

Etude du diméthylsulfoniopropionate et du
diméthylsulfoxyde chez *Posidonia
oceanica* (L.) Delile (1813) : cycle saisonnier
naturel et biomarqueur de réponse au stress
oxydatif induit par le cuivre.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Biologie des
Organismes et Ecologie

Engels Guyliann



Richir Jonathan (UMONS), promoteur

Borges Alberto (ULg), co-promoteur

Année académique 2016-2017



Remerciement

Je tiens à remercier en premier lieu mon promoteur, Jonathan Richir, de m'avoir permis de travailler sur ce sujet donnant lieu à une collaboration personnellement enrichissante entre l'unité d'océanographie chimique de l'ULg et le service d'écologie numérique des milieux aquatiques de l'UMONS. Son encadrement constant et ses nombreux conseils m'ont permis de mener à bien ce projet ambitieux alliant analyse en laboratoire et expérience sur le terrain. Il m'a permis de découvrir les plaisirs du scientifique de terrain qui bosse tous les jours, dimanches et jours fériés, de 7 h du matin à pas d'heure.

Je tiens également à remercier mon co-promoteur et chef du service d'océanographie chimique, Alberto Borges, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour y réaliser l'ensemble de mes analyses et de m'avoir conseillé tout au long de ce travail.

Je remercie tout particulièrement le chef du service d'écologie numérique des milieux aquatiques, Philippe Grosjean, de m'avoir aidé à trouver le sujet de mémoire alliant l'ensemble de mes envies, accueilli au sein de son laboratoire et conseillé tout au long de l'année dans mes nombreuses réflexions sur ce travail.

Je tiens à remercier le doctorant au sein du laboratoire d'océanographie chimique, Willy Champenois, qui m'a formé sur la technique analytique nécessaire au dosage du DMSP et du DMSO.

Un grand merci, tout particulier, au technicien du service d'écologie numérique des milieux aquatiques, Antoine Batigny, qui m'a aidé quotidiennement durant les deux semaines d'expériences sur le terrain. Tes nombreuses répliques ont rendu les deux changements d'eau, les mesures et prélèvements en aquariums et en plongée, bien plus agréable : « Je n'ai pas le temps, je fais de la science » ou encore « c'est bon ça ! »

J'adresse mes sincères remerciements à ma famille et mes amis qui m'ont supporté durant les cinq années amenant à la concrétisation de ce projet. Parmi eux, je remercie tout particulièrement Laurence Druet, Doryann Engels, Laurence Lefebvre, Yann Delaunois, Martin Vastrade, Laurie-Anne Lamotte, Maxime Martin et Jérémy Gheysen. Je te l'avais bien dit maman, malgré toutes les épreuves que la vie a placées devant nous, je termine mes années d'études sans aucun couac avec ce projet. Le plus grand de tes fils a réalisé les études que tu n'as pas eu l'occasion de faire et le deuxième me suit de près.

Je ne peux oublier de remercier mon AGE qui m'a permis de vivre pleinement ma vie universitaire bien au-delà que mes espérances. J'ai pris pour habitude lors de l'accueil des rhétos et lors des salons SIEP d'expliquer que la vie étudiante ne se limite pas à étudier. L'AGE, durant ces quatre années dont deux en tant que Vice-président m'ont offert cette autre partie de la vie étudiante. J'y suis entré en n'y connaissant qu'une seule personne et j'en ressors avec une seconde famille et des amis proches que je garderais pour toujours.

Enfin, je ne t'ai pas oublié, je remercie Tiffani Bouanati qui m'a supporté au quotidien. Ce qui n'est pas une mince affaire, mais en plus avec la pression que m'a apportée ce mémoire, j'étais un petit copain encore plus fatigant qu'à l'habitude. Ton soutien permanent surtout sur la fin m'a donné les ressources nécessaires pour ne pas craquer. Mes présentations te remercient également de la touche de folie que tu leurs as apportée, je te l'ai dit tu as raté ta vocation, tu aurais dû faire designer de Powerpoint.

Je terminerai par remercier le directeur de la station de recherche Sous-marines et Océanographiques (STARESO), Pierre Lejeune, pour m'avoir donné accès à ces installations.

Ce travail rentre dans le cadre du projet STARECAPMED (Station of Reference and rEsearch on Change of local an global Anthropogenic Pressures on Mediterranean Ecosystems Drifts).

Résumé

Etude du diméthylsulfoniopropionate et du diméthylsulfoxyde chez *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813) : cycle saisonnier naturel et biomarqueur de réponse au stress oxydatif induit par le cuivre.

Mots clés : ***Posidonia oceanica*, diméthylsulfoniopropionate, diméthylsulfoxyde, cycle saisonnier, biomarqueur, cuivre**

Le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) et son dérivé, le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont des molécules organosoufrées très étudiées de par leurs nombreux rôles physiologiques (e.g. osmorégulateur, antioxydant) et environnementaux (e.g. précurseur du diméthylsulfure (DMS), un gaz qui aide à compenser l'effet de serre). Borges et champenois (2015) ont récemment démontré la présence de ces molécules chez *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813), une magnoliophyte marine endémique de la mer Méditerranée qui forme de vastes et denses herbiers sur tout le pourtour de son littoral.

Le présent travail s'intéresse tout d'abord à l'évolution saisonnière de la production de DMSP et de DMSO dans les feuilles de posidonies échantillonnées dans l'herbier sain et équilibré de la baie de Calvi (Corse, France), à fréquence hebdomadaire à bimensuelle entre avril 2015 et juillet 2016. Les concentrations en ces deux molécules sont maximales fin septembre et diminuent jusqu'en août. La variable physiologique la plus corrélée avec ces concentrations est la surface foliaire de la feuille analysée, en l'occurrence la troisième feuille des faisceaux. Cette surface foliaire est, à l'inverse des concentrations en DMSP et DMSO, minimale en septembre pour ensuite augmenter jusqu'en août. Ainsi, au plus la feuille s'allonge, *i.e.* au plus elle vieillit, au moins elle produit de DMSP et de DMSO. Cette production privilégiée dans la feuille jeune laisse envisager d'éventuels rôles physiologiques, dont la protection contre le broutage. Ces rôles restent à définir. En revanche, aucun des autres paramètres environnementaux (e.g. température, lumière) et physiologiques (e.g. activité photosynthétique) suivis ne semble influencer la production de DMSP et de DMSO par la plante.

Les biomarqueurs que sont le rapport DMSP/DMSO proposé par McFarlin et Alber (2013) et l'activité photosynthétique proposé par Schreiber et al. (1994) sont utilisés pour quantifier les stressseurs environnementaux, dont la pollution par le cuivre. Ce micronutriment essentiel intervient dans de nombreux processus métaboliques comme la photosynthèse, la respiration cellulaire et la régulation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), mais peut s'avérer particulièrement toxique à des concentrations trop élevées. Ainsi, nous avons étudié expérimentalement en aquariums les effets de l'exposition de fragments d'herbier à des niveaux de contamination en cuivre environnementalement pertinents (de 0 à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$; Richir et al. 2013) sur l'expression de ces deux biomarqueurs. Si aucun effet clair de l'exposition au cuivre n'a pu être observé sur les rapports DMSP/DMSO, le traitement 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a eu un effet nuisible sur l'activité photosynthétique des plantes.

En conclusion, la production de DMSP et de DMSO suit un cycle saisonnier marqué dans les feuilles de posidonies, conditionnées par leur croissance et vieillissement, dont les rôles écologiques restent maintenant à investiguer. Quant à l'utilisation du rapport DMSP/DMSO comme biomarqueur du stress oxydatif induit par le cuivre chez cette espèce, il ne peut à ce stade être affirmé ou infirmé.

Listes des figures

- Figure 1 : Composés soufrés importants pour la chimie de l'environnement terrestre (Bliefert & Perraud, 2001). Les traits pointillés représentent les dépôts secs et humides. COS (oxysulfure de carbone), O (oxygène singulet), SO₄⁻ (ion sulfate), SO₂ (dioxyde de soufre), O₂ (dioxygène), OH (radical hydroxyle), H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène), CS₂ (sulfure de carbone), H₂S (sulfure d'hydrogène), (CH₃)₂S (diméthylsulfure).022*
- Figure 2 : Structure chimique du diméthylsulfoniopropionate (DMSP), du diméthylsulfure (DMS), du diméthylsulfoxyde (DMSO).025*
- Figure3 : Voie métabolique de l'incorporation des sulfates à la synthèse de la cystéine et de la méthionine - schéma adapté (Stefels, 2000). APS (adénosine 5'-phosphosulphate), PAPS (3'-phosphate-5'-phosphosulphate), GSH (glutathione).026*
- Figure 4 : Voie métabolique de la formation du DMSP à partir de la méthionine - schéma adapté (Stefels 2000). 1) voie métabolique de *Wollastonia biflora* Wild (1965), 2) voie métabolique de *Spartina alterniflora* Loisel (1807), 3) voie métabolique de micro et macroalgues. AdoMet (S-adenosylmethionine), SMM (S-méthyl-méthionine), MTOB (4-méthylthio-2-oxobutyrate), MTHB (4- methylthio-2-hydroxybutyrate), DMSHB (4-dimethylsulphonio-2-hydroxybutyrate)027*
- Figure 5 : Voie métabolique de la dégradation du DMSP et de la formation du DMSO par la réaction d'oxydoréduction entre le DMS et le DMSO. A) voie métabolique de la déméthylation B) voie métabolique de la lyse.028*
- Figure 6 : Distribution géographique de *Posidonia oceanica* (Telesca et al. 2015). A) Embouchure du Rhone B) du Po C) du Nil D) côtes de la Syrie, du Liban et d'Israël.035*
- Figure 7 : Structure morphologique de *Posidonia oceanica*. À gauche, photographie montrant les parties épigées et endogées en bordure d'herbier (photo : Arnaud Abadie). À droite, schéma détaillant les différents organes – schéma adapté (Boudouresque and Meinesz 1982).036*
- Figure 8 : Structure morphologique des feuilles de *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813) (Boudouresque et al. 2006). A, B) feuilles adultes C) feuille intermédiaire D) feuille juvénile. .037*

Figure 9 : Evolution moyenne au cours du temps du nombre de feuilles juvéniles, intermédiaires et adultes par pousse dans l’herbier de *Posidonia oceanica* de la Baie de la Revellata à Calvi en Corse à 10m de profondeur (Gobert 2002).038

Figure 10 : Photographie d’une fleur de *Posidonia oceanica* (photo : Arnaud Abadie).038

Figure 11 : Schématisation du fonctionnement de l’écosystème de *P.oceanica* – Schéma traduit (Personnic et al. 2014). Les encadrés disposant d’un indice numérique sont ceux employés dans l’indice de qualité d’un écosystème (Ecosystem-based quality Index, EBQI. Matière organique particulaire (POM), carbone organique dissous (DOC), les organismes décomposeurs principalement des bactéries, des archées, des straménopiles hétérotrophes (BAFHS).040

Figure 12 : Représentation cartographique du lieu de l’étude (Calvi, Corse, France) – schéma adapté (Richir et al. 2013).047

Figure 13 : Photographie des sondes HOBO et Odyssey (photo : Guyliann Engels). À gauche, la sonde HOBO mesurant l’intensité lumineuse (Ix) et la température (°C). À droite, la sonde Odyssey mesurant le PAR ($\mu\text{mol de photons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$).048

