui augmentent en suivant une droite de très faible pente (Figure III-4). Cela concorde avec des concentrations en métal labile très faibles dans l'eau de mer turbide. Il existe donc au moins une classe de ligands capables de former des complexes inertes avec le cuivre dans l'eau de mer turbide. L'eau de mer filtrée présente une rupture de pente dans la courbe de titration de cuivre pour une concentration en cuivre total proche de $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ce qui implique la présence d'une classe de ligands dont la concentration est égale à celle mise en évidence dans le cas de l'eau de mer turbide. Cependant les pentes des droites avant et après cette rupture sont plus élevées que dans le cas de l'eau de mer turbide. La titration du cuivre dans l'eau peu turbide n'a pas mis en évidence de rupture dans la courbe aussi franche que pour l'eau turbide ou l'eau filtrée. Les réponses voltampérométriques sont néanmoins équivalentes à celles mesurées pour l'eau de mer filtrée à partir de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Pour les échantillons d'eau de mer peu turbide, ces réponses voltampérométriques pour des concentrations en cuivre total inférieures à $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sont plus élevées que les réponses mesurées pour l'eau de mer filtrée aux mêmes concentrations en cuivre total.

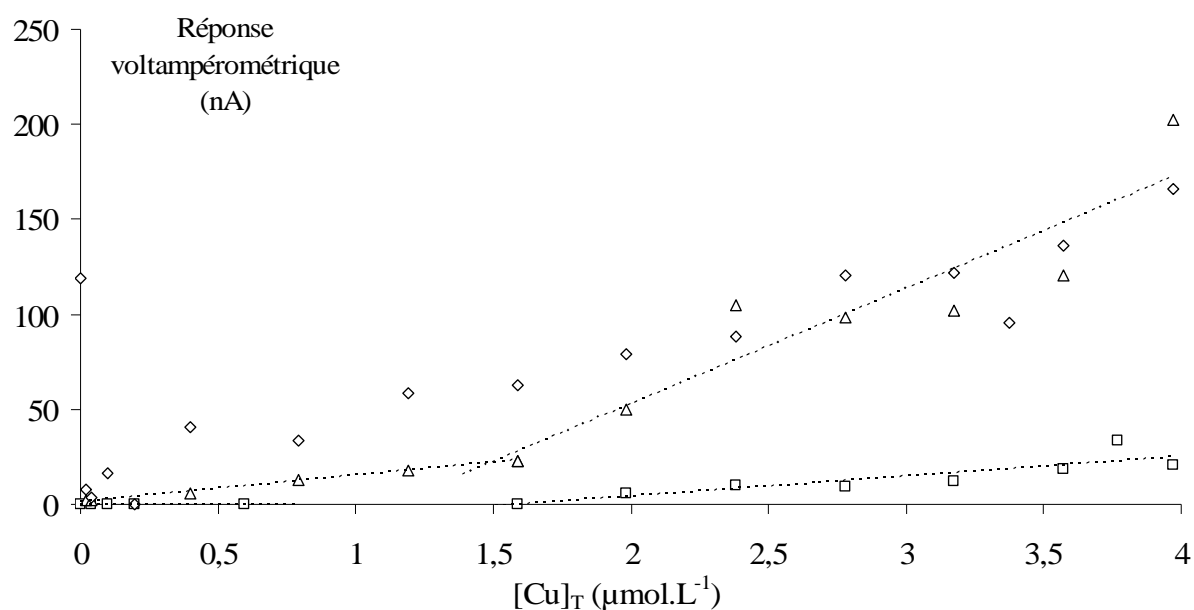


Figure III-4 Courbes de titration du cuivre pour l'eau de mer côtière turbide (□), peu turbide (◇) et filtrée (△)

La titration de cuivre dans l'eau souterraine salée brute Ifremer met en évidence une rupture de pente correspondant à une classe de ligands dont la concentration totale est comprise entre 2 et 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figure III-5). Dans l'eau souterraine filtrée, aucune rupture de pente n'a pu être mise en évidence. Les intensités mesurées dans le cas de l'eau filtrée sont inférieures à celles mesurées dans l'eau brute pour des concentrations en cuivre total équivalentes, comme dans le cas du cadmium.

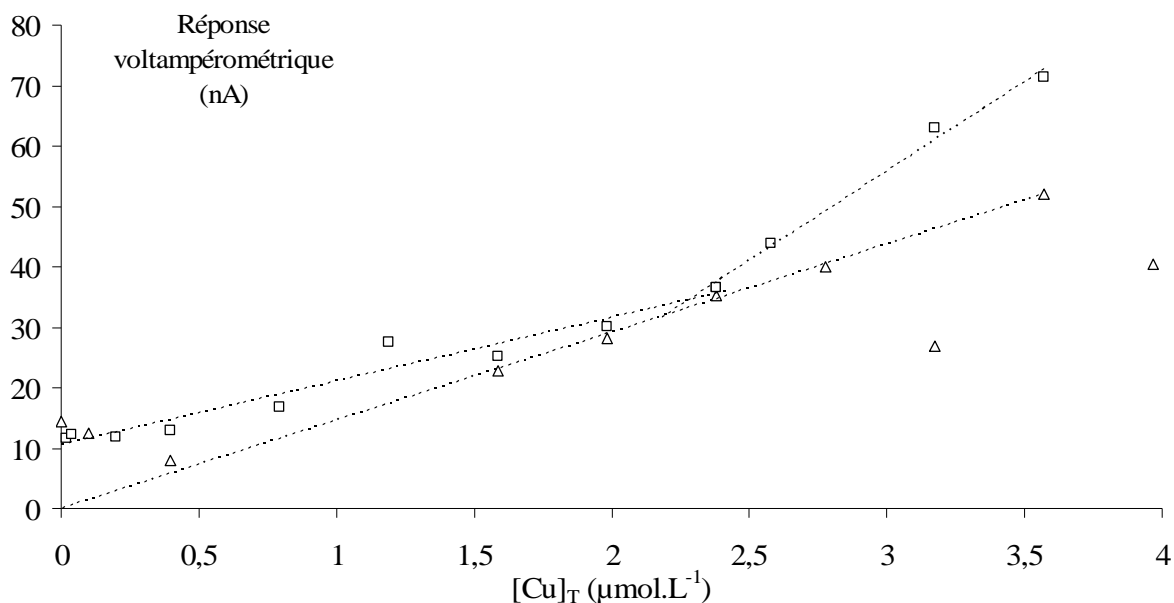


Figure III-5 Courbes de titration du cuivre pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (□) et après filtration sur GF-F (△)

Les réponses voltampérométriques mesurées pour le cuivre labile dans l'eau de mer sont deux fois supérieures à celles mesurées dans l'eau souterraine salée.

III-3.1.c Le plomb dans l'eau de mer côtière et l'eau souterraine salée brute Ifremer

Dans l'eau de mer turbide, les intensités mesurées pour le plomb sont très faibles (Figure III-6). Une tendance à l'augmentation de ces intensités est observée pour des concentrations en plomb total supérieures à 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une faible pente. Dans l'eau de mer peu turbide, les intensités mesurées sont supérieures et la rupture de pente est observée pour une concentration totale en plomb comprise entre 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 0,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les pentes des deux droites sont supérieures à celles observées dans le cas de l'eau de mer turbide. Dans l'eau filtrée, les intensités mesurées pour le pic de plomb sont encore plus fortes et la

rupture de pente intervient plutôt, entre 0,3 et 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de plomb total. Les pentes des deux droites issues de la titration de l'eau filtrée sont supérieures aux pentes obtenues lors des titrations du plomb dans l'eau de mer turbide et l'eau de mer peu turbide.

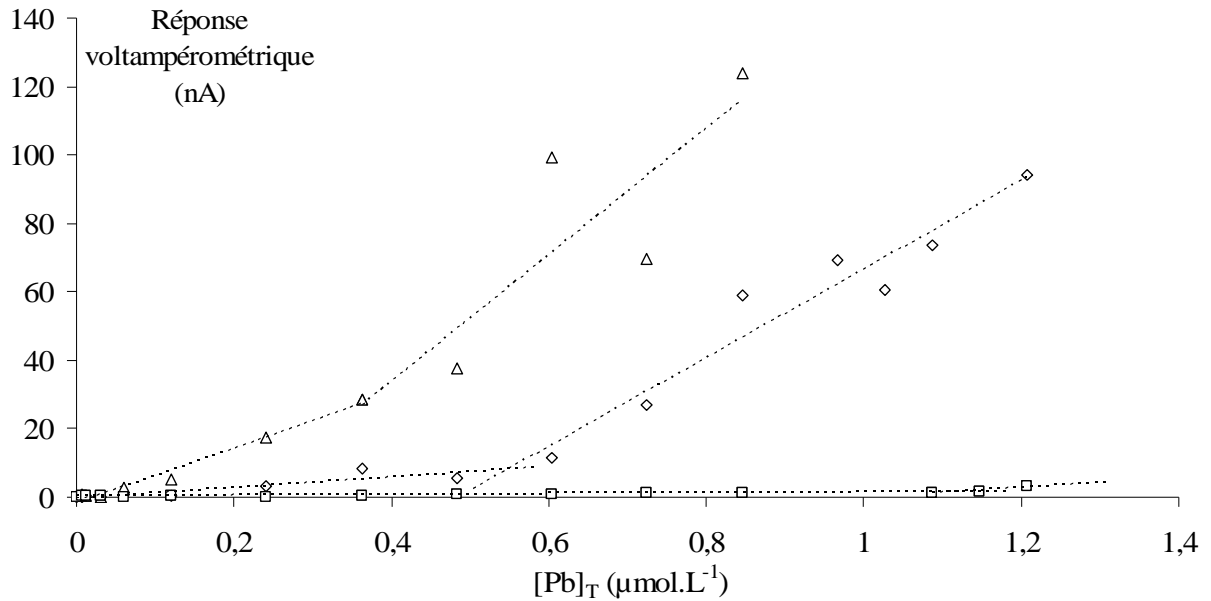


Figure III-6 Courbes de titration du plomb pour l'eau de mer côtière turbide (\square), peu turbide (\diamond) et filtrée (Δ)

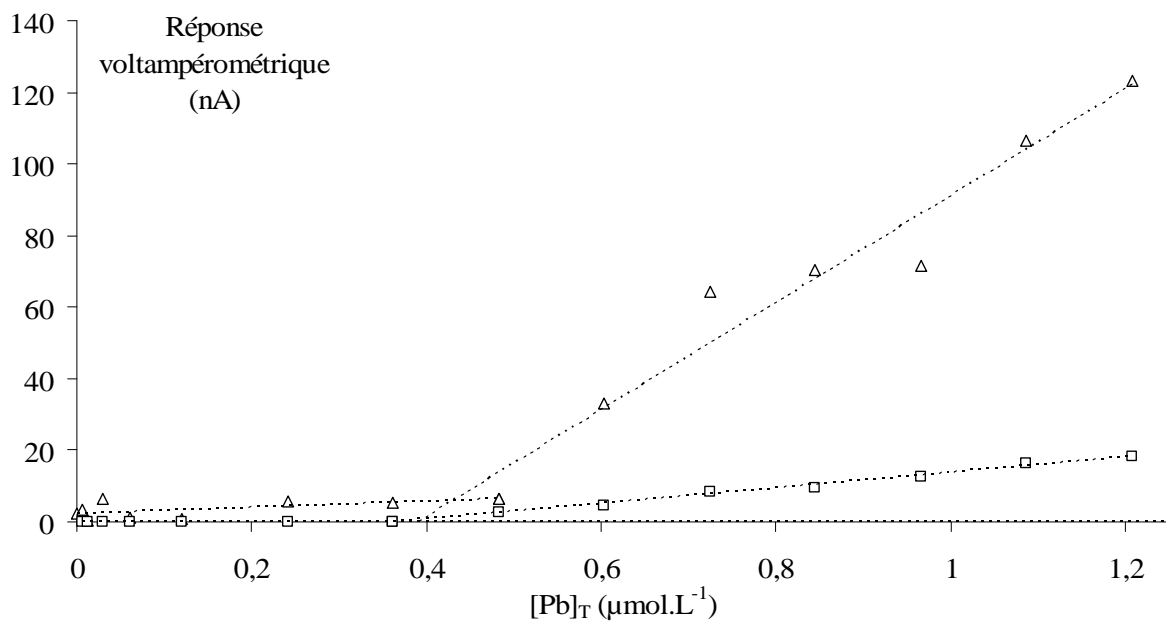


Figure III-7 Courbes de titration du plomb pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (\square) et après filtration sur GF-F (Δ)

Les intensités du pic de plomb dans les échantillons d'eau souterraine Ifremer brute sont quasi-nulles jusqu'à une concentration en plomb total proche de $0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figure III-7). Ensuite, les intensités augmentent proportionnellement à l'augmentation de la concentration totale en plomb. Ces réponses voltampérométriques sont supérieures aux pentes obtenues lors des titrations de l'eau de mer turbide.

Les réponses voltampérométriques enregistrées pour les différentes concentrations totales en plomb ajoutées à l'eau souterraine salée filtrée augmentent proportionnellement à ces concentrations jusqu'à $0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en suivant une pente légèrement supérieure à celle observée dans l'eau brute. Après $0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, les réponses augmentent proportionnellement en suivant une pente 6 fois plus importante que celle observée pour l'eau brute. Les réponses voltampérométriques mesurées pour l'eau souterraine filtrée sont du même ordre de grandeur que celles mesurées pour l'eau de mer filtrée. Dans l'eau souterraine salée brute ou filtrée, une seule classe de ligands est donc mise en évidence.

III-3.1.d Le zinc dans l'eau de mer côtière et l'eau souterraine salée brute Ifremer

Le zinc est le seul métal pour lequel un modèle à deux ligands est proposé pour interpréter les courbes de titration réalisées dans l'eau de mer.

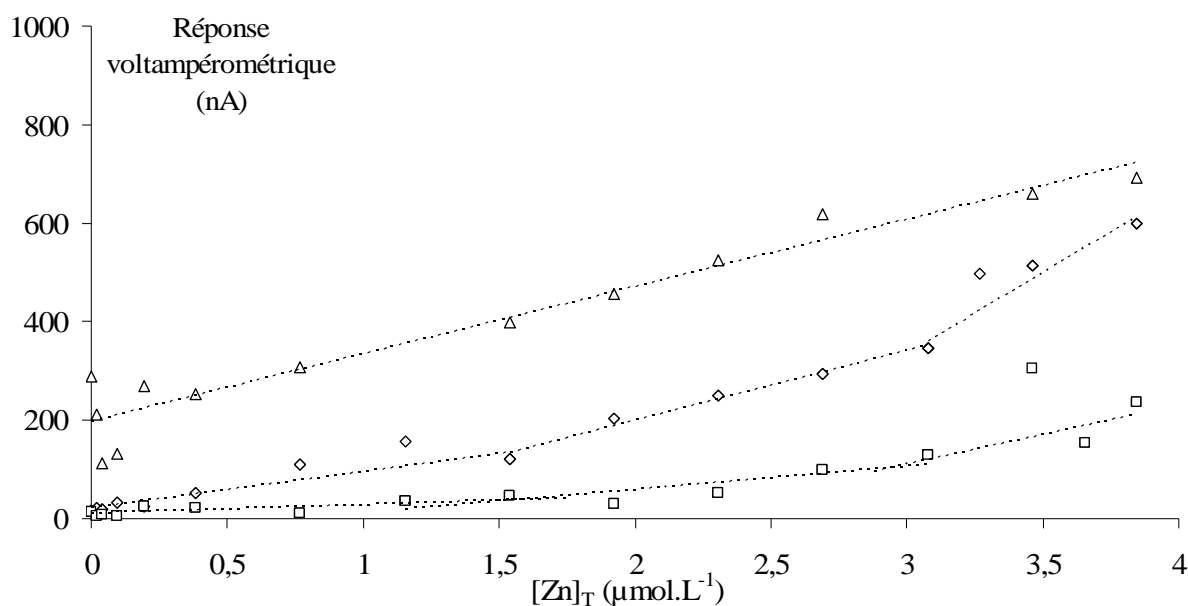


Figure III-8 Courbes de titration du zinc pour l'eau de mer côtière turbide (□), peu turbide (◇) et filtrée (△)

Deux classes de ligands ont pu être mises en évidence par la présence de deux ruptures de pente dans les courbes de titration du zinc dans l'eau de mer côtière turbide et dans l'eau de mer peu turbide (Figure III-8). Les ruptures de pente pour les courbes de titration du zinc dans l'eau de mer turbide et dans l'eau de mer peu turbide sont placées sensiblement aux mêmes concentrations en zinc total : la première vers $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et la deuxième vers $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les différences portent essentiellement sur les intensités relevées pour le zinc labile qui sont, pour une concentration en zinc donné, plus fortes dans l'eau de mer peu turbide que dans l'eau de mer turbide. Dans l'eau filtrée, la titration de zinc n'a pas mis en évidence de rupture de pente, les intensités mesurées pour le zinc labile sont supérieures aux intensités relevées dans l'eau de mer turbide et dans l'eau de mer peu turbide.

La titration de zinc dans l'eau souterraine salée Ifremer brute met en évidence une seule rupture de pente vers $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de zinc total. Pour l'eau filtrée, aucune rupture de pente n'est mise en évidence. Les intensités des pics de zinc dans l'eau souterraine, qu'elle soit brute ou filtrée, sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans l'eau de mer peu turbide et filtrée et plus fortes que celles mesurées dans l'eau de mer turbide. Néanmoins les pentes des droites de titration du zinc dans l'eau souterraine salée brute sont supérieures à celles obtenues lors de la titration du zinc dans l'eau de mer turbide et dans l'eau de mer peu turbide.

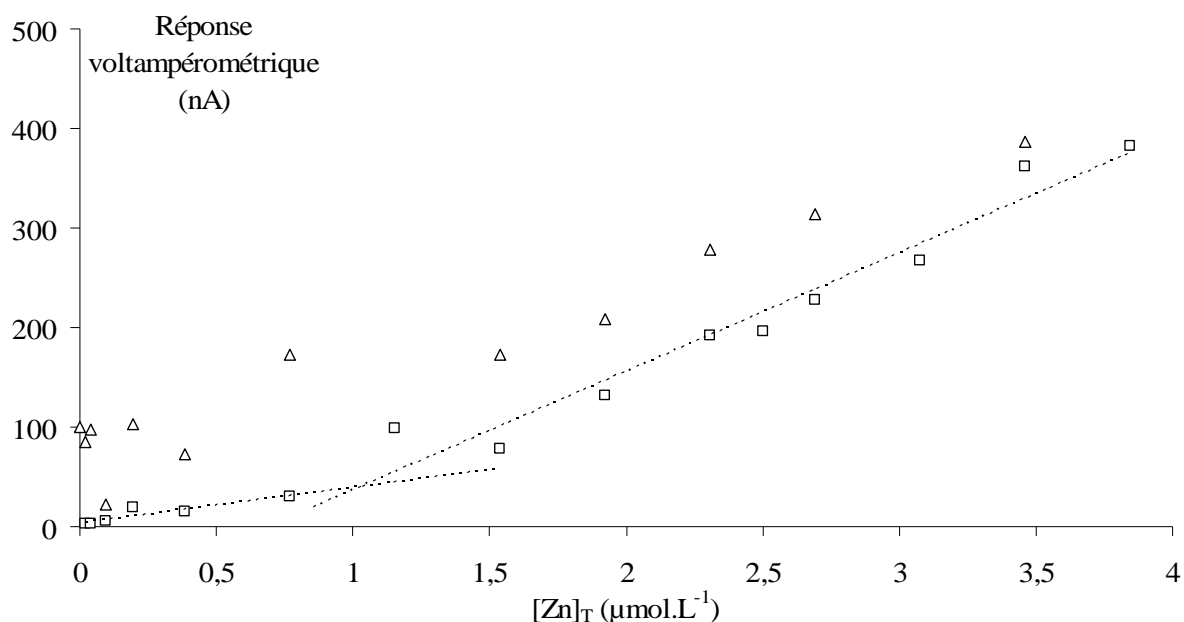


Figure III-9 Courbes de titration du zinc pour l'eau souterraine salée brute de la station Ifremer avant (□) et après filtration sur GF-F (△)

Le Tableau III-1 présente les valeurs, estimées graphiquement, de capacité de complexation (CC = point d'intersection des droites) et de constante de stabilité conditionnelle (K = calculée à partir des valeurs de pente des droites) des eaux pour la classe de ligands L₁ dans le cas du cuivre et du plomb, et pour les deux classes de ligands L₁ et L₂ décrits pour le zinc.

Tableau III-1 Estimation graphique des valeurs de capacités de complexation (CC) et des constantes de stabilité conditionnelle (K) de l'eau de mer côtière et l'eau souterraine salée pour le cuivre, le plomb et le zinc

	Classe de ligands L ₁		Classe de ligands L ₂	
	CC (μmol.L ⁻¹)	log K (L.μmol ⁻¹)		
Cuivre				
Eau de mer turbide	1,60	nc		
Eau de mer peu turbide	?	?		
Eau de mer filtrée	1,49	0,37		
Eau souterraine salée brute	0,44	0,62		
Eau souterraine salée brute filtrée	<i>Pas de ligand mis en évidence</i>			
Plomb				
Eau de mer turbide	1,10	1,12		
Eau de mer peu turbide	0,55	1,14		
Eau de mer filtrée	0,36	0,56		
Eau souterraine salée brute	0,37	nc		
Eau souterraine salée brute filtrée	0,43	1,59		
	CC ₁	log K ₁	CC ₂	log K ₂
Zinc				
Eau de mer turbide	1,55	0,01	2,96	0,72
Eau de mer peu turbide	1,56	0,77	3,03	0,63
Eau de mer filtrée	<i>Pas de ligand mis en évidence</i>			
Eau souterraine salée brute	1,04	0,35		
Eau souterraine salée brute filtrée	<i>Pas de ligand mis en évidence</i>			

n.c. : non calculé, K tend vers l'infini car la pente a₁ tend vers 0.

? : Aucune rupture de la courbe n'est mise en évidence mais les données ne suivent pas une régression linéaire.

Pas de ligand mis en évidence : les données suivent une régression linéaire.

La filtration de l'eau de mer entraîne une diminution de la concentration des classes de ligands L₁ complexant le cuivre et le plomb ainsi que de leurs constantes de stabilité conditionnelle, et une rétention des deux classes de ligands complexant le zinc. La turbidité a un impact sur la concentration en ligands dans le cas du plomb, pour lequel la classe de ligands L₁ est deux fois moins importante en concentration dans l'eau peu turbide que dans

l'eau de mer turbide pour des constantes de stabilité conditionnelle similaires. Dans le cas du zinc, la turbidité n'influence pas les concentrations des classes de ligands mais pour la classe L_1 , la constante d'association est plus élevée. Les classes de ligands L_2 présents dans l'eau de mer turbide et l'eau de mer peu turbide possèdent des caractéristiques similaires (concentration totale et constante de stabilité conditionnelle).

Dans le cas de l'eau souterraine salée Ifremer, la filtration induit une perte d'une classe de ligands du cuivre et du zinc. La classe de ligands capables de former des complexes inertes de plomb est toujours présente dans l'eau filtrée à une concentration proche de celle observée pour l'eau brute. Néanmoins, la constante de stabilité conditionnelle est plus faible pour la classe de ligands du plomb présente dans l'eau filtrée.

Les concentrations en ligands du cuivre, du plomb et du zinc sont inférieures dans l'eau souterraine salée Ifremer à celles observées dans l'eau de mer. Les valeurs de constante de stabilité conditionnelle pour les classes de ligands L_1 sont supérieures dans le cas du plomb et du zinc dans l'eau souterraine salée à celles mesurées dans l'eau de mer. Pour le cuivre, la classe de ligands L_1 présente dans l'eau de mer turbide possède une valeur de constante de stabilité conditionnelle (K) très grande ce qui n'est pas le cas pour l'eau souterraine salée.

III-3.2 Expériences d'enrichissement en métaux des eaux souterraines salées

Des expériences type bioessai ont été réalisées en utilisant la diatomée *Haslea ostrearia* cultivée sur l'eau souterraine salée prélevée sur la concession de Monsieur F. Taraud.

Les concentrations en phosphore inorganique dissous mesurées dans l'eau filtrée sont quatre fois plus faibles ($1,76 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 0,01$) que celles mesurées dans l'eau brute ($7,71 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 0,10$). Les concentrations en silicium dissous sont semblables dans l'eau brute ($260 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 4$) et dans l'eau filtrée ($255 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 7$). Les concentrations en azote inorganique dissous ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, NO_2^- et NO_3^-) ne sont pas différentes dans l'eau souterraine brute et filtrée.

La filtration sur GF-F retient les précipités jaune orange présents dans l'eau souterraine salée dès trois à quatre heures après la filtration. Les milieux de culture préparés avec l'eau souterraine salée brute présentent au fond du flacon ces précipités flocculants alors que les milieux de culture préparés avec l'eau souterraine filtrée sont limpides.

Les quatre métaux testés lors de la même expérimentation, les cultures témoin utilisées en tant que comparaison sont donc les mêmes pour les quatre métaux. Dans les graphes, ces cultures témoins apparaissent en gris pour mettre en évidence les résultats obtenus sur les cultures enrichies en métaux.

Des problèmes d'ordre expérimental ont mis fin prématurément aux cultures réalisées sur l'eau souterraine salée enrichie en métaux mais non filtrées (ni avant, ni après). C'est pourquoi les courbes de croissance pour ces lots s'arrêtent au neuvième jour. Les comparaisons statistiques ont donc été effectuées pour les jours 9 et 18.

III-3.2.a Impact du cadmium sur les cultures d'*Haslea ostrearia* sur l'eau souterraine salée Taraud, filtrée ou non, avant et après l'ajout

Les courbes de croissance d'*Haslea ostrearia*, cultivées sur l'eau souterraine salée Taraud brute ou filtrée, sont présentées sur la Figure III-10 : sans ajout de cadmium (courbes témoin) et avec ajout de cadmium d'une concentration égale à $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ avant ou après la filtration pour l'eau filtrée.

La culture témoin réalisée sur l'eau souterraine filtrée présente une phase de latence plus longue que celle réalisée sur l'eau souterraine brute. Au neuvième jour de culture, les densités en cellule entre les cultures témoin eau souterraine salée et témoin eau souterraine salée filtrée sont significativement différentes ($p < 0,001$). La densité en cellules finale de la culture témoin sur eau souterraine salée filtrée est légèrement inférieure à celle de la culture témoin sur eau souterraine salée brute mais cette différence n'est pas statistiquement vérifiée.

Les trois cultures enrichies en cadmium présentent des courbes de croissance avec des densités inférieures à celles des témoins. Au 9^{ème} jour, seules les cultures réalisées sur l'eau souterraine salée filtrée puis enrichie en cadmium sont statistiquement moins abondantes en cellules que les cultures témoins ($p = 0,004$). Au 18^{ème} jour, les cultures sur eau filtrée puis enrichie et sur eau enrichie puis filtrée sont significativement moins abondantes en cellules que les cultures témoin ($p < 0,001$). Les densités en cellules mesurées dans les cultures réalisées sur l'eau enrichie puis filtrée sont supérieures à celles mesurées dans les cultures réalisées sur l'eau filtrée puis enrichie ($p = 0,005$).

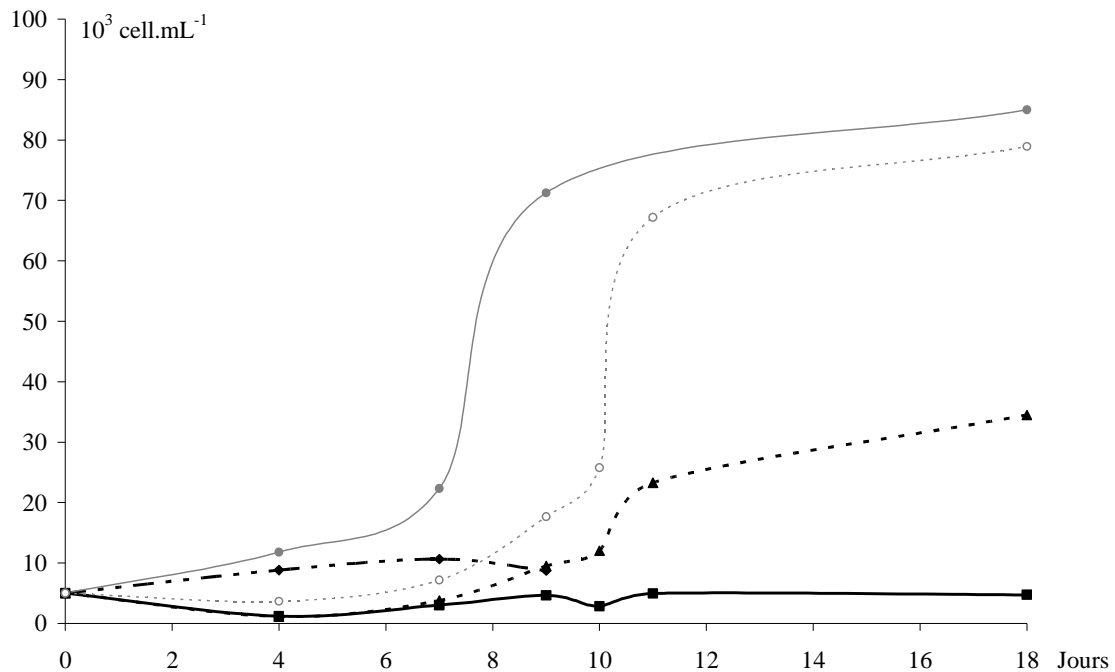


Figure III-10 Etude de la complexation du cadmium sur les particules retenues à environ $0,45 \mu\text{m}$. Courbes de croissance de la diatomée *Haslea ostrearia* cultivée dans les différentes conditions de culture.

Légendes :
 Eau souterraine salée (—●—)
 Eau souterraine salée filtrée sur GF-F (—○—)
 Eau souterraine salée filtrée sur GF-F puis enrichie en cadmium $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (—■—)
 Eau souterraine salée enrichie en cadmium $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (—◆—)
 Eau souterraine salée enrichie en cadmium $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ puis filtrée sur GF-F (—▲—)

III-3.2.b Impact du cuivre sur les cultures d'*Haslea ostrearia* sur l'eau souterraine salée Taraud, filtrée ou non, avant et après l'ajout

Dans le cas de l'enrichissement en cuivre (Figure III-11), au 9^{ème} jour, seules les cultures réalisées sur l'eau enrichie puis filtrée et sur l'eau filtrée puis enrichie présentent des densités en cellules significativement différentes ($p = 0,05$; tests non paramétriques). Au 18^{ème} jour, la culture sur l'eau enrichie puis filtrée contient plus de cellules que les cultures témoins (avec un facteur 2) et la culture sur l'eau filtrée puis enrichie ($p < 0,001$; tests paramétriques). La culture filtrée puis enrichie contient peu de cellules, la densité en cellules de cette culture est très inférieure à celle des cultures témoins ($p < 0,001$; tests paramétriques).

Dans le cas du cuivre, le taux de croissance le plus important est observé pour les cultures réalisées sur l'eau enrichie puis filtrée. Les cultures filtrées puis enrichies en cuivre présentent des densités en cellules faibles et similaires.

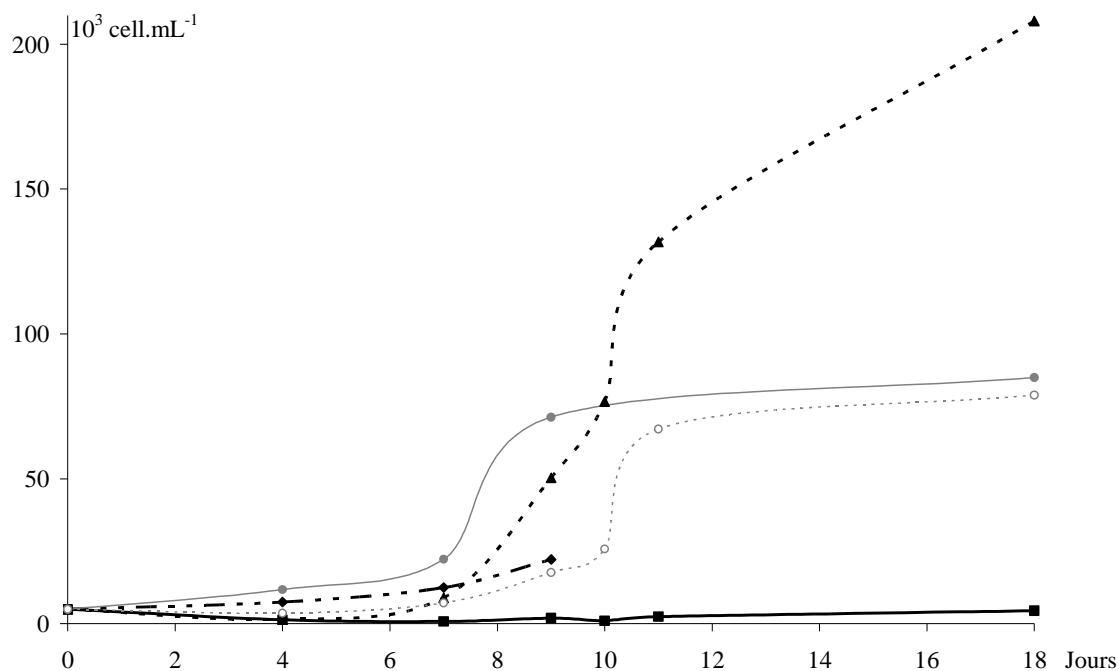


Figure III-11 Etude de la complexation du cuivre sur les particules retenues à environ 0,45 μm . Courbes de croissance de la diatomée *Haslea ostrearia* cultivée dans les différentes conditions de culture.

Légendes :

- Eau souterraine salée (—●—)
- Eau souterraine salée filtrée sur GF-F (---○---)
- Eau souterraine salée filtrée sur GF-F puis enrichie en cuivre 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (—■—)
- Eau souterraine salée enrichie en cuivre 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (---◆---)
- Eau souterraine salée enrichie en cuivre 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ puis filtrée sur GF-F (---▲---)

III-3.2.c Impact du plomb sur les cultures d'*Haslea ostrearia* sur l'eau souterraine salée Taraud, filtrée ou non, avant et après l'ajout

Les courbes de croissance d'*Haslea ostrearia* dans les différentes conditions d'enrichissement en plomb sont présentées sur la Figure III-12.

La culture réalisée sur l'eau souterraine enrichie en plomb mais non filtrée soutient une croissance supérieure au 9^{ème} jour ($p < 0,001$) à celles de la culture témoin sur l'eau filtrée et des deux autres cultures enrichies en plomb (avant ou après filtration). Cette croissance est néanmoins inférieure à celle observée dans la culture témoin non filtrée ($p < 0,001$).

Les cultures enrichies en plomb (filtrées avant ou après l'ajout de métal) soutiennent des densités en cellules semblables au 9^{ème} jour ($p = 0,253$) et inférieures à celles observées dans les deux cultures témoins ($p < 0,001$).

Au 18^{ème} jour, la croissance dans les cultures enrichies en plomb est toujours plus faible que dans les cultures témoins. La culture réalisée sur l'eau enrichie en plomb puis filtrée présente une densité en cellules supérieure à celle observée pour la culture sur l'eau filtrée puis enrichie en plomb, mais cette différence n'est pas vérifiée statistiquement ($p = 0,295$).

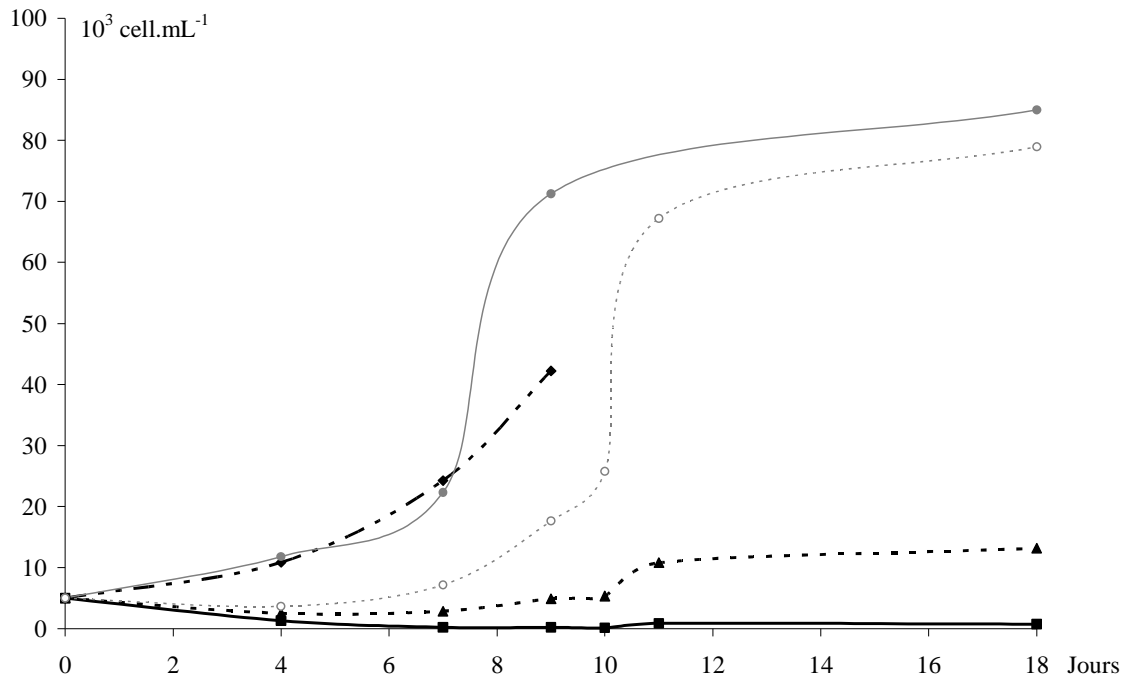


Figure III-12 Etude de la complexation du plomb sur les particules retenues à environ 0,45 µm. Courbes de croissance de la diatomée *Haslea ostrearia* cultivée dans les différentes conditions de culture.

Légendes :

- Eau souterraine salée (—●—)
- Eau souterraine salée filtrée sur GF-F (---○---
- Eau souterraine salée filtrée sur GF-F puis enrichie en plomb 1 µmol.L⁻¹ (—■—)
- Eau souterraine salée enrichie en plomb 1 µmol.L⁻¹ (---◆---
- Eau souterraine salée enrichie en plomb 1 µmol.L⁻¹ puis filtrée sur GF-F (---▲---

III-3.2.d Impact du zinc sur les cultures d'*Haslea ostrearia* sur l'eau souterraine salée Taraud, filtrée ou non, avant et après l'ajout

Les courbes de croissance d'*Haslea ostrearia* dans les différentes conditions d'enrichissement en zinc sont présentées sur la Figure III-13.

Au 9^{ème} jour, la croissance de la culture sur l'eau enrichie en zinc est plus faible que celle des cultures témoins ($p < 0,05$) mais n'est pas différente de celle des deux autres cultures enrichies en zinc filtrées avant ou après l'ajout. Les croissances des deux cultures enrichies et filtrées sont inférieures à celle des témoins ($p < 0,01$), mais semblable en terme de densité en cellules ($p = 0,45$).

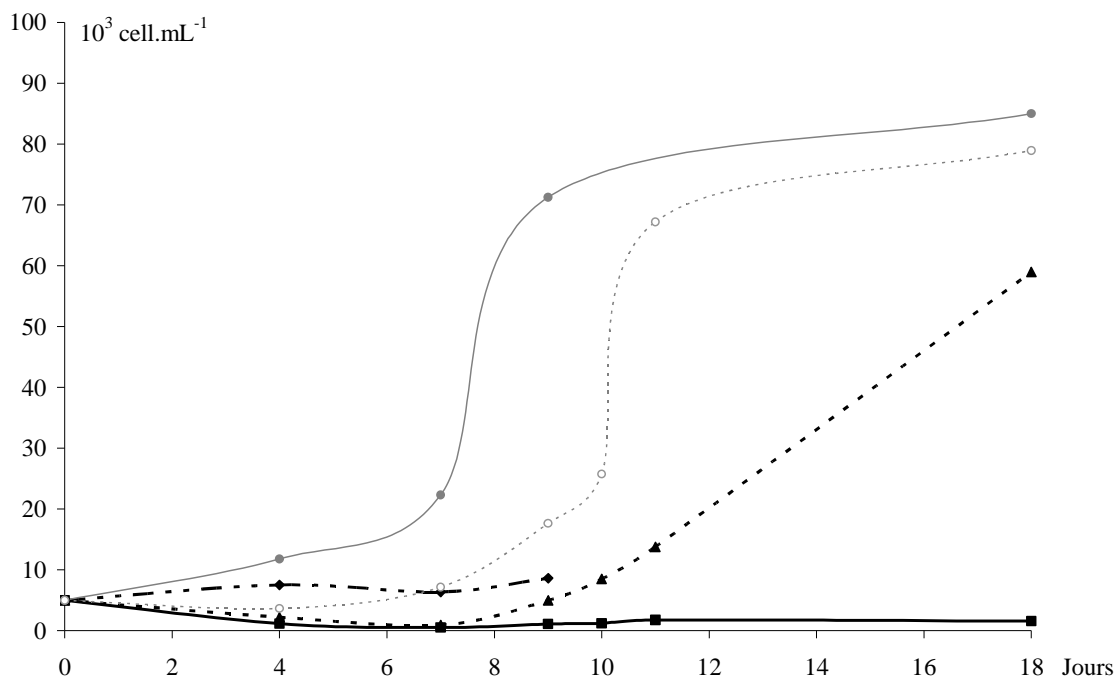


Figure III-13 Etude de la complexation du zinc sur les particules retenues à environ 0,45 µm. Courbes de croissance de la diatomée *Haslea ostrearia* cultivée dans les différentes conditions de culture.