Figure 14 : Mesure de la fluorescence avec le Diving-Pam. A gauche, photographie montrant l’utilisation du Diving-Pam (photo : Antoine Batigny). À droite, principe de la mesure de fluorescence pour les organismes adaptés au noir ou non.049

Figure 15 : Exemple de courbe de lumière (RLC) montrant l’évolution du ETR ($\mu\text{mol d’électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) par rapport au intensité croissante de PAR ($\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). α (pente initiale de la courbe), ETRmax (taux de transfert d’électron maximal), iK (valeur de la moitié de la saturation maximale).051

Figure 16 : Photographie du site de prélèvement (photo : Guyliann Engels) et disposition en aquarium des faisceaux de *Posidonia oceanica* (photo : Guyliann Engels). À gauche, tâche de sable longiforme à 14m de profondeur dans l’herbier de posidonies. À droite, disposition dans un aquarium d’un des 4 morceaux d’herbier, avec faisceaux et une partie de la matre.053

Figure 17 : Schématisation de l’installation des aquariums utilisés pour les différentes expositions au cuivre :0,5,15,50 μgL^{-1}053

<i>Figure 18 : Photographie de la pompe de brassage, sondes pH, oxygène dissous, température et DGT. À gauche, pompe de brassage, les sondes pH et oxygène reliées à l'enregistreur multiparamètre. À droite, la sonde HOBO et le DGT (photo : Guyliann Engels).</i>	<i>054</i>
<i>Figure 19 : Photographie de l'auto-analyseur (photo : Guyliann Engels) et des instruments de mesures des paramètres physicochimiques (photo : Guyliann Engels). À gauche, l'autoanalyseur. À droite, le salinomètre, l'oxymètre et le pHmètre.</i>	<i>056</i>
<i>Figure 20 : photographie de l'enregistreur multiparamètre (photo : Guyliann Engels).</i>	<i>057</i>
<i>Figure 21 : photographie des mesures de fluorescence et des RLCs avec le Diving-Pam en aquarium (photo : Antoine Batigny).</i>	<i>058</i>
<i>Figure 22 : Schématisation du principe de la chromatographie en phase gazeuse.</i>	<i>059</i>
<i>Figure 23 : Photographie de l'appareil chromatographique (photo : Guyliann Engels).</i>	<i>060</i>
<i>Figure 24 : Mécanisme réactionnel de la formation du DMS à partir du DMSP en condition basique.</i>	<i>061</i>
<i>Figure 25 : Mécanisme réactionnel de la réduction du DMSO en DMS suite à l'ajout de l'agent réducteur TiCl3.</i>	<i>061</i>
<i>Figure 26 : Evolution de l'intensité lumineuse moyenne (Ix) entre 11h et 14h au pied de l'herbier de Posidonia oceanica à 10 m de profondeur (gris) et au-dessus de la canopée de l'herbier à 8m de profondeur (noir) au cours du temps.</i>	<i>065</i>
<i>Figure 27 : Evolution du rayonnement photosynthétiquement actif moyen journalier (PAR, en $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) entre 11h00 et 14h00 au-dessus de la canopée de l'herbier de Posidonia oceanica à 10 m de profondeur (capteur déployé à la vertical par rapport à la surface).</i>	<i>066</i>
<i>Figure 28 : Variation du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, en $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) mesuré de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier à mi-hauteur du faisceau de feuilles des pousses de Posidonia oceanica, avec le quantamètre du Diving-PAM à 10 m de profondeur au cours du temps (n=18, mesures prises horizontalement par rapport à la surface).</i>	<i>067</i>
<i>Figure 29 : Evolution de la température (°C) moyenne entre 11h et 14h à l'interface eau-sédiments au pied de l'herbier de Posidonia oceanica à 10m de profondeur au cours du temps.</i>	<i>068</i>

Figure 30 : Variation du rendement photosynthétique effectif moyen, mesuré de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, avec un Diving-PAM à 10m de profondeur au cours du temps (n=18, mesures prises verticalement par rapport à la surface). Les doubles barres représentent les écart-types.069

Figure 31 : Variation moyenne du taux de transfert relatif d'électrons (rETR) calculé à partir des mesures réalisées de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, avec un Diving-PAM à 10m de profondeur au cours du temps (n=18, mesures prises verticalement par rapport à la surface). rETR obtenu avec les mesures de PAR de la sonde Odyssey (mesures prises horizontalement par rapport à la surface). Les doubles barres représentent les écart-types. .070

Figure 32 : Variation moyenne du taux de transfert relatif d'électrons (rETR) calculé à partir des mesures réalisées de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, avec un Diving-PAM à 10m de profondeur au cours du temps (n=18, mesures prises verticalement par rapport à la surface). rETR obtenus avec les mesures de PAR du quantamètre du Diving-PAM (mesures prises verticalement par rapport à la surface). Les doubles barres représentent les écart-types.071

Figure 33 : Variation de la concentration moyenne en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes (n=3), prélevé de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée, à 10 m de profondeur au cours du temps. Les doubles barres représentent les écart-types.072

Figure 34 : Variation de la concentration moyenne en DMSO ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes (n=3), prélevé de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée, à 10 m de profondeur au cours du temps. Les doubles barres représentent les écart-types.073

Figure 35 : Variation du rapport des concentrations en DMSP sur celles DMSO, sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes (n=3), prélevé de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la

canopée de l'herbier, à 10 m de profondeur au cours du temps. Les doubles barres représentent les écart-types.074

Figure 36 : Matrice de corrélation réalisée avec le coefficient de corrélation de Pearson sur les mesures et prélèvements sur la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies réalisés de façon hebdomadaire à bimensuelle dans l'herbier à 10m de profondeur au cours du temps (n= 103). Conc_DMSP (concentration en DMSP), Conc_DMSO (concentration en DMSO), Ratio (DMSP/DMSO), Yield (rendement photosynthétique), ETR (taux de transfert d'électron), rETR (taux de transfert d'électron relatif établi avec la mesure du PAR du Diving-PAM), rETR_ODY (taux de transfert d'électron relatif établi avec la mesure du PAR de la sonde Odyssey).

.....075

Figure 37 : Matrice de corrélation réalisée avec le coefficient de corrélation de Pearson sur les mesures et prélèvements moyens sur la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies dans l'herbier à 10 m de profondeur au cours du temps. (n= 31). avg_DMSP (concentration moyenne en DMSP), avg_DMSO (concentration moyenne en DMSO), avg_ratio (DMSP/DMSO), avg_PAR (PAR moyen entre 11H et 14h avec la sonde Odyssey), avg_Lux10 (Intensité lumineuse entre 11H et 14H à l'interface eau-sédiment), avg_Lux (Intensité lumineuse entre 11H et 14H à 8m de profondeur), avg_Temperature (température moyenne entre 11h et 14h à l'interface eau-sédiments).076

Figure 38 : Matrice de corrélation réalisée avec le coefficient de corrélation de Spearman sur les mesures biométriques mensuelles (Bouchachi 2017) et les dosages moyens en DMSP et DMSO sur la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies dans l'herbier à 10 m de profondeur au cours du temps (n=11). Avg_DMSP (concentration moyenne en DMSP), avg_DMSO (concentration moyenne en DMSO), avg_ratio (DMSP/DMSO), avg_Surf3 (surface foliaire de la 3^{ème} feuille).077

Figure 39 : Evolution de la concentration en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$) par rapport à la surface foliaire de la 3^{ème} feuille de Posidonia oceanica. La droite modélise la régression linéaire employé afin d'établir une relation entre ces deux paramètres.078

Figure 40 : Variation du rendement photosynthétique effectif (n = 2-4) mesuré quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de Posidonia oceanica maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau

quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillée représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.084

Figure 41 : Variation du rendement photosynthétique effectif ($n = 2-4$) mesuré quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.085

Figure 42 : Variation du taux de transfert d'électron maximal relatif ($r\text{ETR}_{\text{max}}$, $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), calculée à partir des mesures de RLC mesurée quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.086

Figure 43 : Variation du taux de transfert d'électron maximal relatif ($r\text{ETR}_{\text{max}}$, $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), calculée à partir des mesures de RLC mesurée quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés.

Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.087

Figure 44 : Variation de la concentration en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes ,maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.088

Figure 45 : Variation de la concentration en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes ,maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.....089

Figure 46 : Variation de la concentration en DMSO ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes ,maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.090

Figure 47 : Variation de la concentration en DMSO ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes ,maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des

concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.091

Figure 48 : Evolution du rapport des concentrations en DMSP sur celles en DMSO, sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.092

Figure 49 : Variation du logarithme rapport de la concentration en DMSP sur celle du DMSO, sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3ème feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.093

Figure 50 : Evolution du rendement photosynthétique effectif moyen ($n = 4$) sur des faisceaux de *Posidonia oceanica*, mesuré en septembre 1996 et en février 1997 à 2.5m de profondeur au cours d'une journée (Figuerola et al. 2002).096

Figure 51 : Evolution du taux de transfert d'électrons moyen (ETR, en $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) au cours d'une journée sur des faisceaux de posidonies mesurés en septembre 1996 et en février 1997 à 2.5m de profondeur à Playazo de Rodalquilar (Cabo de Gata, Espagne) cours d'une journée ($n = 4$) (Figuerola et al. 2002).098

Figure 52 : Variation du DMSP ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids sec) dans la partie basale (0-10cm) de l'ensemble des feuilles de 2 à 3 faisceaux de *Posidonia oceanica*, prélevé à 10, 15, 20, 25, 30 m de profondeur en baie de Calvi, Corse (France), de février 2012 à novembre 2013 (Borges & Champenois 2015).101

Figure 53 : Variation de la surface foliaire totale et de la 3 ^{ème} feuilles de faisceaux de <i>Posidonia oceanica</i> (n=10, moyenne \pm écart-type) prélevé de façon mensuelle à 10 m de profondeur au cours du temps (Bouchachi 2017).	102
Figure 54 : Variation moyenne du DMSP ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids sec) dans les feuilles de 2 à 3 faisceaux de <i>Posidonia oceanica</i> par sections (environ 10 cm) à 10, 15, 20, 25 et 30m de profondeur dans la baie de Calvi (Corse, France), en août 2013 (Borges & Champenois 2015).	103
Figure 55 : Variation moyenne des concentration ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids frais) de DMSO et de DMSP dans la moitié de la 2 ^{ème} feuille, les tiges et les racines de <i>Spartina alterniflora</i> à Dauphin Island (Alabama, USA) (n=4) (Husband & Kiene 2007).	104
Figure 56 : Cycle journalier moyen de l'oxygène dissous (mg.L^{-1}) dans la colonne d'eau au-dessus de la canopée de l'herbier de <i>Posidonia oceanica</i> dans la baie de Calvi (Corse, France), entre les mois d'avril et mai, de 2006 à 2014 (Champenois, données non publiées).	108
Figure 57 : Variation du rendement photosynthétique effectif $\Delta F/F_m'$ de <i>Halophila ovalis</i> , prélevée à Taylor's Bay (Sydney, Australie) et exposée à différentes concentrations de cuivre : 0 (rond), 1 (losange), 5 (triangle) et 10 (rectangle) mg.L^{-1} durant 96h (n = 4) (P. J. Ralph and Burchett 1998).	112
Figure 58 : Variation du rendement photosynthétique de <i>Zostera capricorni</i> exposée in situ sous cloche à Paradise beach (Pittwater, Australie) à différentes concentrations de cuivre : 0.1, 1 mg.L^{-1} . La 1 ^{ère} phase d'exposition de 10h00 est suivie d'une phase de récupération de 86h00 (Macinnis-Ng et Ralph 2002).	113
Figure 59 : Variation du rendement photosynthétique de <i>Thalassia hemprichii</i> prélevée dans la baie de Xincun (Hainan, Chine) et exposée en aquarium durant 10 jours à différentes concentrations de cuivre : 0, 10, 50, 100 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (n = 3) (Li et al. 2012).	114
Figure 60 : Variation du rendement photosynthétique effectif de <i>Cymodocea nodosa</i> prélevée dans les herbiers de Brasidas, Nea Karvali et Thasos en mer Egée et exposée en aquariums à différentes concentrations de cuivre : 0, 1.6, 4.7 et 7.9 μM , avec ajout de 0.3 μM de nitrates et 0.02 μM d'orthophosphates (Papathanasiou, Orfanidis, and Brown 2015).	115