Légendes :
 Eau souterraine salée (—●—)
 Eau souterraine salée filtrée sur GF-F (---○---)
 Eau souterraine salée filtrée sur GF-F puis enrichie en zinc 1 µmol.L⁻¹ (—■—)
 Eau souterraine salée enrichie en zinc 1 µmol.L⁻¹ (---◆---)
 Eau souterraine salée enrichie en zinc 1 µmol.L⁻¹ puis filtrée sur GF-F (---▲---)

Au 18^{ème} jour, la culture réalisée sur l'eau enrichie en zinc puis filtrée s'est développée et la densité en cellules bien qu'apparemment inférieure à celle des deux témoins n'est pas statistiquement différente ($p = 0,06$; $p = 0,18$). La croissance de la culture réalisée sur l'eau filtrée puis enrichie en zinc est par contre très faible et inférieure à celles des témoins et à la croissance de la culture sur l'eau enrichie puis filtrée ($p < 0,001$).

III-3.2.e Comparaison des résultats obtenus pour les quatre métaux

Dans le cas des cultures enrichies puis filtrées, le cuivre a été le seul métal à induire un effet positif sur la croissance des cellules par rapport aux témoins avec des densités en cellules supérieures à celles observées pour toutes les autres conditions. Le plomb est le métal qui a entraîné l'effet le plus négatif sur les cultures réalisées sur les eaux enrichies puis filtrées, vient ensuite le cadmium.

L'eau non filtrée enrichie en plomb permet d'obtenir des cultures dont la croissance est supérieure à celles obtenues avec les eaux non filtrées enrichies en cadmium ou en cuivre. Les

eaux enrichies en plomb et filtrées avant ou après l'ajout présentent des courbes dont le profil est semblable à celui observé dans le cas de l'enrichissement en cadmium, avec néanmoins des densités en cellules inférieures.

C'est dans le cas des cultures filtrées puis enrichies que le plomb a eu l'effet le plus négatif sur la croissance d'*H. ostrearia*, avec des densités en cellules significativement inférieures à celles observées en présence de cadmium ou de cuivre. Le zinc semble aussi avoir eu un effet plus néfaste sur les densités que le cadmium et le cuivre mais cet effet n'est pas statistiquement vérifié.

Les profils de courbes de croissance obtenus pour les cultures enrichies en zinc ressemblent à ceux obtenus dans le cas du cuivre avec néanmoins un effet positif moins marqué du zinc dans le cas des cultures enrichies puis filtrées que celui mis en évidence en présence de cuivre.

III-3.2.f Dosage des métaux totaux dans les eaux, dans les rétentats issus de la filtration et dans les algues en fin de culture en fonction des conditions expérimentales

Les dosages de métaux totaux dans les eaux après la période d'équilibration ont été réalisés par DP-ASV. Les expérimentations ayant eu lieu en début de mise au point de la méthode de DP-ASV pour ce type d'échantillon, les résultats des dosages ont présentés une grande variabilité majoritairement expérimentale. Les concentrations en zinc n'ont pas pu être déterminées. Les rapports (exprimés en %) entre la quantité de métal présent dans les différentes eaux après la période d'équilibration et la quantité de métal initialement présent dans l'eau Taraud ou ajouté sont présentés dans le Tableau III-2.

Le pourcentage du métal retrouvé dans l'eau souterraine salée enrichie est plus faible quand la filtration a lieu après l'enrichissement plutôt qu'avant. Ceci est observé pour le cadmium, le cuivre et le plomb. La perte dans le rétentat à environ 0,45 μm est plus importante dans le cas du plomb (95% retenus) que dans le cas du cuivre (60% retenus) ou du cadmium (30%). Les concentrations mesurées dans les échantillons filtrés puis enrichis en cadmium ou en cuivre ne sont pas identiques à celles attendues. Seulement 90% du cadmium et 86% du cuivre ont été retrouvés dans le filtrat. Ces différences peuvent provenir de la variabilité des mesures, les concentrations métalliques testées étant relativement élevées pour la méthode analytique utilisée.

Tableau III-2 Dosages de métaux totaux dans l'eau souterraine salée enrichie avant ou après la filtration – Pourcentages de métal restant dans l'eau (en blanc) par rapport à la quantité initiale de métal (témoin ou après l'ajout)

	Cd	Cu	Pb
Enrichissement puis filtration de l'eau souterraine salée			
enrichie en Cd 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			
enrichie en Cu 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			
enrichie en Pb 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			
Filtration puis enrichissement de l'eau souterraine salée			
enrichie en Cd 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			
enrichie en Cu 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			
enrichie en Pb 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			

L'enrichissement en cadmium dans l'eau souterraine salée semble diminuer la part de cuivre et de plomb retenue sur le filtre (40% et 8%) par rapport à la part retenue lorsque la filtration est effectuée avant l'ajout de cadmium, soit 74% du cuivre et 63% du plomb retenus.

Le cuivre ajouté avant la filtration est également retenu à 60% avec les précipités, mais l'ajout de cuivre ne modifie pas la rétention du cadmium ou du plomb sur la membrane comme observé dans le cas du cadmium. L'enrichissement en plomb avant filtration n'entraîne une rétention élevée du cuivre sur le filtre que lorsque l'eau souterraine salée est filtrée avant l'ajout. La part du plomb retenue sur la membrane est très élevée (95%).

Les dosages du cuivre et du zinc ont été effectués en S.A.A. sur les rétentats issus de la filtration des eaux dans les différentes conditions après la période d'équilibration. Dans les échantillons enrichis en cuivre puis filtrés, le rétentat à 0,45 μm contenait 61% du cuivre ajouté. Cela concorde avec les résultats obtenus en DP-ASV. Dans les échantillons enrichis en zinc puis filtrés, seulement 16% du zinc a été retenu avec les particules sur le filtre.

Les concentrations en cadmium, en cuivre et en zinc ont été déterminées dans les cellules cultivées sur l'eau souterraine salée Taraud dans les différentes conditions définies auparavant. Les résultats sont présentés dans les graphes Figure III-14.

Les concentrations en cadmium sont plus élevées dans les cellules cultivées sur l'eau enrichie, filtrée ou non, que dans les cellules cultivées sur l'eau brute et filtrée témoins. L'accumulation de cadmium est plus importante lorsque le métal est ajouté à l'eau non filtrée. La filtration de l'eau avant ou après l'ajout du métal n'a pas d'effet sur l'accumulation du cadmium par *H. ostrearia*.

Dans le cas du cuivre, seules les concentrations mesurées dans les cellules cultivées sur l'eau enrichie non filtrée sont significativement plus élevées que celles mesurées dans les cellules issus des quatre autres conditions de culture.

L'accumulation du zinc est plus importante dans les cellules cultivées sur l'eau enrichie non filtrée. Les concentrations en zinc accumulé dans les cellules cultivées sur les eaux enrichies filtrées avant ou après l'ajout du zinc ne présentent pas de différence entre elles ou avec les cultures témoins.

Pour les mêmes raisons analytiques que dans le chapitre II, le plomb n'a pu être dosé dans les échantillons.

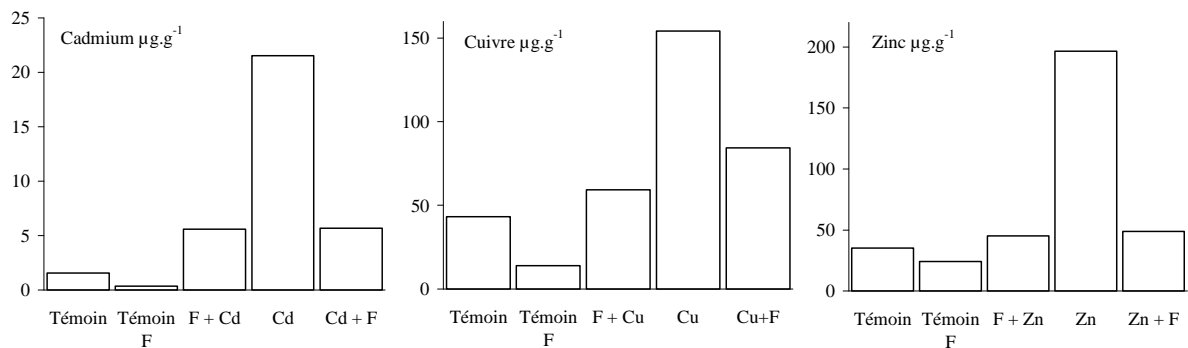


Figure III-14 Accumulation des métaux : cadmium (Cd), cuivre (Cu) ou zinc (Zn) dans les algues cultivées dans les différentes conditions.

- Légendes :
- Eau souterraine salée (Témoin)
 - Eau souterraine salée filtrée sur GF-F (Témoin F)
 - Eau souterraine salée filtrée sur GF-F puis enrichie en métal 1 µmol.L⁻¹ (F + Métal)
 - Eau souterraine salée enrichie en métal 1 µmol.L⁻¹ (Métal)
 - Eau souterraine salée enrichie en métal 1 µmol.L⁻¹ puis filtrée sur GF-F (Métal + F)

III-4 Discussion

III-4.1 Complexation du cadmium

Le cadmium ne semble pas être complexé ni dans l'eau de mer ni dans l'eau souterraine salée. Aucun ligand n'a été mis en évidence lors de la titration. De plus, peu de cadmium est retenu sur le filtre, l'association à la matière particulaire et colloïdale semble réduite. Dans le chapitre II, nous avons vu que les pourcentages de cadmium labile par rapport au cadmium total sont élevés dans l'eau de mer et dans l'eau souterraine salée. La majorité du cadmium dans les 2 types d'eau se trouve donc sous forme labile (métal libre et faiblement liée à des petits groupements inorganiques) (Tableau II-8). Ces observations sont en adéquation avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature sur la présence dans les eaux salées de cadmium majoritairement sous formes de chlorures (Turner *et al.*, 1981; Nürnberg, 1983; Millero et Hawke, 1992). La titration du cadmium dans l'eau souterraine salée filtrée est caractérisée par une pente plus faible que celle observée pour la titration du cadmium dans l'eau souterraine brute. Cette diminution de pente ne peut pas s'expliquer par une perte de cadmium lors de la filtration puisque la filtration est réalisée avant l'ajout des différentes concentrations de cadmium dans les aliquotes. Cette diminution du signal voltampérométrique peut s'expliquer par une modification de la matrice électrolytique de l'échantillon par la filtration ; certaines molécules contenues dans l'eau souterraine et retenues lors de la filtration peuvent être à l'origine d'une amélioration de la diffusion du cadmium vers la goutte ou du passage de courant entre l'électrode et la contre-électrode. Ce phénomène est à prendre en compte dans l'interprétation des titrations des autres métaux en vérifiant les valeurs des pentes des droites de titration.

Dans les expériences type bioessai sur *H. ostrearia*, la toxicité du cadmium est mise en évidence dans les trois conditions de préparation de l'eau souterraine salée avec une réduction de la croissance de la population de 50% à 95% par rapport aux cultures témoins. La filtration de l'eau souterraine après l'ajout de cadmium réduit l'effet toxique du cadmium. Dans ce cas, 70% du cadmium total est présent dans l'eau contre 90% quand la filtration a lieu avant l'ajout. L'accumulation de cadmium par les cellules est pourtant similaire dans ces deux conditions de culture et supérieure à celle observée dans les cellules cultivées dans les conditions témoins. Cette absence de différence dans l'accumulation peut s'expliquer par une concentration en cadmium peu modifiée par la filtration. Par contre, cela n'est pas corrélé aux effets toxiques différents observés sur les courbes de croissance : les cultures réalisées sur

l'eau filtrée puis enrichie sont caractérisées par une biomasse dix fois moins abondantes que celles sur l'eau enrichie puis filtrée. Cela implique que l'ajout de cadmium dans l'eau souterraine salée a modifié les équilibres des éléments, naturellement présents dans l'eau (p. ex. le cuivre et le plomb), avec les complexants de la matière particulaire retenue à 0,45 µm. Il apparaît effectivement que le cuivre et le plomb sont dans ce cas moins retenus sur le filtre que dans le cas où la filtration a lieu avant l'ajout. Dans l'eau souterraine enrichie puis filtrée, une diminution sensible de la concentration totale en cadmium et une rétention inférieure d'oligo-éléments déplacés des oxydes par la présence de cadmium semblent donc induire une meilleure croissance. Une accumulation similaire de cadmium chez *H. ostrearia*, en dépit de la diminution de la concentration en cadmium dans le milieu, peut suggérer un contrôle de la prise de cadmium par la cellule soit passif (saturation des sites d'adsorption à la surface de la cellule), soit actif (par contrôle de l'absorption ou par excrétion).

Les cellules cultivées sur l'eau souterraine salée non filtrée enrichie en cadmium présentent les teneurs en cadmium les plus élevées par rapport aux cellules cultivées sur les eaux témoins ou filtrées et enrichies. La courbe de croissance des cultures réalisées sur l'eau non filtrée et enrichie présente une phase de latence et un début de phase exponentielle semblables à celles observées pour les cultures témoins sur l'eau souterraine salée brute avant que la croissance ne soit inhibée. Parallèlement, les cultures sur l'eau filtrée et enrichie (avant ou après) présentent des courbes de croissance qui ressemblent sur les sept premiers jours à la courbe de croissance des cultures témoins réalisées sur l'eau souterraine filtrée. La phase de latence observée pour les cultures réalisées sur eau filtrée (enrichie ou pas) est plus longue que celle observée pour les cultures sur l'eau brute. Cet allongement de la phase de latence peut être provoquée par des carences en certains éléments nutritifs ; Boye et van den Berg (2000) ont montré que c'était notamment le cas pour les cultures d'*Emiliania huxleyi* quand la ressource en fer était limitée. Moreau (1996) a montré une diminution de 98% de fer quand l'eau souterraine est filtrée cinq heures après le pompage. La perte de fer dans nos conditions est donc conséquente. Hörnström (1990) rapporte que l'allongement de la phase de latence permet une période d'acclimatation aux métaux pour les algues, ce qui réduit leur toxicité apparente sur les cultures. Cette acclimatation pourrait expliquer la résistance des cellules cultivées sur l'eau filtrée puis enrichie exposées à une même concentration en cadmium que celles cultivées sur l'eau non filtrée et enrichie. Par ailleurs, la prise de métal est essentiellement réalisée lors de la phase exponentielle de croissance de la culture (Sunda et Huntsman, 1998). Le taux de croissance plus élevé dans les cultures réalisées sur l'eau non

filtrée et enrichie que dans celles réalisées sur les eaux filtrées et enrichies peut expliquer l'accumulation observée de cadmium trois fois supérieure dans les cultures sur eau non filtrée enrichie que celle observée dans les cultures sur eau filtrée. En outre, la possibilité d'une meilleure accumulation de cadmium sous une forme associée à des molécules uniquement présente dans l'eau non filtrée ne peut être exclue. L'absorption de cadmium associé à des molécules organiques lipophiles a été montrée pour *Thalassiosira weissflogii* par Phinney et Bruland (1994). Cependant, même si Tang et Morel (2006) ont montré dans le cas d'une culture phytoplanctonique réalisée sur une eau riche en oxydes de fer, que la fraction de métaux traces associés à ces oxydes en fin de culture était négligeable par rapport à la fraction associée aux cellules algales, les concentrations en métal utilisées dans nos expériences sont telles que cette fraction semble au contraire importante comme le montrent les résultats obtenus pour les dosages d'accumulation dans les microalgues, ce qui expliquerait une accumulation des métaux multipliée par trois dans nos conditions expérimentales.

En définitive, le cadmium apparaît être majoritairement présent sous forme labile dans l'eau souterraine salée. Cependant, une partie de ce cadmium peut être associée à la matière colloïdale et particulaire étant donné qu'il y a une rétention de cadmium sur la membrane lors de la filtration. L'ajout important de cadmium lors de ces expériences d'enrichissement a provoqué des modifications dans les équilibres entre les formes des autres métaux, notamment le cuivre et le plomb. Haslea ostrearia semble pouvoir s'acclimater à une exposition au cadmium et les dosages de métaux suggèrent une régulation de la prise du cadmium par la diatomée.

III-4.2 Complexation du cuivre

Les profils des titrations de cuivre réalisées sur l'eau de mer et l'eau souterraine salée mettent en évidence une spéciation du cuivre différente entre les deux eaux. Effectivement, les concentrations en ligands déterminées pour l'eau de mer sont plus faibles que celles déterminées dans le cas de l'eau souterraine salée mais les affinités des ligands présents dans l'eau de mer pour le cuivre sont supérieures.

Dans le cas de l'eau de mer, la complexation semble indépendante du degré de turbidité puisque l'eau de mer turbide et l'eau de mer filtrée présentent des concentrations en ligands similaires. Cependant, la pente de la deuxième droite issue de la titration du cuivre dans l'eau de mer turbide est proche de celle de la première droite issue de la titration du cuivre dans

l'eau de mer filtrée. Cela peut impliquer l'existence d'une deuxième classe de ligands dont la concentration est supérieure à $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (limite de la titration). La filtration de l'eau de mer ferait disparaître la première classe de ligands présente dans l'eau de mer turbide dont l'affinité pour le cuivre est très importante (K tend vers l'infini). L'observation des points obtenus pour l'eau de mer peu turbide, même si aucune information sur les ligands n'a pu être déduite de la titration, montre que cette première classe de ligands n'est pas présente dans l'eau de mer peu turbide. On peut en conclure que cette classe de ligands est majoritairement composée de matière particulaire. La matière particulaire et les sédiments adsorbent fortement les ions métalliques pour former des complexes stables (Florence, 1982). Par contre, les points semblent suivre la deuxième droite de la titration effectuée sur l'eau de mer turbide. Cette deuxième classe de ligands est encore présente après la filtration puisqu'elle se retrouve dans l'eau de mer filtrée. Cette classe de ligands du cuivre est donc majoritairement composée de molécules inférieures à $0,45 \mu\text{m}$, considérées alors sous forme dissoute selon la définition de Florence (1982). Dans les composés de taille inférieure à $0,45 \mu\text{m}$, Lead et Wilkinson (2006) placent des composés inorganiques dont une partie des oxydes métalliques, des carbonates et des silicates et des composés organiques dont les acides humiques et fulviques présents dans l'eau de mer côtière (Kozelka et Bruland, 1998). Ces composés ont été montrés comme capables de complexer le cuivre (Buffle *et al.*, 1977 ; Hart, 1981 ; Turner *et al.*, 1981 ; Florence, 1982 ; Cao *et al.*, 1995). L'affinité des acides humiques a été décrite par Cao *et al.* (1995) comme forte pour le cuivre, moins forte pour le plomb et dix fois moins grande pour le cadmium que pour le cuivre.

Dans le cas de l'eau souterraine salée, est observé pour les titrations du cuivre dans les eaux brute et filtrée, le même phénomène de diminution du signal voltampérométrique que celui observé dans le cas des titrations du cadmium dans ces mêmes eaux. L'eau souterraine salée brute semble contenir une seule classe de ligands étant donné que la pente de la deuxième droite de la titration est plus élevée que celle de la droite de titration du cuivre dans l'eau filtrée. La filtration élimine cette classe de ligands qui peut donc être caractérisée par une taille supérieure à $0,45 \mu\text{m}$ correspondant aux précipités d'oxydes de fer retenus sur la membrane. Cette observation se corrèle avec les dosages de cuivre effectués sur les membranes qui montrent que la filtration retient les trois quarts du cuivre présent dans l'eau. Néanmoins, dans cette étude, nous ne pouvons pas exclure une classe de ligands dissous capables de fixer le cuivre, autres que les carbonates et les silicates (complexes dissociables) puisque les concentrations en métal labile de la titration n'ont pas pu être déterminées.

La culture d'*H. ostrearia* sur l'eau souterraine salée enrichie en cuivre puis filtrée est la seule à présenter une meilleure croissance que les cultures témoin. L'apport de cuivre peut avoir un effet positif sur la croissance d'*H. ostrearia*. La prise de cuivre par les cellules dans cette culture n'est pas aussi importante que dans les cellules issues des cultures sur l'eau souterraine enrichie en cuivre non filtrée, comme pour le cadmium. L'enrichissement en cuivre ne modifie pas les proportions de cadmium et de plomb retenues sur les membranes. Cao *et al.* (1995) ont montré qu'il n'y avait pas d'effet de la présence de cuivre sur la complexation du plomb. Cependant, il aurait été intéressant de connaître l'impact de la présence de cuivre en une telle quantité sur les autres éléments tels que le manganèse, le fer et le zinc qui sont nécessaires à la croissance des algues et qui sont complexés (dans le cas du manganèse et du fer) aux oxydes de fer et donc retenus à 0,45 μ m. Une légère désorption de fer ou de manganèse liés à ces groupements par échange avec le cuivre pourrait expliquer la meilleure croissance. Les affinités du cuivre pour ces groupements sont bien inférieures à celles du fer et du manganèse mais la compétition entre les ions dépend également des concentrations. Dans notre cas, le cuivre est jusqu'à 10 fois plus concentré que le fer et le manganèse ce qui pourrait expliquer un échange au niveau des groupements oxydes/phosphates.

En bref, le cuivre apparaît dans l'eau de mer comme dans l'eau souterraine salée majoritairement complexé. Cependant, les classes de ligands sont de nature et d'affinité différentes dans les deux types d'eau ce qui est susceptible de modifier les équilibres d'échange avec les cellules algales. La compilation des titrations réalisées sur l'eau de mer dans différentes conditions de turbidité permet de mettre en évidence l'existence d'une classe de ligands supplémentaire qui ne se voit pas sur la titration du cuivre dans l'eau de mer turbide, en raison de la gamme de titration choisie. Le cuivre a été le seul métal testé à induire un effet positif sur la croissance algale. L'accumulation de cuivre dans les algues cultivées sur les eaux enrichies et filtrées n'est pas supérieure à celle observée dans les algues cultivées sur les eaux témoins ce qui conforte l'idée d'une régulation de la prise de cuivre dans ces cellules.

III-4.3 Complexation du plomb

Le plomb apparaît fortement complexé dans l'eau de mer turbide, la constante d'affinité pour cette première classe de ligands est relativement élevée, mais inférieure à celle calculée pour le cuivre. Dans l'eau de mer, le plomb semble subir le même type de complexation que le cuivre avec néanmoins la présence d'une classe de ligands supplémentaire. Comme pour le

cuivre, la comparaison des titrations du plomb dans l'eau de mer turbide, peu turbide et filtrée permet de mettre en évidence plus de classes de ligands dans l'eau turbide que la titration seule. La première classe de ligands de forte affinité trouvée dans l'eau de mer turbide est donc caractérisée par de la matière particulaire, la seconde classe d'une affinité également élevée pour le plomb, est composée de molécules supérieures à 0,45 μm et la dernière classe détectée dans le cas de l'eau de mer filtrée correspondrait à un ensemble de composés sous forme dissoute.

Dans l'eau souterraine brute, une classe de ligands de forte affinité est mise en évidence. La filtration fait disparaître cette classe de ligands et met en évidence une deuxième classe avec une affinité plus faible que la première mais néanmoins relativement élevée. Les affinités des ligands dans l'eau souterraine pour le plomb sont plus fortes que celles des ligands présents dans l'eau de mer. Par contre la concentration en ligands est plus faible. La première classe de ligands présents dans l'eau brute doit se rapporter aux précipités d'oxydes de fer étant donné la fraction de plomb retenue (entre 60 et 70%) sur le filtre dans les expériences de bioessais. La deuxième classe de ligands étant présente dans l'eau souterraine filtrée, ces ligands sont donc sous forme dissoute.

L'enrichissement de l'eau souterraine salée en plomb entraîne une rétention plus importante du cuivre lors de la filtration. La fraction de plomb retenue est également très élevée étant donné qu'il ne reste que 5% du plomb ajouté. Ce phénomène est très différent de celui observé pour les autres métaux. Il se peut qu'une co-précipitation du cuivre et du plomb ait lieu. En effet, nous avons remarqué sur les voltampérogrammes des eaux souterraines salées un pic qui apparaît entre le pic de plomb et celui du cuivre lors des enrichissements des eaux en plomb. Sa forme est caractéristique et reproduite sur les différents voltampérogrammes au même potentiel (-0,4 V). Ce pic ne correspond pas aux pics décrits pour des formes organiques du cuivre qui réagissent avec la goutte de mercure dont le pic a une forme le plus souvent large et aplati (patatoïde) et est placé en début du pic de Cu^{2+} (Devez, 2004). Nous n'avons pas pu définir l'origine de ce pic et lors des ajouts de cuivre ou de plomb, il disparaît en faveur de l'apparition des pics de cuivre et de plomb ioniques libres classiques.

Vis-à-vis de la toxicité du plomb pour *H. ostrearia*, les cultures réalisées sur l'eau brute non filtrée enrichie en plomb ne montrent pas d'altération de la croissance sur les neuf premiers jours. Par contre, les cultures réalisées sur les eaux filtrées et enrichies (avant ou après) ont présenté les plus faibles taux de croissance par rapport aux autres métaux testés.

Dans le cas des cultures sur l'eau souterraine filtrée puis enrichie en plomb, la concentration en plomb est telle qu'une forte partie de ce plomb se trouve sous forme labile si on se réfère aux courbes de titration. Dans le cas où l'eau est filtrée après l'enrichissement, la concentration en plomb est fortement diminuée (0,05 au lieu de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Une majeure partie de ce plomb est alors complexée par la deuxième classe de ligands présente dans l'eau souterraine salée (fraction dissoute puisque présente dans l'eau filtrée) mais une fraction labile subsiste. Cette toxicité suggère que le plomb est facilement échangeable entre ces formes complexées et les sites d'adsorption à la surface de la cellule.

Le plomb semble être fortement complexé dans les deux types d'eau. Tout comme le cuivre, les classes de ligands ne sont pas semblables entre l'eau de mer et l'eau souterraine. Cette différence est due à la présence de matière particulaire et de matière organique dans l'eau de mer alors que dans l'eau souterraine, la matière inorganique colloïdale (oxydes de fer) possède un rôle très important dans la complexation du plomb.

Le plomb est le métal testé qui a eu le plus d'effet négatif en absence de ses ligands (dans les eaux filtrées) alors que dans l'eau brute, la courbe de croissance suit les courbes témoins.

III-4.4 Complexation du zinc

La complexation du zinc dans l'eau de mer est essentiellement due à des molécules de taille supérieure à 0,45 μm . La filtration de l'eau de mer entraîne la perte des ligands comme il a été mis en évidence par la titration. Le degré de turbidité est important dans la complexation du zinc. Les grosses particules présentes dans l'eau de mer turbide semblent pouvoir adsorber le zinc à leur surface avec une affinité relativement faible, les particules de plus petit diamètre (dont la vitesse de sédimentation est plus faible et qui se retrouvent donc dans l'eau peu turbide) présentent des affinités supérieures pour le zinc. Dans la fraction dissoute, les associations de zinc avec les molécules sont très labiles puisque la majeure partie du zinc mesuré se trouve sous forme labile.

L'eau souterraine salée présente une seule classe de ligands caractérisée par une concentration plus faible que celle observée pour les classes de ligands dans l'eau de mer et par une faible affinité. Ces résultats sont confortés par les résultats des expérimentations type bioessais. En effet, les cultures sur l'eau souterraine non filtrée et enrichie en zinc se sont

développées avec un taux de croissance inférieure à ceux des deux cultures témoins, contrairement à l'autre métal essentiel, le cuivre. Le zinc est décrit dans la littérature comme présentant des associations variables en fonction des ligands présents. Turner *et al.* (1981) précisent que dans un milieu d'eau de mer sans ligand organique et à pH = 8,2, le zinc est pour 46% sous forme ionique libre et pour 35 % associé aux chlorures ce qui explique la labilité du zinc mise en évidence lors de ces expériences. Néanmoins, la filtration de l'eau souterraine salée après l'enrichissement en zinc limite les effets négatifs observés sur la croissance et permet un bon développement de la culture même si la durée de la phase de latence augmente. L'accumulation du zinc est semblable dans les cellules issues de ces cultures à celle observée dans les cellules cultivées sur l'eau filtrée puis enrichie. Apparemment, la toxicité observée n'est pas due à la seule présence de zinc.

En résumé, le zinc semble peu complexé dans l'eau souterraine salée en comparaison à la complexation observée dans l'eau de mer. La toxicité du zinc à une telle concentration est démontrée pour H. ostrearia quand elle est cultivée sur l'eau souterraine. Cependant, il y a peut-être un effet synergique avec d'autres éléments toxiques pour la cellule ou une carence quand cette eau est filtrée.

III-5 Conclusion

Dans ce travail, des différences de spéciation ont pu être mises en évidence que ce soit entre les eaux étudiées (eau souterraine salée ou eau de mer) ou entre les métaux (Cd, Cu, Pb, Zn). L'impact de la forme du métal sur la toxicité de celui-ci vis-à-vis d'*Haslea ostrearia* a également été mis en avant.

Critiques de la méthode employée et perspectives d'amélioration

Les métaux dosés dans ces expériences sur les rétentats de culture ne sont pas uniquement ceux adsorbés/absorbés par les algues mais ils peuvent apparemment provenir des métaux associés aux précipités d'oxydes de fer retenus sur le filtre. Cela n'a pas pu être montré et l'augmentation de l'accumulation de métal peut être due à d'autres phénomènes (meilleure croissance, biodisponibilité différente des métaux en présence de ces précipités). Une rétention des algues sur des membranes avec de plus grands pores peut être envisagée pour tenter de séparer les précipités de organismes, mais cela nécessite une meilleure connaissance de la structure de ces précipités.

Plusieurs problèmes posés par les types d'échantillons utilisés dans cette étude ont été mis en avant :

- Les concentrations élevées en métaux dans ces eaux et en ligands nécessitent pour réaliser les titrations d'utiliser des concentrations trop élevées en métal pour l'analyse en DP-ASV (problèmes de saturation). Une solution tampon électrolyte pourrait être utilisée pour réaliser des dilutions et permettre d'obtenir une meilleure précision.
- A ces concentrations élevées, s'ajoutent dans certains cas, des équilibres très rapides avec certains complexants qui empêchent la réalisation de gamme en ajouts dosés fiables. Il serait intéressant de travailler avec des temps de déposition décroissants en fonction de l'augmentation des concentrations appliquées lors de la titration pour limiter ces effets.

Ces deux adaptations permettraient de prolonger les titrations vers des concentrations en métal total supérieures pour vérifier nos hypothèses sur le nombre de ligands dans les eaux brutes et de travailler non plus avec les valeurs d'intensité de pics mais avec les concentrations en métal labile. Ce dernier point nous affranchirait des variations entre les matrices des différents échantillons et nous permettraient de comparer réellement les

différentes conditions entre elles. L'utilisation de linéarisations augmenterait la fiabilité des résultats et permettrait de détecter des classes de ligands de forte affinité mais de faibles concentrations souvent difficiles à mettre en évidence (Rue et Bruland, 1995 ; Wells *et al.*, 1998).

En outre, la méthode utilisée n'est pas préconisée en présence de particules aussi importantes que dans le cas de l'eau de mer turbide à cause de l'hétérogénéité des échantillons.

Pour améliorer la définition des classes de ligands, des protocoles différents peuvent être envisagés :

- La méthode de Batley et Florence (1976) modifiée par Skogerboe *et al.* (1980) permet de différencier les ligands inorganiques et les ligands organiques ainsi que les métaux qui sont adsorbés de ceux qui sont « incrustés » au niveau de ces ligands, en utilisant une colonne échangeuse d'ions (Chelex-100), le traitement aux ultra-violets et l'acidification.
- Les filtrations et ultrafiltrations permettent de séparer les ligands en fonction de leur taille.
- La chromatographie permet de séparer les ligands en fonction de la taille, de certains groupements fonctionnels ou des charges (Van Loon, 1979; Tessier et Turner, 1995; Ali et Aboul-Enein, 2002). Elle est souvent utilisée en complément de la filtration et de l'ultrafiltration (Florence, 1982; Achterberg et Braungardt, 1999).

Ces différentes pistes sont dans les perspectives de poursuite de ce travail pour obtenir plus d'informations sur la spéciation métallique dans les eaux souterraines salées.

Chapitre IV Cultures en conditions contrôlées sur milieu artificiel

IV-1 Introduction

Dans le cadre d'expériences sur la physiologie des microalgues, le milieu de culture utilisé est un facteur de variation des résultats. La composition de l'eau de mer prélevée en milieu côtier varie en fonction du lieu et de la date du prélèvement, et peut donc influencer différemment sur les cultures et sur le paramètre étudié. Dans la littérature, sont décrits des milieux artificiels qui permettent de cultiver différentes microalgues dans des conditions expérimentales contrôlées et reproductibles (Provasoli *et al.*, 1957; Neuville et Daste, 1971 ; Harrison *et al.*, 1980; Price *et al.*, 1988; Berges *et al.*, 2001; Wolfstein *et al.*, 2002). Les milieux artificiels ont été utilisés dans plusieurs études concernant la physiologie des microalgues (Berland *et al.*, 1973; Carvalho et Malcata, 2000; Lane et Morel, 2000; Reinfelder *et al.*, 2000) et plus précisément concernant le métabolisme et l'impact des métaux dans les cellules algales (Jensen *et al.*, 1982; Stauber et Florence, 1989; Price et Morel, 1990; Ahner *et al.*, 1994; Yee et Morel, 1996; Knauer *et al.*, 1997; Ahner *et al.*, 1998; Muysen et Janssen, 2001; Yan et Pan, 2002). Dans des travaux précédents (Moreau, 1996), la biomasse obtenue lors de la culture de la diatomée *Haslea ostrearia* sur le milieu artificiel Aquil (Morel *et al.*, 1979, Price *et al.*, 1988) était inférieure à celle obtenue sur le milieu d'eau de mer enrichie très diluée f/50 (Guillard, 1982) utilisé dans la même expérience. L'utilisation du milieu artificiel ESAW (Harrison *et al.*, 1980; Berges *et al.*, 2001) a montré sur le long terme des déformations des cellules d'*H. ostrearia* (Mouget, comm. pers.). Pour effectuer des expérimentations en milieu contrôlé sur cette diatomée, le milieu artificiel DAM (Diatom Artificial Medium) a été conçu dans l'optique d'obtenir une biomasse maximale et une qualité des cellules algales constante de façon reproductible sur plusieurs repiquages tout en permettant le contrôle des différents éléments le composant. Dans la première partie de ce chapitre, sont exposés la mise au point du milieu artificiel DAM, le comportement des métaux dans ce milieu et les suivis de culture d'*H. ostrearia* et d'autres microalgues cultivées sur DAM.

L'utilisation d'un milieu artificiel permet de réaliser des expériences en conditions contrôlées : non seulement les variables physiques (température, éclairage...) mais aussi les variables chimiques (salinité, pH, apport de nutriments majeurs et de métaux traces...) sont connues et modifiables.

Une seconde partie traite des expériences en conditions contrôlées réalisées sur le milieu artificiel DAM avec *Haslea ostrearia*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*.

Dans un premier temps, des expériences ont été réalisées dans l'objectif de déterminer l'impact des métaux et leur accumulation dans ces quatre algues cultivées dans les mêmes conditions.

Dans un second temps, un suivi des cinétiques d'accumulation du cadmium et du zinc a été réalisé à l'aide de radioéléments et sur milieu artificiel à l'aide de méthodes voltampérométriques.

Pour finir, des expériences sur le milieu DAM ont été réalisées sur *H. ostrearia* afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses expliquant la faible accumulation de métal observée dans les cultures sur les eaux souterraines salées : l'implication de polysaccharides, de la marennine et d'exsudats produits par l'algue dans la complexation des métaux.

IV-2 Mise au point du milieu artificiel

Les différents milieux artificiels décrits dans la littérature ont été comparés (Tableau IV-1, page 162) et les besoins spécifiques de la diatomée *Haslea ostrearia* notamment en fer, en silice et en métaux traces (Neuville et Daste, 1971; Robert, 1992; Koussih, 1995; Moreau, 1996) ont été intégrés pour la réalisation du milieu artificiel DAM.

IV-2.1 Mise au point : méthode et composition du milieu artificiel DAM

Un premier milieu artificiel nommé milieu C a été réalisé à partir d'eau ultra pure, de sels et de solutions stocks d'éléments nutritifs et d'oligo-éléments (Coffin, 2000). Les expériences menées pour l'optimisation du milieu en testant plusieurs modifications des concentrations de différents éléments ont été réalisées sur des lots de trois à cinq flacons erlenmeyers de 250 mL contenant 150 mL *versus* un lot contrôle composé du milieu initial C, sur deux cycles de croissance. Ces tests ont été réalisés sur *Skeletonema costatum* dans un premier temps, car une population de cette diatomée présente un cycle de croissance court (6 à 8 jours) et apparaît plus résistante à des conditions stressantes de culture. Les modifications qui apportaient des améliorations au milieu ont ensuite été testées sur *H. ostrearia*. Ce cycle d'expérimentations sur le milieu initial C a permis de l'optimiser et d'obtenir le milieu artificiel DAM. L'élaboration des solutions stocks, la préparation et la composition finale du milieu artificiel DAM sont présentées dans le Tableau IV-2 (page 163).

Le milieu est conçu en ajoutant à de l'eau ultra-pure des sels, des nutriments et des oligo-éléments. Les différentes solutions stocks (ions, nutriments majeurs et métaux) sont à conserver à l'obscurité et à 4°C. Le milieu peut être stérilisé par autoclavage. Dans certains cas, la formation de « paillettes », induites par notamment la concentration élevée en silicium, est observée, mais cela ne semble pas réduire sa biodisponibilité. La solution de vitamines doit être filtrée sur 0,2 µm et congelée à -20°C. Elle est ajoutée au milieu stérilisé par autoclavage dans des conditions stériles (sous hotte à flux laminaire). Pour les expérimentations destinées à l'étude de métaux à l'état de traces, les métaux présents dans les solutions et l'eau ultra-pure doivent être éliminés par un passage sur une colonne chélatrice de cations (type Chelex-100) (Price *et al.*, 1988).

Tableau IV-1 Tableau comparatif de milieux artificiels décrits dans la littérature

Concentration (mol.L ⁻¹)	Milieux artificiels										Milieux d'eau de mer enrichie		
	Aquil (Morel <i>et al.</i> , 1979; Price <i>et al.</i> , 1988)	ESAW (Berges <i>et al.</i> , 2001)	Conway (Wane, 1979)	K (Keller <i>et al.</i> , 1987)	(Mougat, comm. pers.)	(Neuville & Daste, 1971)	ASP-6 (Provasoli <i>et al.</i> , 1957)	Détreé du milieu F/2 (Wolfslein <i>et al.</i> , 2002)	ES (Provasoli, 1968)	ES1/3 (Provasoli, 1968, Robert, 1983)	F/2 (Guillard, 1982)		
CaCl ₂ -2H ₂ O	1,05E-02	9,14E-03	1,09E-02	2,70E-03	9,04E-03	1,22E-02	3,75E+03	1,09E-02					
Citrate (C ₆ H ₈ O ₇ -H ²⁺ O)	2,50E-09		4,20E-08					1,43E-05					
CoCl ₂ -6H ₂ O		5,69E-09		5,00E-08	6,64E-08	4,98E-08	1,70E-07	3,56E-08	8,54E-08	2,99E-08	4,20E-08		
CoSO ₄ -7 H ₂ O		7,35E-08	3,92E-08	1,00E-08		1,00E-07	7,87E-06	3,93E-08					
CuSO ₄ -5H ₂ O	9,97E-10	6,56E-06	9,88E-03	1,17E-05	6,48E-06	9,99E-06	3,58E-05		9,06E-07	3,17E-07	1,17E-05		
FeCl ₃ -6H ₂ O	4,51E-07								8,95E-06	3,13E-06			
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ -6H ₂ O													
Fe-NH ₄ -Citrate								1,27E-06					
H ₃ B ₃ O ₃	4,85E-04	3,72E-04	1,38E-04	9,70E-06	3,68E-04	3,40E-04	1,85E-04	1,78E-04	9,22E-05	3,23E-05			
KBr	8,40E-04	7,25E-04	3,28E-04	1,00E-05	7,17E-04	6,72E-04		3,28E-04					
KCl	9,39E-03	8,04E-03	7,24E-03	8,00E-03	7,94E-03	7,38E-03	9,39E-03	7,24E-03					
MgCl ₂ -6H ₂ O	5,46E-02	4,12E-02	4,28E-02	7,40E-02	4,67E-02	4,28E-02	6,64E-02	4,28E-02					
MnCl ₂ -4H ₂ O	2,30E-08		9,10E-08	9,00E-07			1,82E-05	9,10E-08			9,10E-07		
MnSO ₄ -4H ₂ O		2,42E-06				4,37E-06			3,26E-06	1,14E-06			
MnSO ₄ -H ₂ O					2,40E-06				3,67E-06	1,28E-06			
Na ₂ -EDTA-2H ₂ O	5,00E-06	6,56E-06	1,17E-02	1,17E-05	8,21E-06	2,18E-05	8,06E-05		2,23E-05	7,98E-06	1,17E-05		
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	1,00E-07	6,10E-09	2,60E-08	3,00E-08	6,05E-08	9,92E-07	5,21E-06	2,60E-08			2,60E-08		
Na ₂ SeO ₃ -5H ₂ O	1,00E-08	1,00E-09	6,08E-12	1,00E-08	5,60E-08			6,08E-12					
Na ₂ SiO ₃ -5H ₂ O									5,00E-05	5,00E-05			
Na ₂ SiO ₃ -9H ₂ O	1,00E-04	1,05E-04	1,06E-04	5,40E-05	1,26E-04	3,10E-04	3,52E-03	1,50E-04	5,00E-05	5,00E-05	1,06E-04		
Na ₂ SO ₄	2,88E-02	2,50E-02	2,25E-02		2,47E-02	2,28E-02		2,25E-01					
NaCl	4,20E-01	3,63E-01	4,12E-01	4,10E-01	3,58E-01	3,42E-01	4,11E-01	4,12E-01					
NaF	7,14E-05	6,57E-05		1,00E-05	6,59E-05	5,72E-05							
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	1,00E-05	2,10E-05	4,35E-05	1,00E-05	2,21E-05	5,00E-05	4,78E-04	5,00E-05			3,62E-05		
NaHCO ₃	2,38E-03	2,07E-03	2,14E-03	2,50E-03	2,05E-03	1,90E-03		2,14E-03	9,52E-04	9,52E-04			
NaN ₂ O ₃	3,00E-04	5,49E-04	8,82E-04	8,83E-04	5,43E-04	1,88E-05	3,53E-03		8,24E-04	2,88E-04	8,82E-04		
NH ₄ Cl				5,00E-05		2,99E-05		5,01E-04			4,95E-04		
NiCl ₂ -6H ₂ O		6,30E-09			6,50E-09								
SrCl ₂	6,38E-05	8,20E-05	3,75E-05	1,00E-04	8,09E-05			3,75E-05					
ZnSO ₄ -7H ₂ O	4,00E-09	2,54E-07	7,65E-08	8,00E-08	2,51E-07	1,88E-06	7,65E-06	7,65E-08	3,83E-07	1,34E-07	7,65E-08		
Thiamine HCl	2,96E-07	2,97E-07	7,41E-10	3,00E-07	2,93E-07	1,48E-06	5,93E-08	1,19E-10	2,96E-07	2,96E-06	2,96E-07		
Biotine	2,05E-09	4,09E-09	2,10E-09	2,10E-09	8,09E-09	4,09E-09	2,05E-10	8,19E-08	4,09E-09	8,19E-08	2,05E-09		
Cyanocobalamine B12	3,70E-10	1,47E-09	4,06E-10	3,70E-10	7,20E-10	1,48E-09		5,90E-10	1,48E-09	2,95E-09	3,69E-10		
Acide Nicotinique													
Thi				1,00E-03		8,25E-03		3,25E-08					
Na ₂ glycérophosphate-6H ₂ O									8,25E-04	2,89E-04			
									4,63E-05	1,62E-05			

Tableau IV-2 Préparation des solutions stocks et du milieu artificiel DAM, concentration finale des différents éléments ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)

Composition des solutions stocks		Concentration finale (mol.L^{-1})	
<u>Solution I: Solution des ions</u>			
H ₃ BO ₃	1,50 g.L ⁻¹	3,64×10 ⁻⁴	
KBr	5,00 g.L ⁻¹	6,30×10 ⁻⁴	
KCl	35,00 g.L ⁻¹	7,04×10 ⁻³	
NaF	0,15 g.L ⁻¹	5,36×10 ⁻⁵	
NaHCO ₃	10,00 g.L ⁻¹	1,79×10 ⁻³	
SrCl ₂ -6H ₂ O	0,85 g.L ⁻¹	4,61×10 ⁻⁵	
Eau ultra-pure	Q.S.P. 1 litre		
<u>Solution II :Nutriments majeurs</u> (Les 3 solutions sont préparées et conservées de façon séparée)			
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	1,38 g.L ⁻¹	2,00×10 ⁻⁵	
NaNO ₃	25,50 g.L ⁻¹	3,00×10 ⁻⁴	
Na ₂ SiO ₃ -9H ₂ O	28,40 g.L ⁻¹	2,00×10 ⁻⁴	
<u>Solution III : Eléments traces</u>			
CoCl ₂ -6H ₂ O	1mL d'une solution à	10 g.L ⁻¹	8,41×10 ⁻⁸
CuSO ₄ -5H ₂ O	1mL d'une solution à	9,80 g.L ⁻¹	7,85×10 ⁻⁸
MnCl ₂ -4H ₂ O	1mL d'une solution à	180,00 g.L ⁻¹	1,82×10 ⁻⁶
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	1mL d'une solution à	6,30 g.L ⁻¹	5,21×10 ⁻⁸
Na ₂ SeO ₃ -5H ₂ O	1mL d'une solution à	0,85 g.L ⁻¹	6,46×10 ⁻⁹
NiCl ₂ -6H ₂ O	1mL d'une solution à	0,74 g.L ⁻¹	6,30×10 ⁻⁹
ZnSO ₄ -7H ₂ O	1mL d'une solution à	22,00 g.L ⁻¹	1,53×10 ⁻⁷
FeCl ₃ -6H ₂ O	3,15 g.L ⁻¹		2,33×10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	4,36 g.L ⁻¹		2,34×10 ⁻⁵
Solution ultra-pure HNO ₃ 0,01 mol.L ⁻¹	Q.S.P. 1 litre		
<u>Solution IV: Solution de vitamines</u> (après stérilisation par filtration sur 0,2 μm)			
Biotine	10mL d'une solution à	0,10 g.L ⁻¹	4,09×10 ⁻⁹
Cyanocobalamine	1mL d'une solution à	1,00 g.L ⁻¹	7,38×10 ⁻¹⁰
Thiamine-HCl	0,20 g		5,93×10 ⁻⁷
Eau ultra-pure	Q.S.P. 1 litre		
Composition du milieu artificiel			
NaCl	20,570 g		3,52×10 ⁻¹
Na ₂ SO ₄	3,067 g		2,16×10 ⁻²
CaCl ₂ -2H ₂ O	1,150 g		7,82×10 ⁻³
MgCl ₂ -6H ₂ O	11,100 g		5,46×10 ⁻²
Solution I	15 mL		
Solution II			
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	2 mL		
NaNO ₃	1 mL		
Na ₂ SiO ₃ -9H ₂ O	2 mL		
Solution III	2 mL		
Solution IV	1 mL		
Eau ultra-pure	Q.S.P. 1 litre		

Pour valider le milieu artificiel DAM pour la culture d'*Haslea ostrearia*, une expérience a été réalisée sur un lot de cinq flacons erlenmeyers contenant 150 mL de milieu et un lot témoin de cinq flacons contenant 150 mL de milieu d'eau de mer enrichie ES (Provasoli, 1968) modifié par Robert (1983) pour la culture de cette diatomée (milieu d'eau de mer enrichie ES1/3). Cette expérience a été menée sur cinq cycles de croissance de la diatomée, les repiquages ont été effectués en début de phase stationnaire à raison de 5000 cellules.mL⁻¹. La manipulation des flacons pour le repiquage ou le suivi de la croissance était effectuée sous la hotte à flux laminaire pour préserver l'axénie des cultures. Le suivi des cultures a été réalisé comme décrit dans la partie II-2.4.a et II-2.5. Les concentrations en marennine interne et en marennine externe ont été estimées en suivant la méthode spectrophotométrique de Robert *et al.* (2002). Un tampon phosphate a été utilisé pour optimiser l'extraction de la marennine interne (Pouvreau, comm. pers.).

Pour élargir l'utilisation du milieu artificiel DAM, 19 autres algues ont été cultivées. Pour douze espèces, les cultures ont été réalisées dans des tubes contenant 25 mL de milieu, dans les mêmes conditions expérimentales, sur dix repiquages successifs. La durée du cycle de certaines microalgues pouvant atteindre 3 semaines, la fréquence des repiquages (1 mL de la culture souche dans 25 mL de milieu stérile) a été fixée à toutes les 3 semaines avec observation au microscope photonique. Pour certaines souches (*Haslea crucigera*, *Odontella aurita*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Rhizosolenia setigera*, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica* et *Thalassionema sp.*), la culture en tubes n'était pas adéquate, elles ont été cultivées en flacons erlenmeyers 250 mL contenant 150 mL de milieu. Pour ces algues, six repiquages ont été réalisés.

IV-2.2 Résultats

IV-2.2.a Résultats des cultures d'algues réalisées sur le milieu artificiel DAM

Culture de la diatomée Haslea ostrearia sur le milieu artificiel DAM comparée à celle obtenue sur le milieu d'eau de mer enrichie ES1/3

Les courbes de croissance obtenues pour les cultures d'*Haslea ostrearia* sur DAM et eau de mer enrichies sont présentées Figure IV-1. Les densités en cellules maximales obtenues dans les cultures sur DAM sont constantes sur les six repiquages. Les densités maximales obtenues pour les cultures sur eau de mer enrichie ES1/3 sont variables d'un repiquage à l'autre jusqu'à un facteur 8 entre les valeurs. Les densités maximales obtenues pour les cultures réalisées sur DAM sont, pour tous les repiquages, supérieures à celles observées dans les cultures sur eau de mer enrichie ES1/3.

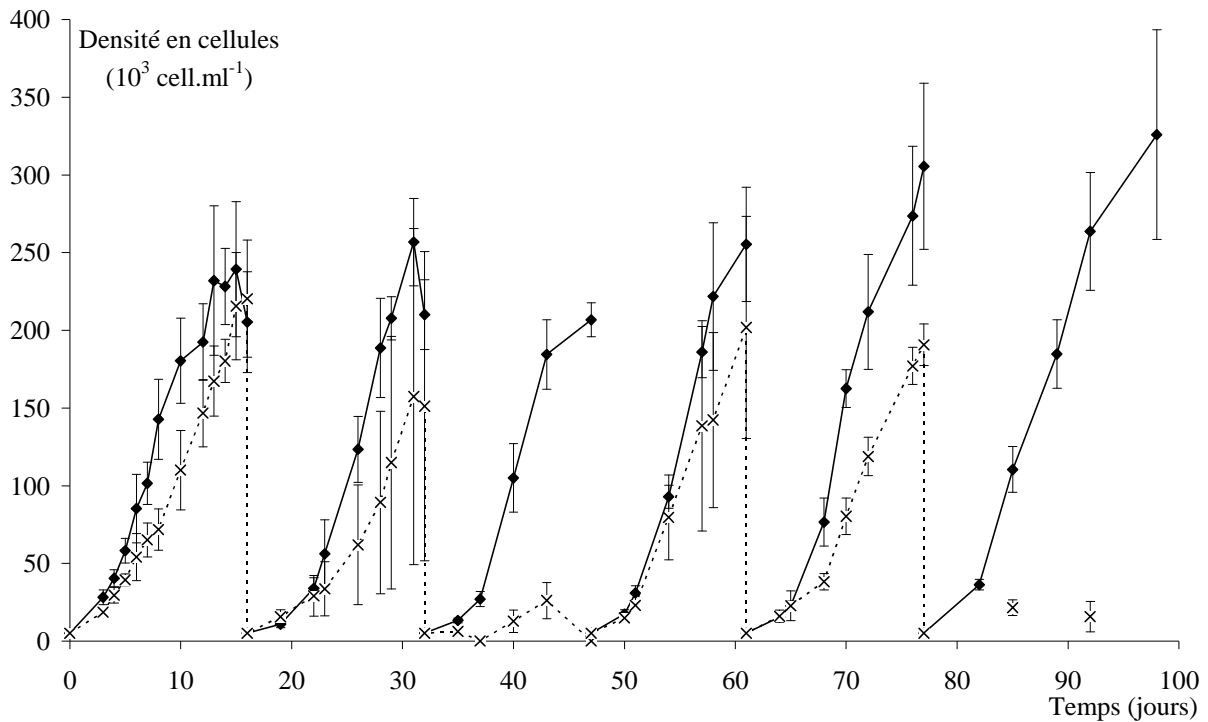


Figure IV-1 Croissance de la diatomée *Haslea ostrearia* sur le milieu artificiel DAM (---◆---) et le milieu d'eau de mer enrichie ES1/3 (-·-×-·-) sur six repiquages successifs. Moyenne \pm intervalle de confiance.

Les densités en cellules dans les cultures d'*Haslea ostrearia* sont, pour les deux premiers repiquages, supérieures à celles obtenues dans les cultures sur ES1/3 mais ce n'est pas statistiquement démontré. La production des cultures sur ES1/3 est en décroissance lors

du deuxième et du troisième repiquage. Les cellules dans les cultures sont significativement plus abondantes lors du troisième repiquage sur le milieu DAM que ES1/3. Lors du quatrième repiquage, les cultures sur ES1/3 sont plus productives et les densités en cellules ne sont plus différentes statistiquement de celles mesurées dans les cultures sur DAM. Lors des cinquième et sixième repiquages, la productivité des cultures sur ES1/3 diminue de nouveau et les densités en cellules sont significativement inférieures à celles mesurées dans les cultures sur DAM.

Les concentrations en glucides et en protéines totales (Figure IV-2) ainsi qu'en caroténoïdes et en chlorophylle *a* (Figure IV-3) et en marennine externe et interne (Figure IV-4) ont été déterminées au dernier jour du cycle de croissance avant le repiquage pour les cultures d'*H. ostrearia* sur DAM et sur ES1/3. Seuls les résultats pour les repiquages 1, 2, 4 et 5 sont présentés pour les glucides, les protéines et les pigments.

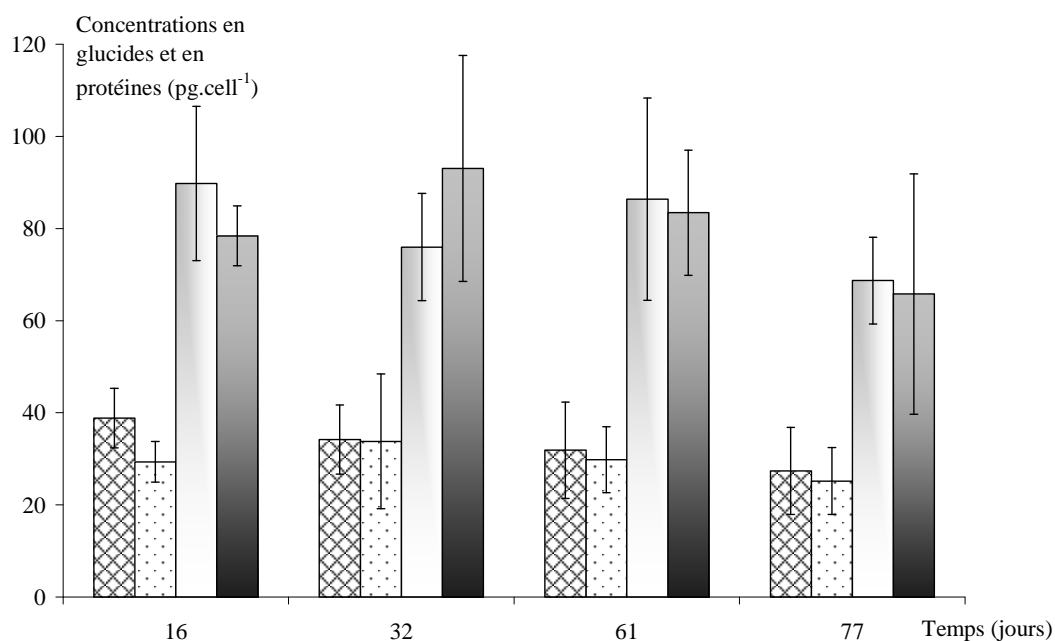


Figure IV-2 Concentrations en glucides et en protéines dans les cellules d'*Haslea ostrearia* cultivées sur le milieu artificiel DAM et le milieu d'eau de mer enrichie ES1/3 au jour de filtration (densité maximale). Moyenne \pm intervalle de confiance.

Légendes :
 Concentrations en glucides totaux dans les cellules cultivées sur DAM (⊗)
 Concentrations en glucides totaux dans les cellules cultivées sur ES1/3 (⋯)
 Concentrations en protéines totales dans les cellules cultivées sur DAM (■)
 Concentrations en protéines totales dans les cellules cultivées sur ES1/3 (■)

La composition en glucides totaux et en protéines totales n'est pas différente pour les cellules issues des deux conditions de culture. En outre, les concentrations sont stables d'un cycle de croissance à l'autre.

Les concentrations en caroténoïdes dans les cellules cultivées sur DAM sont significativement supérieures à celles mesurées dans les cellules cultivées sur l'eau de mer enrichie. Les concentrations en chlorophylle *a* dans les cellules cultivées sur DAM semblent également supérieures à celles mesurées dans les cellules cultivées sur ES1/3, mais cette différence n'est pas statistiquement vérifiée. Au cours du temps, une diminution des concentrations en pigments est observée. Les concentrations déterminées pour les cellules issues du cinquième repiquage sont significativement inférieures à celles déterminées pour les cellules issues du premier repiquage et ce dans chaque condition.

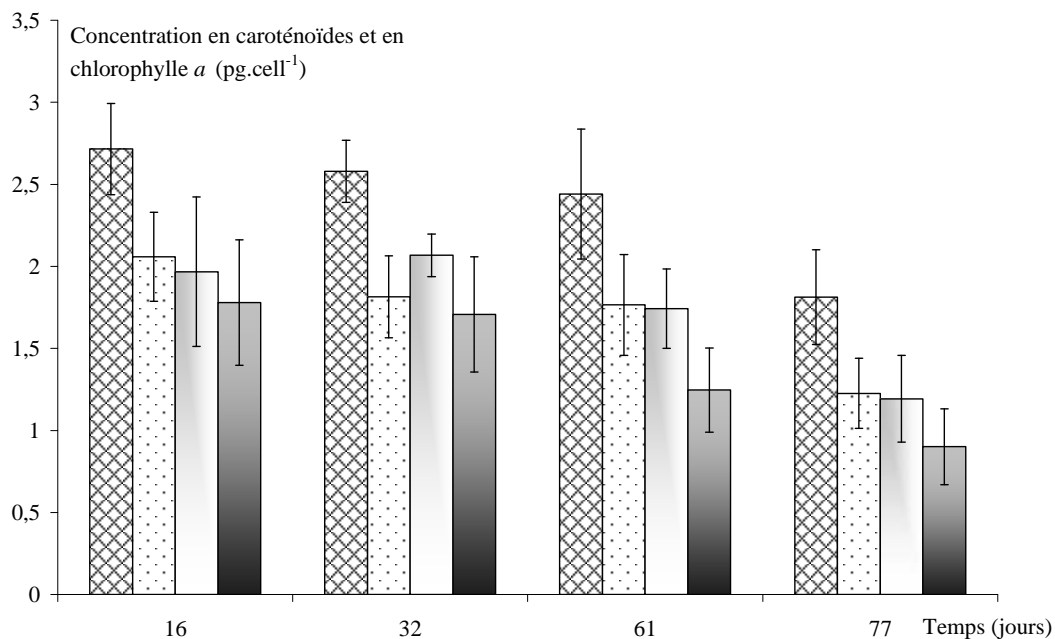


Figure IV-3 Concentrations en caroténoïdes et en chlorophylle *a* dans les cellules d'*Haslea ostrearia* cultivées sur le milieu artificiel DAM et le milieu d'eau de mer enrichie ES1/3 au jour de filtration (densité maximale). Moyenne \pm intervalle de confiance.

Légendes :
 Concentrations en caroténoïdes dans les cellules cultivées sur DAM (⊗)
 Concentrations en caroténoïdes dans les cellules cultivées sur ES1/3 (⋯)
 Concentrations en chlorophylle *a* dans les cellules cultivées sur DAM (■)
 Concentrations en chlorophylle *a* dans les cellules cultivées sur ES1/3 (■)

La production de marennine par *H. ostrearia* est intéressante étant donné les fonctions que les auteurs lui ont assignées (photoprotection -Schubert *et al.*, 1995-, toxicité vis-à-vis des autres populations algales, marqueur de vieillissement -Neuville et Daste, 1971; Robert *et al.*, 2002; Pouvreau, 2006) et son intérêt en cosmétologie (à partir de la pâte d'algues - Pouvreau, 2006). Les cultures produites sur milieu artificiel présentent une couleur bleu-vert moins soutenue que celles produites sur le milieu d'eau de mer enrichie. Les concentrations en

marennine externe corroborent cette observation puisqu'elles sont deux à quatre fois plus faibles dans les cultures sur DAM. Par contre, les teneurs en marennine interne sont du même ordre de grandeur dans les cellules issues des deux milieux de culture. Les concentrations en marennine interne des cellules issues du 3^{ème} cycle de croissance n'ont pas pu être déterminées à cause d'une détérioration des échantillons.

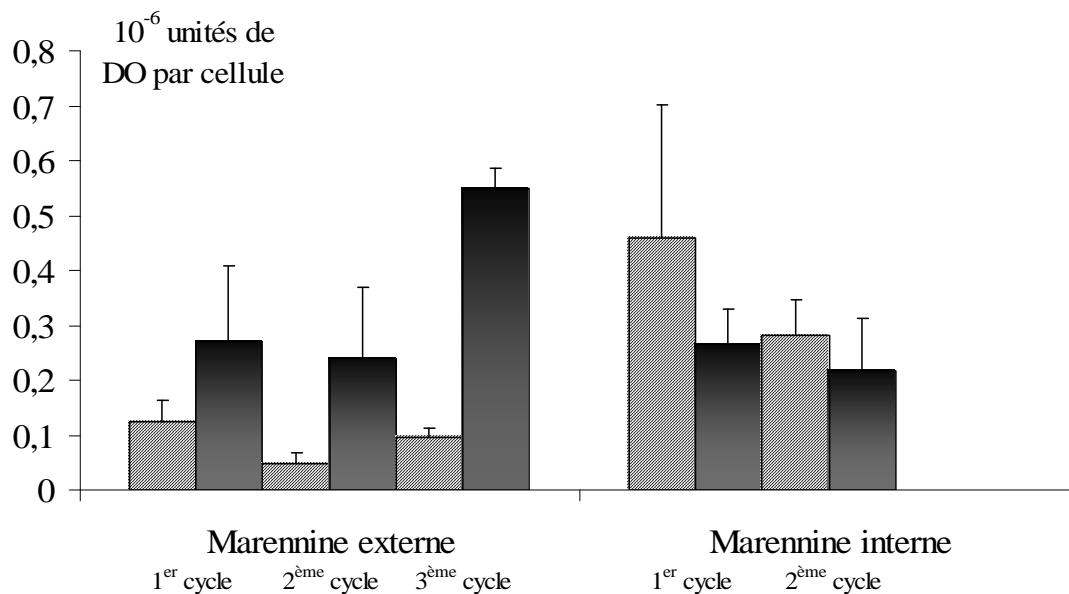


Figure IV-4 Estimation des concentrations de marennine externe et interne dans les cultures d'*Haslea ostrearia* sur milieu artificiel DAM (▨) et sur eau de mer enrichie ES1/3 (■). Moyenne ± intervalle de confiance.

Résultats obtenus avec d'autres microalgues cultivées sur le milieu artificiel DAM

Dans le but d'utiliser ce milieu notamment pour comparer *H. ostrearia* avec d'autres algues, 19 autres microalgues ont été cultivées et repiquées sur le milieu artificiel DAM. Pendant quatre mois d'expérimentations, les algues cultivées en tubes ont été repiquées 10 fois sur DAM alors que les algues cultivées en flacon ont été repiquées 6 fois, le temps que les cultures atteignent une biomasse maximale. Mise à part la diatomée *Rhizosolenia setigera*, aucune dégradation des cultures (diminution de l'abondance, déformation des cellules) n'a été observée au fil des transferts des microalgues. Lors du deuxième cycle, la culture de *R. setigera* a diminué en abondance de cellules et ne s'est pas développée après le second transfert.

Tableau IV-3 Nombre de cycles de croissance atteints avec les différentes microalgues testées sur le milieu artificiel DAM

Espèce	Clone	Nombre de cycles
Bacillariophyceae		
<i>Amphora hyalina</i>	NCC 1 D-Am.hy.	10
<i>Bacillaria paradoxa</i>	NCC 6 D-Ba.pa.	10
<i>Chaetoceros sp.</i>	NCC 8 D-Ch.sp.	10
<i>Coscinodiscus granii</i>	NCC 11 D-Co.gr.	10
<i>Entomoneis alata</i>	NCC 17 D-En.al.	10
<i>Haslea crucigera</i> *	NCC 32 D-Ha.cr.	6
<i>Heliotheca thamesis</i>	NCC 59 D-He.th.	10
<i>Navicula ramosissima</i>	NCC 73 D-Na.ra.	10
<i>Nitzschia compressa</i>	NCC 38 D-Ni.co.	10
<i>Odontella aurita</i> *	NCC 87 D-Od.au.	6
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> *	NCC 45 D-Ph.tr.	6
<i>Pleurosigma intermedium</i>	NCC 78 D-Ple.in.	10
<i>Rhizosolenia setigera</i> *	NCC 81 D-Rh.se.	2-†
<i>Skeletonema costatum</i> *	NCC 52 D-Sk.co.B2	6
<i>Thalassionema sp.</i> *	NCC 69 D-Thn.sp.	6
Autres microalgues		
<i>Dunaliella sp.</i>	NCC 14 C-Du.sp.	10
<i>Isochrysis sp.</i>	NCC 24 Pry-Is.sp.	10
<i>Porphyridium cruentum</i>	NCC 49 R-Po.cr.	10
<i>Tetraselmis suecica</i> *	NCC 62 Pra-Te.Su.	6

*cultures réalisées en flacon

† mort de la population algale après le transfert

IV-2.2.b Etude de la spéciation métallique dans le milieu artificiel DAM

Etude de la spéciation à l'aide du modèle mathématique MOCO

La spéciation du cuivre et du zinc dans le milieu artificiel a été définie par le modèle mathématique de spéciation MOCO développé par Ifremer. Ce modèle a déjà été décrit et appliqué dans les travaux de Gonzalez *et al.* (2001a, 2001b) et de Laurier *et al.* (2003). Les constantes de complexation utilisées pour calculer les pourcentages des espèces chimiques pour les éléments considérés sont celles déterminées par Morel et Hering (1993). Les calculs ont également été réalisés dans le cas d'un ajout de cadmium ou de plomb pour déterminer leur spéciation dans le milieu DAM. Les simulations ont été réalisées à pH 7,8 avec les concentrations initiales en nutriments, avec et sans ajout d'EDTA pour évaluer l'impact de la

présence de ce complexant cationique. La compétition entre les ions métalliques et les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} a été prise en compte dans les calculs. Les simulations ont permis de calculer les pourcentages de métal libre ou associé aux autres éléments majoritaires composant le milieu en présence ou en absence d'EDTA (Tableau IV-4).

Tableau IV-4 Pourcentages des différentes espèces métalliques présentes dans le milieu artificiel DAM calculés grâce au modèle mathématique MOCO Ifremer

Association métal-ligand (%)	Métaux présents dans le DAM		Métaux ajoutés au DAM	
	Cu	Zn	Cd ^a	Pb ^a
<i>Sans ajout d'EDTA</i>				
Métal libre ($\text{M}^{\text{n}+}$)	0,030	6,412	3,723	5,515
Carbonates	97,293	n.c.	n.c.	n.c.
Chlorures	0,011	2,34	95,233	39,177
Hydroxydes	0,014	0,21	0,006	2,367
Phosphates	2,643	89,889	n.c.	48,869
Sulfates	0,009	1,149	1,037	4,072
Σ	100	100	100	100
<i>Avec ajout d'EDTA^b</i>				
EDTA	100	100	100	100
Autres formes	$< 1.10^{-8}$	$< 1.10^{-8}$	$< 1.10^{-8}$	$< 1.10^{-8}$

n.c. : non calculé

^a avec un ajout de 1.10^{-8}M de cadmium total et plomb total au milieu DAM

^b espèces majoritaires de l'EDTA(Y): HY^{3-} (97,5%), H_2Y^{2-} (2,5%)

En présence d'EDTA, le cuivre et le zinc pour les concentrations initiales dans le milieu sont associés majoritairement à cette molécule chélatrice. Dans les simulations d'ajout de cadmium ou de plomb (10^{-8} à 10^{-6} $\mu\text{mol.L}^{-1}$), ces métaux sont également totalement associés à l'EDTA.

En absence d'EDTA, le cuivre est majoritairement associé aux carbonates alors que le zinc s'associe préférentiellement aux phosphates. Le pourcentage de zinc libre est plus élevé que celui de cuivre libre dans le milieu. Pour les métaux non-essentiels, deux profils différents sont observés : le cadmium est principalement sous forme de chlorures, alors que le plomb est pour presque 50% associé aux phosphates et pour 40% aux chlorures. Le pourcentage de métal libre est également plus élevé pour le cadmium et le plomb que pour le cuivre.

Résultats de l'étude expérimentale de la capacité de complexation du milieu artificiel DAM

L'étude de la capacité de complexation du cuivre et du zinc, métaux présents initialement dans le milieu, et du cadmium et du plomb, ajoutés dans le cadre par exemple d'une expérience de contamination, a été réalisée sur le milieu artificiel DAM en suivant la méthode décrite dans la partie III-2.1. L'absence de pouvoir tampon du milieu artificiel a réclamé l'utilisation d'une solution tamponnée de métaux (tampon acétate, pH=6) pour réaliser les ajouts. Certaines formes d'association semblent être facilement dissociables ou échangeables au niveau de la goutte de mercure pendant le temps de déposition. Les gammes en ajouts dosés effectuées sur les échantillons n'ont pas permis de déterminer les concentrations en métal labile, sauf dans le cas du cadmium.

Les titrations du cuivre dans le milieu artificiel DAM (avec EDTA) ont mis en évidence une classe de ligands dont la concentration totale a été calculée graphiquement égale à $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et la constante de stabilité conditionnelle $\log K_{\text{Cu}}^{\text{cond}} = 1$. Les titrations du zinc ne mettent pas en évidence de classe de ligands (Figure IV-5).

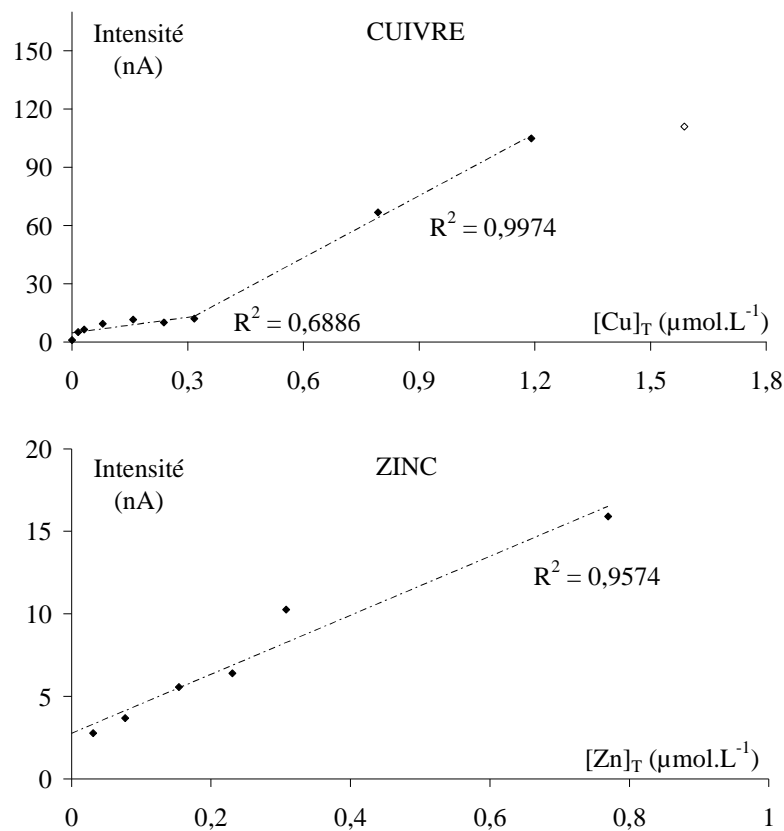


Figure IV-5 Étude de la complexation du cuivre et du zinc dans le milieu artificiel par la méthode voltampérométrique

Pour le cadmium et le plomb, une classe de ligands est mise en évidence par une rupture de pente (Figure IV-6).

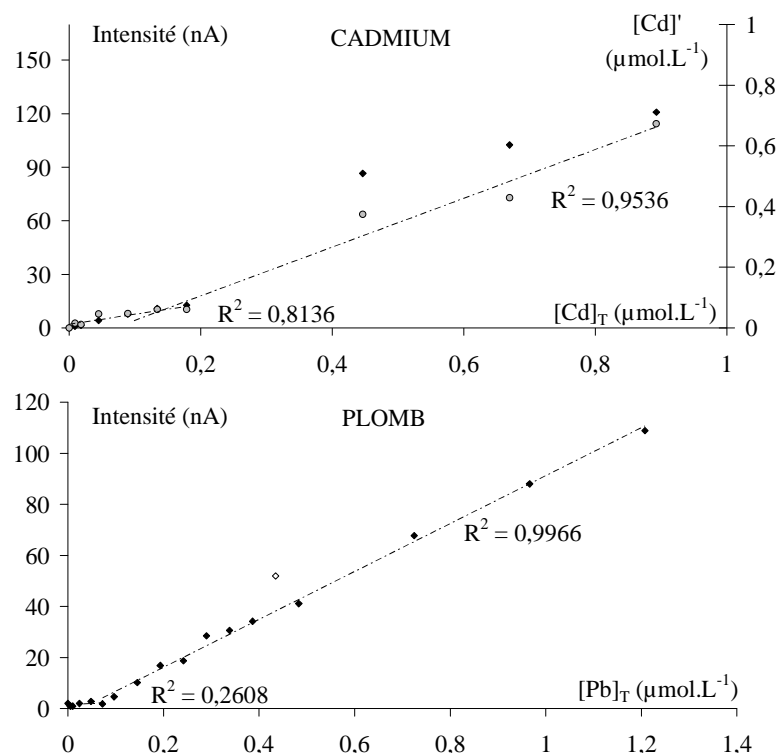


Figure IV-6 Étude de la complexation du cadmium et du plomb dans le milieu artificiel par la méthode voltampérométrique

La concentration en ligands pour le cadmium a été calculée d'après le graphique égale à $0,14 \mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une constante de stabilité conditionnelle $\log K_{\text{Cd}}^{\text{cond}} = 1$. Pour le plomb, la concentration en ligands est plus faible ($0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$) mais la constante de stabilité conditionnelle est plus élevée ($\log K_{\text{Pb}}^{\text{cond}} = 2,12$).

Dans le cas du cadmium, les concentrations en métal labile ont pu être calculées. Il apparaît que la deuxième droite (après la rupture de pente) n'est pas parallèle à la droite $y=x$ formée par les concentrations en métal total. Une complexation du cadmium subsiste donc. En outre, aucune classe de ligands pouvant faire référence à l'association des métaux avec l'EDTA n'a été mise en évidence. La dissociation des complexes métaux-EDTA est peut-être suffisamment rapide sous l'effet du potentiel imposé pour que le métal interagisse au moins en partie avec la goutte de mercure pendant le temps de déposition.

IV-2.3 Conclusion et perspectives d'utilisation

Le milieu artificiel DAM est relativement facile à réaliser. Le milieu permet d'obtenir une bonne croissance de la diatomée *Haslea ostrearia* sans entraîner de modification dans sa composition globale ou dans sa morphologie (pas de déformation) et ceci sur plusieurs repiquages. La diminution des teneurs en pigments, observée dans les cellules cultivées sur DAM et sur le milieu d'eau de mer enrichie peut être due à une acclimatation de l'algue aux conditions de culture (température, lumière) (Mouget *et al.*, 1999). L'excrétion de marennine est plus faible dans le cas des cultures sur DAM que celles sur ES1/3. La teneur en marennine interne dans les cellules cultivées sur DAM est cependant constante et similaire à celle observée dans les cellules issues d'une culture sur ES1/3. La marennine a été décrite comme un produit de réaction à un stress (lumière, carence), on peut alors supposer que le milieu artificiel convient à la culture de cette diatomée.

Les autres microalgues cultivées, à l'exception de *Rhizosolenia setigera*, se sont développées sur le milieu artificiel DAM et ce sur plusieurs repiquages, sans montrer de diminution des densités maximales en cellules ou de déformation morphologique. Cela est intéressant dans le cadre d'études de comparaison entre *H. ostrearia* et d'autres microalgues, notamment dans le cadre d'études sur l'assimilation d'éléments (nutriments et oligo-éléments) puisque un même milieu avec les mêmes caractéristiques (biodisponibilité, concentration des éléments) peut être utilisé dans les mêmes conditions expérimentales.

L'étude de la spéciation a permis de déterminer mathématiquement les formes métalliques présentes dans le milieu, nécessaires pour prévoir ou comprendre les phénomènes d'accumulation des métaux dans les microalgues. En absence d'EDTA, les associations du cadmium et du cuivre avec les autres formes ioniques présentes dans le milieu sont semblables à celles observées dans l'eau de mer en absence de ligands organiques (Turner *et al.*, 1981). Dans le cas du plomb, les deux espèces majoritaires de plomb dans le milieu artificiel (chlorures 40% et phosphates 50%) ne sont pas celles décrites par Turner *et al.* (1981), Nürnberg (1983) et Millero et Hawke (1992) dans l'eau de mer où le plomb semble principalement associé aux carbonates (40%) et aux chlorures (47%). La concentration élevée en phosphore dans le milieu artificiel dissous par rapport à l'eau de mer (facteur 100) est responsable de ces modifications d'équilibre des espèces de plomb.

La présence de l'EDTA permet de simplifier le modèle puisque les quatre métaux y sont associés. La biodisponibilité du métal est donc dépendante des constantes d'affinité des

métaux pour l'EDTA comparées à celles des métaux pour les sites d'adsorption à la surface des microalgues. Le rôle de l'EDTA dans la complexation des métaux dans les milieux de culture a été étudié et une diminution de la toxicité des métaux a été observée en présence de ce chélateur (Sillanpaa et Oikari, 1996; Minier *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2000). Cet effet est donc à prendre en compte dans les concentrations métalliques choisies dans les expérimentations de contamination. Morel *et al.* (1979), Price et Morel (1990) et Knauer *et al.* (1997) utilisent l'EDTA pour contrôler la proportion de métal sous forme ionique libre, ce qui leur permet de travailler avec des concentrations faibles proches de celles observées dans les eaux océaniques, notamment dans les études des effets de carence en métal. Les classes de ligands mis en évidence dans l'étude voltampérométrique n'ont pas été définies. Un travail complémentaire reste à effectuer pour déterminer la nature de ces ligands et leur origine.

Le milieu artificiel DAM a été utilisé lors des expérimentations en conditions contrôlées sur *H. ostrearia* mais aussi sur *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricorutum* et *Tetraselmis suecica* pour étudier les phénomènes de bioaccumulation des métaux dans ces algues. Des approches plus spécifiques ont été menées sur *H. ostrearia* et *S. costatum* pour déterminer d'éventuelles différences de comportement au niveau des phénomènes d'adsorption et d'absorption et sur *H. ostrearia* pour étudier l'impact de la marennine sur la toxicité des métaux et le piégeage des métaux dans le tapis de mucus formé par cette diatomée.