*Figure 61 : Variation de l'activité de la superoxyde dismutase ($U. g^{-1}$ de poids frais) de *Thalassia hemprichii* prélevé dans la baie de Xincun (Hainan, Chine) et exposée en aquarium durant 10 jours à différentes concentrations de cuivre : 0, 10, 50, 100 et 150 $\mu mol.L^{-1}$ ($n = 3$) (Li et al. 2012). 118*

Listes des tableaux

Tableau 1 : Ensemble des fonctions du DMSP et ses dérivés cités dans la littérature scientifique. osmorégulateur (Dickson et Kirst 1987; Diggelen et al. 1986; Husband et Kiene 2007; Husband et al. 2012; Karsten et al. 1992; Keller et al. 1996; McFarlin and Alber 2013; Otte and Morris 1994) / cryoprotectant (Karsten et al.1992; Kirst et al. 1991) / antibiotique (Van Alstyne and Puglisi 2007; Sieburth 1961) / régulation du soufre (Diggelen et al. 1986; Stefels 2000) / répulsif (Van Alstyne and Houser 2003; Borges and Champenois 2015; Strom et al. 2003) / antioxydant (Borges and Champenois 2015; Dring 2005; Husband and Kiene 2007; Husband et al. 2012; Ross and Alstyne 2007; Sunda et al. 2002) / attractant (DeBose and Nevitt 2007; Dell’Ariccia et al. 2014; Kiehn and Morris 2010).029

Tableau 2 : Nombre de faisceaux par aquarium en fonction de la concentration en cuivre. .054

Tableau 3 : la force des corrélations (Fowler J. et Cohen L. 1998).062

Tableau 4 : évolution de la concentration en cuivre biodisponible ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans les quatre aquariums expérimentaux durant les phases de contamination et de récupération . Les deux renouvellements d’eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l’ajout d’une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés.082

Tableau 5 : Concentration en DMSP et DMSO et rapport de leur concentrations (n=6-10 , moyenne \pm écart-type) dans les feuilles de *Spartina alterniflora* collectées dans des zones affectées par 4 types de stress environnementaux: dépréssiment visible, le broutages par les cheveux, l’augmentation de le densité d’escargots et l’ensevelissement par les sédiments, en bordures de ces zones de perturbations et dans des zones préservées (McFarlin & Alber 2013).105

Listes des abréviations et symboles

α	Pente dans la phase initiale d'une courbe de lumière (RLC)
ϕ_{PSII}	Efficacité du photosystème II
$\Delta F/F_m'$	Rendement photosynthétique effectif
AF	Facteur d'absorbance
BiPo	Indice biotique utilisant <i>Posidonia oceanica</i> (<i>biotic index using the seagrass Posidonia oceanica</i>)
°C	Degré Celsius (unité)
DMS	Diméthylsulfure
DGT	<i>Diffusive gradients in thin films</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSP	Diméthylsulfoniopropionate
ETR	Taux de transfert d'électron.
ETR _{max}	Taux de transfert d'électron maximal
F ₀	Fluorescence minimale
FID	Détecteur à ionisation de flamme
F _m	Fluorescence maximale
F _m '	Fluorescence maximale adapté à la lumière
FPD	Détecteur à photométrie de flamme
F _t	Fluorescence initiale adapté à la lumière
g	Gramme
g _{pf}	Gramme de poids frais
g _{ps}	Gramme de poids sec
GC	Chromatographie gazeuse
GMT	Greenwich mean time
h	Heure
ICP	Plasma à couplage inductif
iK	Valeur de la moitié de la saturation maximale
J	Jour
L	Litre

lx	Lux (unité - intensité lumineuse par unité de surface)
m	Mètre (unité)
min	Minute (unité)
mol	Mole (unité)
M.M.	Masse molaire
MS	Spectrométrie de masse
n	Nombre de réplicats
PAR	Rayonnement photosynthétiquement actif ou radiation photosynthétiquement active. Lumière émise par unité de surface dans une gamme de longueur d'onde comprise uniquement entre 400 et 700nm, exprimée en $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
POMI	A multivariate index based on the seagrass <i>Posidonia oceanica</i>
PoSTe	Indice biométrique basé sur <i>Posidonia oceanica</i>
PGH	Modèle de Platt, Gallagos et Harrison
ppb	Part par billion
ppm	Part par millions
PREI	Indice rapide et simple basé sur <i>Posidonia oceanica</i> (<i>Posidonia oceanica Rapid Easy Index</i>)
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
rETR	Taux de transfert d'électron relatif
rETRmax	Taux de transfert d'électron maximal relatif
RLC	Courbe de lumière (<i>rapid light curve</i>)
s	Seconde (unité)
STARESO	STation de Recherche Sous-marines et Océanographique situé dans la baie de Calvi (Corse, France)
Y	Rendement photosynthétique maximal ou effectif

Table des matières

Chapitre I: Introduction	021
1. Cycle biogéochimique du Soufre	022
2. Biosynthèse du DMSP	025
3. Rôle biochimique du DMSP	028
a. Phytoplankton	028
b. Macroalgues	030
c. Angiospermes	031
d. Macroinvertébrés et vertébrés	032
4. <i>Posidonia oceanica</i> (L.) Delile (1813)	034
a. Biologie de <i>P. oceanica</i>	034
b. Ecologie de <i>P. oceanica</i>	039
c. Fonctions écologiques de <i>P. oceanica</i>	040
d. Bioindicateur	041
Chapitre II: Finalité du mémoire	043
1. Cycle saisonnier naturel en DMSP & DMSO	044
2. Utilisation du DMSP & du DMSO comme biomarqueurs de réponse au stress oxydatif induit par le cuivre	044
Chapitre III: Matériels & méthodes	046
1. Lieu de l'étude	047
2. Mesure des paramètres environnementaux	047
3. Mesure <i>in situ</i> de l'activité photosynthétique et collecte des échantillons	048
4. Exposition expérimentale au cuivre en aquarium	052
a. Collecte et disposition des organismes	052
b. Mise en place de l'installation	053
i. Principe général	053
ii. Mouvement de l'eau	054
iii. Lumière	054
iv. Renouvellement de l'eau des aquariums	055

v. Apport en nitrates et phosphates	055
c. Exposition au cuivre	056
d. Suivi des paramètres physico-chimiques des aquariums et <i>in situ</i>	056
e. Mesures de l'activité photosynthétique et prélèvements	058
5. Dosage du DMSP et du DMSO par chromatographie en phase gazeuse	058
6. Traitements statistiques	062
Chapitre IV: Résultats	063
1. Cycle saisonnier naturel	064
a. Paramètres environnementaux	064
i. Lumière	064
ii. Température	067
b. Mesure <i>in situ</i> de l'activité photosynthétique	068
i. Rendement effectif de la photosynthèse	068
ii. Taux de transfert des électrons	069
c. Dosage du DMSP et du DMSO par chromatographie en phase gazeuse	072
i. DMSP	072
ii. DMSO	073
iii. DMSP/DMSO	073
d. Analyses statistiques	074
2. Utilisation du DMSP & du DMSO comme biomarqueurs de réponse au stress induit par le cuivre	078
a. Paramètres physiques, chimiques et biologiques mesurés <i>in situ</i>	078
b. Paramètres physicochimiques des aquariums	079
c. Mesure de l'activité photosynthétique	083
i. Rendement photosynthétique	083
ii. Taux de transfert maximal des électrons	085
d. DMSP & DMSO	087
i. DMSP	087
ii. DMSO	089
iii. DMSP/DMSO	091
Chapitre V: Discussion	094

1. Cycle saisonnier naturel	095
a. Paramètres environnementaux	095
b. Mesure <i>in situ</i> de l'activité photosynthétique	096
c. Dosage du DMSP & du DMSO par chromatographie en phase gazeuse	098
i. DMSP	098
ii. DMSO	104
iii. DMSP/DMSO	105
2. Utilisation du DMSP & DMSO comme biomarqueurs de réponse au stress oxydatif induit par le cuivre	107
a. Paramètres physicochimiques	107
b. Mesure de l'activité photosynthétique	111
i. Rendement photosynthétique effectif	112
ii. Taux de transfert maximal d'électrons	117
iii. Evolution du DMSP, DMSO et DMSP/DMSO suite à l'exposition au cuivre	118
Chapitre VI : Conclusion et perspectives	120
Bibliographie	124
Annexes A	134
Annexes B	135
Annexes C	136
Annexes D	137
Annexes E	142
Annexes F	143
Annexes G	147
Annexes H	154
Annexes I	155

Chapitre I :

Introduction

L'étude des cycles du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre et de leurs interactions est indispensable pour permettre la compréhension des principaux processus biogéochimiques qui gouvernent l'environnement dans lequel nous évoluons. De plus, il est important de mettre en évidence l'effet des activités anthropiques sur ces derniers (Bolin et Cook 1983).

1. Cycle biogéochimique du soufre

Le soufre est indispensable à la vie. Il se retrouve dans des molécules essentielles telles que divers acides aminés comme la méthionine ou la cystéine, ainsi que dans la biotine ou encore les sulfolipides. Certains microorganismes, champignons, algues et plantes supérieures sont capables d'assimiler le soufre inorganique sous différentes formes et de le modifier chimiquement pour l'incorporer dans des composés organiques soufrés, dont les acides aminés. Les animaux doivent, quant à eux, couvrir leurs besoins en composés soufrés par l'ingestion d'autres organismes.