IV-3 Cultures sur milieu artificiel DAM enrichi en métaux

IV-3.1 Matériel et méthodes

IV-3.1.a Expériences de bioaccumulation de métaux par les microalgues

Le matériel utilisé dans ces expérimentations a été préalablement nettoyé et rincé en suivant le même protocole que celui décrit auparavant (II-2.1). Les cultures ont été réalisées dans des flacons erlenmeyer de 250 mL contenant 150 mL de milieu artificiel DAM stérilisé par autoclavage (avec un barreau aimanté dans chaque flacon). Le métal a été ajouté dans les milieux dans des conditions axéniques (sous la hotte à flux laminaire) 24 heures avant l'inoculum algal pour laisser un temps d'équilibration des formes métalliques (Arab-Joux, 1999). L'inoculum algal a été réalisé à partir d'une culture mère âgée de sept jours pour toutes les expériences d'accumulation, ceci pour limiter les biais induits par l'âge des cellules inoculées initialement (Robert, 1983). La densité de l'inoculum algal est égale à 2500 cellules.mL⁻¹ ; ceci est l'inoculum maximal qui a pu être obtenu à partir des cultures souches d'*Haslea ostrearia*.

Les gammes des concentrations testées dans un premier temps ont été établies à partir des travaux de Amiard-Triquet (1989) et de Arab-Joux (1999). A partir de ces expériences préliminaires testant quatre concentrations en métaux, les deux concentrations les plus faibles induisant des modifications ont été sélectionnées pour étudier l'impact et l'accumulation de ces métaux pour chaque algue. L'expérience d'accumulation des métaux aux deux concentrations retenues a permis d'augmenter le nombre de réplicats pour chaque condition de culture. Ces cultures ont été réalisées et suivies avec les protocoles décrits précédemment (II-2.4 et II-2.5). Les effets sur le cycle de croissance comportent les modifications des durées des différentes phases de croissance (latence, exponentielle et stationnaire).

En plus des dosages de glucides, de marennine (interne et externe) et de protéines (décrits auparavant), les concentrations en lipides ont été déterminées en suivant le protocole défini par Marsh et Weinstein (1966). Le dosage des lipides est basé sur l'hydrolyse acide à chaud des acides gras révélant une coloration brune dont l'absorbance est mesurée à 360 nm. La gamme étalon est réalisée avec une solution de tripalmitate dans du dichlorométhane. Le protocole est présenté dans l'annexe 1.

Les concentrations en exopolysaccharides excrétés dans le milieu par les algues ont été déterminées à partir du protocole de Yang *et al.* (2002). Une aliquote de culture d'algues est centrifugée à 2500 g pendant 15 minutes, les cellules algales se retrouvent dans le culot. Une vitesse de centrifugation supérieure risquerait de casser les cellules. À un volume de surnageant contenant les exopolysaccharides, sont ajoutés deux volumes d'éthanol absolu. L'éthanol induit la précipitation des polysaccharides. Après centrifugation (5000 g, 20 minutes), la masse sèche du culot est déterminée après 48 h à l'étuve à 60°C.

Les colorations du tapis de mucus et des polysaccharides situés sur la surface algale d'*Haslea ostrearia* ont été effectuées à partir d'échantillons issus de cultures réalisées dans des flacons de 2 L contenant 1 L de milieu artificiel DAM : une culture témoin et une culture sur milieu enrichi en cuivre (2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Ces cultures ont été placées dans la chambre thermostatée dans les mêmes conditions (II-2.4) avec, néanmoins un bullage d'air filtré supplémentaire pour stimuler la production d'exopolysaccharides (Koussih, 1995).

À la phase stationnaire de croissance, des échantillons du tapis de mucus contenant les microalgues sont prélevés et sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2,5%, puis rincés à l'eau ultra-pure. Les échantillons sont ensuite colorés au bleu alcian puis rincés à l'eau ultra-pure selon la méthode utilisée par Rincé *et al.* (1999). Les échantillons sont placés entre lame et lamelle et observés à l'aide d'un microscope photonique relié à une caméra et au logiciel de traitement d'images Lucia.

IV-3.1.b Expérimentations réalisées à l'A.I.E.A. à l'aide de radioéléments

Les expériences avec les radioéléments ont été réalisées à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (A.I.E.A.) à Monaco. Les radioéléments utilisés ^{109}Cd et ^{65}Zn ont des temps de demi-vie suffisamment longs (respectivement 462 et 244 jours) pour étudier des cinétiques d'accumulation sur plusieurs semaines et ont des bandes d'émission d'énergie distinctes permettant leur étude simultanée et leur éventuelle compétition.

Deux types d'expériences ont été menés avec ces radioéléments : la détermination des paramètres d'utilisation du 8-HQS (acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique) et la comparaison de la cinétique d'accumulation du ^{109}Cd et du ^{65}Zn chez *Skeletonema costatum* et *Haslea ostrearia*. Les cultures ont été réalisées dans des flacons à vis Schott 1 L contenant 450 mL de milieu f/2 (Guillard, 1982) sans ajout d'EDTA. Des flacons témoins « contrôle eau de mer » et « contrôle f/2 » ont été réalisés pour établir un « blanc » référence et estimer l'impact de

l'enrichissement en sels nutritifs du milieu f/2 sur la répartition des métaux (formation de matière colloïdale pouvant retenir une fraction des métaux).

*Cinétique d'accumulation du ^{109}Cd et du ^{65}Zn par *Skeletonema costatum* et *Haslea ostrearia**

Les algues sont inoculées à hauteur de $5000 \text{ cellules.mL}^{-1}$ dans les milieux de culture. L'ajout de radioéléments est réalisé au premier jour de culture à une activité de 10 Bq.mL^{-1} . Chaque jour de l'expérience, les algues sont dénombrées sur des lames hématimétriques (une cellule de Fuchs-Rosenthal pour *Skeletonema costatum* et une cellule de Lemaire pour *Haslea ostrearia*) et 40 mL de chaque culture sont filtrés sur des membranes en polycarbonate Nuclipore à l'aide d'un système de filtration Nalgene mis en place sous la hotte aspirante de type sorbone. L'activité provenant des isotopes contenus dans les algues, retenues sur les filtres, et contenus dans les filtrats a été mesurée avec des détecteurs γ au germanium. Les trois détecteurs sont calibrés tous les jours avec des échantillons standardisés d'eau (40 mL dans des boîtes de Petri de 100 mL) contenant des radioéléments dont l'activité théorique est connue. Le format de l'échantillon et le volume sont des paramètres importants de la calibration. La calibration donne une valeur permettant de corriger, par rapport à la valeur standard, la valeur des échantillons mesurée au temps t en fonction des interférences extérieures (obtention des valeurs normalisées). Le logiciel de traitement du signal compense directement la perte d'activité en fonction du temps de demi-vie de chaque isotope. Les membranes sont disposées dans les mêmes boîtes de Petri et 40 mL d'eau de mer sont ajoutés pour ajuster le volume. Les échantillons sont placés dans des enceintes en plomb (pour limiter la propagation des rayons γ et limiter la perturbation de l'analyse par les ondes extérieures), le comptage s'effectue jusqu'à l'obtention d'une erreur sur la mesure inférieure à 5 %.

Au huitième jour de culture, après les prélèvements destinés au comptage et à la mesure de la radioactivité dans les cellules, le reste de la culture a été utilisé pour déterminer les paramètres d'utilisation (temps d'extraction et concentration optimale) du 8-HQS.

Détermination des conditions d'utilisation du 8-HQS : concentration et temps d'extraction

Pour déterminer la concentration en métaux situés à la surface des algues, Price et Morel (1990) utilisent un complexant de cations, le 8-HQS (acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique). Le 8-HQS possède une plus grande affinité pour les cations que les sites présents à la surface de la paroi algale et ce complexant est plus spécifique des cations métalliques que l'EDTA (El Hourch, 2002). Ce complexant a été utilisé dans ce cadre dans plusieurs

expérimentations (Perrein-Ettajani *et al.*, 1999 ; El Hourch, 2002 ; Ng *et al.*, 2005) La réaction est présentée sur la Figure IV-7.

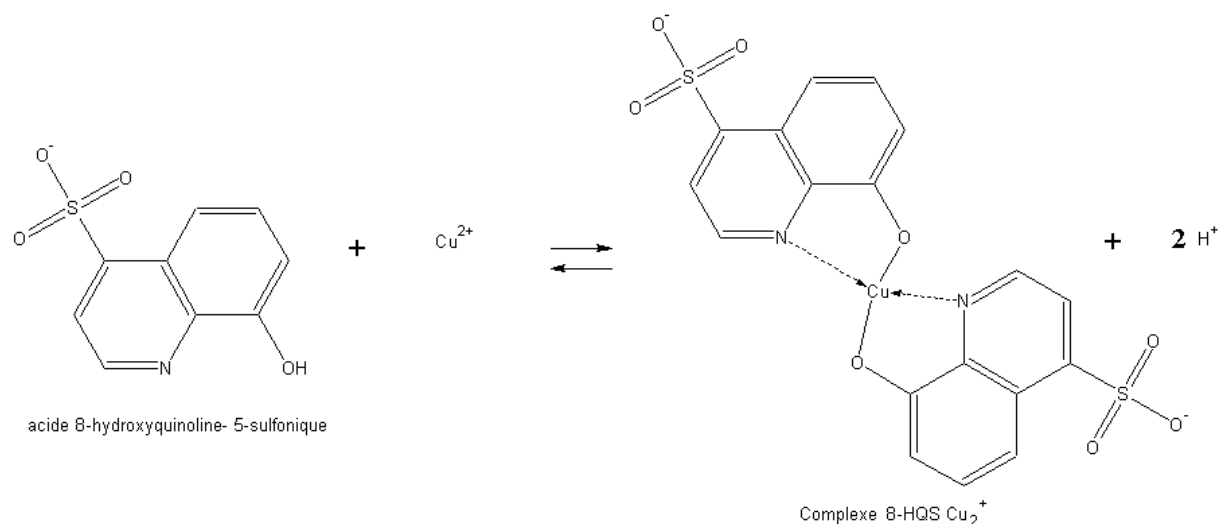


Figure IV-7 Complexation d'un ion Cu^{2+} avec deux molécules de 8-HQS (d'après El Hourch, 2002)

Le temps, ainsi que la concentration en 8-HQS, nécessaires à la désorption des métaux de la paroi ont été testés avec des radioéléments à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique. Etant donné le délai court pendant lequel cette expérience a été menée, et le temps de comptage long pour les échantillons à faible activité, deux temps d'extraction et quatre concentrations ont été testés.

Les cellules filtrées sur les membranes en polycarbonate (40 mL de culture) sont remises en suspension dans une solution de NaCl à pH 9 contenant 0 mmol.L^{-1} , $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, 1 mmol.L^{-1} et 3 mmol.L^{-1} de 8-HQS. Après 30 minutes d'extraction, 20 mL sont filtrés de nouveau sur des membranes en polycarbonate et les autres 20 mL sont filtrés après 1 heure d'extraction. Les filtres et les filtrats sont analysés au détecteur γ au germanium.

Détermination de la concentration optimale en 8-HQS et du temps nécessaire pour la désorption du cadmium et du zinc adsorbé sur les cellules algales

Le dosage de métal dans les filtrats après l'extraction au 8-HQS correspond à la concentration en métal désorbé (cadmium ou zinc) de la cellule algale. Cette concentration est rapportée à la concentration totale en métal assimilé par l'algue (adsorbé et absorbé). Ce rapport est exprimé en pourcentage dans la Figure IV-8, en fonction de la concentration en 8-HQS utilisée et du temps d'extraction, ainsi que de l'espèce algale.

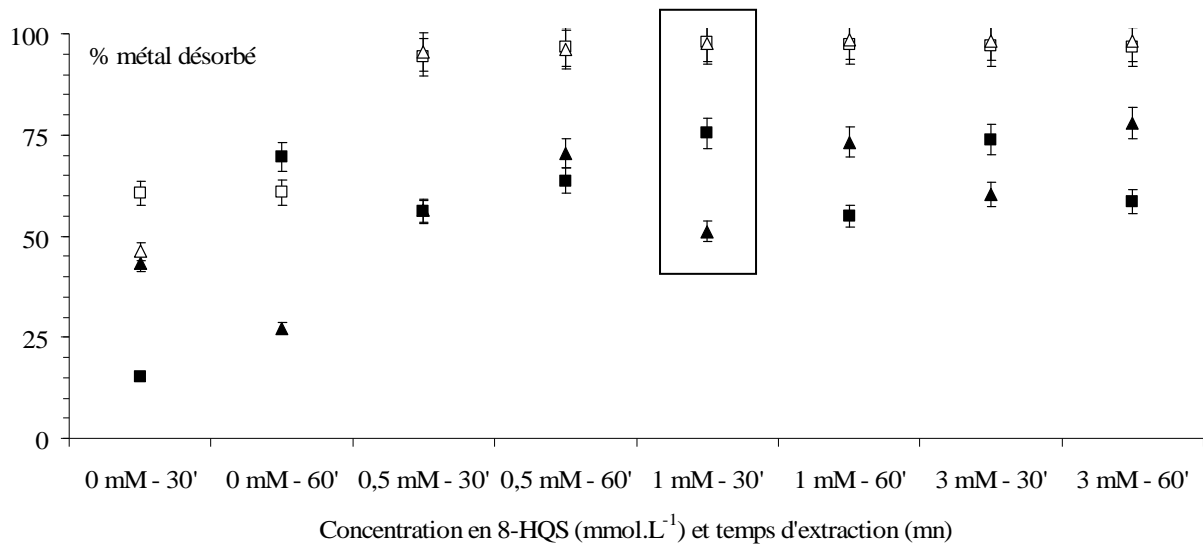


Figure IV-8 Pourcentage de métal ¹⁰⁹Cd (□, ■) ou ⁶⁵Zn (△, ▲) désorbé de la paroi algale par rapport à la quantité de métal total adsorbé et absorbé par les cellules d'*Haslea ostrearia* (□, △) et *Skeletonema costatum* (■, ▲)

En absence du chélateur 8-HQS, une désorption du métal est observée. Cette désorption est plus importante pour *H. ostrearia* que pour *S. costatum* et est fonction du temps puisque la proportion relarguée au bout d'une heure d'extraction est plus importante que celle mesurée au bout d'une demi-heure.

L'ajout de chélateur augmente les quantités de métal désorbé pour les deux métaux considérés et les deux espèces algales. Une concentration en chélateur de 1 mmol.L⁻¹ désorbe une proportion de métal plus élevée qu'une concentration de 0,5 mmol.L⁻¹; les résultats obtenus avec 3 mmol.L⁻¹ de 8-HQS ne sont pas différents de ceux obtenus avec 1 mmol.L⁻¹.

L'effet du temps d'extraction n'est pas le même dans le cas de *S. costatum* pour le cadmium et le zinc. En effet, un temps d'extraction d'une heure induit une désorption plus élevée de zinc et moins élevée de cadmium qu'un temps d'extraction d'une demi-heure. Ce phénomène n'est pas observé dans le cas d'*H. ostrearia*. Toutefois, pour cette espèce algale, la quasi-totalité du métal fixé en huit jours est désorbée par le chélateur.

En fonction de ces observations, une concentration de 1 mmol.L⁻¹ a été choisie pour le protocole de désorption. Pour le temps d'extraction, les auteurs ayant utilisé ce chélateur utilisent un temps inférieur à une demi-heure; l'effet du chélateur sur la perméabilité membranaire n'ayant pas été testé, un temps de trente minutes a été préféré.

IV-3.1.c Dosage des métaux totaux, adsorbés et absorbés

Dosage des métaux dans les cellules

Le dosage des métaux dans les cellules a été réalisé comme décrit dans le paragraphe II-2.5.c. Cette fraction correspond au métal qui se situe dans la cellule et adsorbé sur les parois.

Dosage des métaux désorbés de la paroi algale

Les cultures sont filtrées sur des membranes en nitrate de cellulose (Sartorius ou Whatman), les cellules sont remises en suspension pendant un temps de 30 minutes dans une solution NaCl 30 g.L⁻¹ dont le pH est ajusté à 9 et contenant 1mmol.L⁻¹ de 8-HQS. Le surnageant est ensuite filtré de nouveau et le filtrat est conservé pour le dosage des métaux adsorbés en DP-ASV. Le blanc en DP-ASV est réalisé avec une solution NaCl 30g.L⁻¹/8-HQS 1mM acidifié à pH = 2 et traité aux ultra-violets comme les échantillons. Les membranes sont rincées avec du NaCl, séchées à l'étuve pour la détermination du poids sec et minéralisées à l'acide nitrique 65% pour le dosage des métaux absorbés (intracellulaires) en SAA.

IV-3.1.d Dosage des métaux (labiles et totaux) et détermination des capacités de complexation des milieux de culture

Le dosage des métaux labiles et totaux ont été réalisés en DP-ASV en suivant la méthode décrite précédemment.

La détermination de la capacité de complexation des eaux et des constantes de stabilité conditionnelle associées a été réalisée en suivant la méthode décrite dans la partie III-2.1.b. Les données ont pu être analysées en utilisant la méthode de linéarisation de Ruzic (1982). Le principe et les équations associées à cette méthode sont décrits dans la partie I-2.4.b.

IV-3.2 Résultats

IV-3.2.a Expériences d'accumulation des métaux Cd, Cu, Pb et Zn sur les quatre algues tests

Pour simplifier l'analyse des résultats obtenus lors de ces expériences, les effets de chaque métal sur la croissance, sur les teneurs en glucides, en lipides, en pigments et en protéines, sur l'accumulation des métaux, sur la production en mucopolysaccharides et sur la taille des cellules sont synthétisés dans un tableau en fonction de l'espèce algale.

Accumulation des métaux chez *Haslea ostrearia*

Les effets des métaux ajoutés dans le milieu de culture d'*H. ostrearia* sont synthétisés dans le Tableau IV-5. Les variables suivies dans les cultures témoins et enrichies ne sont pour la majorité que peu différentes d'une condition à l'autre, laissant supposer une action réduite des métaux sur les cellules.

Tableau IV-5 Effets du cadmium (0,5 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), du cuivre (0,75 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), du plomb (4 et 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) et du zinc (4 et 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sur les cultures d'*Haslea ostrearia* réalisées sur le milieu artificiel DAM (NS : différence non significative, pas de tendance ; - : non déterminé)

	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
Croissance				
Densité en cellules maximale	NS	NS	Diminution non significative	Diminution non significative
Effet sur le cycle de croissance	NS	NS	NS	NS
Teneurs en caroténoïdes	NS	NS	Diminution	NS
Teneurs en chlorophylle <i>a</i>	NS	NS	Diminution	Diminution pour [Zn]=8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Augmentation des teneurs en phéopigments
Teneurs en glucides	NS	NS	NS	NS
Teneurs en lipides	Diminution non significative	Diminution non significative	Diminution proportionnelle	NS
Teneurs en marennine interne	Diminution	NS	-	-
Teneurs en protéines	Diminution non significative	Diminution non significative	Diminution non significative	Augmentation
Accumulation des métaux (Témoin, Métal 1, Métal 2)	1-3-4 $\mu\text{g.g}^{-1}$	43-75-78 $\mu\text{g.g}^{-1}$	-	0-13-19 $\mu\text{g.g}^{-1}$
Influence sur les autres métaux	Diminution de la concentration en cuivre 18-20 $\mu\text{g.g}^{-1}$	-	-	-
Concentrations en polysaccharides	Diminution non significative	Augmentation non significative	-	-

Le cadmium n'a pas entraîné d'effet sur la croissance et la teneur en pigments et en glucides. Les teneurs en lipides en protéines et en polysaccharides des cellules issues des cultures enrichies en cadmium sont plus faibles que celles mesurées dans les cellules issues

des cultures témoins, mais cette observation n'est pas vérifiée statistiquement. La teneur en marennine interne est toutefois plus faible dans les cultures enrichies en cadmium. Néanmoins, une diminution de la prise du cuivre dans les cellules issues des cultures enrichies en cadmium a été observée par rapport à la prise de cuivre dans les cellules des cultures témoins.

Le cuivre n'a pas entraîné de modification significative des variables mesurées pour le suivi de culture. Le plomb et le zinc ont induit de légères diminutions de la densité en cellules et des teneurs en chlorophylle *a*. Les teneurs en lipides et en protéines ont également diminué dans les cellules cultivées sur le milieu enrichi en plomb. Un enrichissement en zinc a, par contre, entraîné une augmentation des teneurs en protéines des cellules et une augmentation des teneurs en phéopigments.

Accumulation des métaux chez *Skeletonema costatum*

Les effets les plus importants sur les cultures de *S. costatum* ont été observés avec l'enrichissement du milieu de culture en cuivre (Tableau IV-6). Le cadmium n'induit aucune modification significative des variables suivies lors des cultures. Les cultures réalisées sur le milieu enrichi en cuivre ont présenté une réduction de 50% de la biomasse associée à une augmentation de la taille peralvaire des cellules et des teneurs en pigments, en glucides, en protéines et en lipides.

Tableau IV-6 Effets du cadmium (0,5 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), du cuivre (0,75 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), du plomb (4 et 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) et du zinc (4 et 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sur les cultures de *Skeletonema costatum* réalisées sur le milieu artificiel DAM (NS : différence non significative, pas de tendance ; - : non déterminé)

	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
Croissance				
Densité en cellules maximale	NS	Diminution de 50%	Diminution non significative	Augmentation proportionnelle
Effet sur le cycle de croissance	NS	NS	NS	NS
Teneurs en caroténoïdes	NS	Augmentation non significative	NS	NS
Teneurs en chlorophylle <i>a</i>	NS	Augmentation non significative	NS	Diminution proportionnelle
Teneurs en glucides	NS	Augmentation pour [Cu]=0,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Diminution proportionnelle	Diminution proportionnelle
Teneurs en lipides	NS	Augmentation pour [Cu]=0,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Diminution pour [Pb]=8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	NS
Teneurs en protéines	NS	Augmentation pour [Cu]=0,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	NS	Diminution proportionnelle
Accumulation des métaux (Témoin, Métal 1, Métal 2)	2-3-4,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	30-35-55 $\mu\text{g.g}^{-1}$	-	25-84-131 $\mu\text{g.g}^{-1}$
Influence sur les autres métaux	NS (Cuivre)	-	-	-
Concentrations en polysaccharides	NS	Augmentation non significative	-	-
Taille des cellules	-	Augmentation de la taille (axe peralvaire)	-	-

L'enrichissement en plomb du milieu de culture DAM a induit une légère diminution de la densité en cellules, ainsi que des teneurs en glucides et en lipides.

L'enrichissement en zinc a entraîné une augmentation de la densité en cellules des cultures de *S. costatum* associée à une diminution des teneurs en chlorophylle *a*, en glucides et en protéines, proportionnelles à la concentration en zinc.

Accumulation des métaux chez Phaeodactylum tricorutum et Tetraselmis suecica

L'impact du cadmium et du cuivre a été testé sur les cultures de *P. tricorutum* et celui du cuivre sur les cultures de *T. suecica*, ces deux espèces cultivées sur le milieu artificiel DAM (Tableau IV-7).

Tableau IV-7 Effets du cadmium (0,5 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) et du cuivre (0,75 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sur les cultures de *Phaeodactylum tricorutum* et de *Tetraselmis suecica* réalisées sur le milieu artificiel DAM (NS : différence non significative, pas de tendance ; - : non déterminé)

	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>		<i>Tetraselmis suecica</i>
	Cadmium	Cuivre	Cuivre
Croissance			
Densité en cellules maximale	NS	Diminution 40-50 %	NS
Effet sur le cycle de croissance	NS	NS	NS
Teneurs en caroténoïdes	NS	Augmentation non significative	Diminution non significative
Teneurs en chlorophylle <i>a</i>	NS	Augmentation non significative	NS
Teneurs en glucides	NS	Augmentation proportionnelle [Cu]	-
Teneurs en lipides	-	-	-
Teneurs en protéines	NS	Augmentation pour [Cu]=1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	NS
Accumulation des métaux (Témoin, Métal 1, Métal 2)	0,6-16-30,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	30-116-152 $\mu\text{g.g}^{-1}$	4,5-10,5-18 $\mu\text{g.g}^{-1}$

Le cadmium n'a induit aucun effet sur *P. tricorutum* dans les conditions de cultures utilisées dans cette expérience. Le cuivre, comme pour *S. costatum*, a induit dans les cultures de *P. tricorutum* une diminution de la densité en cellules maximale de 50% associée à une augmentation des teneurs en pigments, en glucides et en protéines.

Les cultures de *T. suecica* réalisées sur le milieu artificiel DAM n'ont pas présenté de modification induite par la présence de cuivre dans le milieu par rapport au témoin, à l'exception d'une diminution non significative des teneurs en caroténoïdes.

Comparaison de l'impact des métaux sur les quatre algues

Le métal qui a provoqué le plus de modifications au niveau des variables suivies lors des cultures des quatre espèces est le cuivre. L'enrichissement en cuivre a induit les mêmes effets sur les cultures de *S. costatum* et *P. tricornutum* : une réduction de la croissance associée à une augmentation des teneurs intracellulaires en pigments, en glucides et en protéines. Les teneurs en cuivre les plus élevées ont été mesurées chez *P. tricornutum*. La concentration en cuivre la plus élevée ajoutée au milieu a induit une augmentation de la prise de cuivre dans les cellules de *P. tricornutum* cinq fois supérieures au témoin. La teneur en cuivre des cellules d'*H. ostrearia* est plus élevée que celle observée dans les cellules de *S. costatum* et de *T. suecica*. L'ajout de 0,75 ou 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cuivre dans le milieu induit une accumulation de métal dans les cellules 1,8 fois supérieure à celle observée dans les cellules des cultures témoins. L'accumulation de cuivre dans les cellules d'*H. ostrearia* n'apparaît pas proportionnelle à la concentration en cuivre du milieu, alors que l'accumulation de cuivre dans les cellules des trois autres espèces algales augmente avec sa concentration dans le milieu. Le facteur d'augmentation de la prise de cuivre par rapport au témoin dans les cellules de *S. costatum* est de 1,8 pour une concentration en métal dans le milieu égale à 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ comme pour *H. ostrearia*, tandis que ce facteur est de 4 pour *T. suecica*.

Lors de l'enrichissement du milieu en cadmium, l'augmentation de la prise de ce métal est beaucoup plus importante dans les cultures de *P. tricornutum* que celle observée dans les cultures d'*H. ostrearia* et de *S. costatum*. La teneur en cadmium dans les cellules de *P. tricornutum* cultivées sur le milieu enrichi en cadmium 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ est 50 fois supérieure à celle observée dans les cultures témoins contre des facteurs 4 et 2 observés pour les cultures d'*H. ostrearia* et de *S. costatum*.

Les cultures de *S. costatum* ont présenté une accumulation plus élevée de zinc que les cultures de *H. ostrearia*.

Les teneurs en polysaccharides des cultures d'*H. ostrearia* et de *S. costatum* ont augmenté pour les deux espèces dans les cultures enrichies en cuivre, cette augmentation n'a pas été observée dans les cultures enrichies en cadmium.

IV-3.2.b Cinétique d'accumulation et détermination du métal adsorbé/absorbé chez *Haslea ostrearia* et *Skeletonema costatum*

Expériences de cinétique d'accumulation du ^{109}Cd et du ^{65}Zn réalisées avec des cultures sur eau de mer enrichie à l'A.I.E.A.

Les premières expériences de cinétique d'accumulation du cadmium et du zinc par *H. ostrearia* et *S. costatum* ont été réalisées à l'A.I.E.A. avec des cultures réalisées sur un milieu d'eau de mer enrichie f/2 (Guillard, 1982). Des contrôles « eau de mer » et « milieu f/2 » ont été réalisés pour estimer l'adsorption sur les parois des flacons utilisés et l'absorption sur les membranes en absence de matériel algal. Les premières expériences de désorption des métaux fixés sur la surface algale par l'utilisation du 8-HQS ont également été réalisées sur ces cultures.

Les mesures de la radioactivité provenant des membranes après filtration de l'eau de mer non enrichie sans matériel algal ont montré une rétention moyenne de 1,4% de ^{109}Cd et 0,4% de ^{65}Zn . L'absorption sur les parois des isotopes de cadmium et de zinc est très faible et n'a donc pas pu être estimée.

L'enrichissement de l'eau de mer avec les solutions f/2 (sans EDTA) a induit la formation de matière colloïdale. L'adsorption des métaux sur ces particules a pu être estimée à l'aide du contrôle f/2 : 3,5% du ^{109}Cd et 60% du ^{65}Zn ont été retenus en moyenne sur les membranes de filtration, la première filtration ayant eu lieu 24 heures après l'ajout des isotopes dans le milieu.

L'accumulation journalière des métaux (^{109}Cd et ^{65}Zn) par les algues a ensuite été mesurée sur 8 jours et une cinétique d'accumulation a été tracée (Figure IV-9). La présence des microalgues modifie ce qui a été observé dans le cas du contrôle f/2 puisqu'au premier jour de comptage, les pourcentages de cadmium et de zinc retenu sur les membranes en présence de matériel algal sont inférieurs à celui observée dans le contrôle f/2 : les pourcentages de cadmium retenu par rapport au métal total s'élèvent à 2,6% pour *H. ostrearia* et 2,0% pour *S. costatum* et ceux du zinc à 18,6% et 39,6% respectivement.

Les courbes de prise de cadmium par *H. ostrearia* et *S. costatum* sont semblables alors que les courbes de prise de zinc montrent des cinétiques et des pourcentages de rétention maximale différents pour les deux espèces. En effet, la cinétique d'accumulation de zinc est

plus lente dans les cellules d'*H. ostrearia* que dans les cellules de *S. costatum* et *H. ostrearia* accumule deux fois moins de zinc que *S. costatum*.

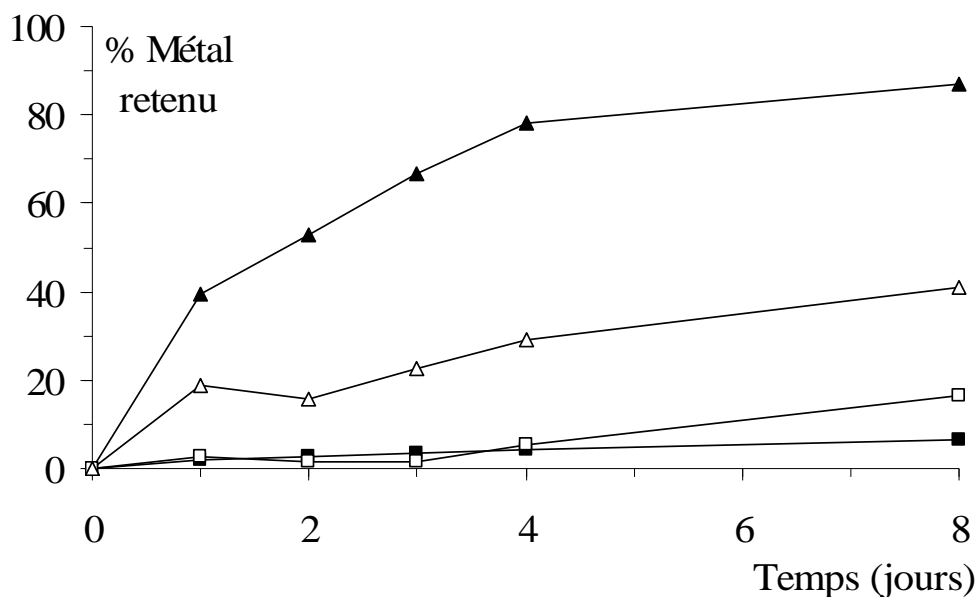


Figure IV-9 Cinétique d'accumulation (adsorption + absorption) du cadmium ^{109}Cd (□, ■) et du zinc ^{65}Zn (△, ▲) chez *Haslea ostrearia* (□, △) et *Skeletonema costatum* (■, ▲)

Au 8^{ème} jour, les métaux fixés sur la surface extérieure des algues ont été désorbés à l'aide du chélateur 8-HQS. La prise de cadmium et de zinc apparaît être au huitième jour de culture essentiellement due à une adsorption du métal sur la surface algale : 98% de cadmium et 98% de zinc sont désorbés dans le cas d'*H. ostrearia* et 51% de cadmium et 75% de zinc dans le cas de *S. costatum*.

Expériences de cinétique d'accumulation réalisées avec des cultures sur milieu artificiel DAM

Des cultures de *H. ostrearia* et de *S. costatum* ont été réalisées sur le milieu artificiel DAM enrichi avec $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium. Comme la phase de latence pour la culture d'*H. ostrearia* est plus longue que celle de *S. costatum*, l'ajout de cadmium a été effectué au 4^{ème} jour de culture.

La prise de cadmium par les algues a été suivie en fonction du temps en déterminant la concentration en cadmium dans le milieu (Figure IV-10).

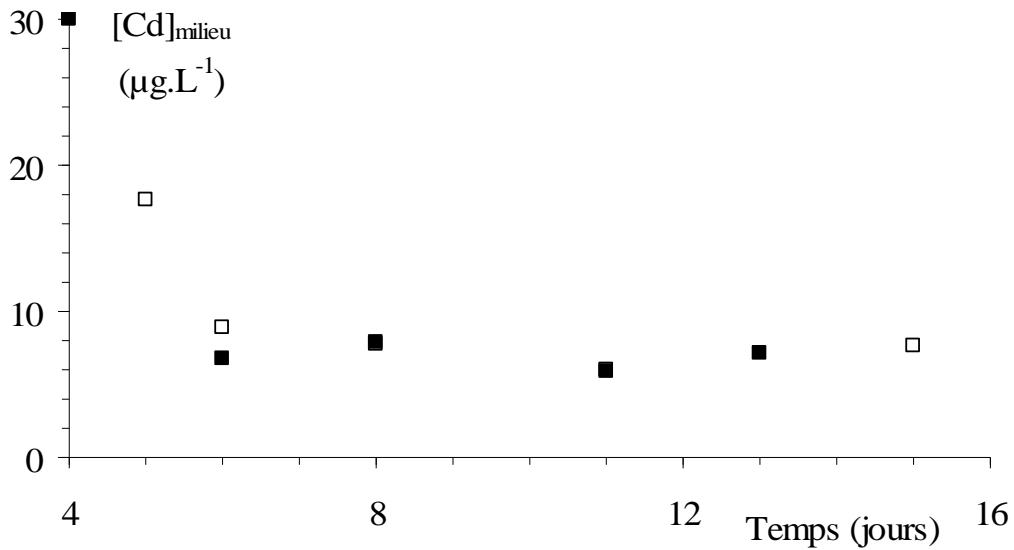


Figure IV-10 Courbes de disparition du cadmium du milieu en fonction du temps dans les cultures de *Haslea ostrearia* (□) et de *Skeletonema costatum* (■) cultivées sur le milieu artificiel DAM enrichi en cadmium

Comme dans les premières expériences réalisées avec les isotopes, la prise de cadmium est semblable (cinétique et quantité) pour les deux espèces algales. Cependant, les densités en cellules finales sont égales pour *H. ostrearia* à 120 000 cellules.mL⁻¹ et pour *S. costatum* à 1 200 000 cellules.mL⁻¹. Les teneurs en cadmium dans les cellules d'*H. ostrearia* sont dix fois plus élevées (0,62 µg.g⁻¹) que celles mesurées dans les cellules de *S. costatum* (0,06 µg.g⁻¹).

Les résultats de la désorption montrent que 54% du cadmium pris par *H. ostrearia* est absorbé contre 95% à 100% dans le cas de *S. costatum*.

Les teneurs en cadmium dans les cellules d'*H. ostrearia* et de *S. costatum* sont inférieures dans cette expérience à celles déterminées dans les expériences d'accumulation. La différence entre ces deux types d'expériences est le moment de l'ajout du cadmium : 24h avant l'inoculation algale dans le cas des expériences d'accumulation et à la fin de la phase de latence de croissance dans cette expérience de cinétique. Une dernière expérience sur la cinétique de prise du cadmium a été réalisée sur des cultures de *S. costatum* en phase stationnaire de croissance pour évaluer l'impact de la phase de croissance sur la prise du métal. Cette expérience s'est déroulée sur trois jours ; l'expérience ne pouvait pas se poursuivre plus longtemps sans entrer dans la phase sénescence de la culture algale. Dans cette expérience, la concentration en cadmium dans le milieu est restée stable sur les trois jours ce qui traduit une faible prise de cadmium par les cellules. La teneur en cadmium adsorbé sur la

surface algale, relargué lors de la désorption au 8-HQS, n'a pas pu être déterminée car elle était plus faible que la teneur détectable en DP-ASV.

IV-3.2.c Impact de la production de molécules par la diatomée *Haslea ostrearia* : formation du biofilm, production de marennine et d'exsudats

La diatomée *H. ostrearia* a présenté des caractéristiques différentes des deux autres diatomées *S. costatum* et *P. tricornutum* quant à l'assimilation des métaux. Dans les différences physiologiques ou morphologiques entre ces trois diatomées, la production d'un tapis de mucus et la présence de marennine caractérisent *H. ostrearia*. De plus, la production d'exsudats par *Haslea ostrearia* en réponse à la présence de métaux dans le milieu a été montrée dans les travaux de Koussih (1995). Ces points nous ont donc intéressé et font l'objet des expériences présentées dans cette partie.

Les expériences sur la coloration des polysaccharides produits par la diatomée et sur l'impact de la présence de marennine dans le milieu sur les métaux ont été réalisées sur des milieux enrichis en cuivre parce qu'une accumulation de cuivre et une augmentation de la concentration en exopolysaccharides dans le milieu ont été observées dans les cultures réalisées sur le milieu enrichi en ce métal.

Par contre, pour estimer la capacité de complexation des exsudats, la titration des ligands a été réalisée avec le plomb. La méthode voltampérométrique possède une bonne précision dans la quantification du cadmium et du plomb. Le cuivre et le zinc sont plus assujettis aux interférences. Le cadmium a déjà été décrit précédemment comme s'associant aux chlorures et peu à la matière organique contrairement au plomb qui s'associe facilement à ces molécules organiques. Le plomb semblait donc le métal le plus approprié pour estimer la production d'exsudats des cultures d'*H. ostrearia* et leur impact sur la spéciation métallique.

*Coloration des polysaccharides excrétés par *Haslea ostrearia* au bleu Alcian*

Une augmentation de la production d'exopolysaccharides a été notée dans les cultures d'*H. ostrearia* cultivées sur le milieu artificiel enrichi avec 0,75 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cuivre. Les cultures d'*H. ostrearia* sont caractérisées par la formation d'un tapis dans lequel les cellules sont enchevêtrées, au fond des flacons. Dans cette approche, la coloration de ce tapis de mucus a été réalisée sur les deux cultures témoin et enrichi en cuivre.

La coloration bleu Alcian a mis en évidence la présence de mucopolysaccharides à la surface d'*H. ostrearia* et dans le tapis formé au cours de la culture. Les cellules issues des cultures réalisées sur le milieu enrichi ont montré des colorations plus intenses et « une enveloppe » de polysaccharides autour de la cellule plus épaisse, avec formation de paquet. Le tapis de mucus observé en microscopie photonique est apparu également plus dense en couleur et en épaisseur. Cependant, la quantification de la production de mucus autour de l'algue et dans le tapis *via* un traitement de l'image s'est avérée relativement complexe car il faut prendre en compte la densité en cellules dans un volume donné et définir une échelle de densité de la coloration obtenue.