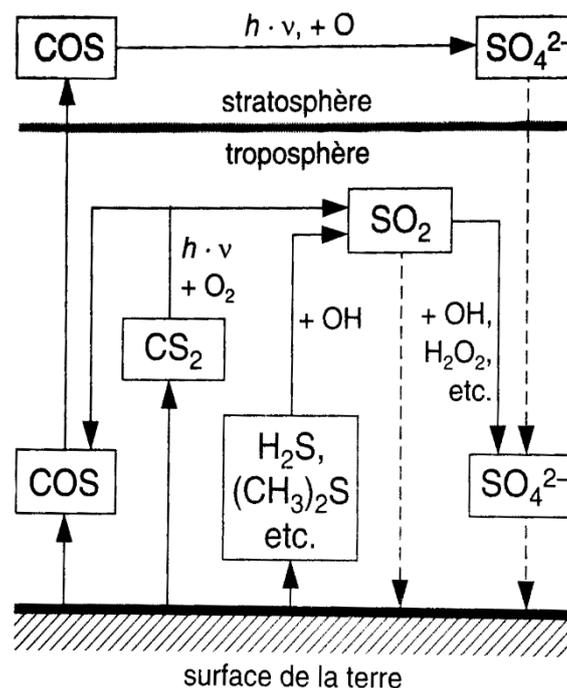


Figure 1 : Composés soufrés importants pour la chimie de l'environnement terrestre (Bliefert & Perraud, 2001). Les traits pointillés représentent les dépôts secs et humides. COS (oxysulfure de carbone), O (oxygène singulet), SO_4^- (ion sulfate), SO_2 (dioxyde de soufre), O_2 (dioxygène), OH^\cdot (radical hydroxyle), H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), CS_2 (sulfure de carbone), H_2S (sulfure d'hydrogène), $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ (diméthylsulfure).

Le cycle du soufre est complexe. Le soufre se retrouve dans l'ensemble des compartiments de l'environnement que sont l'atmosphère, la lithosphère l'hydrosphère et la biosphère. Penner et al. (2001) ont quantifié les flux de soufre provenant de l'activité volcanique, anthropique et biologique. L'activité anthropique génère entre 60 et 100 Mt de soufre par an. Cela représente

70 % de la production globale. L'activité biologique marine, quant à elle, produit entre 13 et 36 Mt de soufre par an. 6 à 20 Mt de soufre par an sont à attribuer à l'activité volcanique. Enfin, 1 à 6 Mt de soufre par an proviennent de la dégradation des matières organiques (Stevenson et al. 2003).

La molécule la plus abondante du cycle du soufre dans l'atmosphère est le dioxyde de soufre (SO_2) sous forme gazeuse. Ce dernier est une molécule charnière dans le cycle du soufre car il est l'intermédiaire de nombreux autres composés (Figure 1). Dans la troposphère (première couche de l'atmosphère qui s'étend de 0 à 15 km d'altitude) sous l'action des radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) ou de l'oxygène (O_2), le sulfure d'hydrogène (H_2S), le sulfure de carbone (CS_2), le diméthylsulfure (DMS (CH_3) $_2\text{S}$) et d'autres composés soufrés en plus faibles concentrations sont transformés en SO_2 . L'oxysulfure de carbone (COS) est, quant à lui, dégradé dans la stratosphère (seconde couche de l'atmosphère comprise entre 15 et 60 km d'altitude) en SO_4^{2-} (Bliefert and Perraud 2001). Son temps de résidence dans l'atmosphère est de plus d'une année alors que le temps de résidence des composés précédents est de 1 à 2 jours (Cutter, Cutter, and Filippino 2004). L'activité volcanique a un rôle important dans le cycle du soufre puisqu'elle relâche dans l'atmosphère du SO_2 , du H_2S et du CS_2 . Elle permet de libérer le soufre présent dans le sol. Dans la lithosphère, on retrouve le soufre essentiellement sous la forme de pyrite (FeS_2) et de sulfate de calcium (CaSO_4), appelé gypse.

L'homme impacte grandement le cycle atmosphérique du soufre. La production anthropique en SO_2 est largement plus importante que la production naturelle. Lors de l'utilisation de différents combustibles fossiles tels que le charbon, la lignite ou encore les fiouls, des composés soufrés sont rejetés dans l'atmosphère. Ainsi, le charbon comprend environ 2 % de FeS_2 . Le SO_2 est également employé comme additif alimentaire (code E220) pour les vins (Bliefert and Perraud 2001). Environ 30 % du SO_2 subit des modifications chimiques sous l'action des $\text{OH}\cdot$ ou du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour former de l'acide sulfurique (H_2SO_4) (Monks 2005). Cet acide fort se dissocie dans l'eau pour former du SO_4^{2-} et des ions H^+ et est majoritairement responsable des pluies acides.

L'hydrosphère (plus particulièrement les océans qui représentent 97.4 % de l'eau sur terre et couvrent 2/3 de la surface du globe) est un compartiment très important dans le cycle du soufre. L'ion SO_4^{2-} est le second anion le plus abondant dissout dans les océans. Il représente plus de 7.5 % de l'ensemble des ions dissous comprenant, entre autres, le Cl^- , Mg^{2+} ou encore Na^+ (A. G. Dickson, Sabine, and Christian 2007). La biochimie marine du soufre est

particulièrement complexe de par la présence de zones aérobies et anaérobies, photiques et aphotiques. Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans le cycle du soufre. Dans les zones anoxiques, des bactéries sulfato-réductrices comme *Desulfobacter curvatus* Widdel (1988), *Desulfococcus multivorans* Widdel (1981) ou encore *Desulfonema limicola* Widdel (1983) utilisent la respiration anaérobie pour produire de l'énergie à partir d'acétate, le SO_4^{2-} jouant le rôle d'accepteur final d'électrons pour produire du H_2S . D'autres bactéries sulfuréductrices comme *Desulfuromonas acetoxidans* Pfenning et Biebl (1976), *Desulfurococcus mobilis* Zillig et Stetter (1983) ou encore *Desulfuromonas acetexigens* Pfenning et Biebl (1977) emploient les sulfures (S^{2-}) ou le soufre élémentaire (S^0) comme accepteur d'électrons des réactions de leur métabolisme. Ces organismes produisent des S^{2-} qui vont former du H_2S ou précipiter sous la forme FeS_2 . On retrouve également, chez certaines espèces du règne des Archaea, des voies métaboliques similaires à celles citées précédemment (Garcia and Roger 2000; Paul, Ritson-Williams, and Sharp 2014).

Les composés soufrés se retrouvent également sous forme dissoute dans les océans, les molécules les plus importantes, hors SO_4^{2-} , étant le COS, le S_2 et le DMS (Andreae 1990). Le COS est dérivé de composés soufrés comme le diméthylsulfoniopropionate (DMSP), diméthylsulfoxyde (DMSO), la méthionine, la cystéine, et le glutathione. Cette forme gazeuse est la résultante de leur photodégradation par le rayonnement ultra-violet (UV), le meilleur substrat de cette réaction étant le glutathione qui est un tripeptide provenant de la condensation d'un acide glutamique, d'une cystéine et d'une glycine (Pos, Riemer, and Zika 1998). La dernière forme dissoute est le DMS issu du clivage enzymatique du DMSP et de la réduction du DMSO. Le DMSP lors de son clivage produit également l'acrylate (Figure 5) (Dickschat, Rabe, and Citron 2015).

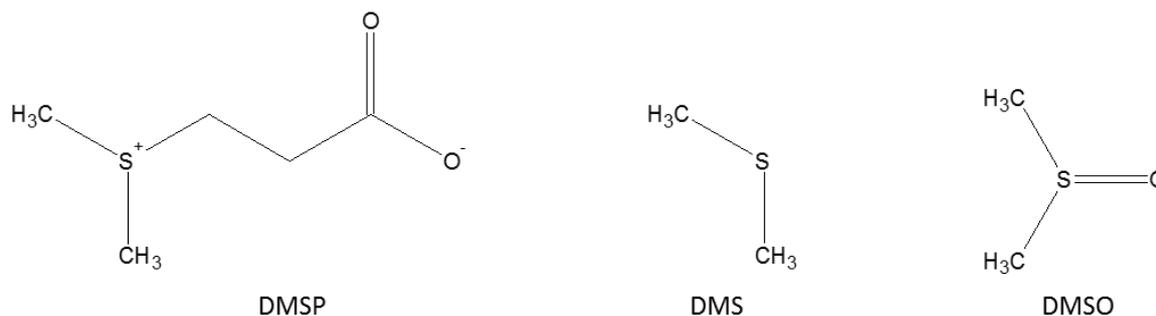


Figure 2 : Structure chimique du diméthylsulfoniopropionate (DMSP), du diméthylsulfure (DMS), du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Simó et al. (2001) ont dosé le DMSP dans l'Océan Atlantique Nord. Cette molécule peut représenter de 48 à presque 100% des composés soufrés. Charlson et al. (1987) suggèrent, quant à eux, que le DMS pourrait influencer le climat. Lorsque le DMS arrive dans l'atmosphère, il est oxydé pour former des sels de sulfates et du méthanosulphonate (MSA). Ces aérosols forment des noyaux de condensation ("*Cloud condensation nuclei*") qui peuvent favoriser la formation de nuages. Une augmentation de la couverture nuageuse permet de modifier l'albédo et par conséquent, la quantité de lumière incidente arrivant sur terre (Bates et al. 1987). Ces derniers auteurs proposent également une rétroaction négative : le réchauffement du climat induirait une augmentation de la production primaire, d'où une augmentation des émissions de DMS vers l'atmosphère, et par conséquent un refroidissement du climat suite à l'augmentation de l'albédo liée à une plus forte couverture nuageuse.

2. Biosynthèse du DMSP

L'intérêt porté à la quantification du DMS dans le cycle du soufre, ainsi que son rôle dans les changements climatiques, a poussé les scientifiques à s'intéresser à sa synthèse et à l'étude de ses fonctions chez les organismes producteurs.

La forme de prédilection inorganique du soufre utilisée par les végétaux est l'ion sulfate (SO₄²⁻). Ce dernier est incorporé de manière active dans la cellule et est transformé par une ATPsulfurylase en adénosine phosphosulfate (APS). D'une part, ce dernier peut être transformé en 3'-phosphoadénosine-5' phosphosulfate (PAPS) qui est le précurseur des sulfolipides et des sulfates esters des polysaccharides. Il joue, par exemple, un rôle dans le mucus des colonies d'algues du genre *Phaeocystis* et les exopolysaccharides (EPS) des

diatomées. Cette voie est non réductive (Figure 3-1). D'autre part, la voie réductive débute par le transfert du sulfate de l'APS vers le glutathion (GSH) grâce à l'action de l'APSsulfotransférase. Une succession de réductions vont avoir lieu afin d'obtenir du S^{2-} . Ce dernier va être incorporé à l'O-acétyl-sérine provenant de la glycolyse pour former la cystéine (Figure 3-2). Cet acide aminé peut être utilisé dans la formation de protéines ou bien servir de précurseur pour former la méthionine par le biais de l'homocystéine (Figure 3-3) (Hawkesford and De Kok 2007; Stefels 2000).

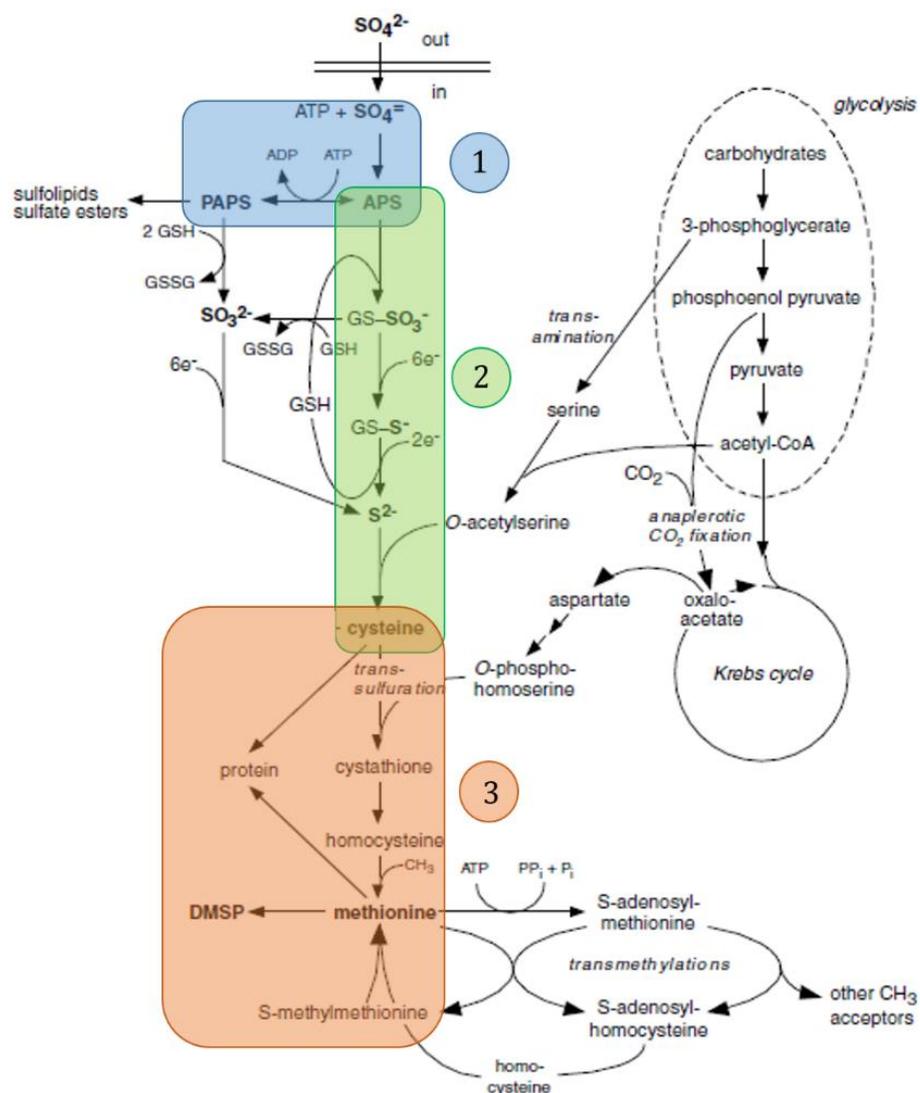


Figure 3 : Voie métabolique de l'incorporation des sulfates à la synthèse de la cystéine et de la méthionine - schéma adapté (Stefels, 2000). APS (adénosine 5'-phosphosulphate), PAPS (3'-phosphate-5'-phosphosulphate), GSH (glutathione).

Il existe différentes voies métaboliques de synthèse du DMSP en fonction de l'organisme producteur. Les voies métaboliques chez *Wollastonia biflora* Wild (1965) (Figure

4-1), *Spartina alterniflora* Loisel (1807) (Figure 4-2), chez diverses micro et macro algues telles que *Ulva lactuca* L. (1753), *Chondria coerulescens* *Chondria coerulescens* (J.Agardh) Falkenberg (1901) ou encore *Emiliania huxley* Hay et Mohler (1967) et *Melosira nummuloides* C.Agardh (1824) (Figure 4-3) ont été étudiées. La méthionine est le point de départ de toutes les synthèses du DMSP. (Dickschat, Rabe, and Citron 2015; Stefels 2000).

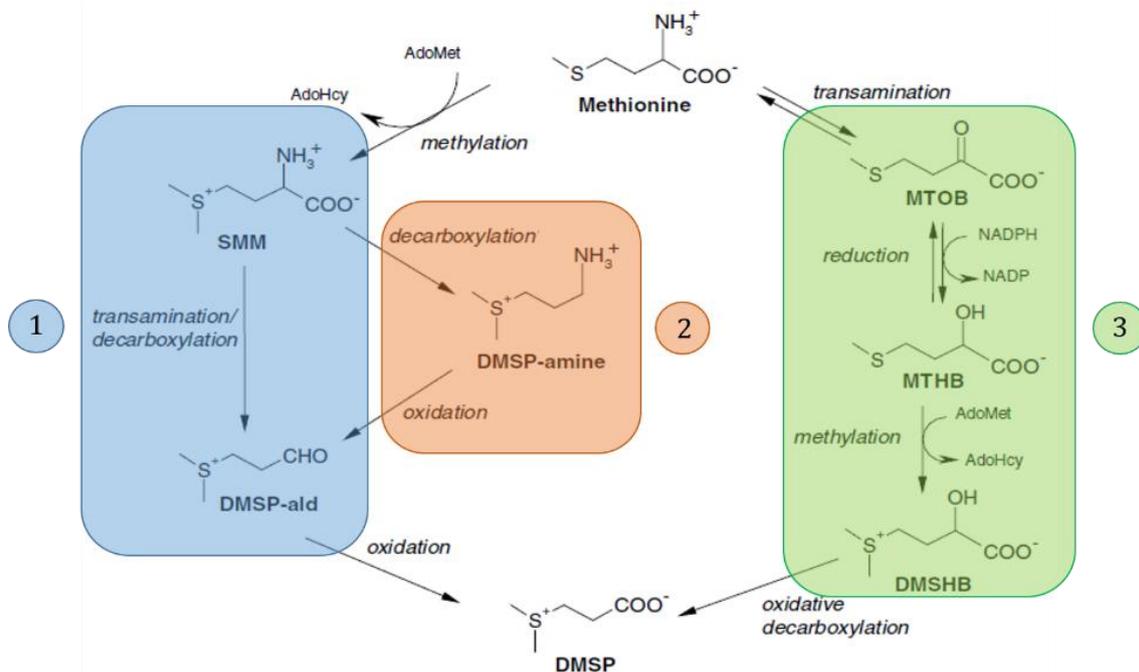


Figure 4 : Voie métabolique de la formation du DMSP à partir de la méthionine - schéma adapté (Stefels 2000).
 1) voie métabolique de *Wollastonia biflora* Wild (1965), 2) voie métabolique de *Spartina alterniflora* Loisel (1807), 3) voie métabolique de micro et macroalgues. AdoMet (*S*-adenosylméthionine), SMM (*S*-méthyl-méthionine), MTOB (4-méthylthio-2-oxobutyrate), MTHB (4- méthylthio-2-hydroxybutyrate), DMSHB (4-dimethylsulphonio-2-hydroxybutyrate).

Dans la voie métabolique de *W. biflora*, la méthionine est tout d'abord méthyliée afin de former le *S*-méthyl-méthionine (SMM). Cette molécule sera transaminée et décarboxylée pour obtenir le DMSP-aldéhyde (DMSP-ald) et puis oxydée pour obtenir le DMSP (Figure 4-1). La voie métabolique de *S. alterniflora* diffère légèrement avec une étape intermédiaire supplémentaire. En effet, la transformation du SMM en DMSP-ald s'effectue en deux étapes. La première étape consiste en la décarboxylation du SMM afin de produire la DMSP-amine. Cette dernière subit ensuite une oxydation qui mènera au DMSP-ald entre le SMM et le DMPS-ald qui est le DMSP-amine (Figure 4-2) (James et al. 1995; Stefels 2000).

En ce qui concerne la voie métabolique des algues, la synthèse débute par une transamination de la méthionine afin d'obtenir le 4-méthylthio-2-oxobutyrate (MTOB). Il s'en suit une série de réactions de type réduction, méthylation et décarboxylation oxydative qui mène à la production de DMSP (Figure 4-3) (Stefels 2000).

La dégradation du DMSP peut être réalisée par des procédés biologiques ou chimiquement par la photo-oxydation. Les deux voies métaboliques employées sont la déméthylation formant du méthaneithiol (Figure 5-A) et la lyse formant le DMS (Figure 5-B) (Dickschat, Rabe, and Citron 2015). La voie principale de dégradation est la déméthylation (Kiene, Linn, and Bruton 2000) (Figure 5-A1). La première enzyme capable de dégrader le DMSP en DMS est l'enzyme DddD qui forme du DMS et du 3-hydroxypropionate (Figure 5-B1). Elle a été découverte par Todd et al. (2007). Les autres enzymes, que sont DddL, DddP ou encore DddQ, forment du DMS et de l'acrylate à partir du DMSP (Figure 5-B2). (Dickschat, Rabe, and Citron 2015) La majeure partie du DMS est oxydé afin de former du DMSO (Hatton et al. 2012; Husband and Kiene 2007; Husband et al. 2012).

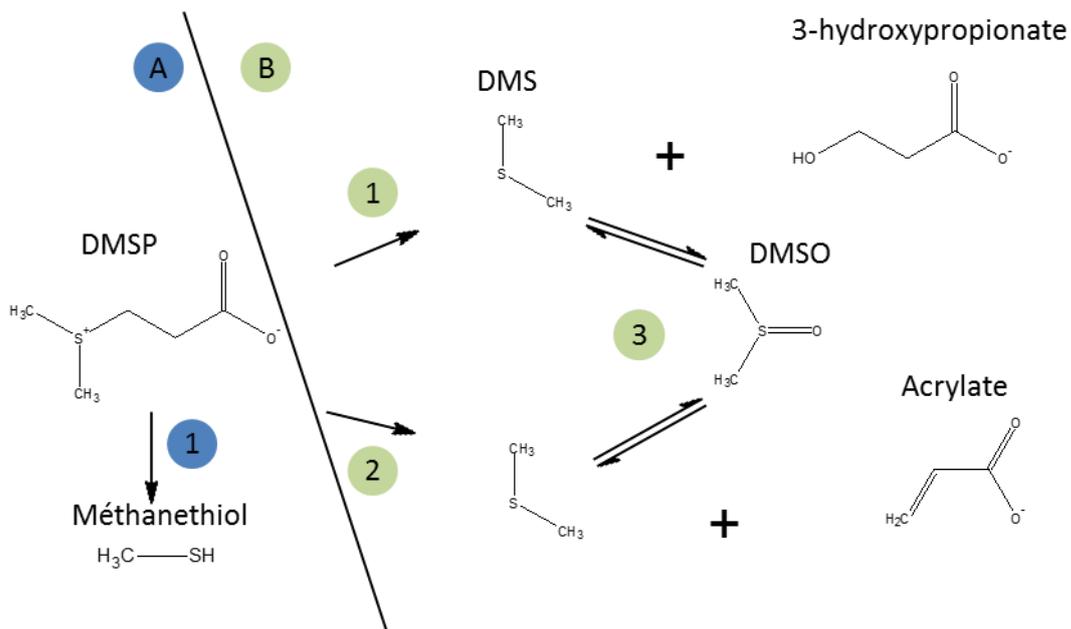


Figure 5 : Voie métabolique de la dégradation du DMSP et de la formation du DMSO par la réaction d'oxydoréduction entre le DMS et le DMSO. A) voie métabolique de la déméthylation B) voie métabolique de la lyse.