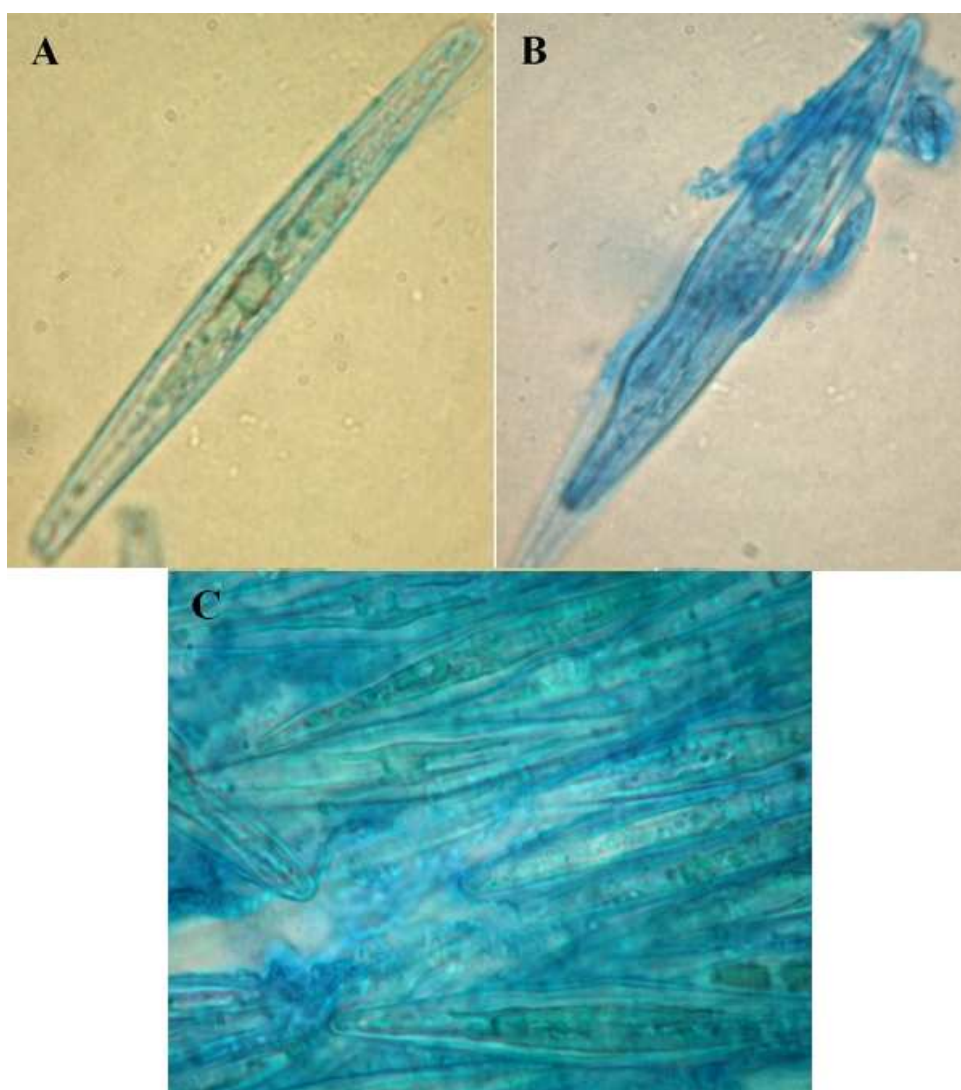


Figure IV-11 Résultats de la coloration au bleu Alcian des cellules d'*Haslea ostrearia*.

A : Cellule issue de la culture témoin sur le milieu artificiel, B : Cellule issue de la culture sur le milieu artificiel enrichi en cuivre à $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, C : Tapis de mucus issu de la culture sur le milieu artificiel enrichi en cuivre à $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Impact de la présence de marennine externe dans les cultures d'Haslea ostrearia sur le cuivre

Des cultures d'*H. ostrearia* ont été réalisées sur le milieu artificiel avec ou sans ajout de marennine externe à une concentration de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et avec ou sans ajout de cuivre à une même concentration. La marennine externe provient de la purification de pâte d'algues issue de cultures d'*H. ostrearia*, suite au protocole mis au point par Pouvreau *et al.* (2006b).

Les courbes de croissance des cultures d'*H. ostrearia* obtenues dans cette expérience sont présentées sur la Figure IV-12.

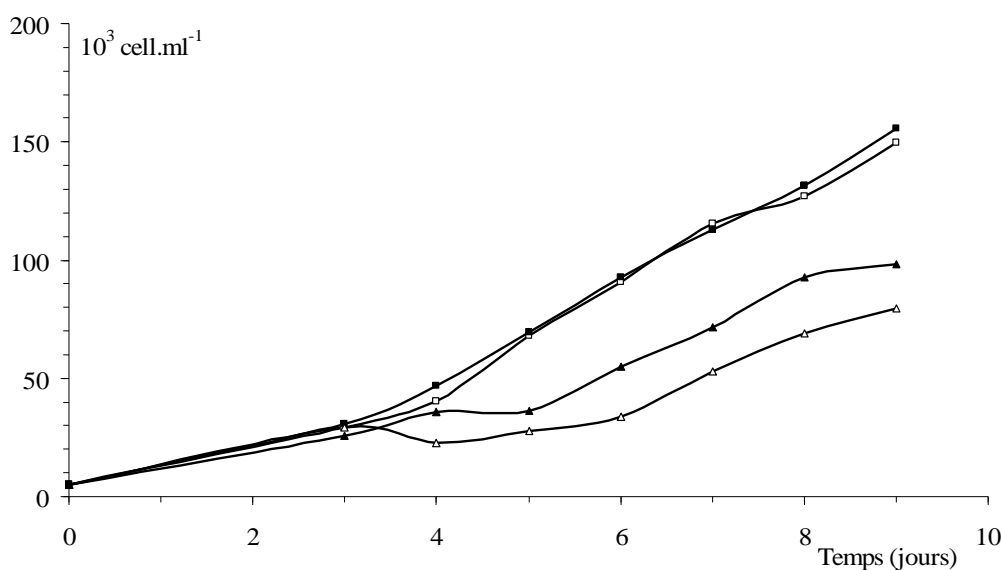


Figure IV-12 Courbes de croissance d'*Haslea ostrearia* cultivées sur milieu artificiel avec ou sans ajout de marennine externe ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et avec ou sans ajout de cuivre ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$)

Cultures d'*H. ostrearia* sur milieu artificiel sans marennine et sans cuivre (témoin) (□)
 Cultures d'*H. ostrearia* sur milieu artificiel sans marennine et avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cuivre (■)
 Cultures d'*H. ostrearia* sur milieu artificiel avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de marennine et sans cuivre (△)
 Cultures d'*H. ostrearia* sur milieu artificiel avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de marennine et avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cuivre (▲)

L'ajout de cuivre n'induit pas de modification de la croissance d'*H. ostrearia* sur le milieu artificiel avec ou sans marennine. Par contre, l'ajout de marennine a un effet négatif sur la densité en cellules et induit une diminution de la densité maximale de 40 à 50%. Les teneurs en pigments, en glucides, en protéines et en marennine interne sont semblables pour toutes les cultures. Aucun effet de la présence de marennine externe dans le milieu sur l'accumulation de cuivre dans les cellules n'a pu être montré.

Les dosages de cuivre dans les différents milieux testés ont montré que la quasi-totalité du cuivre se trouvait, malgré la présence de marennine, sous forme labile (Tableau IV-8). Les concentrations en cuivre sont plus élevées dans les milieux contenant de la marennine car

l'extrait purifié de marennine contient du cuivre. Pouvreau (2006) a montré que la marennine possédait des charges à la surface de la molécule capable d'adsorber des ions cuivriques. Les concentrations en cadmium, en plomb et en zinc ne sont pas modifiées en présence de marennine, l'affinité de la molécule pour le cuivre semble plus importante que pour le zinc présent dans des concentrations semblables dans le milieu initial de préparation de la pâte d'algue.

Tableau IV-8 Concentrations en cuivre dans les milieux, déterminées par DP-ASV.

	Cuivre labile ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cuivre total ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Milieu artificiel DAM	$4,9 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,6$
Milieu enrichi en cuivre ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	$131,0 \pm 8,7$	$135,1 \pm 4,8$
Milieu enrichi en marennine ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	$26,7 \pm 2,6$	$26,0 \pm 1,1$
Milieu enrichi en cuivre et en marennine ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	$137,1 \pm 17,5$	$157,6 \pm 1,9$

Comparaison de la capacité de complexation des milieux en fin de culture d'Haslea ostrearia

Pour estimer l'impact de la production de ces exsudats sur la spéciation métallique dans le milieu de culture, la capacité de complexation du milieu en fin de culture d'*H. ostrearia* a été comparée à la capacité de complexation initiale. Pour évaluer l'impact du milieu choisi, cette expérience a été menée avec des cultures réalisées sur le milieu artificiel DAM et sur un milieu d'eau de mer enrichie (milieu ES1/3 - Provasoli, 1968 ; Robert, 1983).

Les concentrations en ligands et les constantes de stabilité conditionnelle ont pu être déterminées par la méthode graphique (Pardo *et al.*, 1994) et par la méthode de linéarisation de Ruzic (1982).

Tableau IV-9 Valeurs des capacités de complexation (CC) du plomb et des constantes de stabilité conditionnelle associées (log K) dans le milieu artificiel DAM et le milieu d'eau de mer enrichie.

Valeurs déterminées par la méthode graphique et par linéarisation de Ruzic (1982) dans les milieux de cultures avant l'inoculum algal (milieu artificiel et milieu d'eau de mer enrichie) et les jus de culture issus de la filtration des cultures d'*Haslea ostrearia* sur ces milieux

	Méthode graphique		Linéarisation de Ruzic	
	CC ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	log K ($\text{L}.\mu\text{mol}^{-1}$)	CC ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	log K ($\text{L}.\mu\text{mol}^{-1}$)
Milieu de culture avant l'inoculum algal				
DAM	0,2	n.c.	0,2	0,3
Eau de mer enrichie ES1/3	1,1	n.c.	1,5	-
Jus de cultures (filtrat des cultures)				
DAM	0,5	n.c.	0,4	1,5
Eau de mer enrichie ES1/3	1,9	n.c.	1,8	0,8

n.c.: non calculé car la pente de la droite est trop faible
 -: valeur négative de log K, la constante tend vers 0

Les valeurs de capacité de complexation du plomb dans les 4 conditions déterminées par la méthode graphique sont proches de celles calculées après une linéarisation des données.

La capacité de complexation du plomb du milieu artificiel DAM est plus élevée que celle attendue d'après les déterminations précédemment réalisées.

Les capacités de complexation observées dans le milieu artificiel DAM initial et le jus des cultures réalisées sur ce milieu sont plus faibles que celles observées dans le milieu eau de mer enrichie et le jus de cultures réalisées sur ce milieu. Le développement de l'algue sur le milieu artificiel DAM et sur l'eau de mer enrichie induit une augmentation de la concentration en ligands pour le plomb dans le milieu. Les constantes de stabilité ont été difficiles à déterminer en raison de pentes de droite trop faibles. La linéarisation de Ruzic a permis, contrairement à la méthode graphique, d'obtenir des informations sur les constantes de stabilité conditionnelle associées aux ligands. Les ligands produits par *H. ostrearia*, cultivée sur le milieu artificiel DAM, possèdent une affinité plus grande pour le plomb que les ligands initialement présents dans le milieu. Les valeurs déterminées pour les cultures réalisées sur l'eau de mer enrichie tendent vers la même observation.

IV-3.3 Discussion

Contrairement à ce qui a pu être décrit sur la sensibilité d'*Haslea ostrearia* au cuivre dans la littérature (Ettajani *et al.*, 1992), dans nos conditions expérimentales, le cuivre a eu moins d'effet sur *H. ostrearia* que sur *Phaeodactylum tricornutum* ou *Skeletonema costatum*. L'accumulation de cuivre chez *H. ostrearia* est supérieure à celle observée chez *S. costatum* dans les cultures enrichies et dans les témoins. Si on compare les teneurs en cuivre dans les cultures témoins, *H. ostrearia* semble avoir des besoins plus importants en cuivre que *P. tricornutum* et *S. costatum*. Dans le chapitre II, nous avons vu que la croissance d'*H. ostrearia* était corrélée à la concentration en cuivre dans le milieu de culture et, lors de la mise au point du milieu artificiel DAM, l'enrichissement en cuivre du milieu artificiel a permis d'obtenir une meilleure croissance de cette diatomée. Néanmoins, l'accumulation de cuivre dans cette algue n'est pas proportionnelle à la concentration de ce métal dans le milieu. Les teneurs en cuivre dans les cellules d'*H. ostrearia* pour les deux conditions d'enrichissement (0,75 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sont semblables, alors que les teneurs en cuivre dans les cellules de *P. tricornutum* et *S. costatum* augmentent avec la concentration de cuivre dans le milieu.

Les cultures sur les eaux souterraines, réalisées dans le cadre des expériences décrites dans le chapitre II, montrent une faible accumulation de cuivre chez *H. ostrearia* et *Tetraselmis suecica* contre des teneurs plus élevées dans les cellules de *P. tricornutum* et *S. costatum*. La différence entre les teneurs en cuivre accumulées par ces trois algues cultivées sur eaux souterraines salées par rapport à celles observées dans les cultures sur le milieu artificiel peut provenir de la biodisponibilité du cuivre et du statut physiologique de l'algue dans chaque type de milieu. En effet, les cultures sur eau souterraine salée présentent des phases de latence et des phases exponentielles de croissance plus longues ainsi que des densités en cellules moins élevées que les cultures sur milieu artificiel. Des variations de ces paramètres peuvent influencer l'accumulation et la toxicité des métaux (Hörnström, 1990; Franklin *et al.*, 2002).

L'enrichissement en cuivre des milieux de culture induit chez *P. tricornutum* et *S. costatum* les mêmes effets : une diminution de moitié des densités en cellules maximales et une augmentation des teneurs en pigments, en glucides et en protéines. Chez *S. costatum*, ces effets sont associés à une augmentation de la taille au niveau de l'axe peralvaire. Le cuivre doit agir au niveau de la division cellulaire ; ce blocage de la division cellulaire avait été observé dans les travaux sur *S. costatum* de Berland *et al.* (1977) et de Rivkin (1979) et

associé à une inhibition de la prise de silicium (Morel *et al.*, 1978). Les phases de croissance G1 et G2 ne semblent pas être modifiées puisque la cellule augmente en taille et en réserves. On peut supposer que le blocage se situe dans le cycle cellulaire au niveau de la cytodivision. Pour vérifier cette hypothèse, une quantification de l'ADN serait nécessaire pour déterminer si le reste du cycle mitotique (dont la réplication de l'ADN) se déroule normalement ou si le blocage se situe plus en amont de la cytodivision. Il serait également intéressant de vérifier la taille des cellules de *P. tricornutum* pour déterminer si le cuivre a le même effet sur cette diatomée, comme le suggèrent les observations réalisées sur la densité en cellules et les teneurs intracellulaires en pigments, en glucides et en protéines.

La teneur en cadmium dans les cellules d'*H. ostrearia* est moins élevée que celles observées dans les cellules de *P. tricornutum* et *S. costatum*. La teneur en zinc est également moins élevée dans les cellules d'*H. ostrearia* que dans les cellules de *S. costatum*. L'accumulation de cadmium et de cuivre la plus importante est observée pour les cellules de *P. tricornutum*. La résistance et les capacités d'accumulation de métaux par cette diatomée ont déjà été décrits dans la littérature (Braek *et al.*, 1980; Cid *et al.*, 1995, 1996; Torres *et al.*, 1998).

Dans ces expériences d'accumulation des métaux, il est intéressant de voir que les métaux dits essentiels (cuivre et zinc) induisent plus de modifications au niveau des cellules quand ils sont présents en excès, que les métaux non essentiels (cadmium et plomb). Plusieurs travaux ont montré une toxicité supérieure du cuivre à celle du cadmium pour les microalgues (Berland *et al.*, 1976; Brand *et al.*, 1986; Nassiri *et al.*, 1994). Ce phénomène peut être expliqué par la présence de pompes présentes au niveau de la cellule pour l'approvisionnement en métaux essentiels alors que les métaux non essentiels utilisent des voies qui ne leur sont pas propres. En outre, ces métaux sont en compétition, au niveau des sites d'assimilation de métaux de la cellule, avec des métaux essentiels tels que le zinc ou le fer (Simkiss et Taylor, 1995). Ces métaux essentiels ne sont pas en concentrations limitantes dans le milieu artificiel DAM, ce qui peut expliquer la limitation de l'accumulation du cadmium et du plomb dans les cellules et donc de leur toxicité.

Dans les expériences de cinétique menées à l'A.I.E.A., le même phénomène a été observé avec une accumulation de ^{109}Cd plus faible que celle du ^{65}Zn dans les cellules d'*H. ostrearia* et de *S. costatum*. Comme dans les expériences d'accumulation des métaux, la prise

de zinc du milieu par les cellules de *S. costatum* a été supérieure à celle observée par les cellules d'*H. ostrearia*.

La prise de cadmium dans le milieu est semblable pour les deux diatomées en terme de concentration, mais la forme d'accumulation est différente. En effet, une grande partie du cadmium pris par *H. ostrearia* est adsorbé à la surface de la cellule alors que ce métal est pour 50% absorbé par les cellules de *S. costatum*. Si les métaux se retrouvent majoritairement adsorbés sur la surface algale d'*H. ostrearia*, cela peut lui conférer une résistance apparente aux métaux puisque ceux-ci ne sont pas entrés dans la cellule et ne peuvent donc pas interférer avec le métabolisme. Le piégeage des métaux à l'extérieur de la cellule, sur la surface algale par la production de ligands encrés sur la paroi cellulaire, ou dans le milieu par la production d'exsudats est un moyen de contrôler l'entrée des métaux dans la cellule (Gonzales-Davila *et al.*, 2000). La production de polysaccharides à la surface d'*H. ostrearia* paraît plausible étant donné les résultats de la coloration au bleu Alcian. Ces colorations n'ont cependant pas permis de quantifier cette production, notamment en présence d'un excès de cuivre. Le biofilm qui est produit par cette diatomée apparaît également constitué de polysaccharides (coloré au bleu Alcian) et peut donc également être un système de piégeage des métaux. Par ailleurs, il apparaît qu'*H. ostrearia* produit des exsudats qui augmentent la capacité de complexation du plomb dans le milieu et Koussih (1995) a montré une production d'exsudats par cette diatomée qui augmentaient la complexation du cuivre dans le milieu. En limitant la biodisponibilité des métaux dans le milieu, l'entrée de métal dans la cellule est réduite. Enfin, les cellules d'*H. ostrearia* sont au moins cinq fois plus grandes que les autres algues. Cette différence de taille implique une diminution du ratio surface algale/volume cellulaire pour les cellules d'*H. ostrearia* par rapport aux trois autres. Le mode de pénétration des métaux consiste en une phase d'adsorption sur la surface algale, puis une phase d'absorption le plus souvent régulée de manière active (Davies, 1973 ; Santana-Casiano *et al.*, 1995). Une telle régulation apparaît probable étant donné la fraction de métaux adsorbés par rapport à la fraction de métaux absorbés plus faible chez *H. ostrearia*. Les grandes cellules présentent donc une potentialité d'accumulation des métaux inférieure à celle des petites cellules (Khoshmanesh *et al.*, 1997 ; Yan et Pan, 2002). Cette remarque est corroborée par nos propres observations des cultures d'*H. ostrearia*.

Une autre hypothèse dans la résistance aux métaux de la diatomée *H. ostrearia* est la complexation des métaux par la marennine produite par cette algue. Minier *et al.* (1998) ont montré que l'ajout de marennine externe dans le milieu de culture diminuait l'effet toxique du cuivre sur l'activité estérasique. Dans notre étude, la présence de marennine externe a entraîné

une réduction de la croissance d'*H. ostrearia*, mais une diminution de la toxicité du cuivre ou de son accumulation n'a pas pu être montrée. En outre, le cuivre a été déterminé en DP-ASV comme majoritairement sous forme labile, et donc échangeables avec les sites de fixation des métaux sur la surface de l'algue. Dans le milieu artificiel DAM, il a été montré que le cuivre était associé majoritairement à l'EDTA et que ce complexe était labile. Il est possible que, dans le milieu artificiel DAM et en présence de marennine, le cuivre soit associé de façon labile à l'EDTA et à la marennine. Pouvreau (2006) a montré que les ions métalliques n'étaient pas ancrés dans la molécule mais qu'ils interagissaient à la surface de la molécule de marennine par des liaisons de type électrostatique ; un complexe de ce type peut être dissociable et donc se comporter comme un complexe labile. Une diminution de la biodisponibilité du cuivre en présence de marennine externe dans le milieu n'est donc pas exclue mais apparaît peu probable. Étant donné le coût de la production de cette molécule, une titration métallique n'a pas pu être réalisée pour déterminer les capacités de complexation et les constantes de stabilité conférées au milieu par la présence de cette molécule.

Les cellules de *T. suecica*, dans les cultures sur les eaux souterraines salées et dans les expériences d'accumulation du cuivre sur le milieu artificiel DAM, ont également présenté comme *H. ostrearia* une faible accumulation des métaux. Cela paraît discordant avec ce qui a pu être précédemment montré pour cette prasinophycée par Perrein-Ettajani *et al.* (1999) qui trouvent une accumulation de cadmium et de cuivre plus élevée dans les cellules de *T. suecica* que dans celles de *S. costatum* ou par Pérez-Rama *et al.* (2002) qui montrent pour cette algue une bonne capacité à fixer le cadmium présent dans le milieu. Des expériences supplémentaires sur cette algue seraient à réaliser pour formuler des hypothèses sur ces observations.

A partir de ces expériences, il a également été mis en avant l'importance de la phase de croissance de la culture dans le phénomène d'accumulation des métaux. En effet, l'accumulation du métal a été plus importante quand l'enrichissement a été réalisé dès l'inoculum algal par rapport aux autres conditions. Elle a, en effet, diminué lorsque cet ajout a été effectué au début de la phase exponentielle de croissance et elle n'a pas été perceptible quand l'ajout a été réalisé sur une culture en phase stationnaire. Cela rejoint les observations de Hörnström (1990) et de Franklin *et al.* (2002) sur l'impact des densités initiales en cellules. En outre, les cellules algales ont un rythme de division plus intense pendant la phase exponentielle que pendant la phase stationnaire ce qui explique une prise plus faible d'éléments provenant du milieu (Martin-Jézéquel, comm. pers.).

IV-4 Conclusion

Le milieu artificiel DAM mis au point dans cette étude permet la culture d'*Haslea ostrearia* et de 18 autres microalgues sur plusieurs cycles de croissance. Les expériences réalisées sur ce milieu artificiel ont permis de confirmer des observations réalisées dans les expériences de culture sur les eaux souterraines salées. En effet, les diatomées *Phaeodactylum tricornutum* et *Skeletonema costatum* ont présenté des teneurs en métaux supérieures à celles observées dans les cellules d'*Haslea ostrearia* et *Tetraselmis suecica*. Une différence d'accumulation entre les métaux essentiels (cuivre et zinc) et les métaux non-essentiels (cadmium et plomb) dans les algues a pu être mise en avant, impliquant des voies d'assimilation des métaux différentes ou d'une efficacité moindre dans le cas du cadmium et du plomb. Par ailleurs, des variations de l'accumulation des métaux ont pu être reliées à la phase du cycle de croissance et à l'état physiologique associé de l'algue.

L'accumulation du cuivre chez *P. tricornutum* et *S. costatum* a induit une diminution de la croissance associée à une augmentation des teneurs en glucides, en pigments et en protéines. L'augmentation de la taille des cellules de *S. costatum* sur l'axe peralvaire renforce l'hypothèse d'un blocage de la division cellulaire dû à un excès de cuivre. Il resterait à savoir à quelle étape de la mitose le blocage se produit et si la consommation de silicium est inhibée par le métal, ce qui pourrait expliquer ce phénomène.

Pour la diatomée *H. ostrearia*, plusieurs hypothèses sont retenues pour expliquer la faible accumulation de métal et la résistance de cette diatomée à l'excès de métaux :

- la taille de la cellule suggère une faible adsorption des métaux si celle-ci est exprimée par rapport au volume cellulaire,
- la fraction de métal adsorbée élevée par rapport à la fraction de métal absorbée entraîne une régulation active de l'entrée de métal dans la cellule,
- la production de molécules excrétées ou fixées sur la paroi permet de réduire la biodisponibilité des métaux dans le milieu car les polysaccharides mis en évidence à la surface de l'algue et dans le tapis de mucus ont des propriétés chélatrices de métaux (Koussih, 1995 ; Gouvêa, 2005).

La marennine excrétée par *H. ostrearia* ne semble pas être impliquée dans une complexation permettant une réduction de la biodisponibilité des métaux dans le milieu.

Conclusions générales et perspectives

Les eaux souterraines salées découvertes dans le marais Breton le long de la Baie de Bourgneuf sont très utilisées en aquaculture pour la production d'algues destinées au nourrissage des bivalves ou la fabrication de pâte d'algues. Les propriétés géologiques des aquifères ont conféré à ces eaux des caractéristiques proches de celles de l'eau de mer. Cependant, on note, par rapport à celle-ci, un enrichissement en nutriments majeurs et en oligo-éléments adéquats pour la production des microalgues. Les cultures ainsi produites sont d'une qualité nutritive pour les bivalves proche voire supérieure à celle des cultures produites sur eau de mer enrichie, technique utilisée par la plupart des concessions aquacoles pour la production d'algues fraîches. Les eaux souterraines salées représentent donc un atout économique majeur quand on sait que le coût moyen des cultures d'algues sur eau de mer enrichie est égal à 30% des dépenses globales d'une entreprise aquacole. L'enrichissement naturel en métaux a pourtant posé problème dans quelques cultures d'algues sur eau souterraine salée en induisant une accumulation de métal dans les cellules dépassant les normes en vigueur.

Les cultures que nous avons réalisées sur les eaux souterraines salées ainsi que sur l'eau de mer enrichie ont confirmé les bons rendements de production des cultures décrits auparavant. La qualité des microalgues obtenues, inhérente à la qualité du milieu de culture, est équivalente voire supérieure pour les variables retenues dans cette étude (la densité en cellules, les teneurs en pigments, en protéines et en glucides totaux) à la qualité des algues obtenues sur l'eau de mer enrichie. Cependant, les deux eaux souterraines salées provenant des forages de la station Ifremer de Bouin et de la concession aquacole de Monsieur F. Taraud ont présenté des différences notables dans leur composition physico-chimique. Ces différences peuvent être reliées aux variations de la composition des aquifères ainsi que de leur toit et de leur substratum. La réalimentation des nappes semble également être différente entre ces deux zones avec des apports d'eau marine et d'eau douce dans des proportions variables. Ceci expliquerait les différences observées sur la salinité et les concentrations en azote inorganique dissous. Ces variations expliquent les différences observées lors de la production d'algues sur les deux eaux souterraines salées avec un rendement supérieur pour les cultures réalisées sur l'eau souterraine « Ifremer ». La détermination et la quantification des acides gras sont habituellement utilisées pour qualifier les cultures. Des investigations supplémentaires dans ce domaine apporteraient des informations complémentaires à notre

étude sur la qualité des algues obtenues sur les eaux souterraines salées. Une comparaison pourrait être établie avec des algues produites sur eau de mer enrichie.

Les cultures que nous avons réalisées n'ont pas mis en évidence d'accumulation de métal supérieure aux valeurs tolérées d'après les normes en vigueur, à l'exception des teneurs en cadmium de *Skeletonema costatum* cultivée sur l'eau souterraine « Ifremer ». Ce résultat n'est, par ailleurs, pas vérifié statistiquement. L'accumulation en métal observée dans les cultures d'*Haslea ostrearia* dans les expériences précédentes n'a pas été retrouvée dans notre étude. Les teneurs en cadmium et en cuivre de cette diatomée cultivée dans nos conditions expérimentales sont plus faibles que celles observées pour *Phaeodactylum tricornutum* et *Skeletonema costatum* dans ces mêmes conditions et semblables à celles de *Tetraselmis suecica*. Pour déterminer l'origine des différences entre les expériences précédemment menées et les nôtres, il serait intéressant d'étudier l'impact du volume de culture sur l'accumulation, qui est la principale différence entre les protocoles. Par ailleurs, le protocole de récolte des algues diffère entre les expérimentations et cela peut également participer à l'obtention des différents résultats. Une étude des échantillons obtenus par centrifugation ou par filtration consisterait dans une première partie à identifier les particules retenues et à différencier les particules vivantes (les cellules algales) de la matière colloïdale susceptible d'adsorber des métaux. Dans un deuxième temps, l'accumulation de ces matières colloïdales par sédimentation dans les bacs de culture, qui peut se produire dans le cadre des cultures en mode semi-continu, serait ensuite à déterminer pour estimer l'impact de cette réserve potentielle de métaux.

Nous avons également tenté d'expliquer les différences d'accumulation de métal dans les cellules cultivées sur eau souterraine salée ou sur eau de mer enrichie en comparant non seulement les concentrations en métaux totaux mais aussi leur spéciation dans les deux types d'eau. Les titrations réalisées et les expériences en bioessai ont permis de montrer que la part des métaux associés aux particules d'une taille $> 0,45 \mu\text{m}$ était importante par rapport à la complexation par des ligands sous forme dissoute. Pour l'eau souterraine salée, les précipités d'oxydes de fer et de manganèse, produits lors de l'oxygénation rapide de ces eaux lors du pompage, ont un rôle prépondérant dans la complexation du cuivre et du plomb. Des ligands présents dans la fraction dissoute, qui peuvent être liés à la richesse en certains ions et en oxydes de fer de plus petite taille, sont également responsables de la réduction de la biodisponibilité du cuivre, du plomb et du zinc dans ces eaux. L'utilisation de méthodes

complémentaires telles que l'ultrafiltration et la chromatographie, permettrait de caractériser les différents ligands par leur taille et par la présence éventuelle de certains groupements dans leur composition. La détermination de leur affinité pour les métaux serait également plus précise et pourrait nous permettre de prédire les équilibres des métaux entre les ligands présents dans le milieu et les sites d'adsorption présents à la surface des cellules algales.

A l'étude de la spéciation métallique des milieux de culture, l'espèce algale elle-même s'ajoute comme variable explicative des variations d'accumulation. En effet, Roméo et Gnassia-Barelli (1985) ont montré que l'espèce était le facteur le plus important dans les phénomènes d'accumulation des métaux. Une partie de ce travail de thèse a donc consisté dans l'étude de l'accumulation des métaux et de leurs effets sur les quatre diatomées sélectionnées pour l'étude.

Pour cultiver la diatomée *Haslea ostrearia*, un nouveau milieu artificiel DAM a été mis au point permettant sa culture à moyen terme (plusieurs repiquages) avec une production constante de biomasse élevée et l'obtention de cellules en bon état. Le milieu a été testé avec dix-neuf autres microalgues pour élargir son utilisation et permettre d'établir des comparaisons entre les espèces. Les cultures de dix-huit de ces microalgues ont donné de bons résultats sur le milieu artificiel, notamment pour les trois autres algues étudiées dans ce travail (*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*). Les expériences menées sur ce milieu artificiel DAM avec ces quatre algues ont porté sur l'impact des enrichissements en métaux (cadmium, cuivre, plomb et zinc) sur les différentes variables suivies lors des cultures. La sensibilité au cuivre d'*Haslea ostrearia*, précédemment décrite dans la littérature, n'a pas été retrouvée dans notre étude. Nos observations ont pu mettre en évidence un besoin plus important en cuivre pour cette diatomée que pour les trois autres algues dans les trois milieux de culture (eaux souterraines salées, eau de mer enrichie et DAM). Une augmentation de la concentration en métaux dans le milieu de culture n'a par contre pas entraîné comme pour les trois autres algues une augmentation proportionnelle des teneurs en métaux dans les cellules d'*Haslea ostrearia*. Les expériences réalisées sur cette diatomée ont montré que la majeure partie du métal fixé à l'algue était adsorbée sur sa surface. Étant donné les teneurs en métal bioaccumulé en fonction de sa concentration dans le milieu, on peut supposer que l'entrée des métaux dans la cellule est contrôlée par des mécanismes actifs. Pour expliquer cette forte adsorption des métaux à la surface de la diatomée, la production de polysaccharides par la cellule a été mise en évidence. Ces molécules entrent dans la composition du tapis muqueux formé dans les cultures. Par ailleurs,

les cellules en cultures produisent aussi des exsudats qui peuvent limiter la biodisponibilité du métal dans le milieu. Par conséquent, ces productions extracellulaires réduisent la quantité de métal susceptible d'être assimilée par les cellules. Nous n'avons pas pu mettre en avant un rôle potentiel de la marennine, pigment produit par cette diatomée, dans la complexation des métaux comme cela avait été suggéré précédemment par Minier *et al.* (1998).

Phaeodactylum tricornutum a présenté les plus grandes capacités d'accumulation de cadmium et de cuivre avec peu d'effets sur la croissance. Cette diatomée est connue pour être résistante aux métaux et pour en accumuler de grandes quantités. De la même façon, *Skeletonema costatum* a présenté des capacités d'accumulation assez importantes, bien qu'inférieures à celle de *P. tricornutum*. Les mêmes effets des métaux ont été observés chez ces deux diatomées cultivées sur un milieu enrichi en cuivre et laissent supposer que le phénomène de division cellulaire est inhibé. Des hypothèses sur l'inhibition de l'assimilation du silicium par les cellules algales en présence de cuivre ont été avancées pour expliquer le blocage de la division cellulaire, il reste à les vérifier pour ces algues et à déterminer à quelle étape de la division ce blocage interviendrait. La prasinophycée *Tetraselmis suecica* a également montré une bonne résistance aux métaux et, contrairement aux attentes, une faible accumulation des métaux. Des expériences supplémentaires restent à réaliser pour comprendre ces divergences par rapport à la littérature.

Nous nous étions posé la question de l'impact de la présence d'un frustule chez les diatomées sur l'absorption des métaux, ce qui a pu être étudié grâce au choix de ces quatre algues. En définitive, le frustule semble jouer un rôle peu important dans ces phénomènes. Les essais de dosage de métaux dans les frustules n'ont pas été satisfaisants notamment à cause de la masse réduite de frustules vides et nettoyés récoltés à partir d'une culture. L'emploi de techniques différentes, notamment la microscopie électronique est à envisager pour déterminer le devenir des métaux dans les différents compartiments cellulaires des algues.

Références bibliographiques

-A-

- Abeliovich A., Azov Y., 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Applied environmental Microbiology*, 31, 801-806.
- Achterberg E. P., van den Berg C. M. G., 1994. In-line ultraviolet-digestion of natural samples for trace metal determination using an automated voltammetric system. *Analytica Chimica Acta*, 291, 213-232.
- Achterberg E. P., Braungardt C., 1999. Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters. *Analytica Chimica Acta*, 400, 381-397.
- Ahner B. A., Price N. M., Morel F. M. M., 1994. Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 8433-8436.
- Ahner B. A., Lee J. G., Price N. M., Morel F. M. M., 1998. Phytochelatin concentrations in the equatorial Pacific. *Deep-Sea Research Part I*, 45, 1779-1796.
- Akcaay H., Oguz A., Karapire C., 2003. Study of heavy metal pollution and speciation in Buyuk Menderes and Gediz river sediments. *Water Research*, 37, 813-822.
- Ali I., Aboul-Enein H. Y., 2002. Speciation of arsenic and chromium metal ions by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, 48, 275-278.
- Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Métayer C., Marchand J., 1980. Etude du transfert de Cd, Pb, Cu et Zn dans les chaines trophiques néritiques et estuariennes - I. Etat dans l'estuaire interne de la Loire (France) au cours de l'été 1978. *Water Research*, 14, 665-673.
- Amiard-Triquet C., 1989. Biaccumulation et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines. *Bull. Ecol.*, 20, 129-151.

Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Robert J.-M., Métayer C., Marchand J., Martin J.-L., 1983. Etude comparative de l'accumulation biologique de quelques oligo-éléments métalliques dans l'estuaire interne de la Loire et les zones néritiques voisines (Baie de Bourgneuf). *Cahiers de Biologie Marine*, XXIV, 105-118.

Aminot A., 1983. Elements nutritifs minéraux dissous. *In*: Manuel des analyses chimiques en milieu marin. *CNEXO*, Brest, 93-150.

Anderson M. A., Morel F. M. M., 1978. Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature*, 276, 70-71.

Arab-Joux L., 1999. Etude de la bioaccumulation du cuivre chez différentes espèces de diatomées d'intérêt aquacole : formes physico-chimiques de stockage et influence sur la composition d'un peuplement. *Thèse de doctorat, Université de Nantes*, 150 pp.

-B-

Bacher C., Baud J.-P., 1992. Intensive rearing of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in an upwelling system: optimization of biological production. *Aquatic Living Resources*, 5, 89-98.

Ballan-Dufrançais C., Marcaillou C., Amiard-Triquet C., 1991. Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biology of the cell*, 72, 103-112.

Banton O., Bangoy L. M., 1997. Hydrogéologie : multiscience environnementale des eaux souterraines. *Presses de l'Université du Québec - AUPELF*, Sainte-Foy (Québec), 460 pp.

Barillé L., Bougrier S., Geairon P., Robert M., 1994. Alimentation expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* à l'aide de navicules bleues *Haslea ostrearia* (Simonsen) de différentes tailles. *Oceanologica acta*, 17, 201-210.

Barillé L., Haure J., Pales-Espinosa E., Morançais M., 2003. Finding new diatoms for intensive rearing of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): energy budget as a selective tool. *Aquaculture*, 217, 501-514.

Barnabé G., 1989. Aquaculture. 2^{ème} édition, *Lavoisier*, Paris, 565 pp.

Barret J., 2003. La conchyliculture mondiale et française, site Ifremer, accessible sur <http://www.ifremer.fr/aquaculture/conchyliculture/index.htm>, dernière mise à jour le 09/24/2003, accédé le 01/05/2006.

Batley G. E., Florence T. M., 1976. Determination of the chemical forms of dissolved cadmium, lead and copper in seawater. *Marine Chemistry*, 4, 347-363.

Batley G. E., Florence T. M., 1980. Exchange of comments on scheme for classification of heavy metal species in natural waters. *Analytical Chemistry*, 52, 1960-1962.

Baud J.-P., Bacher C., 1990. Use of saline groundwater for intensive rearing of *Ruditapes philippinarum* juveniles in a nursery system. *Aquaculture*, 88, 157-178.

Baud J.-P., Robert J.-M., Lemoine O., 1991. Potential uses of subterranean salt water for aquaculture on the coast of "Pays de la Loire"(France). *EAS special publication*, 14, 23-24.

Bendschneider K., Robinson R. J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research*, 11, 87-96.

Berges J. A., Franklin D. J., Harrison P. J., 2001. Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *Journal of Phycology*, 37, 1138-1145.

Bergsma J., Konings W. N., 1983. The properties of citrate transport in membrane vesicles from *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 134, 151-156.

Berland B. R., Bonin D. J., Maestrini S. Y., Pointier J. P., 1973. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. III. Réponses de la diatomée *Skeletonema costatum* à différentes concentrations d'éléments nutritifs. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 58, 401-416.

Berland B. R., Bonin D. J., Kapkov V. I., Maestrini S. Y., Arlhac D. P., 1976. Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 282, 633-636.

Berland B. R., Bonin D. J., Guérin O. J., Kapkov V. I., Arlhac D. P., 1977. Action des métaux lourds à des doses subléthales sur les caractéristiques de la croissance chez la diatomée *Skeletonema costatum*. *Marine Biology*, 42, 17-30.

Berthelot M. E. P., 1859. Répertoire de chimie appliquée. 284.

Bodelle J., Margat J., 1980. L'eau souterraine en France. *Masson*, Paris, 208 pp.

Borowitzka M. A., 1999. Economic evaluation of microalgal processes and products. *In*: Cohen Z., Chemicals from microalgae. *Taylor & Francis*, London, 387-409.

Bossuyt B. T. A., Janssen C. R., 2004. Long-term acclimatation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology*, 68, 61-74.

Boutier B., Chiffolleau J.-F., Gonzalez J.-L., Lazure P., Auger D., Truquet I., 2000. Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters : consequences on the Marennes-Oléron bay (France). *Oceanologica acta*, 23, 745-757.

Boye M., van den Berg C. M. G., 2000. Iron availability and the release of iron-complexing ligands by *Emiliana huxleyi*. *Marine Chemistry*, 70, 277-287.

Boyle E. A., Sclater F., Edmond J. M., 1976. On the marine geochemistry of cadmium. *Nature*, 263, 42-44.

Braek G. S., Malnes D., Jensen A., 1980. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. IV. Combined effect of zinc and cadmium on growth and uptake in some marine diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 42, 39-54.

Bragigand V., Berthet B., Amiard J. C., Rainbow P. S., 2004. Estimates of trace metal bioavailability to humans ingesting contaminated oysters. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1893-1902.

Brand L. E., Sunda W. G., Guillard R. R. L., 1983. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *Limnology and Oceanography*, 28, 1182-1198.

Brand L. E., Sunda W. G., Guillard R. R. L., 1986. Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96, 225-250.

Bresson G., 1988. L'eau souterraine salée au service de l'aquiculture nouvelle. *Géologues*, 83-84, 51-53.

Brown M. R., Jeffrey S. W., Garland C. D., 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. *CSIRO Marine Laboratories*, Canberra, 44 pp.

Bruland K. W., Franks R. P., 1979. Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc and nickel at the nanogram per liter level in sea water. *Analytica Chimica Acta*, 105, 233-245.

Bruland K. W., Coale K. H., Mart L., 1985. Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper and lead: an intercomparison of voltammetric and atomic absorption methods. *Marine Chemistry*, 17, 285-300.

Bruland K. W., Rue E. L., Donat J. R., Skrabal S. A., Moffett J. W., 2000. Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample. *Analytica Chimica Acta*, 405, 99-113.