3. Rôle biochimique du DMSP

a. Phytoplancton

Les principaux groupes taxonomiques de phytoplancton marin produisant du DMSP sont les *dinophyceae* et les *prymnesiophyceae* (Maureen D. Keller 1989). Parmi ces deux classes, on retrouve les zooxanthelles, connues pour leurs symbioses avec les coraux, les coccolithophores et le genre *Phaeocystis*, largement étudié pour sa capacité à former des colonies macroscopiques et des efflorescences conséquentes. D'autres groupes produisent du DMSP en moins grandes concentrations comme certaines *chrysophyceae*, *bacillariophyceae* ou encore certaines cyanobactéries (Keller 1989). Le DMSP représente de 50 à presque 100% des composés soufrés dans ces organismes.

Tableau 1 : Ensemble des fonctions du DMSP et ses dérivés cités dans la littérature scientifique. osmorégulateur (Dickson et Kirst 1987; Diggelen et al. 1986; Husband et Kiene 2007; Husband et al. 2012; Karsten et al. 1992; Keller et al. 1996; McFarlin and Alber 2013; Otte and Morris 1994) / cryoprotectant (Karsten et al.1992; Kirst et al. 1991) / antibiotique (Van Alstyne and Puglisi 2007; Sieburth 1961) / régulation du soufre (Diggelen et al. 1986; Stefels 2000) / répulsif (Van Alstyne and Houser 2003; Borges and Champenois 2015; Strom et al. 2003) / antioxydant (Borges and Champenois 2015; Dring 2005; Husband and Kiene 2007; Husband et al. 2012; Ross and Alstyne 2007; Sunda et al. 2002) / attractant (DeBose and Nevitt 2007; Dell’Ariccia et al. 2014; Kiehn and Morris 2010)

Fonctions	Phytoplancton	Macroalgues	Angiospermes	Animaux
Osmorégulateur	X	X	X	X
Cryoprotectant	X	X	X	
Antibiotique	X			X
Régulation du soufre	X		X	
Répulsif	X	X	X	X
Antioxydant	X	X	X	X
Attractant				X

Le phytoplancton tire de nombreux avantages de la production de DMSP (Tableau 1). Son possible rôle de régulateur osmotique a été mis en avant dans plusieurs études. Ainsi, une haute concentration en DMSP a été observée chez *Cryptocodinium cohnii* Javornicky (1962) et *Hymenomonas carterae* Braarud (1954) lors de chocs osmotiques. Il n'est cependant pas le seul acteur de cette régulation, mais fait partie d'un ensemble de composés impliqués (proline, glycérol, bétaïne) (Dickschat et al. 2015; Dickson and Kirst 1987; Keller et al. 1996). Le possible rôle de cryoprotectant a également été mis en avant par Kirst *et al.* (1991) dans la mer de Weddell en Antarctique chez *Phaeocystis pouchetii* Lagerh (1896), et dans les

diatomées vivant dans la glace de mer (Turner et al. 1995). Chez cette même espèce, Sieburth (1961) a montré la propriété d'agent antibiotique de l'acide acrylique (dérivée du clivage du DMSP). La production de DMSP serait aussi un mécanisme de régulation du soufre réduit (Stefels 2000) et est un répulsif contre les prédateurs (Strom et al. 2003).

Sunda et al. (2002) ont mis en évidence la capacité du DMSP et des molécules basées sur celui-ci de capter les dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) agissant ainsi, comme mécanisme régulateur des stress oxydatifs (Apel and Hirt 2004). De nombreux paramètres peuvent influencer la production de ROS : le gel, la dessiccation, les rayonnements UV, les métaux traces,...(Dring 2005). La production de radicaux libres chez les producteurs primaires photoautotrophes est due principalement, en conditions normales, à la photosynthèse dans les chloroplastes et dans une moindre mesure, la respiration aérobie dans la mitochondrie. Une régulation fine des ROS est indispensable car ces derniers peuvent interagir et modifier chimiquement les lipides, les acides nucléiques et les protéines (Dummermuth et al. 2003). Ils n'en restent pas moins bénéfiques pour les organismes jouant plusieurs fonctions biologiques dont la lutte contre les pathogènes (Apel and Hirt 2004).

Le DMSP, le DMS, l'acrylate et le DMSO forment ensemble un système complexe antioxydant qui peut être plus efficace que l'ascorbate ou le glutathion (Sunda et al. 2002). Le DMS est 20 à 60 fois plus réactif vis-à-vis des radicaux hydroxyles que le DMSP. Il est également très réactif avec les oxygènes singulets. Les travaux, cités ci-dessus ont porté sur *Thalassiosira pseudonana* Cleve (1873), *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay et Mohler (1967) et *Skeletonema costatum* Cleve (1978). L'induction d'un stress oxydatif à partir de la limitation CO₂ (Butow et al. 1998) et de Fe résultait en une augmentation du DMSP, d'un facteur 20 à 60 par rapport aux cellules contrôles chez *T. pseudonana*. Sunda et al. (2002) ont observé également une augmentation du DMS et de l'activité de la peroxydase ascorbate antioxydante (APX), principale enzyme présente dans les chloroplastes pour limiter la production de peroxyde d'hydrogène lors de la photosynthèse. Une étude plus récente indique également que l'augmentation de la température et la limitation du CO₂ sur *E. huxleyi* induisent une hausse de la synthèse de DMSP en réponse aux stress oxydatifs provoqués (Arnold, Kerrison, and Steinke 2013). Ce mécanisme d'antioxydant n'a pas été confirmé par Galindo et al. (2016).

b. Macroalgues

La plus grande partie des études sur le DMSP et ses dérivés ont été menées sur le phytoplancton. Cependant, la découverte du DMS résulte de recherches sur une algue rouge à thalle, *Polysiphonia fastigiata* Greville (1824) (Haas 1935). Quelques années plus tard, Challenger et Simpson (1948) ont découvert chez cette même algue, son précurseur, le DMSP. Plusieurs études se sont succédé par la suite afin de mettre en lumière le mécanisme de production de ces molécules (Bywood and Challenger 1953; Cantoni and Anderson 1956; Greene 1962).

Van Alstyne et Puglisi (2007) ont montré que les chlorophytes dont les ulvales produisent de grandes quantités de DMSP (médiane à 145 $\mu\text{mol/g}$ de poids sec, $n=15$). En comparaison, les algues brunes et rouges produisent de plus faibles concentrations (inférieure à 10 $\mu\text{mol/g}$ de poids sec, $n=65$) excepté les genres *Polysiphonia* et *Halopytis* (médiane à 23 $\mu\text{mol/g}$ de poids sec, $n=9$) (Van Alstyne and Puglisi 2007).

Les avantages issus de la production du DMSP sont similaires à ceux listés précédemment pour le phytoplancton (Tableau 1). Karsten *et al.* (1992) ont montré que plusieurs macroalgues (*Ulothrix implexa* Kutzing (1849), *Ulothrix subflaccida* Wille (1901), *Enteromorpha bulbosa* Montagne (1846) et *Acrosiphonia arcta* Gain (1912)) présentes en Antarctique accumulent le DMSP afin de résister aux fortes pressions osmotiques induites par des chocs hypersalins : une augmentation linéaire du DMSP a été, en effet, corrélée à l'augmentation de la salinité. Ils démontrèrent, de plus, une différence significative entre les concentrations intracellulaires en DMSP chez les algues exposées à des températures différentes (0°C *versus* 10°C). Ils en ont déduit un rôle cryoprotectant, comme chez certaines espèces du phytoplancton. Le DMSP et ses dérivés jouent également un rôle dans la réduction de la prédation, tel que mis en évidence par Van Alstyne et Houser (2003). Enfin, il a été démontré que le DMSP et ses dérivés jouent un rôle dans la régulation du stress oxydatif chez *U. lactuca* (Ross and Alstyne 2007).

c. Angiospermes

Il n'existe que quelques rares angiospermes produisant des concentrations importantes de DMSP. C'est cependant le cas de certaines poacées et astéracées. Van Diggelen *et al.* (1986) ont mis en évidence la production de DMSP chez *Spartina anglica* Hubbard (1978). La production de DMSP a été également observée quelques années plus tard

par Dacey et al (1994) chez *S. alterniflora*. Une production de DMSP a été également identifiée chez *Wollastonia biflora* (Hanson et al. 1994) et *Saccharum officinarum* L. (1753) (Paquet et al. 1994).

Les études sur les angiospermes sont encore trop peu nombreuses pour confirmer les rôles de ces molécules soufrées telles que décrites chez le phytoplancton et les macroalgues (Tableau 1). Le rôle d'antioxydant suggéré par Sunda et son équipe (2002) n'a pas encore pu être démontré avec certitude (Husband and Kiene 2007; Husband et al. 2012), de même que le rôle d'osmolyte (Diggelen et al. 1986; Otte and Morris 1994). Deux nouvelles fonctions potentielles qui n'ont pas été observées chez les algues sont par ailleurs proposées. Premièrement, l'excrétion de DMS pourrait réduire le nombre d'épiphytes sur la plante (Borges and Champenois 2015; Otte et al. 2004). Deuxièmement, l'augmentation de la concentration en DMSP chez *S. anglica* observée par Van Diggelen *et al.* (1986) lors d'un ajout de sulfites dans le milieu de croissance de la plante, laisse à penser que la production de DMSP permettrait à la plante d'excréter l'excédent de soufre. Otte et Morris (2004) n'ont cependant pas retrouvé ce mécanisme chez *S. alterniflora*. Ces auteurs ont même avancé que l'hypothèse proposée par Van Diggelen était une mauvaise interprétation des données obtenues.

Husband et Kiene (2007) ont mis en évidence l'intérêt d'étudier le rapport du DMSO sur le DMSP afin d'exprimer le taux d'oxydation du DMSP, qui est la principale source de DMSO. Le rapport DMSO/DMSP a été utilisé par MacFarlin et Alber (2013) en tant que biomarqueur chez *S. alterniflora*. En effet, ils ont démontré que l'augmentation du rapport DMSO/DMSP survenait suite à un stress.

Borges et Champenois (2015) ont rajouté une plante marine à la liste des angiospermes productrices de DMSP. Ces auteurs furent en effet les premiers à mettre en avant la production de DMSP par *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813), une magnoliophyte endémique de la Mer Méditerranée (Gobert et al. 2006). Ils ont émis l'hypothèse que les variations saisonnières et bathymétriques de DMSP pourraient être liées à une variation de la lumière.

d. Macroinvertébrés et vertébrés

Le DMSP se retrouve dans le règne animal essentiellement par le biais de la symbiose et de la prédation. Il est présent principalement chez les cnidaires, les mollusques et les

porifères (Van Alstyne, Schupp, and Slattery 2006). Le phylum présentant les plus hautes concentrations en DMSP est celui des cnidaires qui effectuent des symbioses avec des microalgues (Van Alstyne and Puglisi 2007). Par exemple, le DMSP produit par les coraux scléactiniaires zooxanthellates (c'est-à-dire, qui effectuent une symbiose avec des zooxanthelles) résulte principalement de la production en DMSP de leurs symbiontes (Broadbent et al. 2002; Dickschat et al. 2015; Raina et al. 2013). Cependant, Raina *et al.* (2013) ont mis en évidence la capacité des larves d'*Acropora millepora* Ehrenberg (1834) et d'*Acropora tenuis* Dana (1846) de synthétiser du DMSP à un stade de leur cycle de vie où ces larves ne sont pas en symbiose mutualiste avec les zooxanthelles. Ce sont les premiers organismes non photosynthétiques producteurs de DMSP découverts. Quoi qu'il en soit, les organismes symbiotiques présentent des concentrations en DMSP en moyenne six fois plus élevées que ceux qui ne le sont pas (Van Alstyne and Puglisi 2007). Les raisons du stockage de cette molécule soufrée chez les invertébrés restent à ce jour méconnues. De nombreuses hypothèses ont été proposées, comme la protection contre les ROS produits par les symbiotes, ou encore, un rôle répulsif contre les prédateurs. Jones *et al.* (2014) ont étudié la concentration en DMSP chez *Acropora intermedia* Brook (1891). Ils ont mis en évidence une fluctuation saisonnière. De plus, ils ont comparé leurs données avec celles obtenues dans d'autres études relatives au blanchissement des coraux sur le récif, une réaction de survie du corail qui expulse ses zooxanthelles massivement lors d'un dérèglement de la symbiose. Une augmentation significative de la concentration en DMSP a été observée lors du blanchissement corallien. Ils ont alors proposé d'employer la concentration en DMSP comme indicateur de stress.