Buffle J., 2006. The key role of environmental colloids/nanoparticles for the sustainability of life. *Environmental Chemistry*, 3, 155-158.

Buffle J., Greter F.-L., Haerdi W., 1977. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Analytical Chemistry*, 49, 216-222.

-C-

Campbell C. D., Hird M., Lumsdon D. G., Meeussen J. C. L., 2000. The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of *Escherichia coli*. *Chemosphere*, 40, 319-325.

Cao Y., Conklin M., Betterton E., 1995. Competitive complexation of trace metals with dissolved humic acid. *Environmental Health Perspectives*, 103, 29-32.

Carvalho A. P., Malcata F. X., 2000. Effect of culture media on production of polyunsaturated fatty acids by *Pavlova lutheri*. *Cryptogamie, Algologie*, 21, 59-71.

Chretiennot-Dinet M. J., Robert R., His E., 1986. Utilisation des "algues-fourrage" en aquaculture. *L'Année Biologique*, 25, 97-119.

Cid A., Herrero C., Torres E., Abalde J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 31, 165-174.

Cid A., Fidalgo P., Herrero C., Abalde J., 1996. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry*, 25, 32-36.

Claisse D., 2000. Surveillance du milieu marin - Travaux du réseau national d'observation de la qualité du milieu marin. *Ifremer*, Nantes, 36 pp.

Claisse D., Beliaeff B., 2000. Tendances temporelles des teneurs en contaminants dans les mollusques du littoral français. In: D. Claisse, Surveillance du milieu marin - Travaux du réseau national d'observation de la qualité du milieu marin. *Ifremer*, Nantes, 16-34.

Clément O., 1987. Les marais de Bourgneuf et des Moutiers en Retz (Loire-Atlantique) : l'évolution d'une zone humide littorale. *Norois*, 34, 27-42.

Coale K. H., Bruland K. W., 1988. Copper complexation in the Northeast Pacific. *Limnology and Oceanography*, 33, 1084-1101.

Coale K. H., Bruland K. W., 1990. Spatial and temporal variability in copper complexation in the North Pacific. *Deep-Sea Research*, 37, 317-336.

Coffin E. V., 2000. Mise au point d'un milieu de culture artificiel pour l'optimisation de la production d'une diatomée marine : *Haslea ostrearia* Simonsen. Rapport de Travail d'Etude de Recherche de la Maîtrise de Biologie des populations et des Ecosystèmes, Université de Nantes, 18 pp.

Coleman J. E., 1998. Zinc enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 222-234.

Corlay J.-P., Le Rhun P.-Y., 1986. Le Marais Breton. *Penn Ar Bed*, 16, 33-61.

Correia Dos Santos M. M., Vilhena M. F., Simoes Gonçalves M. L. S., 2001. Interaction of lead(II) with sediment particles : a mercury microelectrode study. *Analytica Chimica Acta*, 441, 191-200.

Côté R., 1983. Aspects toxiques du cuivre sur la biomasse et la productivité du phytoplancton de la rivière de Saguenay, Québec. *Hydrobiologia*, 98, 85-95.

Coutteau P., Sorgeloos P., 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalves molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*, 11, 467-476.

Cresswell R. C., Syrett P. J., 1981. Uptake of nitrate by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 32, 19-25.

-D-

Davies A. G., 1973. The kinetics of and a preliminary model for the uptake of radio-zinc by *Phaeodactylum tricornutum* in culture. *Symposium on the Interaction of Radioactive Contaminants with the Constituents of the Marine Environment. International Atomic Energy Agency Proceedings Series*, Seattle WA (USA), 403-420.

Deaver E., Rodgers J. H. J., 1996. Measuring bioavailable copper using anodic stripping voltammetry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 1925-1930.

Devez A., 2004. Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur les écosystèmes aquatiques. Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts (ENGREF), 239 pp.

Lameyre J., 1975. Roches et minéraux. Les matériaux, vol.1. *Doin éditeurs*, Paris, 128 pp.

Dubois F., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

Duinker J. C., Kramer C. J. M., 1977. An experimental study on the speciation of dissolved zinc, cadmium, lead and copper in river rhine and north sea water, by differential pulsed anodic stripping voltammetry. *Marine Chemistry*, 5, 207-228.

Dzombak D. A., Morel F. F. M., 1990. Surface complexation modeling : hydrous ferric oxide. *John Wiley and Sons*, New-York, 393 pp.

-E-

Eisler R., 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Patuxent Wildlife Research Center - US Fish and Wildlife Service*, Laurel (Maryland), 30 pp.

El Hourch M., 2002. Optimisation des méthodes électrochimiques et spectroscopiques à l'aide de plans d'expériences dans l'étude des interactions métaux-biota - Applications à diverses problématiques environnementales. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 227 pp.

Errecalde O., Seidl M., Campbell P. G. C., 1998. Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum* : an exception to the free-ion model. *Water Research*, 32, 419-429.

Ettajani H., Pirastru L., 1992. Méthodologie pour prévoir le transfert des métaux lourds dans les chaînes trophiques marines incluant les mollusques filtreurs. *Hydroécologie Appliquée*, 4, 79-90.

Ettajani H., Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., 1992. Etude expérimentale du transfert de deux éléments traces (Ag, Cu) dans une chaîne trophique marine : eau - particules (sédiment naturel, microalgue) - mollusques filtreurs (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Water, Air and Soil Pollution*, 65, 215-236.

Ettajani H., Berthet B., Amiard J. C., Chevolut L., 2001. Determination of cadmium partitioning in microalgae and oysters contribution to the assessment of trophic transfer. *Archives of environmental Contamination and Toxicology*, 40, 209-221.

-F-

Ferris F. G., Hallberg R. O., Lyven B., Pedersen K., 2000. Retention of strontium, cesium, lead and uranium by bacterial iron oxides from a subterranean environment. *Applied Geochemistry*, 15, 1035-1042.

Florence T. M., 1982. The speciation of trace elements in waters. *Talanta*, 29, 345-364.

Florence T. M., Batley G. E., 1980. Exchange of comments on scheme for classification of heavy metal species in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 52, 1960-1962.

Flores E., Frías J. E., Rubio L. M., Herrerro A., 2005. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83, 117-133.

Franklin N. M., Stauber J. L., Apte S. C., Lim R. P., 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 742-751.

-G-

Gavis J., Guillard R. R. L., Woodward B. L., 1981. Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. *Journal of Marine Research*, 39, 315-333.

Gélabert A., Pokrovsky O. S., Reguant C., Schott J., Boudou A., 2005. A surface complexation model for cadmium and lead adsorption onto diatom surface. *Journal of Geochemical Exploration*, 88, 110-113.

Giri B. S., Chowdary Y. B. K., 1992. Trace element nutrition in diatoms. I. Copper, zinc, manganese and iron requirement. *Acta Botanica Indica*, 20, 189-193.

Gleick P. H., 1993. Water in crisis. A guide to the World's Fresh Water Resources. *Oxford University Press*, New-York, 473 pp.

Gonzales-Davila M., Santana-Casiano J.-M., Perez-Pena J., 1995. Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environmental Science and Technology*, 29, 289-301.

Gonzales-Davila M., Santana-Casiano J.-M., Laglera L. M., 2000. Copper adsorption in diatom cultures. *Marine Chemistry*, 70, 161-170.

Gonzalez J.-L., Dange C., Thouvenin B., 2001a. Spéciation des contaminants métalliques en milieu estuarien : Intérêt de la modélisation et application au cadmium. *Hydroécologie Appliquée*, 13, 37-55.

Gonzalez J.-L., Thouvenin B., Dange C., Fiandrino A., Chiffolleau J.-F., 2001b. Modelling of Cd speciation and dynamics in the Seine estuary (France). *Estuaries*, 24, 1041-1055.

Gouvêa S. P., Vieira A. A. H., Lombardi A. T., 2005. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere*, 60, 1332-1339.

Grasshof K., Johannsen H., 1972. A new sensitive and direct method for the automatic determination of ammonia in seawater. *Journal du Conseil - Conseil international pour l'Exploration de la Mer*, 34, 516-521.

Griscom S. B., Fisher N. S., Luoma S. N., 2000. Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels. *Environmental Science and Technology*, 34, 91-99.

Guillard R. R. L., 1973. Division rates. *In*: Stein J. R., Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press*, New-York, 290-311.

Guillard R. R. L., 1982. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In*: Smith, W. L., Chanley M. H., Culture of Marine Invertebrates Animals. *Plenum Press*, New-York, 108-139.

-H-

Hansson I., 1973. A new set of acidity constants for carbonic acid and boric acid in sea water. *Deep-Sea Research*, 20, 461-478.

Harrison P. J., Waters E. E., Taylor F. J. R., 1980. A broad spectrum artificial medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology*, 16, 28-35.

Hart B. T., 1981. Trace metal complexing capacity of natural waters: a review. *Environmental Technology Letters*, 2, 95-110.

Haure J., Baud J.-P., 1995. Approche de la capacité trophique dans un bassin ostréicole (baie de Bourgneuf). Ifremer, Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes, Nantes, 103 pp.

Haure J., Sauriau P.-G., Baud J.-P., 1996. Effets du vent sur la remise en suspension particulaire en baie de Bourgneuf : conséquences sur la croissance de *Crassostrea gigas*. *Journal de Recherche Océanographique*, 21, 88.

Henrotte J. G., Viza D., Vich J. M., Gueyne J., 1988. Le rôle régulateur du silicium dans la division cellulaire. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences, Série D, Paris*, 306, 525-528.

Hirata K., Tsujimoto Y., Namba T., Ohta T., Hirayanagi N., Miyasaka H., Zenk M. H., Miyamoto K., 2001. Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green algae, *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 24-29.

Hörnström E., 1990. Toxicity test with algae - A discussion on the batch method. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20, 343-353.

Hu S., Lau K. W. K., Wu M., 2001. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, 161, 987-996.

-I-

Idlafkih Z., Cossa D., Meybeck M., 1995. Comportement des contaminants en trace dissous et particulaires dans le Seine. *Hydroécologie Appliquée*, 1-2, 127-150.

Ifremer, 2006. Résultats de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral - Bulletins régionaux de la surveillance, site Ifremer, accessible sur <http://www.ifremer.fr/envlit>, dernière mise à jour le 28/04/2006, accédé le 03/08/2006.

Imber B., Robinson M. G., Pollehne F., 1984. Complexation by diatom exudates in culture and in the field. *In*: Kramer C. J. M., Duinker J. C., Complexation of trace metals in natural waters: proceedings of the international symposium, May 2-6, 1983, Texel, the Netherlands. *Martinus Nijhoff / Dr W. Junk Publishers*, The Hague, Boston, Lancaster, 429-440.

Imber B. E., Robinson M. G., Ortega A. M., Burton J. D., 1985. Complexation of zinc by exudates from *Skeletonema costatum* grown in culture. *Marine Chemistry*, 16, 131-139.

INERIS, 2003. Plomb et ses dérivés - Fiches des données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, site INERIS, accessible sur <http://www.ineris.fr>, dernière mise à jour le 03/02/2003, accédé le 01/08/2006.

INERIS, 2005. Cuivre et ses dérivés - Fiches des données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, site INERIS, accessible sur <http://www.ineris.fr>, dernière mise à jour le 28/02/2005, accédé le 01/08/2006.

INRS, 1997. Cadmium et composés minéraux - Fiche toxicologique n°60, site INRS, accessible sur <http://www.inrs.fr/>, accédé le 01/08/2006.

INRS, 1998. Plomb et composés minéraux - Fiche toxicologique n°59, site INRS, accessible sur <http://www.inrs.fr/>, accédé le 01/08/2006.

INRS, 2002. Zinc et composés minéraux - Fiche toxicologique n°75, site INRS, accessible sur <http://www.inrs.fr/>, accédé le 01/08/2006.

-J-

Jardim W. F., Allen H. E., 1984. Measurement of copper complexation by naturally occurring ligands. *In*: Kramer C. J. M., Duinker J. C., Complexation of trace metals in natural waters: proceedings of the international symposium, May 2-6, 1983, Texel, the Netherlands. *Martinus Nijhoff / Dr W. Junk Publishers*, The Hague, Boston, Lancaster, 1-15.

Jensen A., Rystad B., Melsom S., 1974. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. I. The tolerance of three algal species to zinc in coastal seawater. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 15, 145-157.

Jensen T. E., Rachlin J. W., Jani V., Warkentine B., 1982. An X-ray energy dispersive study of cellular compartmentalization of lead and zinc in *Chlorella saccharophila* (Chlorophyta), *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* (Bacillariophyta). *Environmental and experimental Botany*, 22, 319-328.

Jin L., Gogan N. J., 2000. Copper complexing capacities of freshwaters by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 412, 77-88.

Johansson O., Wedborg M., 1980. The ammonia-ammonium equilibrium in sea water at temperatures between 5 and 25°C. *Journal of Solution Chemistry*, 9, 37-44.

Joux-Arab L., Berthet B., Robert J.-M., 1998. Distribution of copper in the diatom *Haslea ostrearia* Simonsen. *Marine Environmental Research*, 46, 555-558.

-K-

Keller M. D., Selvin R. C., Claus W., Guillard R. R. L., 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology*, 23, 633-638.

Khoshmanesh A., Lawson F., Prince I. G., 1996. Cadmium uptake by unicellular green microalgae. *The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal*, 62, 81-88.

Khoshmanesh A., Lawson F., Prince I. G., 1997. Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal*, 65, 13-19.

Kieffer F., 1991. Metals as essential trace elements for plants, animals and humans. In: E. Merian, Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance. *Weinheim, New-York*, 481-489.

Knauer K., Behra R., Sigg L., 1997. Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 220-229.

Koroleff F., 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *ICES, C. M. 1969/C*, 9, 19-22.

Koussih L., 1995. Contribution à l'étude de la matière organique dissoute excrétée par deux diatomées marines, *Skeletonema costatum*(Grev.) Cleve et *Haslea ostrearia* Simonsen - Rôle dans la complexation des métaux. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 257 pp.

Kozelka P. B., Bruland K. W., 1998. Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb in Narragansett Bay, Rhode Island. *Marine Chemistry*, 60, 267-282.

Kraepiel A. M. L., Chiffoleau J.-F., Martin J.-M., Morel F. M. M., 1997. Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 1421-1436.

Kramer C. J. M., 1986. Apparent copper complexation capacity and conditional stability constants in north Atlantic waters. *Marine Chemistry*, 18, 335-349.

Kucuksezgin F., Kontas A., Altay O., Uluturhan E., Darilmaz E., 2006. Assessment of marine pollution in Izmir Bay: nutrient, heavy metal and total hydrocarbon concentrations. *Environment International*, 32, 41-51.

Kudo I., Kokubun H., Matsunaga K., 1996. Chemical fractionation of phosphorus and cadmium in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Chemistry*, 52, 221-231.

-L-

Lane T. W., Morel F. M. M., 2000. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant physiology*, 123, 345-352.

Laumond F., Copin-Montegut G., Courau P., Nicolas E., 1984. Cadmium, copper and lead in the western Mediterranean sea. *Marine Chemistry*, 15, 251-261.

Laurier F. J. G., Cossa D., Gonzalez J.-L., Breviere E., Sarazin G., 2003. Mercury transformations and exchanges in a high turbidity estuary: the role of organic matter and amorphous oxyhydroxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 3329-3345.

Lavens P., Sorgeloos P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO*, Rome, 295 pp.

Le Faucheur S., Behra R., Sigg L., 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1731-1737.

Lead J. R., Wilkinson K. J., 2006. Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry*, 3, 159-171.

Lee C.-S., Tamaru C. S., 1993. Live larval food production at the Oceanic Institute, Hawaiï. In: J. P. McVey, CRC Handbook of mariculture. Volume 1 Crustacean Aquaculture. *CRC Press, Inc.*, Boca Raton (Florida), 15-28.

Loeffler S., Hochberger A., Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H., 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Letters*, 258, 42-46.

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

Lovley D. R., 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn (IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 55, 259-287.

Lowry G. H., Rosebrough N. J., Faar A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological Chemistry*, 193, 265-275.

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

-M-

Mantoura R. F. C., Riley J. P., 1975. The use of gel filtration in the study of metal binding by humic acids and related compounds. *Analytica Chimica Acta*, 78, 193-200.

Marsh J. B., Weinstein D. B., 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7, 574-576.

Martin J.-M., Windom H. L., 1991. Present and future roles of ocean margins in regulating marine biogeochemical cycles of trace elements. In: Mantoura R. F. C., Martin J.-M., Wollast R., Ocean margin processes in global change. *John Wiley & Sons*, Chichester, New-York, 469.

Martín-Díaz M. L., Blasco J., Gonzáles de Canales M., Sales D., DelValls T. Á., 2005. Bioaccumulation and toxicity of dissolved heavy metals from the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill using *Ruditapes philippinarum*. *Archives of environmental Contamination and Toxicology*, 48, 233-241.

Martin-Jézéquel V., Lopez J., 2003. Silicon - a central metabolite for diatom growth and morphogenesis. In: Müller W. E. G., Progress in molecular and subcellular biology. Springer-Verlag, Berlin, volume 33, 99-124.

- Martoja R., Ballan-Dufrançais C., Jeantet A.-Y., Gouzerh P., Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Berthet B., Baud J.-P., 1988. Effets chimiques et cytologiques de la contamination expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 45, 1827-1841.
- Mehrbach C., Culberson C. H., Hawley J. E., Pytkowicz R. M., 1973. Measurements of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and Oceanography*, 18, 897-907.
- Métras F., 2004. Mieux comprendre les métaux dans l'environnement. La lettre de l'APESA. 27, 1-5.
- Metzger E., Jézéquel D., Prévot F., Sarazin G., Viollier E., 2001. Spéciation du cadmium en mesure directe dans l'estuaire de la Seine, site Institut de Physique du globe à Paris, accessible sur http://www.ipgp.jussieu.fr/rech/lge/pages_indiv/metzger/poster_cdd_2001.pdf, accédé le 30/08/2006.
- Millero F. J., Hawke D. J., 1992. Ionic interaction of divalent metals in natural waters. *Marine Chemistry*, 40, 19-48.
- Minier C., Tutundjian R., Galgani F., Robert J.-M., 1998. Copper tolerance in *Haslea ostrearia* assessed by measurements of in vivo esterase activity. *Marine Environmental Research*, 46, 579-582.
- Miramand P., Fichet D., Bentley D., Guary J.-C., Caurant F., 1998. Concentrations en métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn) observées le long du gradient de salinité dans le réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Seine. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences Paris, Sciences de la terre et des planètes*, 327, 259-264.
- Miramand P., Ferchaud R., Pigeot J., Caurant F., Bustamante P., Guyot T., 2002. Estimation of the Cd intake in the human dietary from the shellfish caught in the seashore of Charente-Maritime (France). *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153, 741-746.

- Moreau C., 1996. Des eaux souterraines salées en Baie de Bourgneuf pour la production de microalgues en aquaculture : l'azote ammoniacal, le fer et le manganèse dissous, causes de la variabilité de la fertilité potentielle pour trois diatomées-tests. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 276 pp.
- Morel F. M. M., Hering J. G., 1993. Principles and applications of aquatic chemistry. *Wiley and sons*, New York, 588 pp.
- Morel N. M. L., Rueter J. G., Morel F. M. M., 1978. Copper toxicity to *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 14, 43-48.
- Morel F. M. M., Rueter J. G., Anderson D. M., Guillard R. R. L., 1979. Aquil: a chemically defined phytoplankton culture medium for trace metals studies. *Journal of Phycology*, 15, 135-141.
- Morel F. M. M., Hudson R. J. M., Price N. M., 1991. Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnology and Oceanography*, 36, 1742-1755.
- Morel F. M. M., Reinfelder J. R., Roberts S. B., Chamberlain C. P., Lee J. G., Yee D., 1994. Zinc and carbon co-limitation of marine phytoplankton. *Nature*, 369, 740-742.
- Morelli E., Scarano G., 1995. Cadmium induced phytochelatins in marine alga *Phaeodactylum tricorutum*: effect of metal speciation. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 7, 43-47.
- Morelli E., Scarano G., 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Marine Environmental Research*, 52, 383-395.
- Morelli E., Scarano G., 2004. Copper-induced of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Science*, 167, 289-296.
- Mouget J.-L., Tremblin G., Morant-Manceau A., Morançais M., Robert J.-M., 1999. Long-term photoacclimatation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *European Journal of Phycology*, 34, 109-115.
- Muller-Feuga A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12, 527-534.

Mullin J. B., Riley J. P., 1955. The spectrophotometric determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to seawater. *Analytica Chimica Acta*, 12, 162-170.

Murphy J., Riley J. P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.

Musy A., 2003. Cycle et bilan hydrologiques, site accessible sur <http://hydram.epfl.ch/e-drologie/chapitres/chapitre1/chapitre1.html>, dernière mise à jour en 2003, accédé le 21/07/2006.

Muyssen B. T. A., Janssen C. R., 2001. Zinc acclimation and its effect on the zinc tolerance of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* in laboratory experiments. *Chemosphere*, 45, 507-514.

Myklestad S., 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29, 161-179.

Myklestad S. M., Skanoy E., Hestmann S., 1997. A sensitive and rapid method for analysis of dissolved mono- and polysaccharides in seawater. *Marine Chemistry*, 56, 279-286.

-N-

Nassiri Y., 1995. Approche par microscopie électronique à transmission analytique des mécanismes de toxicité et de bioaccumulation du cadmium et du cuivre chez *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica* et *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 207 pp.

Nassiri Y., Ginsburger-Vogel T., 1995a. EELS investigation of cadmium and copper in contaminated microalga *Tetraselmis suecica*. "Trinoculaire" de Microscopies Electroniques, Lausanne, 221.

Nassiri Y., Ginsburger-Vogel T., 1995b. Toxic action of cadmium and copper on the diatom *Skeletonema costatum* : an atem study. "Trinoculaire" de Microscopies Electroniques, Lausanne, 221.

- Nassiri Y., Ginsburger-Vogel T., Mansot J. L., Wéry J., 1994. Ultrastructural characterization of cadmium and copper in marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher. *International conference on electrical machines*. Paris, 823-824.
- Nassiri Y., Ginsburger-Vogel T., Mansot J.-L., Wéry J., 1996. Effects of heavy metals on *Tetraselmis suecica* : ultrastructural and energy-dispersive X-ray spectroscopic studies. *Biology of the cell*, 86, 151-160.
- Nassiri Y., Mansot J. L., Wéry J., Ginsburger-Vogel T., Amiard J.-C., 1997. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33, 147-155.
- Nassiri Y., Robert J.-M., Rincé Y., Ginsburger-Vogel T., 1998. The cytoplasmic fine structure of the diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyceae) in relation to marennine production. *Phycologia*, 37, 84-91.
- Natarajan K. V., 1970. Toxicity of ammonia to marine diatoms. *Journal - Water Pollution Control Federation*, 42, 184-190.
- Neubecker T. A., Allen H. E., 1983. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. *Water Research*, 17, 1-14.
- Neuville D., Daste P., 1971. Observation concernant la production de pigment bleu par la Diatomée *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory maintenue en culture unicellulaire sur un milieu synthétique. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris (série D)*, 272, 2232-2234.
- Ng T. Y.-T., Amiard-Triquet C., Rainbow P. S., Amiard J. C., Wang W.-X., 2005. Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Marine Ecology - Progress Series*, 299, 179-191.
- Nierop K. G. J., Jansen B., Vrugt J. A., Verstraten J. M., 2002. Copper complexation by dissolved organic matter and uncertainty assessment of their stability constants. *Chemosphere*, 49, 1191-1200.
- Nriagu J. O., Pacyna J. M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.

Nürnberg H. W., 1982. Voltammetric trace analysis in ecological chemistry of toxic metals. *Pure and Applied Chemistry*, 54, 853-878.

Nürnberg H. W., 1983. Investigations on heavy metal speciation in natural waters by voltammetric procedures. *Fresenius Z Analytische Chemie*, 316, 557-565.

-O-P-

O'Shea T. A., Mancy K. H., 1976. Characterisation of trace metal-organic interactions by anodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry*, 48, 1603-1607.

Pajot R., 2006. L'aquaculture en Pays de la Loire, site Aqualog engineering and publications: aqualog international, accessible sur <http://www.aqualog-international.com/en/regpaloi.htm>, dernière mise à jour le 07/06/2006, accédé le 25/07/2006.

Pardo R., Barrado E., Vega M., Deban L., Tascón M. L., 1994. Voltammetric complexation capacity of waters of the Pisuerga river. *Water Research*, 28, 2139-2146.

Pérez-Rama M., Herrero López C., Abalde Alonso J., Torres Vaamonde E., 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2061-2066.

Pérez-Rama M., Abalde Alonso J., Herrero López C., Torres Vaamonde E., 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*, 84, 265-270.

Perrein-Ettajani H., Amiard J.-C., Haure J., Renaud C., 1999. Effets des métaux (Ag, Cd, Cu) sur la composition biochimique et compartimentation de ces métaux chez deux microalgues *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 56, 1757-1765.

Phinney J. T., Bruland K. W., 1994. Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science and Technology*, 28, 1781-1790.

- Phinney J. T., Bruland K. W., 1997. Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 2046-2053.
- Pigeot J., Miramand P., Guyot T., Fichet D., 2002. Estimation des quantités et des flux de cadmium et de plomb associés au compartiment biologique benthique du bassin de Marennes-Oléron. *Institut océanographique, Actes du Colloque "5ème colloque International de Limnologie Océanographie"*, La Rochelle, 9 au 11 septembre 2002.
- Pirastu L., 1994. Une eau salée souterraine de la Baie de Bourgneuf : caractéristiques physico-chimiques, biodisponibilité des phosphates et fertilité potentielle de la diatomée *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 198 pp.
- Pizeta I., Branica M., 1997. Simulation and fitting of anodic stripping voltammetry data for determination of the metal complexing capacity. *Analytica Chimica Acta*, 351, 73-82.
- Plasvic M., Krznaric D., Branica M., 1982. Determination of the apparent copper complexing capacity of seawater by anodic stripping voltammetry. *Marine Chemistry*, 11, 17-31.
- Pouvreau J.-B., 2006. Purification et caractérisation du pigment bleu-vert « marennine » synthétisé par la diatomée marine *Haslea ostrearia* (Gaillon/ Bory) Simonsen ; propriétés physico-chimiques et activités biologiques. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 252 pp.
- Pouvreau J.-B., Morançais M., Fleury F., Rosa P., Thion L., Cahingt B., Zal F., Fleurence J., Pondaven P., 2006a. Preliminary characterisation of the blue-green pigment "marennine" from the tythropelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Applied Phycology*, Accepté le 8 mars 2006.
- Pouvreau J.-B., Morançais M., Massé G., Rosa P., Robert J.-M., Fleurence J., Pondaven P., 2006b. Purification of the blue-green pigment "marennine" from the marine tythropelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Applied Phycology*, Accepté le 8 mars 2006.
- Price N. M., Harrison G. I., Hering J. G., Hudson R. J., Nirel P. M. V., Palenik, B., Morel F. M. M., 1988. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biological Oceanography*, 6, 443-461.

Price N. M., Morel F. M. M., 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature*, 344, 658-660.

Provasoli L., 1968. Media and prospect for the cultivation of marine algae. *In* : Cultures and Collection of algae. *Watanabe & Hattori, Proc. USA, Japan Conf. Hakone, sept. 1966. Japanese Society of Plant Physiologists*, 63-75.

Provasoli I., McLaughlin J. J. A., Droop M. R., 1957. The development of artificial media for marine algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 25, 392-428.

-R-

Rainbow P. S., Ng T. Y.-T., Shi D., Wang W.-X., 2004. Acute dietary pre-exposure and trace metal bioavailability to the barnacle *Balanus amphitrite*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311, 315-337.

Ranson G., 1927. L'absorption des matières organiques dissoutes par la surface extérieure du corps chez les animaux aquatiques. *Annales de l'Institut Océanographique*, 4, 49-174.

Ranson G., 1937. Le verdissement des huîtres. *Sciences*, 8, 13-24.

Raven J. A., Evans M. C. W., Korb R. E., 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport O₂ evolving organisms. *Photosynthesis research*, 60, 111-149.

Redfield A. C., 1934. On the proportions of organics derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. *In*: James Johnstone Memorial Volume. *University Press*, Liverpool, 176-192.

Reinfelder J. R., Kraepiel A. M. L., Morel F. M. M., 2000. Unicellular C₄ photosynthesis in a marine diatom. *Nature*, 407, 996-999.

Richards F. A., Thompson T. G., 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *Journal of Marine Research*, 11, 156-172.

Rincé Y., 1993. Les Diatomées marines de la région de Basse-Loire : inventaire, distribution spatio-temporelle et devenir expérimental des peuplements naturels d'écosystèmes ostréicoles. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Nantes, 496 pp.

- Rincé Y., Lebeau T., Robert J.-M., 1999. Artificial cell-immobilization: a model stimulating immobilization in natural environments? *Journal of Applied Phycology*, 11, 263-272.
- Ringbom A., 1963. Complexation in analytical chemistry - A guide for the critical selection of analytical methods based on complexation reactions. *Interscience Publishers, a division of John Wiley and Sons*, New-York / London, 305 pp.
- Riso R. D., Le Corre P., Chaumery C. J., 1997a. Rapid and simultaneous analysis of trace metals (Cu, Pb and Cd) in seawater by potentiometric stripping analysis. *Analytica Chimica Acta*, 351, 83-89.
- Riso R. D., Monbet P., Le Corre P., 1997b. Measurement of copper in sea-water by constant stripping analysis (CCSA) with a rotating gold disk electrode. *Analyst*, 122, 1593-1596.
- Rivkin R. B., 1979. Effects of lead on growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Marine Biology*, 50, 239-247.
- Robert J.-M., 1983. Fertilité des eaux des claires ostréicoles et verdissement : utilisation de l'azote par les diatomées dominantes. Thèse de Doctorat d'Etat *es Sciences biologiques*, Université de Nantes, 281 pp.
- Robert J.-M., 1990. An example of development for aquaculture in France: the shellfish-culture polders in the Bay of Bourgneuf. *Bulletin d'Ecologie*, 21, 39-43.
- Robert J.-M., 1992. *Haslea ostrearia* Simonsen: originalités métaboliques et applications. *Cryptogamie, Algologie*, 13, 152-153.
- Robert J.-M., Morançais M., Pradier E., Mouget J.-L., Tremblin G., 2002. Extraction and quantitative analysis of the blue-green pigment "marennine" synthesized by the diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of Applied Phycology*, 14, 299-305.
- Robinson W. E., Ryan D. K., 1986. Metal interactions within the kidney, gill, and digestive gland of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, following laboratory exposure to cadmium. *Archives of environmental Contamination and Toxicology*, 15, 23-30.

Rodier M., 1984. Perturbation dans la nutrition azotée chez une diatomée marine (*Chaetoceros affinis* Lauder Hustedt). Effets sur différentes étapes de la voie métabolique de l'azote minéral : absorption, accumulation et assimilation. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Pierre et Marie Curie, 132 pp.

Rollemberg M. C. E., Simoes Gonçalves M. L. S., Mota A. M., Jimenez F. B., 1999. Determination of stability constants of labile heterogeneous complexes using differential pulse polarography and anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 384, 17-26.

Roméo M., Gnassia-Barelli M., 1985. Metal uptake by different species of phytoplankton in cultures. *Hydrobiologia*, 123, 205-209.

Rouillard I., Robert J.-M., 1992. Variations de la production et de la composition biochimique de la diatomée *Skeletonema costatum* cultivée sur deux types d'eaux souterraines salées enrichies différenciellement en azote et phosphore. *Oceanis*, 18, 157-168.

Roy C., 1992. Utilisation des eaux souterraines salées - Exemple d'application à Noirmoutier. *Géologues*, 97, 37-40.

Rue E. L., Bruland K. W., 1995. Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration / adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Marine Chemistry*, 50, 117-138.

Ruzic I., 1982. Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its formation yield for trace metal speciation. *Analytica Chimica Acta*, 140, 99-113.

-S-

Santana-Casiano J.-M., Gonzales-Davila M., Perez-Pena J., Millero F. J., 1995. Pb²⁺ interactions with the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Marine Chemistry*, 48, 115-129.

Sanz-Medel A., 1998. Toxic trace metal speciation: importance and tools for environmental and biological analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 2281-2285.

Sauriau P.-G., Haure J., Baud J.-P., 1997. Sprinkling: a new method of distributing live algae food in marine coastal ponds used for Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) intensive culture. *Aquaculture Research*, 28, 661-669.

SCE, 1999. SAGE du marais Breton et du bassin versant de la baie de Bourgneuf. Document de synthèse de la réunion thématique "Exploitation de l'eau salée souterraine" de l'Association pour le Développement du Bassin Versant de la baie de Bourgneuf, mai 1999, 29 pp.

Scheinberg I. H., 1991. Copper. *In*: E. Merian, Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance. *Weinheim*, New-York, 893-908.

Schintu M., Koussih L., Chevolut L., Amiard J.-C., Robert J.-M., 1999. Monitoring of labile zinc in cultures of *Skeletonema costatum* using a salt groundwater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42, 207-211.

Schœller H., 1962. Les eaux souterraines. Hydrogéologie dynamique et chimique. Recherche, exploitation et évaluation des ressources. *Masson & Cie*, Paris, 627 pp.

Schubert H., Tremblin G., Robert J.-M., Sagert S., Rincé Y., 1995. In-vivo fluorescence measurement of photosynthesis of *Haslea ostreria* Simonsen in relation to marennine content. *Diatom Research*, 10, 341-349.

S.E.-C.G.V., 2004. Observatoire des nappes salées du Marais Breton et de l'île de Noirmoutier. Réunion intermédiaire de présentation des résultats, 07/09/2004, Rapport au Service Eau - Conseil Général de la Vendée, 19 pp.

Shinn M. B., 1941. A colorimetric method for the determination of nitrite. *Industrial Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 13, 33-35.

Sigg L., Stumm W., Behra P., 1992. Chimie des milieux aquatiques : Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. *Masson*, Paris, 391 pp.

Sillanpaa M., Oikari A., 1996. Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using microtox bioassay. *Chemosphere*, 32, 1485-1497.

Simkiss K., Taylor M. G., 1995. Transport of metals across membranes. *In*: Tessier, A., Turner, D. R. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. *John Wiley & Sons*, New-York, 1-44.

- Skogerboe R. K., Wilson S. A., Osteryoung J. G., 1980. Exchange of comments on scheme for classification of heavy metal species in natural waters. *Analytical Chemistry*, 52, 1960-1962.
- Smith M. A., 1983. The effect of heavy metals on the cytoplasmic fine structure of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). *Protoplasma*, 116, 14-23.
- Sournia A., 1978. Phytoplankton manual. *Muséum d'Histoire Naturelle, UNESCO, Paris*, 337 pp.
- Sprague J. B., 1968. Promising anti-pollutant: chelating agent NTA protects fish from copper and zinc. *Nature*, 220, 1345-1346.
- Stauber J. L., Florence T. M., 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*, 94, 511-519.
- Stauber J. L., Florence T. M., 1989. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Water Research*, 23, 907-911.
- Strickland J. D. H., Parsons T. R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, Ottawa, 311 pp.
- Stumm W., Morgan J. J., 1996. Aquatic chemistry. Chemical equilibria and rates in natural waters, Third edition. *John Wiley and Sons, New-York*, 1022 pp.
- Sullivan C. W., Volcani B. E., 1976. Role of silicon in diatom metabolism. VII. Silicic acid-stimulated DNA synthesis in toluene-permeabilized cells of *Cylindrotheca fusiformis*. *Experimental Cell Research*, 98, 23-30.
- Sunda W., Guillard R. L., 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 34, 511-529.
- Sunda W. G., Huntsman S. A., 1998. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *The Science of Total Environment*, 219, 165-181.

Suzuki R., Fujita Y., 1986. Chlorophyll decomposition in *Skeletonema costatum*: a problem in chlorophyll determination of water samples. *Marine Ecology - Progress Series*, 28, 81-85.

-T-

Tadros M. G., Mbutia P., Smith W., 1990. Differential response of marine diatoms to trace metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 826-831.

Tang D., Morel F. M. M., 2006. Distinguishing between cellular and Fe-oxide-associated trace elements in phytoplankton. *Marine Chemistry*, 98, 18-30.

Tessier A., Turner D. R., 1995. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. *John Wiley & Sons*, New-York, 679 pp.

Thompson P.-A., Couture P., 1991. Short- and long-term changes in growth and biochemical composition of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 21, 135-144.

Tomas C. R., 1997. Identifying Marine Phytoplankton. *Academic Press*, San Diego, 858 pp.

Torres E., Cid A., Fidalgo P., Herrero C., Abalde J., 1997. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Aquatic Toxicology*, 39, 231-246.

Torres E., Cid A., Herrero C., Abalde J., 1998. Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technology*, 63, 213-220.

Turner D. R., Whitfield M., Dickson A. G., 1981. The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25°C and 1 atm pressure. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, 855-881.

Turpin V., Robert J. M., Gouletquer P., 1999. Limiting nutrients of oysters pond seawaters in the Marennes-Oleron Region for *Haslea ostrearia* : applications to the mass production of the diatom in mesocosm experiments. *Aquatic Living Resources*, 12, 335-342.

-V-W-X-Y-

Van Leeuwen H. P., 1999. Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. *Environmental Science and Technology*, 33, 3743-3748.

Van Loon J. C., 1979. Metal speciation by chromatography / atomic spectrometry. *Analytical Chemistry*, 51, 1139A-1150A.

Varney M. S., Turner D. R., Whitfield M., Mantoura R. F. C., 1984. The use of electrochemical techniques to monitor complexation capacity titrations in natural waters. *In: Kramer C. J. M., Duinker J. C., Complexation of trace metals in natural waters: proceedings of the international symposium, May 2-6, 1983, Texel, the Netherlands. Martinus Nijhoff / Dr W. Junk Publishers, The Hague, Boston, Lancaster, 33-46.*

Vasconcelos M. T. S. D., Leal M. F. C., van den Berg C. M. G., 2002. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Marine Chemistry*, 77, 187-210.

Walne P. R., 1979. Culture of bivalves molluscs, 50 years' experience at Conwy. *Fishing News Books*, Farnham, 189 pp.

Wells M. L., Kozelka P. B., Bruland K. W., 1998. The complexation of 'dissolved' Cu, Zn, Cd and Pb by soluble and colloidal organic matter in Narragansett bay, RI. *Marine Chemistry*, 62, 203-217.

Wojcik M., Vangronsveld J., Tukiendorf A., 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response of cadmium. *Environmental and experimental Botany*, 53, 151-161.

Wolfstein K., de Brouwer J. F. C., Stal L. J., 2002. Biochemical partitioning of photosynthetically fixed carbon by benthic diatoms during short term incubation at differences irradiances. *Marine Ecology - Progress Series*, 245, 21-31.

Wong Y. S., Tam N. F. Y., Lau P. S., Xue X. Z., 1995. The toxicity of marine sediments in Victoria Harbour, Hong-Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 464-470.

Wood E., Armstrong F. A. J., Richards F. A., 1967. Determination of nitrate in seawater by cadmium copper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 47, 23-31.

Xue H. B., Sigg L., 1990. Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Water Research*, 24, 1129-1136.

Xue H.-B., Stumm W., Sigg L., 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Research*, 22, 917-926.

Yan H., Pan G., 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, 49, 471-476.

Yang B. Y., Ding Q., Montgomery R., 2002. Extracellular polysaccharides of a bacterium associated with a fungal canker disease of *Eucalyptus sp.* *Carbohydrate Research*, 337, 731-742.

Yee D., Morel F. M. M., 1996. *In vivo* substitution of zinc by cobalt in carbonic anhydrase of a marine diatom. *Limnology and Oceanography*, 41, 573-577.

Annexe 1 : Protocoles de dosages

Dosage de la chlorophylle *a* (Richards et Thompson, 1952 ; Lorenzen, 1967)

Pour estimer la concentration en chlorophylle *a* et en phéopigments d'un échantillon, l'absorbance de l'extrait pigmentaire est mesurée à 665 nm avant et après acidification.