Le DMSP et le DMS sont également employés comme signatures chimiques indiquant une zone de haute production primaire et secondaire. En effet, certains poissons et oiseaux marins utilisent ces deux molécules soufrées comme indicateurs. (DeBose and Nevitt 2007; Dell'Araccia et al. 2014). Savoca et Nevitt (2014) émettent l'hypothèse que le DMS relâché par les proies lors de broutage par les consommateurs primaires peut attirer les *top-predators* afin de réduire le nombre de consommateurs primaires. Il s'agirait d'une symbiose mutualiste dans un système tritrophique entre les producteurs de DMSP et les *top-predators*, très étudiée dans les interactions entre les plantes et les insectes (Kasai et al. 2005).

Ackman et Hingley (1967) ont montré que certains mollusques accumulent le DMSP via leur alimentation. En fournissant une alimentation dépourvue de cette molécule à des huitres creuses (*Crassostrea gigas* Thunberg (1793)), la concentration en DMSP diminuait pour devenir imperceptible après quatre mois. Des études dans les pêcheries au Canada ont indiqué une forte odeur soufrée des produits de la pêche liée au DMS. Ce phénomène appelé *Blackberry feed* provient, chez la morue de l'atlantique (*Gadus morhua* L. (1758)), de son régime alimentaire, lorsqu'il est basé sur un ptéropode (*Limacina helicina* Phipps (1774)) brouteur de phytoplancton (Levasseur et al. 1994). Des recherches plus anciennes avaient déjà fait part de ce phénomène chez le maquereau commun (*Scomber scombrus* L. (1758)) se nourrissant également de ptéropodes (*Limacina retroversa* Fleming (1823)) (Ackman, Hingley, and MacKay 1972).

4. *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813)

Les magnoliophytes marines, dont fait partie *P. oceanica*, ne sont pas l'intermédiaire entre les algues et les plantes. Il s'agit de plantes terrestres qui ont recolonisé le milieu marin. Elles ont dû mettre en place un ensemble de mécanismes afin de s'adapter aux contraintes de l'environnement marin côtier comme l'hydrodynamisme, la salinité ou encore les limitations en nutriments dans la colonne d'eau (Papenbrock 2012; Sieg and Kubanek 2013).

a. *Biologie de P. oceanica*

P. oceanica, qui appartient à l'ordre des *Najadales* et à la famille des *Posidoniaceae*, est une plante endémique de la Mer Méditerranée. Son aire de distribution y couvre plus de 12 000 km² (Figure 6) (Telesca et al. 2015).

P. oceanica se développe sur les fonds sableux et rocheux en formant des patches ou des prairies continues sous-marines. On la retrouve de la surface jusqu'à 45 m de profondeur. La température, la salinité et la turbidité sont des paramètres essentiels qui déterminent les endroits où elle prospère. Ceci explique son absence près de l'embouchure du Rhône, du Po et du Nil (turbidité inadéquate), ainsi qu'au large des côtes de la Syrie, du Liban et d'Israël où la température est trop élevée (Celebi et al. 2006). La température moyenne journalière de l'eau à Ras beirut (ville côtière du Liban) au mois d'août est de 28. 5°C et atteint des maximums à 29.5°C (www.seatemperature.org). La posidonie est pourtant considérée comme eurytherme et se développe dans une gamme de température large, allant de 9°C à 29°C avec

un optimum de 17°C à 20°C (Boudouresque and Meinesz 1982). Par contre, elle est sténohaline et tolère une fourchette étroite de salinité comprise entre 36.5 et 39.5. Cependant, Meinesz *et al.* (2009) ont mis en évidence la présence de *P. oceanica* dans le détroit de Dardanelles et la mer Marmara avec des salinités de 22-28. Elle a été trouvée également dans le lagon hypersalin de Stagnone à Marsala (salinité de 48) qui se situe à l'Est de la Sicile (Tomasello et al. 2009).

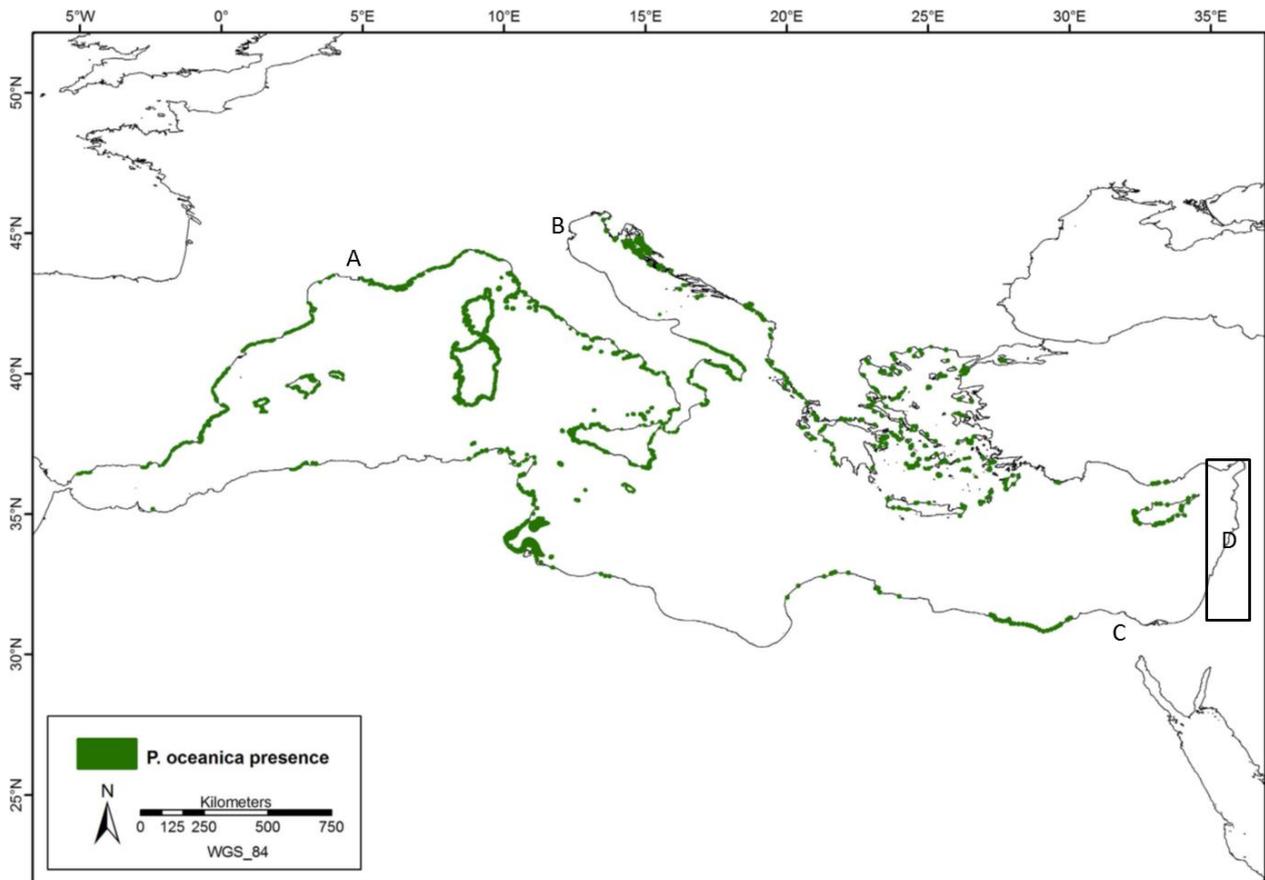


Figure 6 : Distribution géographique de *Posidonia oceanica* (Telesca et al. 2015). A) Embouchure du Rhone B) du Po C) du Nil D) côtes de la Syrie, du Liban et d'Israël.

Morphologiquement, *P. oceanica*, tout comme les autres Magnoliophytes marines, est composée de tissus épigés et endogés (Figure 7). La partie endogée de la plante regroupe les racines et les rhizomes. La partie épigée est composée de faisceaux de feuilles. Ses rhizomes peuvent croître horizontalement (rhizomes plagiotropes) ou bien verticalement (rhizomes orthotropes). L'enchevêtrement des racines, des rhizomes et des sédiments forme la mat. Cette dernière croît en épaisseur de 0.18 cm en moyenne par an (Gobert et al. 2006).

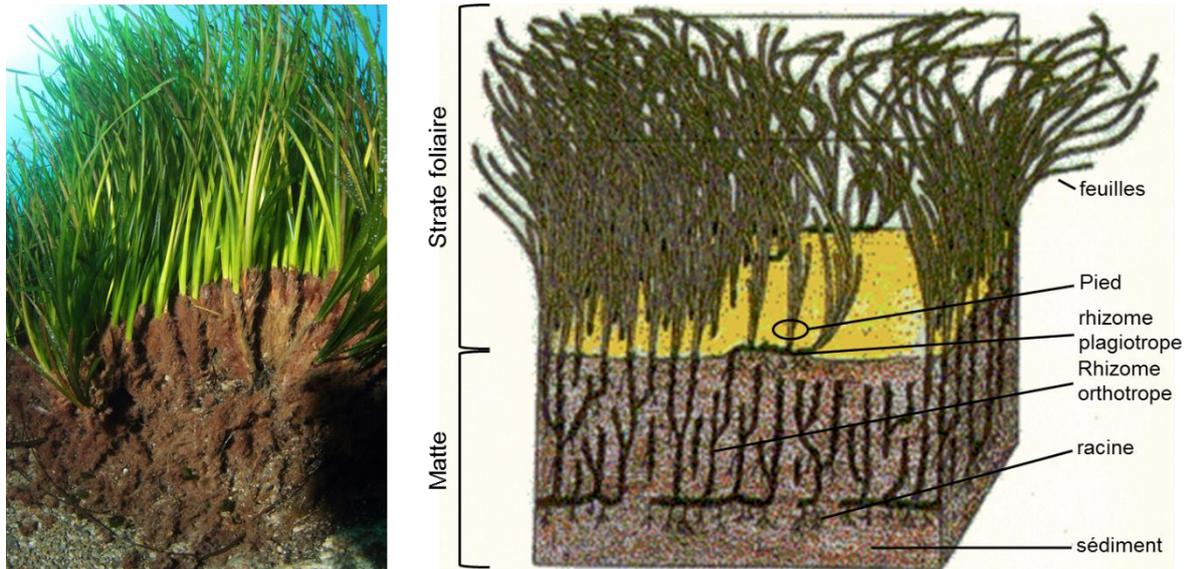


Figure 7 : Structure morphologique de *Posidonia oceanica*. À gauche, photographie montrant les parties épigées et endogées en bordure d'herbier (photo : Arnaud Abadie). À droite, schéma détaillant les différents organes – schéma adapté (Boudouresque and Meinesz 1982).