- Les milieux sont filtrés sur des membranes GF-F 2,5. Les membranes sont congelées à -30°C dans l'attente d'être analysées.
- Réactifs
 - Acétone 90 % pour analyses
 - Acide chlorhydrique 20%
- Mode opératoire
 - Le filtre est broyé avec 10 mL d'acétone (mesurés dans une éprouvette graduée) dans un tube à centrifuger. Les tubes sont laissés au froid et à l'obscurité pendant une nuit pour l'extraction.
 - Les tubes sont centrifugés à 3000 tours / min pendant 15 min dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C pour ne pas dégrader la chlorophylle *a*.
 - Le volume d'acétone est mesuré dans une éprouvette graduée de 10 mL. La totalité de l'échantillon est placée dans une cuve en verre OS de 4 cm.
 - L'absorbance de l'échantillon est mesurée à 480, 510, 665 et 750 nm.
 - A l'aide d'une micropipette, 100 μL d'acide chlorhydrique 20% sont introduits dans la cuve et homogénéisés par pipetage-refoulement. Deux minutes après l'acidification, l'absorbance est mesurée de nouveau à 480, 510, 665 et 750 nm.
- Calculs et expression des résultats

- Calcul des absorbances nettes

$$A_{480} = DO_{480} - DO_{750}$$

$$A_{510} = DO_{510} - DO_{750}$$

$$A_{665} = DO_{665} - DO_{750}$$

$$A_{665\text{ ac}} = DO_{665\text{ac}} - DO_{750\text{ac}}$$

$$A_{665\text{ac}} < A_{665}$$

- Expression des résultats

Les teneurs en chlorophylle *a*, phéopigments et caroténoïdes sont données par les formules suivantes :

$$\text{Chlorophylle } a = (26,7 * (A_{665} - A_{665\text{ac}}) * v) / (V * L)$$

$$\text{Phéopigments} = (26,7 * (1,7 * A_{665\text{ac}} - A_{665}) * v) / (V * L)$$

$$\text{Caroténoïdes} = (7,6 * (A_{480} - 1,49 * A_{510}) * v) / (V * L)$$

Avec : - v le volume d'acétone contenant l'extrait (mL)

- V le volume de culture filtré (L)

- L la largeur de la cuve utilisée (cm)

mg.mL⁻¹

Dosage des glucides (Dubois *et al.*, 1956)

Les glucides donnent une couleur orangée lorsqu'ils sont traités avec du phénol et concentrés par l'acide sulfurique. La réaction est sensible et la coloration est stable. Les glucides totaux sont ainsi dosés par spectrophotométrie à 490 nm. Une courbe étalon est effectuée à partir d'une solution de glucose.

- Les milieux sont filtrés sur des membranes GF-F 2,5. Les membranes sont congelées à -30°C dans l'attente d'être analysées.
- Réactifs
 - Solution de phénol à 5 % dans de l'eau distillée à conserver à l'abri de la lumière à 4°C dans un flacon en verre.
 - Solution concentrée d'acide sulfurique H_2SO_4 .
- Mode opératoire
 - Le filtre est placé dans un tube à centrifuger avec 1 mL d'eau distillée.
 - Est rajouté 1 mL de la solution de phénol à 5 %
 - Les tubes sont placés dans la cuve à ultra-sons pendant 40 min à température ambiante en agitation.
 - Sont ajoutés rapidement 5 mL d' H_2SO_4 concentré
 - Les tubes sont homogénéisés aussitôt, puis laissés au repos 10 min.
 - Les tubes sont centrifugés 10 min à 3000 tr / min.
 - Le surnageant est récupéré et la DO est lue à 490 nm dans des cuves en verre (OS).
(la coloration est stable pendant 6 heures)
- Les absorbances des échantillons sont comparées à une gamme étalon établie à partir d'une solution mère de D-Glucose $200 \mu\text{g} / \text{mL}$. La gamme étalon est linéaire sur l'intervalle de 0 (blanc) à $175 \mu\text{g} / \text{mL}$ de D-Glucose.

Dosage des lipides (Marsh & Weinstein, 1966)

L'hydrolyse acide et à chaud des acides gras révèle une coloration brune.

- Réactifs

- Acide sulfurique H₂SO₄ concentré
- Dichlorométhane
- Méthanol

- Mode opératoire

- Le filtre est placé dans un tube à centrifuger avec 1 mL de dichlorométhane et 1 mL de méthanol.
- Les tubes sont placés dans la cuve à ultra-sons pendant ½ heure (la cuve est placée au réfrigérateur) suivie d'½ heure d'extraction à froid.
- Le surnageant est récupéré et transvasé dans un deuxième tube à centrifuger ; l'opération d'extraction est renouvelée sur le premier tube (le surnageant issu de la deuxième extraction est prélevée et versé dans le deuxième tube).
- Dans le deuxième tube contenant le mélange chloroforme / méthanol (au total, 4 mL), sont ajoutés 2 mL d'eau ultra pure ; les tubes sont homogénéisés et laissés une nuit au froid pour décanter.
- La phase supérieure (eau + éthanol) est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et jetée. Les tubes sont placés dans un bloc chauffant à 30°C sous la hotte sous un flux d'azote pour que le reste de solvant s'évapore.
- 2 mL d'H₂SO₄ concentré sont ajoutés sur les lipides ainsi retenus et les tubes non bouchés sont placés dans un bloc chauffant à 200°C pendant 20 min.
- Après refroidissement, 3 mL d'eau ultra pure sont ajoutés avec précaution, les tubes bouchés sont homogénéisés. Attention, la réaction est très exothermique.
- Après refroidissement, la DO est lue à 360 nm dans des cuves en verre.

Ne pas oublier de faire un blanc avec un filtre nu.

- Les résultats sont comparés à une gamme étalon et exprimés en mg d'équivalent glycérol tripalmitate / L.

La gamme étalon est établie à partir de glycérol tripalmitate, la dilution est réalisée avec du dichlorométhane. La solution mère de glycérol tripalmitate est de 1g / L et les concentrations testées vont de 0 à 200 mg/L (0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mg/L).

Prendre 2 mL de chaque tube, verser dans un tube à centrifuger, évaporer sous azote, ajouter 2 mL de H₂SO₄. Chauffer 20 min à 200°C, laisser refroidir, ajouter 3 mL d'eau distillée et homogénéiser. Laisser refroidir et lire la DO à 360 nm.

Dosage des protéines (Lowry *et al.*, 1951)

Un sel de cuivre en milieu alcalin forme un complexe coloré avec les peptides. L'addition du réactif de Folin-Ciocalteu (acide phosphotungstique et molybdique) produit une coloration bleu-foncé due à la fois à la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques et à la réduction de l'acide phosphotungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine.

- Réactifs

- Solution A : carbonate de sodium anhydre ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$) à 2 % dans une solution de soude 0,1 N.
 - Solution B₁ : sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$) à 0,5 % dans l'eau ultra-pure.
 - Solution B₂ : tartrate de sodium / potassium à 1 % dans de l'eau ultra-pure.
- A, B₁, B₂ se conservent environ 2 mois à 4°C.
- Solution C : 100 mL de A + 2 mL de B₁ + 2 mL B₂. La solution C est à préparer au moment de l'analyse. Elle ne se conserve que quelques heures.
 - Solution D : (Réactif de Folin Ciocalteu) : le réactif est dilué au 1/2 avec de l'eau ultra-pure.

- Mode opératoire

- Le filtre est introduit dans un tube à centrifuger avec 1 mL d'eau ultra-pure. Il est broyé avec une canne de verre.
 - 5 mL de la solution C sont ajoutés et les tubes sont laissés 10 min à température ambiante.
 - 0,5 mL de la solution D est ajouté et les tubes sont immédiatement homogénéisés et placés à l'obscurité pendant 1h30 à température ambiante.
 - Les tubes sont centrifugés à 4000 g pendant 20 min.
 - La DO est lue à 750 nm au spectrophotomètre dans des cuves en verre.
 - Les résultats sont exprimés en mg équivalent BSA / L.
- Ne pas oublier de faire un blanc avec un filtre nu.

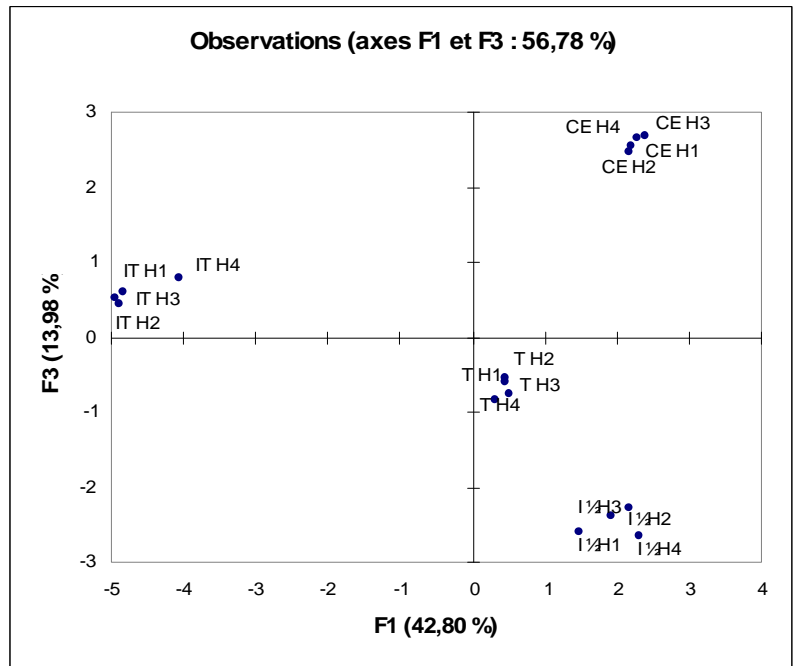
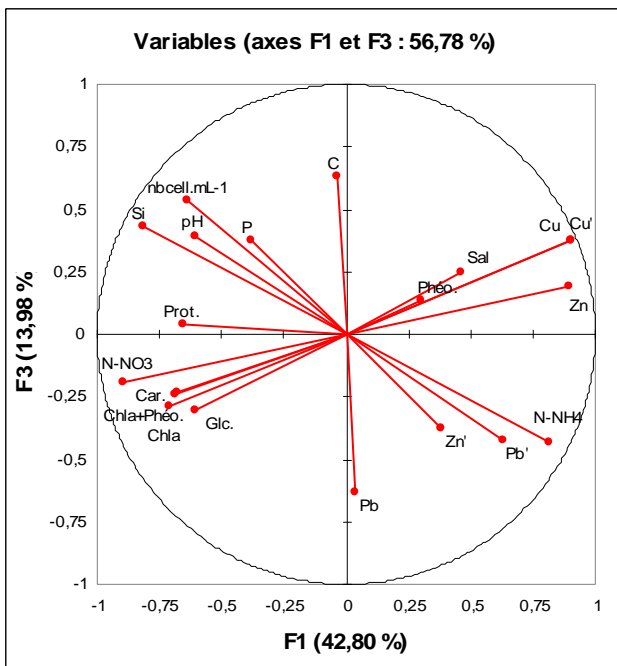
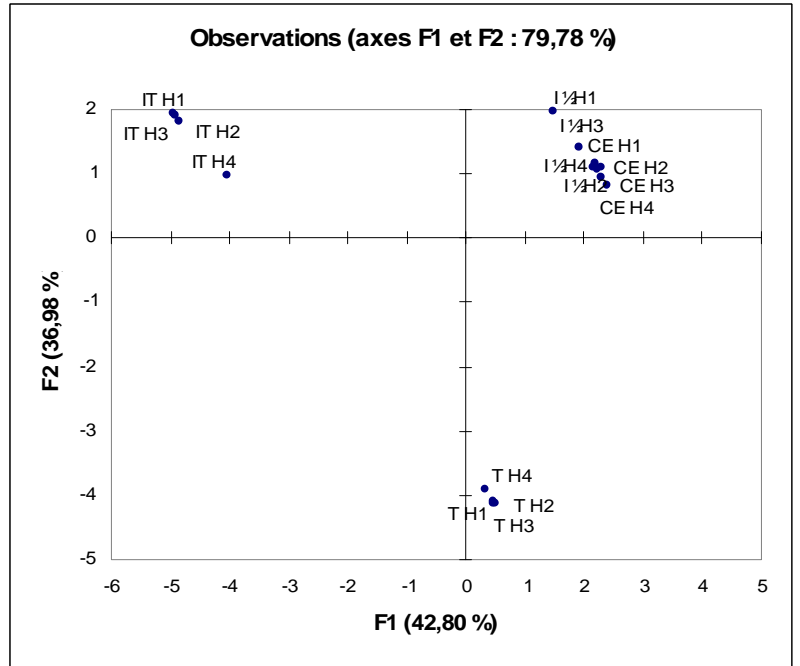
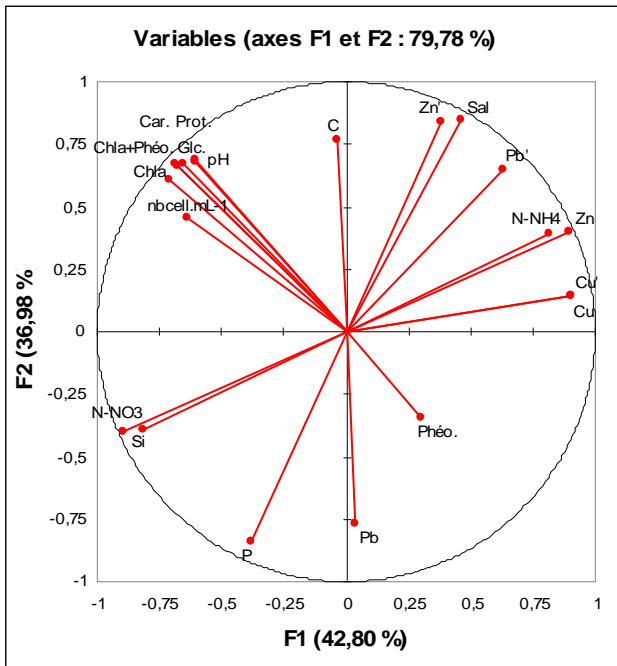
- Gamme étalon

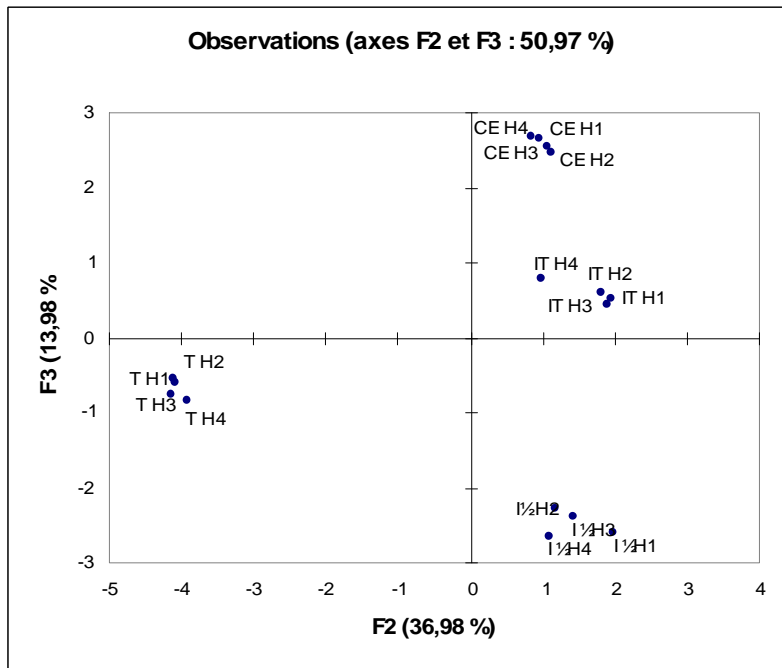
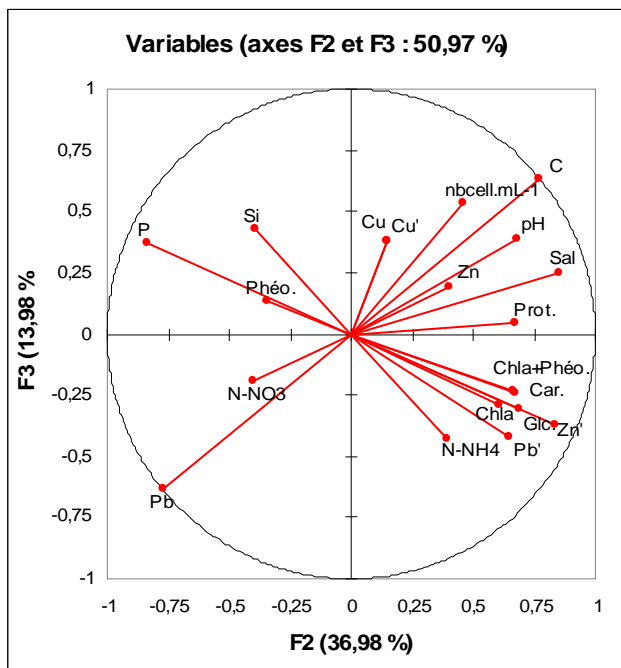
La gamme étalon est établie à partir d'une solution d'albumine (Bovine Serum Albumin BSA) à 1 g / L. Les concentrations testées vont de 0 à 200 mg / L (0, 25, 50, 100, 150, 200).

1 mL de chaque solution fille et 5 mL de la solution C sont introduits dans des tubes. Après 10 min à température ambiante, est ajouté le réactif de Folin (0,5 mL de solution D) ; les tubes sont homogénéisés et placés 1h30 à l'obscurité à température ambiante. La DO est lue à 750 nm.

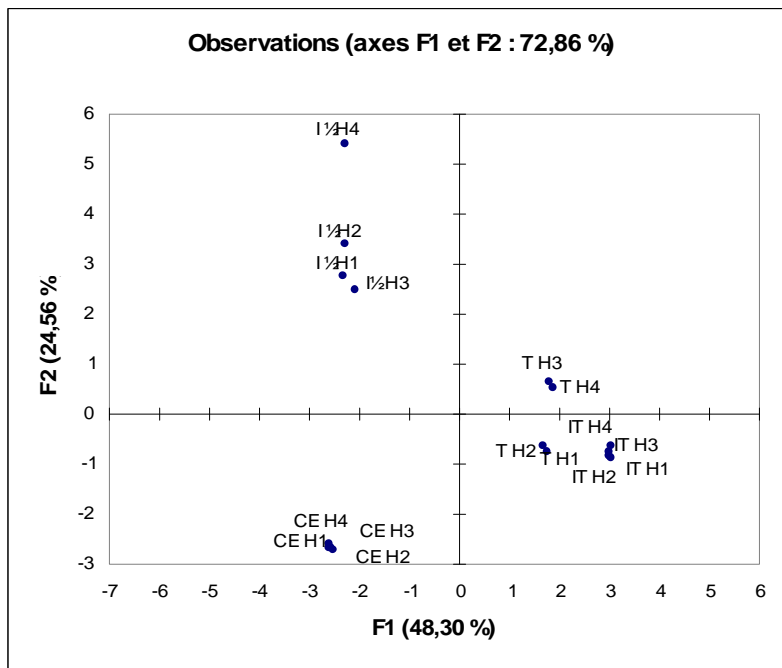
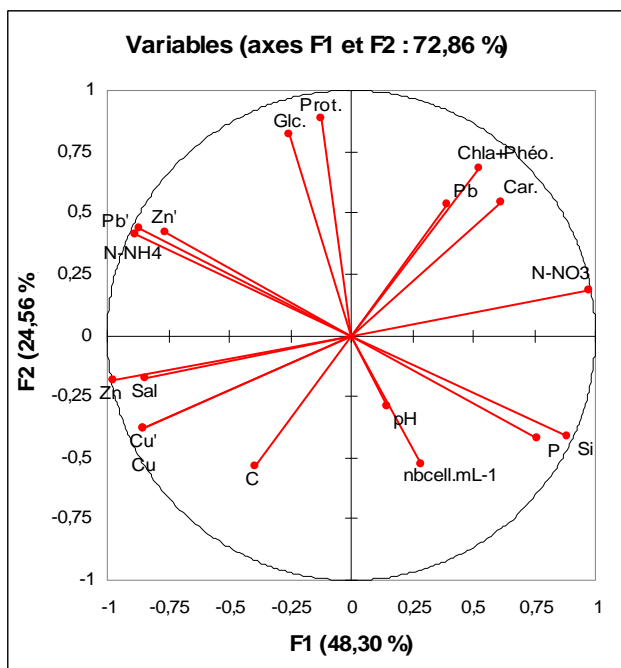
**Annexe 2 : Résultats des analyses en
composantes principales dans l'étude des eaux
souterraines salées utilisées pour les cultures
de microalgues**

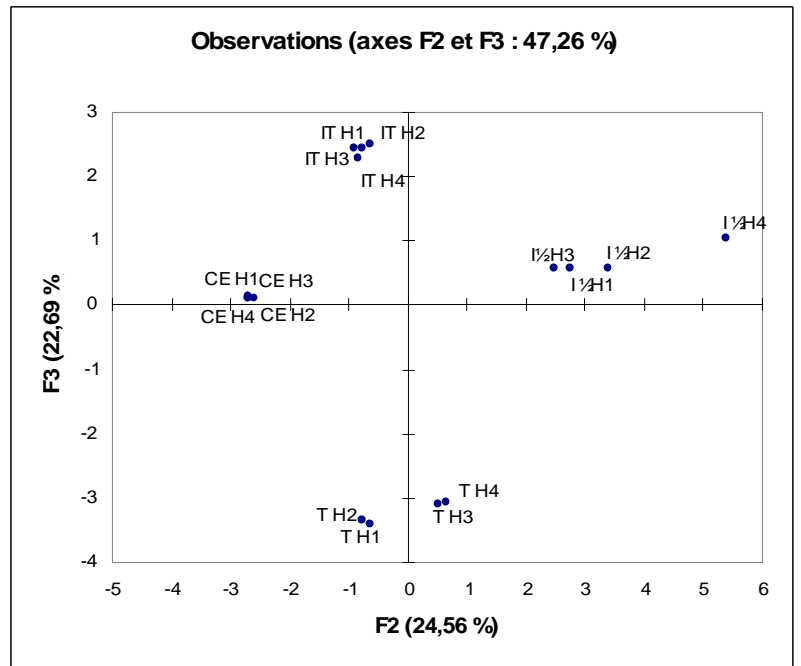
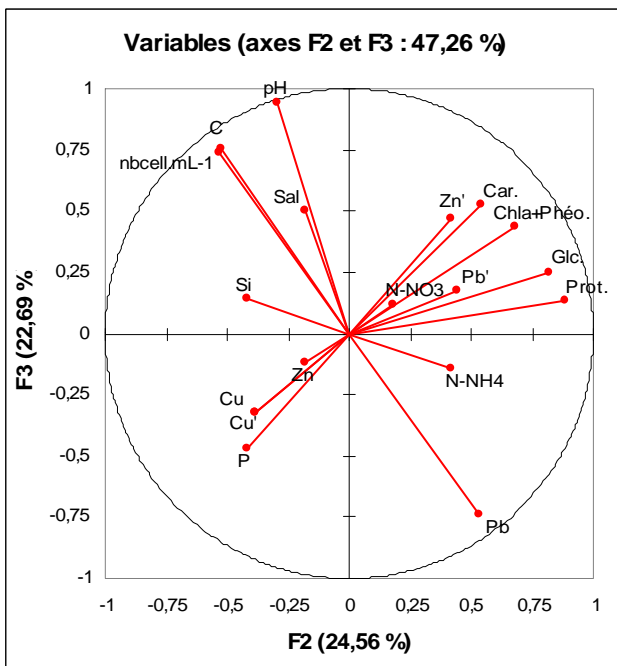
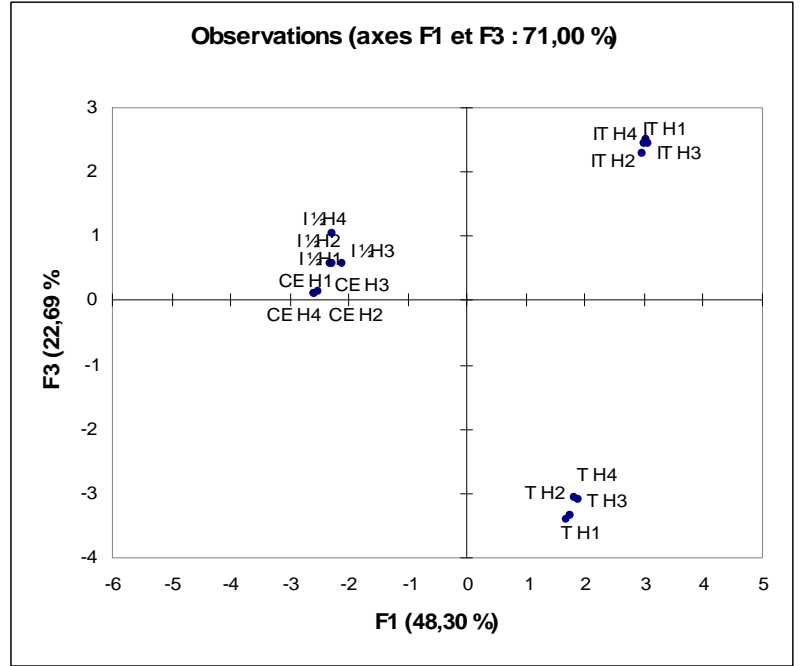
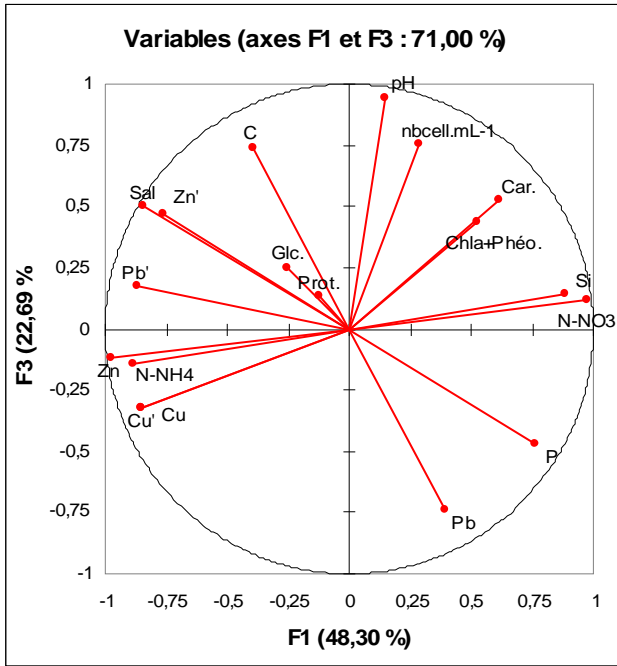
ACP *Haslea ostrearia* données mg.L⁻¹



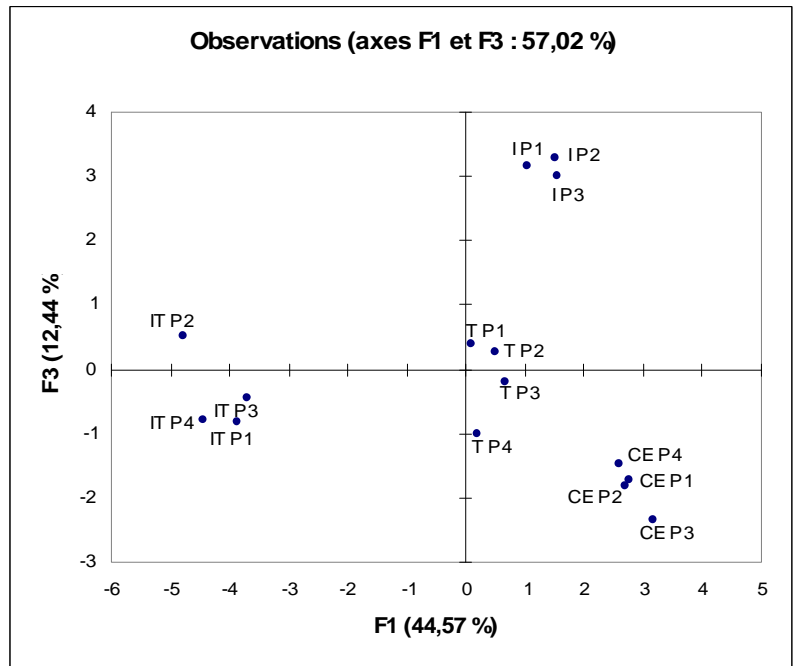
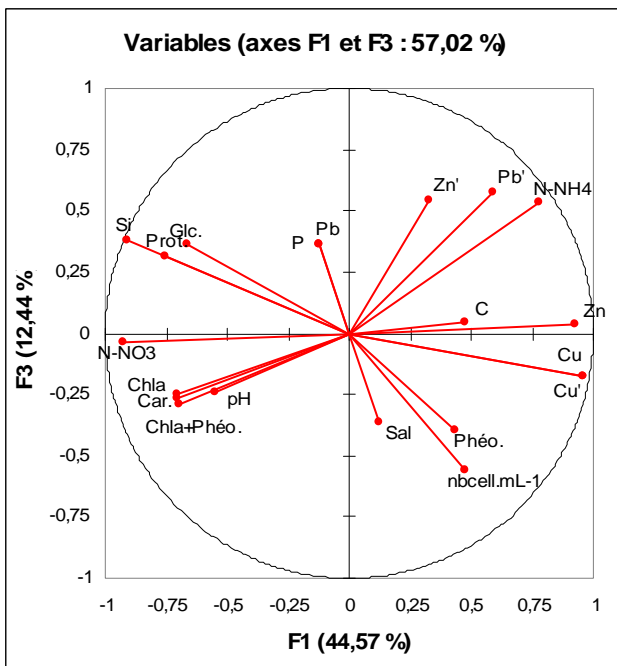
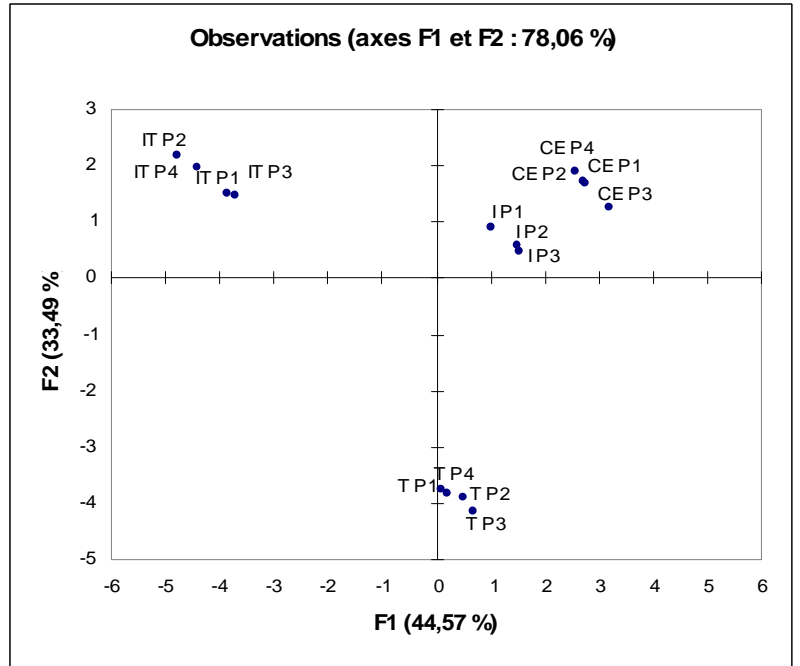
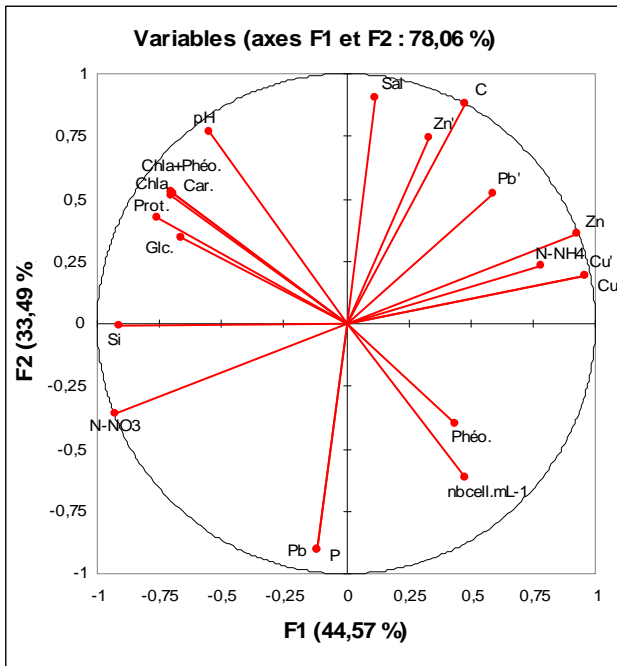


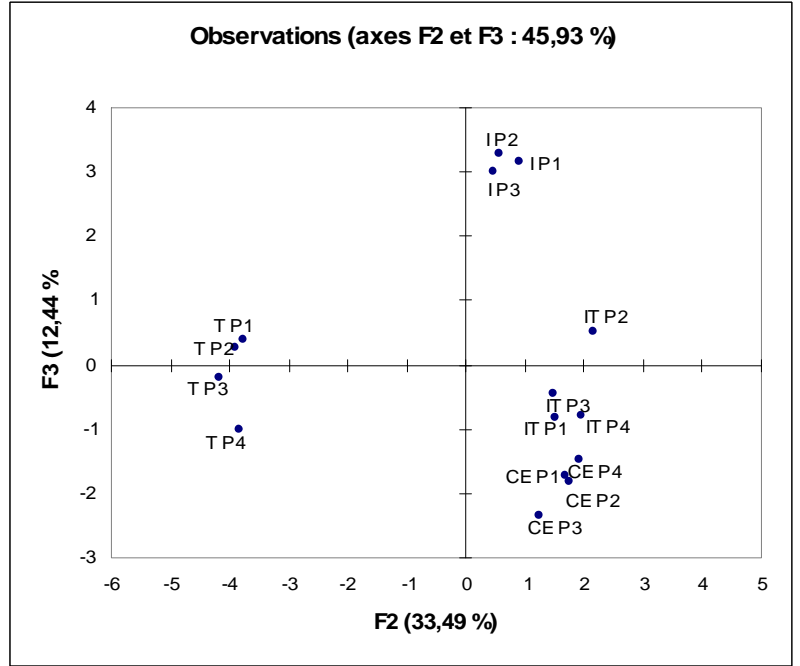
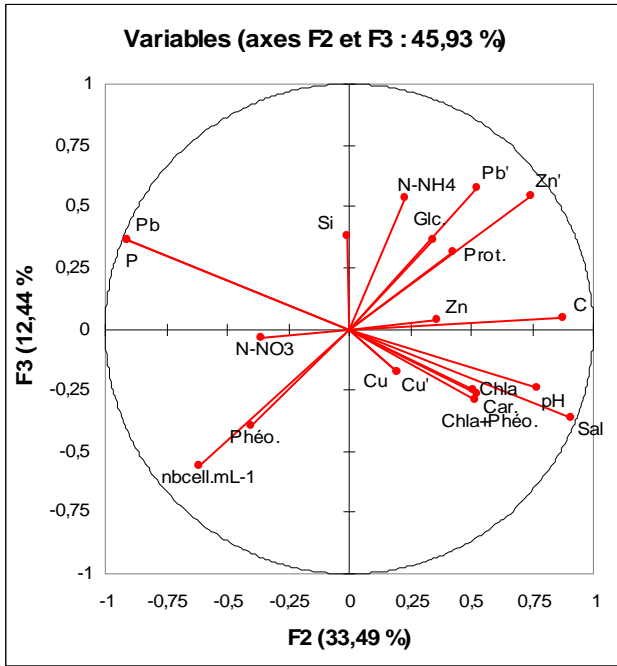
ACP *Haslea ostrearia* données pg.cell⁻¹



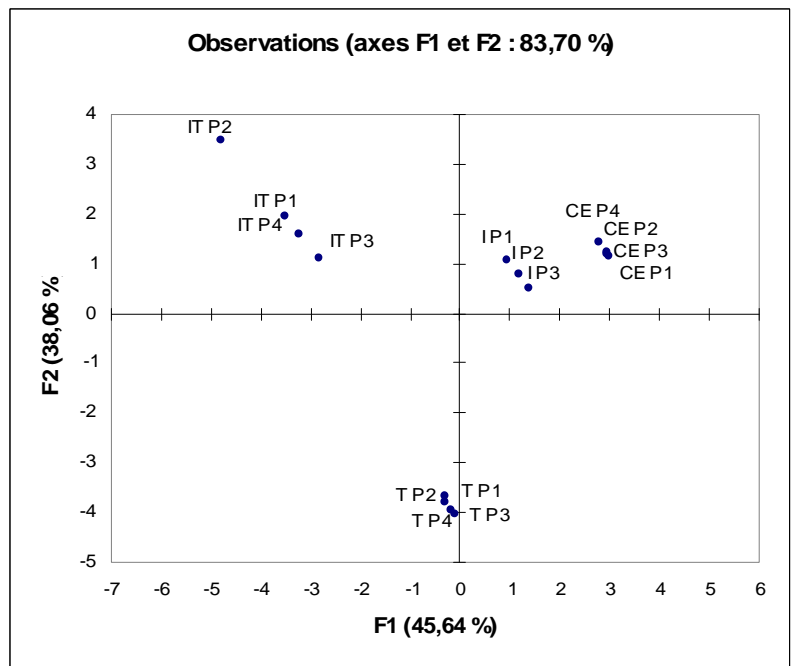
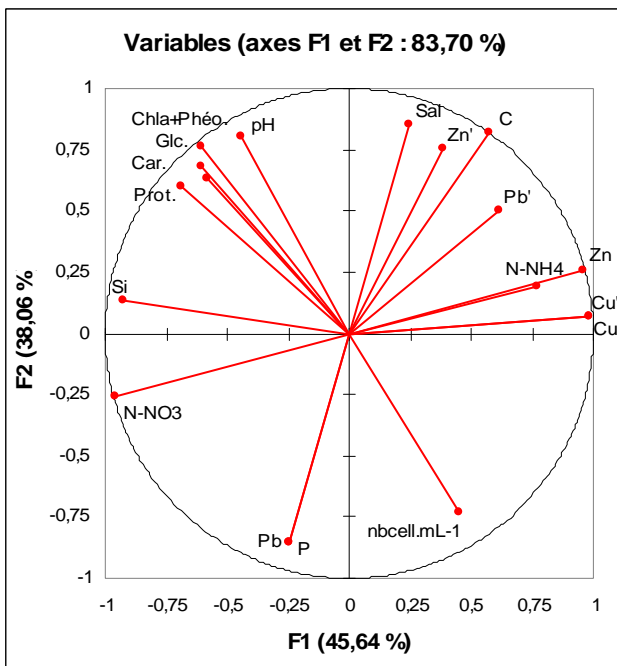


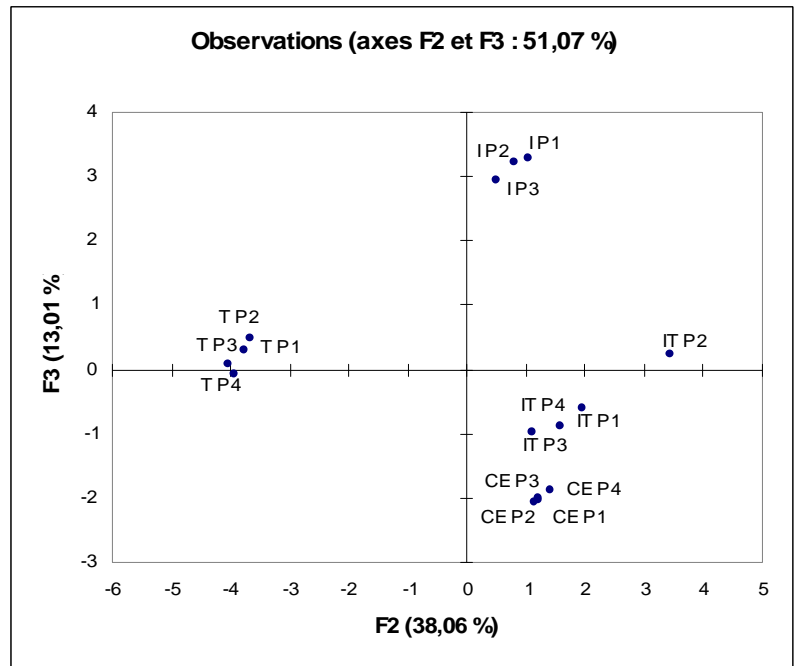
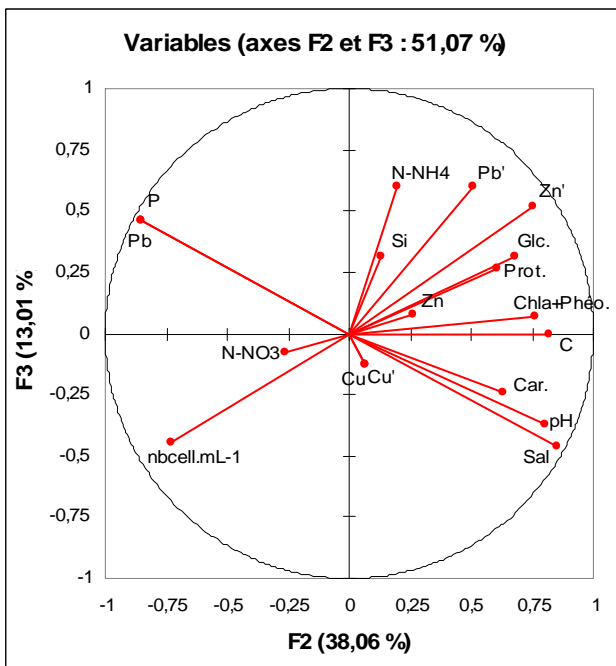
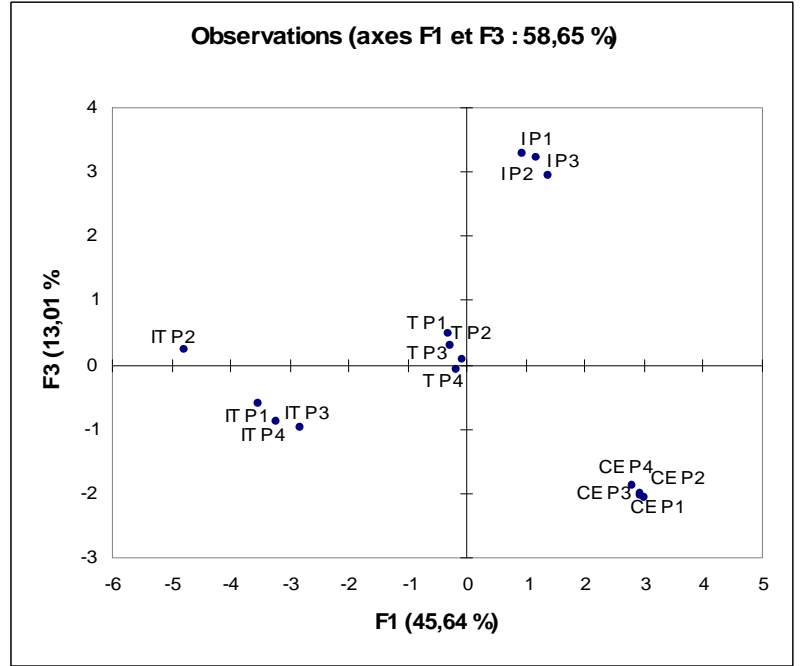
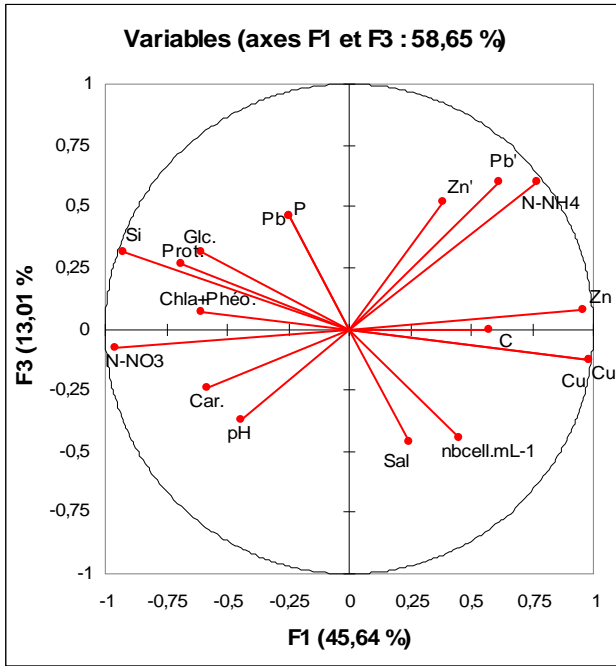
ACP *Phaeodactylum tricornutum* données mg.L⁻¹



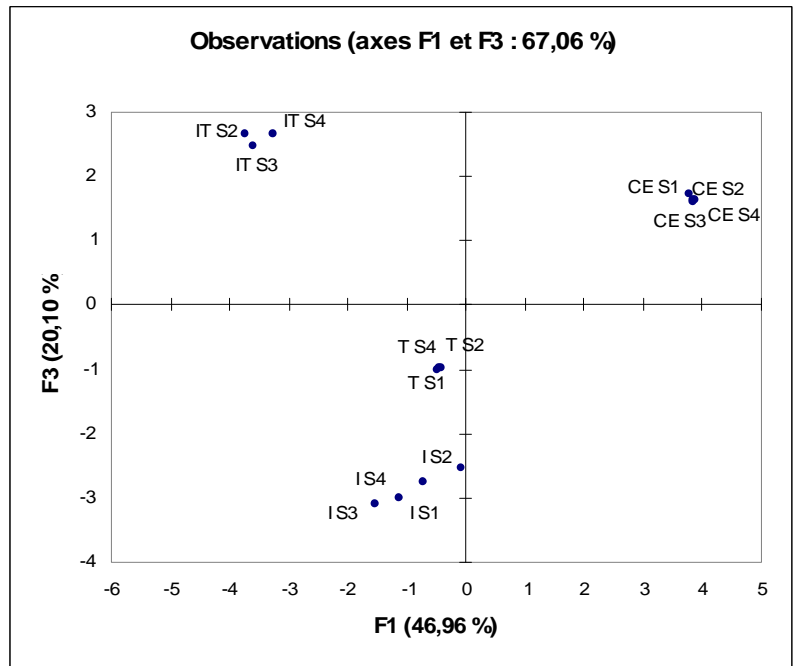
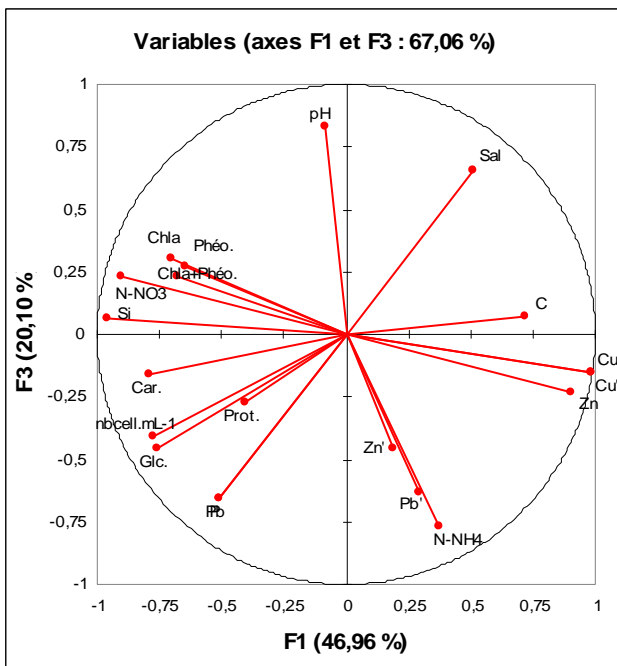
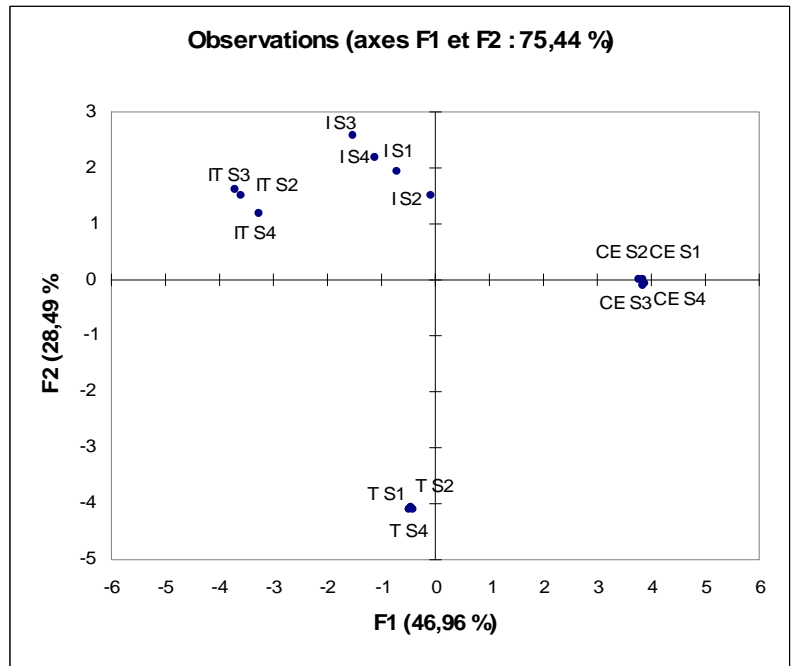
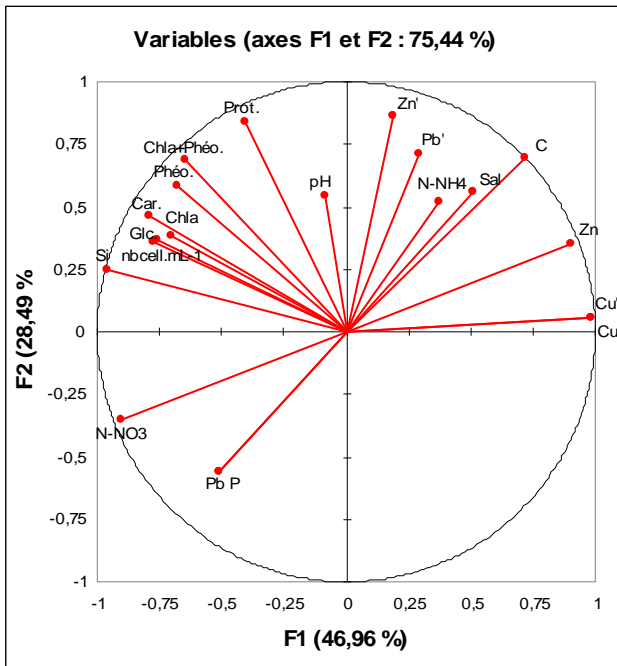


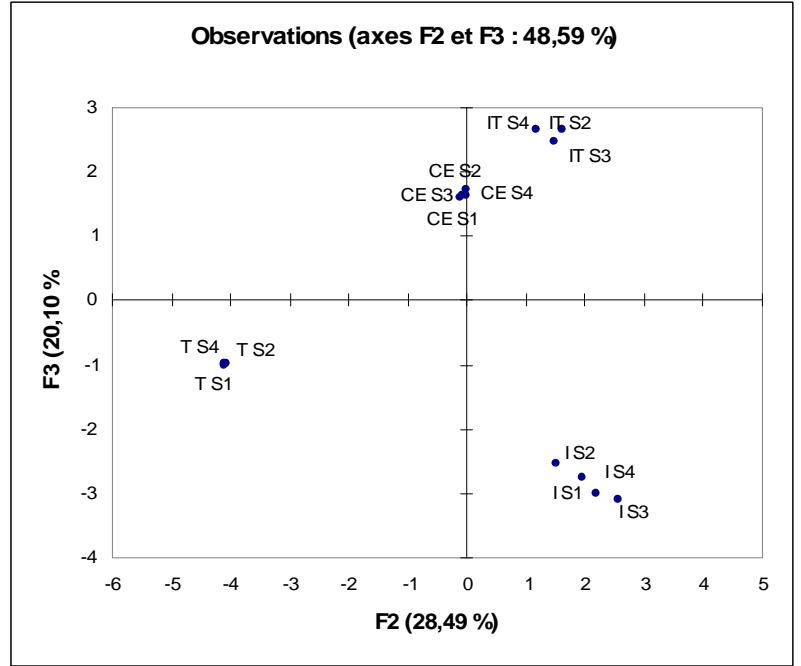
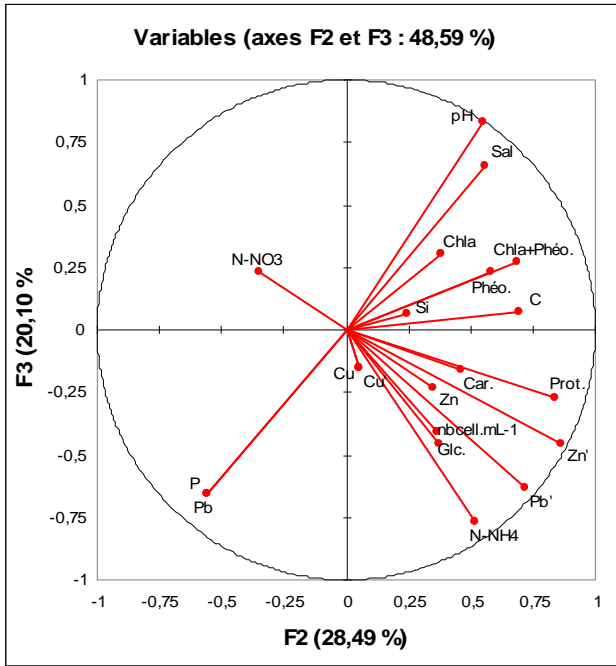
ACP *Phaeodactylum tricornutum* données pg.cell⁻¹



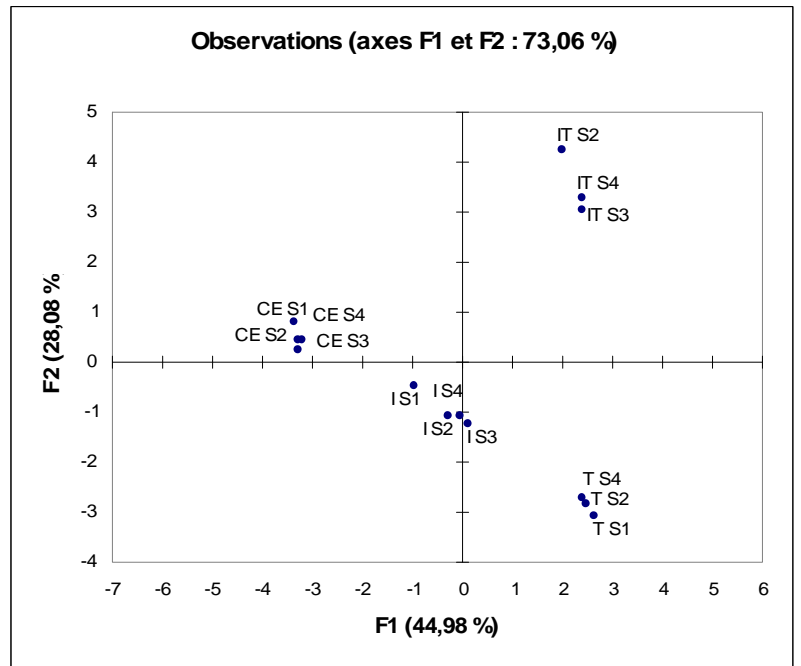
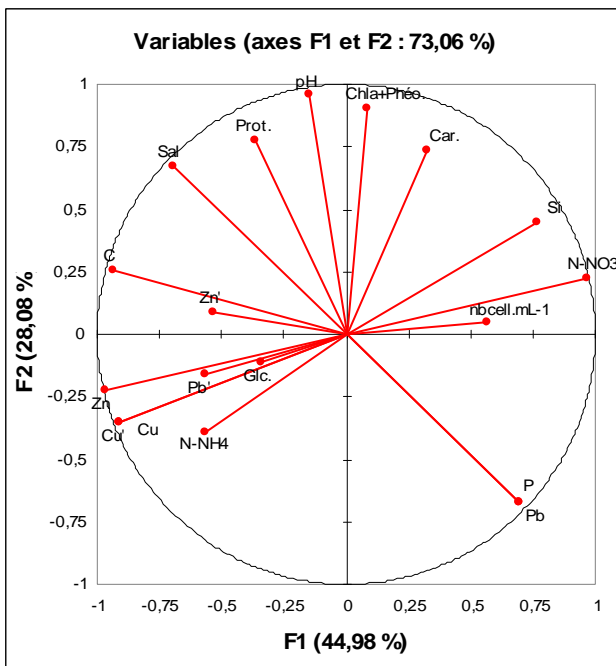


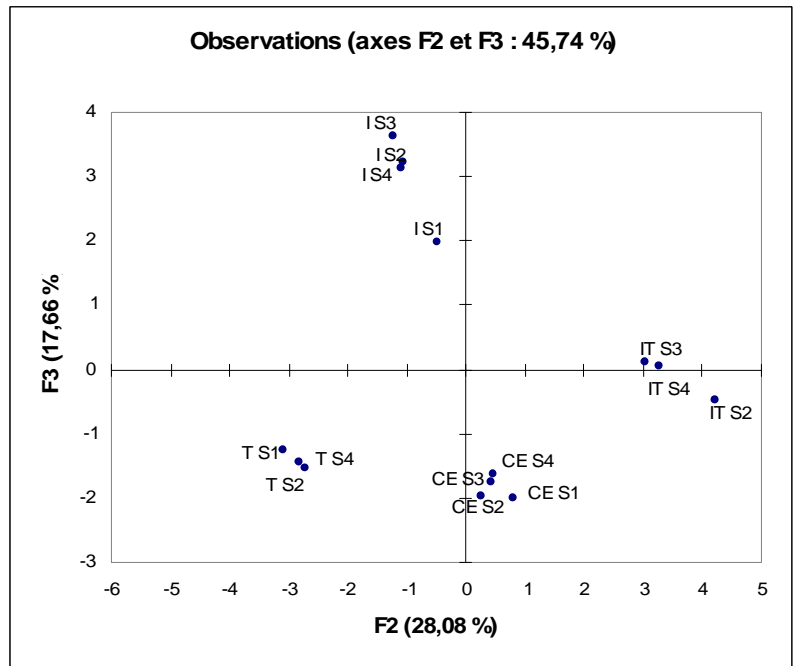
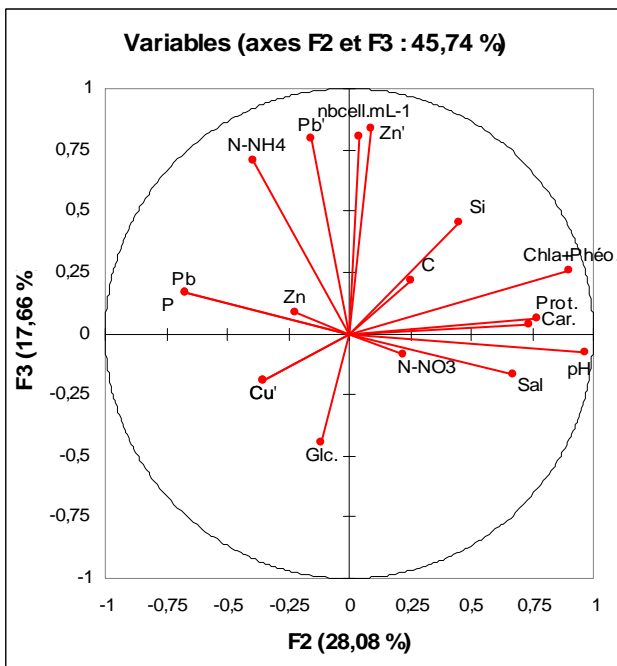
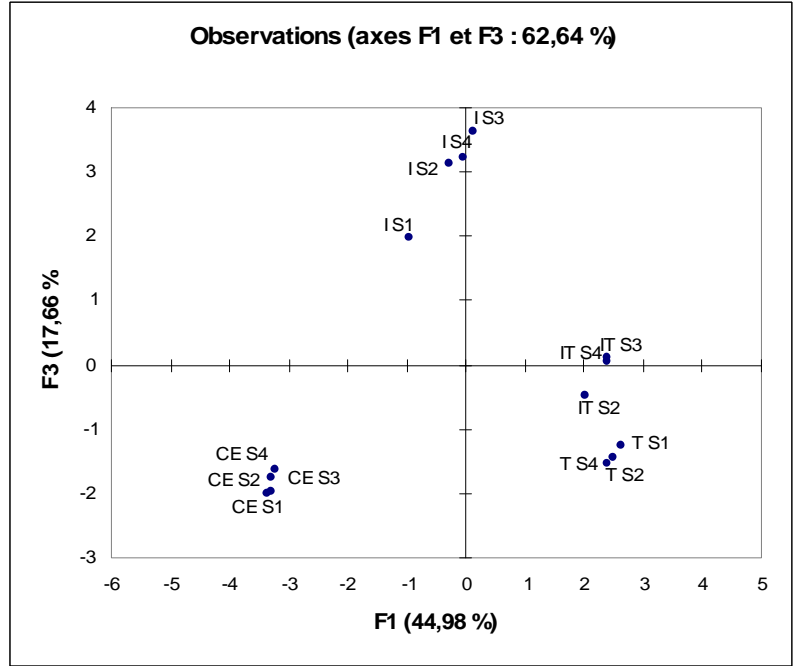
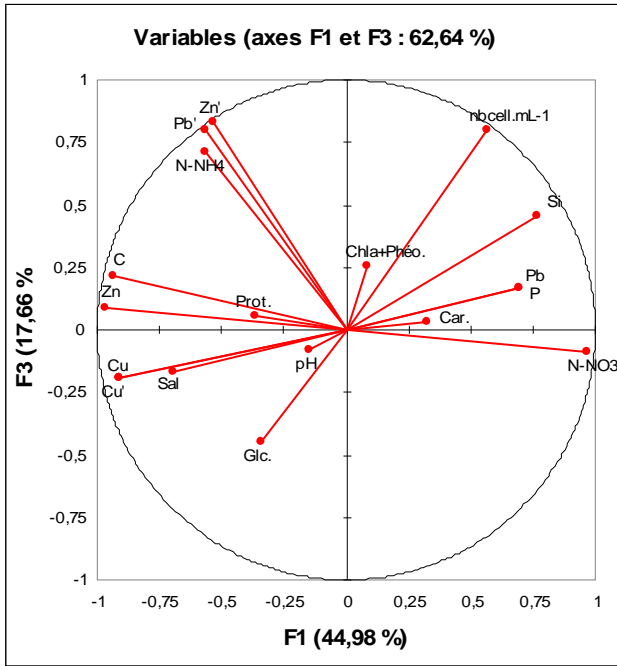
ACP *Skeletonema costatum* données mg.L⁻¹



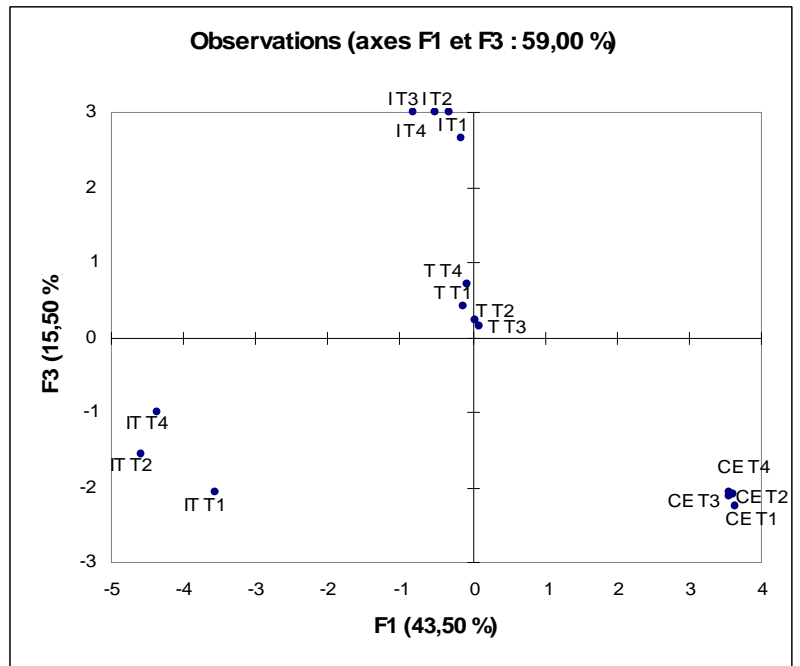
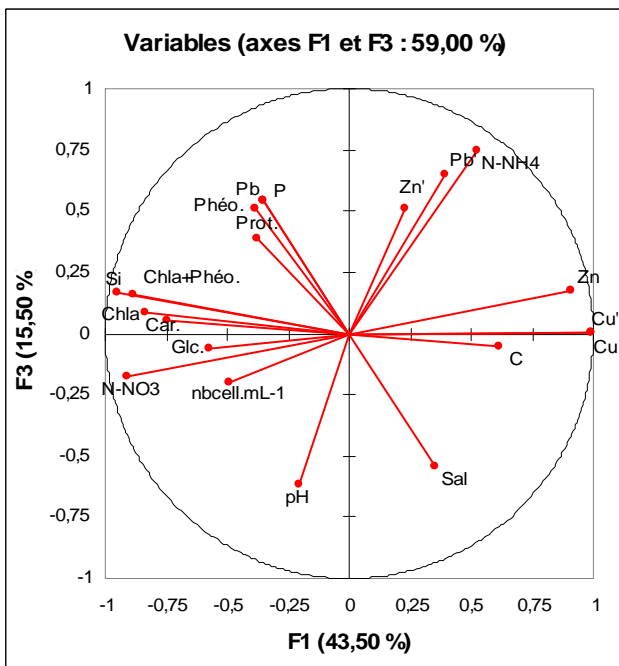
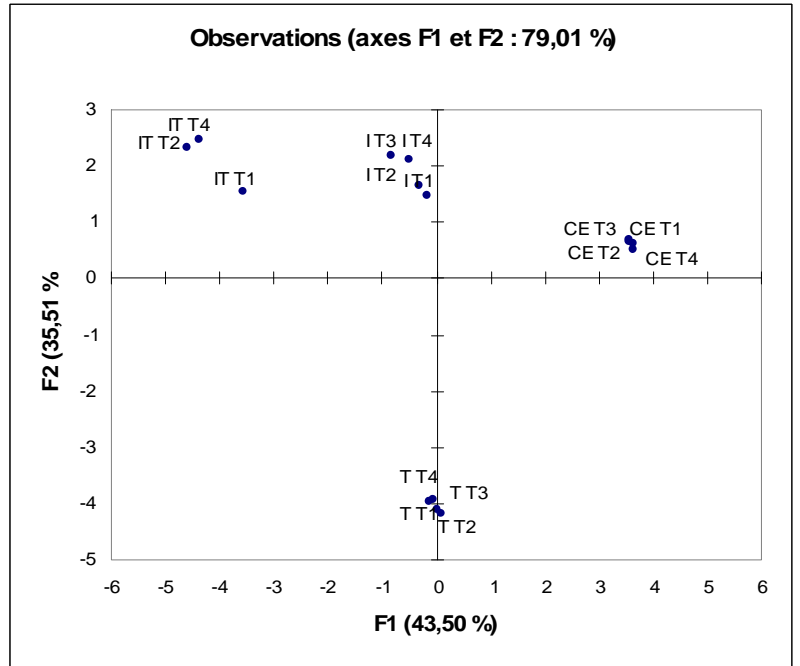
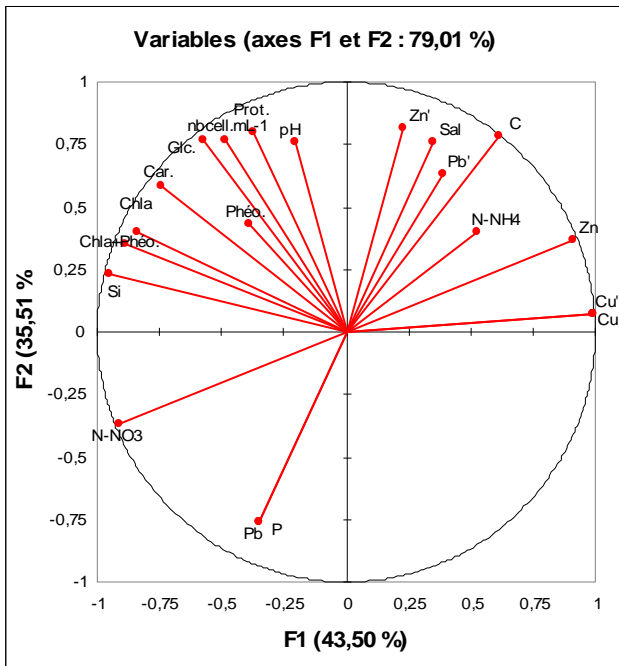


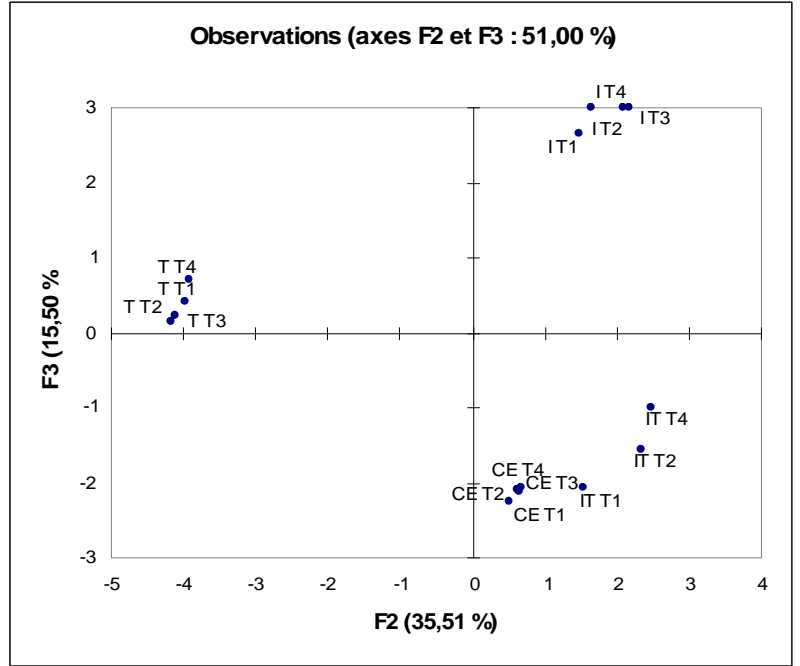
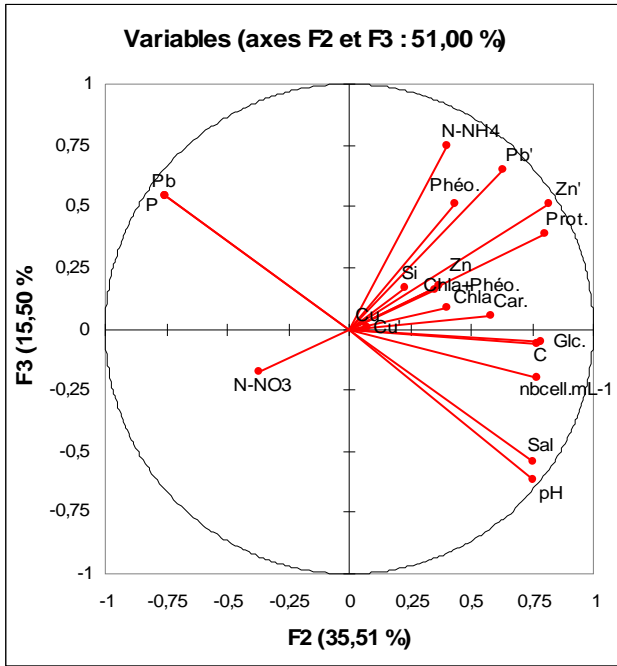
ACP *Skeletonema costatum* données pg.cell⁻¹



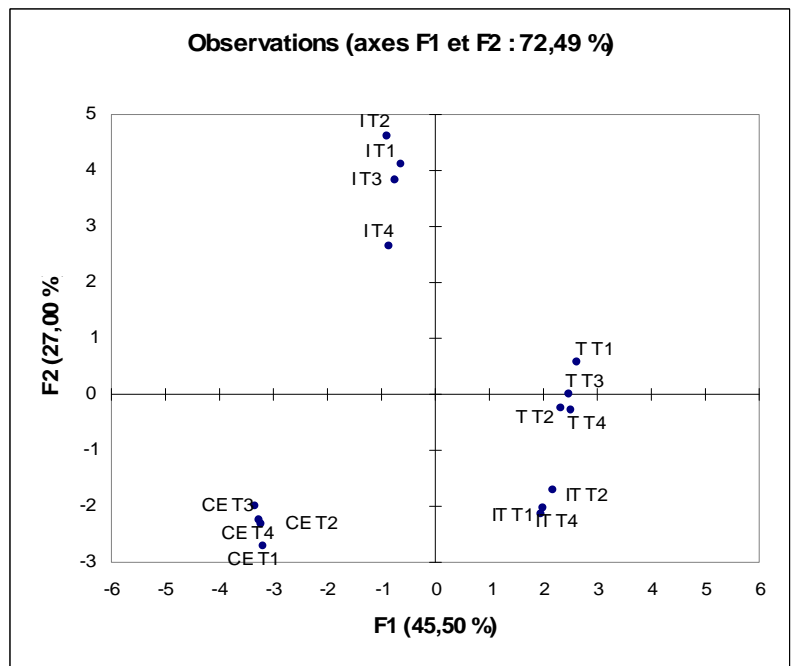
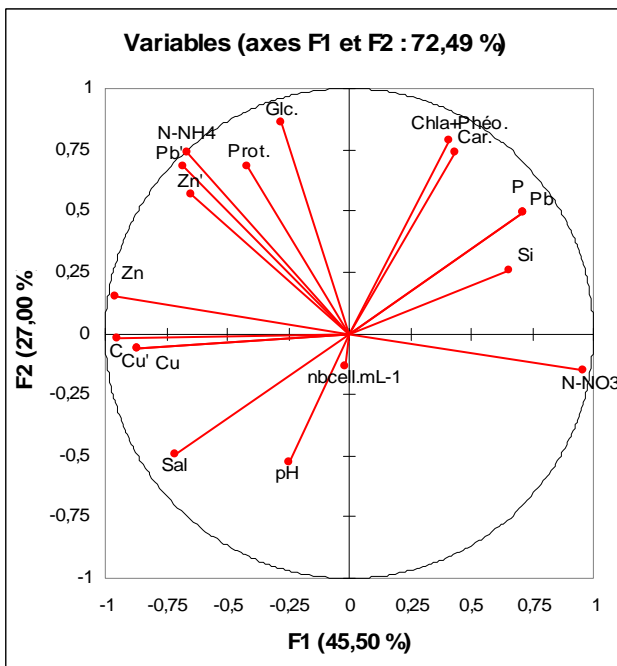


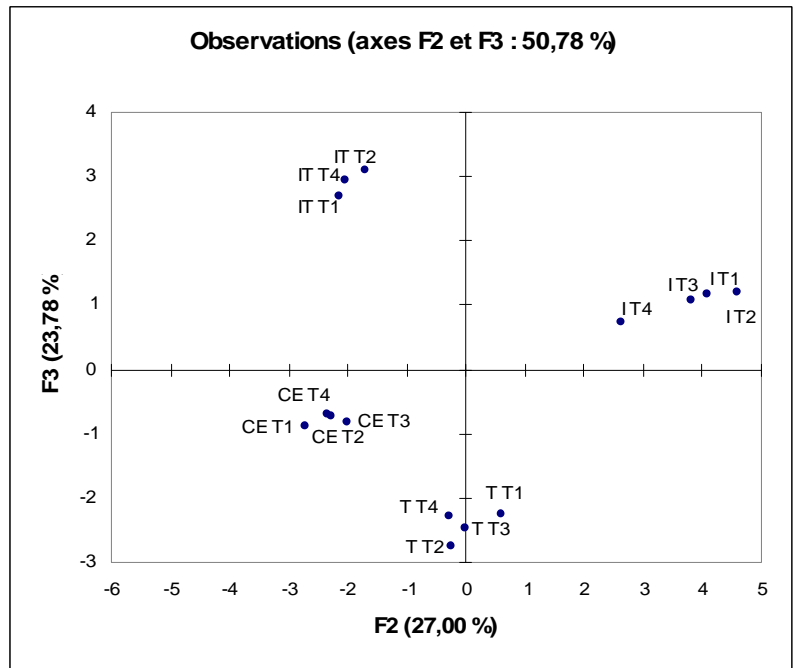
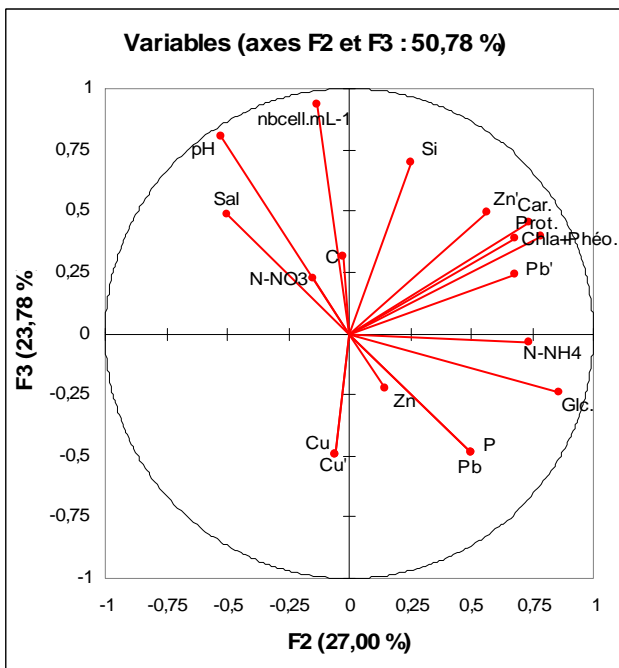
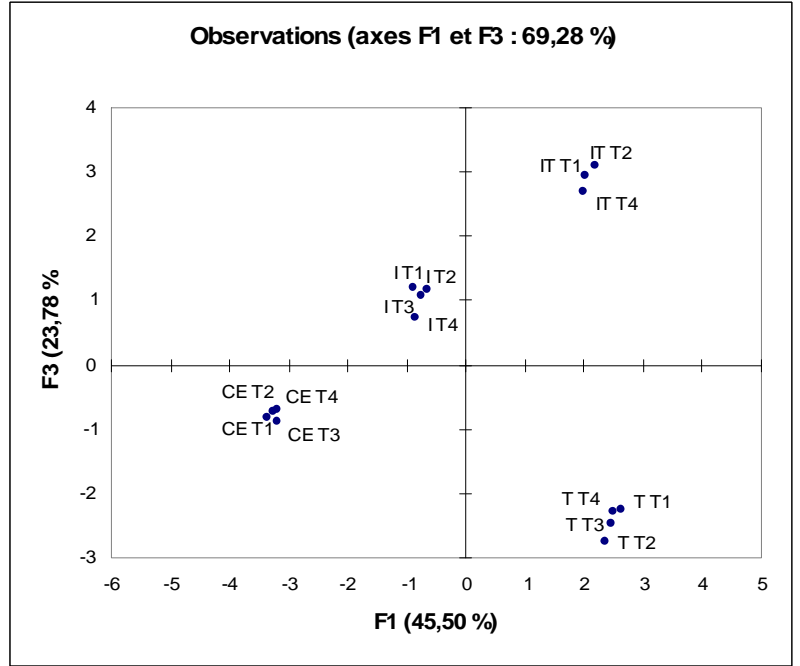
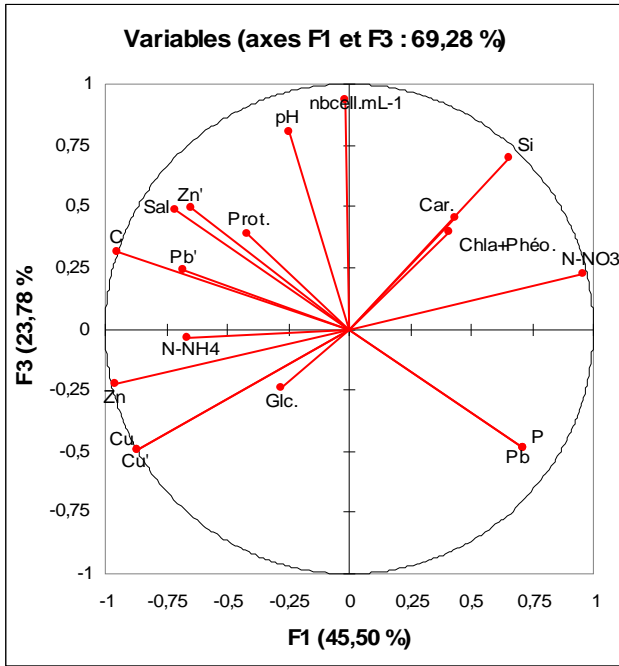
ACP Tetraselmis suecica données mg.L⁻¹





ACP *Tetraselmis suecica* données pg.cell⁻¹





Annexe 3 : Articles

Sindy Gagneux-Moreaux, Richard P. Cosson, Paco Bustamante & Christophe Moreau, 2006. Growth and metal uptake of microalgae produced using salt groundwaters from the Bay of Bourgneuf. *Aquatic Living Resources*, volume 19 (3) : 247-255.

Sindy Gagneux-Moreaux, Christophe Moreau, Jean-Louis Gonzalez & Richard P. Cosson, 2006. Diatom Artificial Medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Haslea ostrearia* and other marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, soumis.