La feuille adulte est composée d'un limbe, d'une ligule et d'une gaine basale comprenant la stipule et le pétiole (Figure 8). La croissance des feuilles est continue avec une durée de vie pour chaque feuille comprise entre 5 et 8 mois. Les feuilles grandissent en trois stades successifs. Tout d'abord, la feuille est juvénile et de taille généralement inférieure à 5 cm (Figure 8-D). À ce stade, les différentes parties de la feuille ne peuvent être distinguées. Ensuite, la feuille passe au stade intermédiaire (Figure 8-C). Elle n'est pas encore composée d'une gaine distincte. Pour terminer, le stade adulte est composé d'une partie basale, séparée du limbe foliaire par une ligule (Figure 8- A, Figure 8-B). Lors de la chute du limbe de la feuille en fin de vie, la partie basale reste et forme une écaille. L'observation de la succession des écailles permet donc de déterminer l'histoire de la plante, ce qui s'appelle la lépidochronologie.

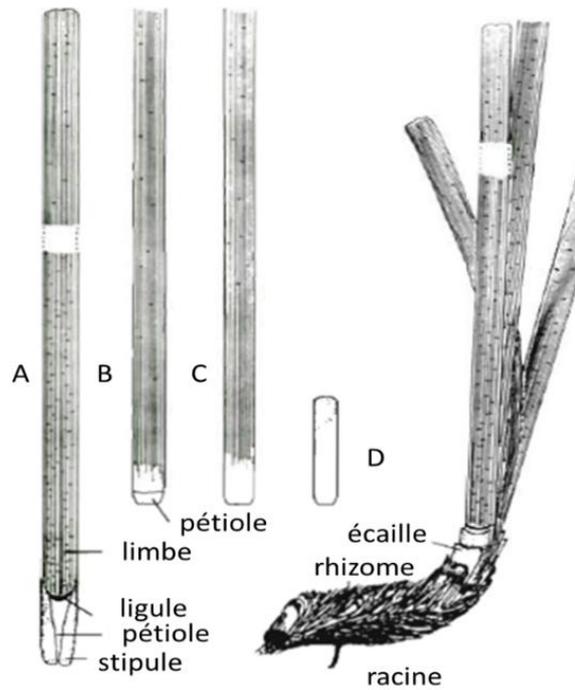


Figure 8 : Structure morphologique des feuilles de *Posidonia oceanica* (Boudouresque et al. 2006). A, B) feuilles adultes C) feuille intermédiaire D) feuille juvénile.

Même si les feuilles de *P. oceanica* apparaissent et tombent tout au long de l'année (plante décidue), un cycle bien marqué apparaît néanmoins (Figure 9). La présence de feuilles juvéniles est maximale en été, et coïncide avec les chutes plus importantes de feuilles adultes sénescentes du mois d'août. Ces feuilles juvéniles vont progressivement grandir pour donner des feuilles intermédiaires qui elles-mêmes donneront des feuilles adultes. Ainsi, l'ensemble du faisceau de feuilles croit et vieillit de l'automne à l'été avant de se régénérer.

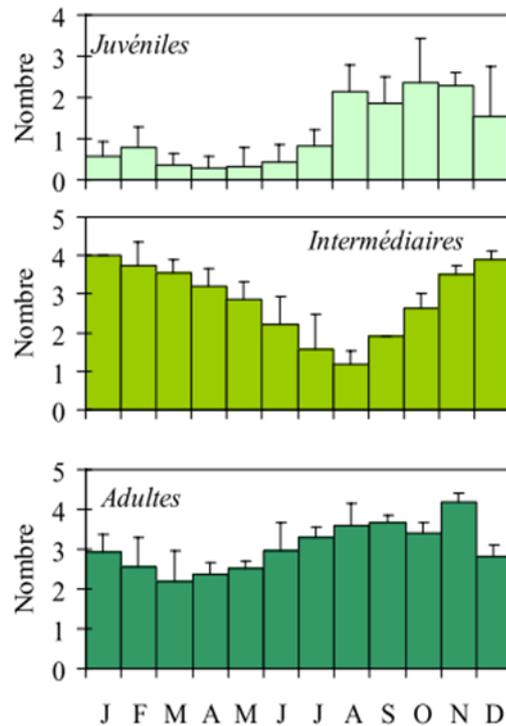


Figure 9 : Evolution moyenne au cours du temps du nombre de feuilles juvéniles, intermédiaires et adultes par pousse dans l’herbier de *Posidonia oceanica* de la Baie de la Revellata à Calvi en Corse à 10m de profondeur (Gobert 2002).

P. oceanica est hermaphrodite et se développe par reproduction sexuée et asexuée. Elle ne fleurit pas chaque année (Figure 10). Malgré le peu d’étude sur le sujet, les deux paramètres primordiaux avancés sont la variation de température (Diaz-Almela et al. 2007) et d’intensité lumineuse (Montefalcone et al. 2013). La reproduction végétative, qui se fait par le développement des rhizomes, permet principalement le maintien de l’herbier alors que la reproduction sexuée permet l’augmentation du recrutement (Gobert et al. 2006). La floraison se déroule entre septembre et novembre. Le fruit mûrit durant plusieurs mois avant de se détacher de l’inflorescence (Balestri et al. 2003).



Figure 10 : Photographie d’une fleur de *Posidonia oceanica* (photo : Arnaud Abadie).

b. Ecologie de *P. oceanica*

P. oceanica est, à la base d'un écosystème complexe schématisé par Personnic et al. (2014) (Figure 11). Ce dernier est l'un des seuls cas de combinaison de deux producteurs primaires complémentaires, soit *P. oceanica* elle-même, soit la cohorte de ses épiphytes. La production primaire de la première est en moyenne de 420 g/m²/an de masse sèche et peut atteindre jusqu'à 1300g/m²/an. Les épiphytes foliaires produisent entre 100 et 500 g/m²/an de masse sèche. Les herbiers de *P. oceanica* forment un écosystème dont la biodiversité est importante. En effet, plus de 1000 espèces animales et 400 espèces végétales sont associées à cet écosystème (Boudouresque et al. 2006). Il est considéré comme un *hot spot* en Mer Méditerranée

La posidonie a peu de prédateurs et cette prédation ne dépasse pas 10% de la biomasse de cette dernière. Les herbivores, les plus importants, sont *Sarpa salpa* L. (1758) et *Paracentrotus lividus* Lamarck (1816) (Figure 11-herbivores). Lors de la chute des feuilles de posidonies, une partie est exportée en dehors de l'herbier et l'autre partie prend part à la litière de ce dernier. La dégradation des feuilles dans la litière est lente par les microorganismes tel le ... (Figure 11-BAFHS) et les détritivores qui sont principalement des oursins tel *Psammechinus microtuberculatus* Blainville (1825), des amphipodes tel *Atylus guttatus* Costa (1851) ou encore des brachyours tel *Sirpus zariquieyi* Gordon (1953) (Figure 11-détritivores). Ces invertébrés, vivant sur les feuilles et dans la matre, sont consommés par des organismes tels *Echinaster sepositus* Retzius (1783), *Coris julis* L. (1758) ou encore *Diplodus annularis* L. (1758) (Figure 11-prédateurs téléostéens, céphalopodes, étoiles de mers). Les prédateurs de ces consommateurs seront *Scorpaena notata* Rafinesque (1810) ou encore *Conger conger* L. (1758) (Figure 11-piscivores téléostéens). Ils consomment également les planctonophages comme *Chromis chromis* L. (1758) (Figure 11-planctonivores téléostéens). Ces piscivores téléostéens sont consommés par des oiseaux marins comme *Phalacrocorax aristotelis* L. (1761) (Figure 11-oiseaux marins).

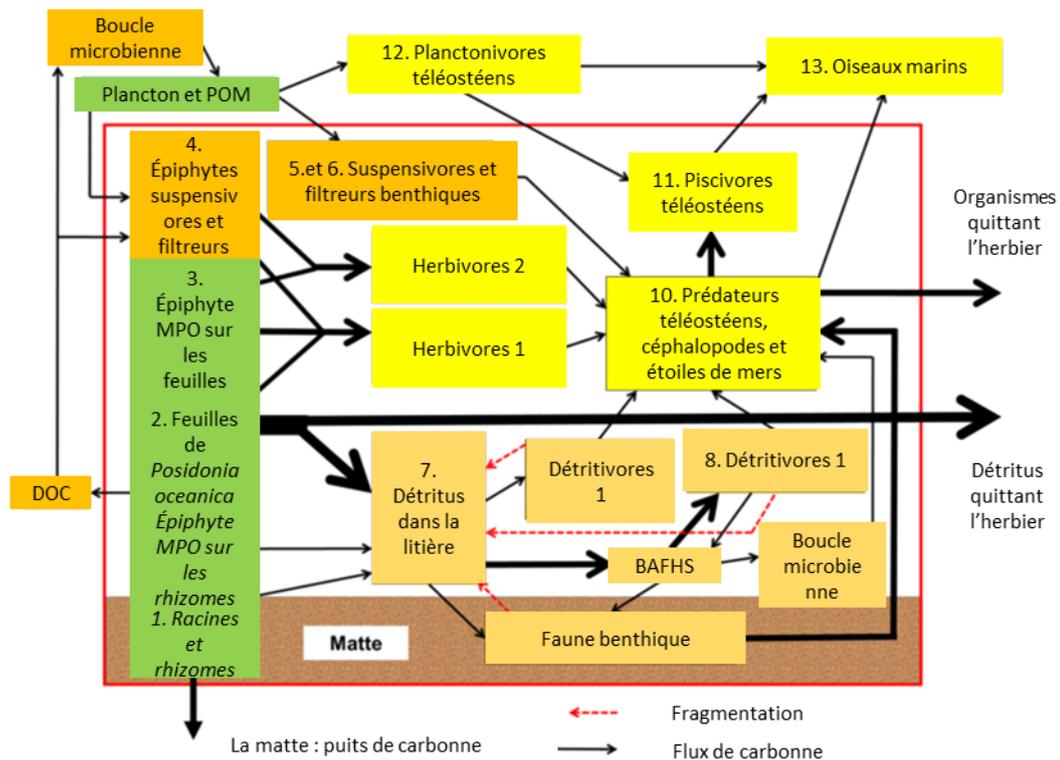


Figure 11 : Schématisation du fonctionnement de l'écosystème de *P. oceanica* – Schéma traduit (Personnic et al. 2014). Les encadrés disposant d'un indice numérique sont ceux employés dans l'indice de qualité d'un écosystème (Ecosystem-based quality Index, EBQI. Matière organique particulaire (POM), carbone organique dissous (DOC), les organismes décomposeurs principalement des bactéries, des archées, des straménopiles hétérotrophes (BAFHS).

c. Fonctions écologiques de *P. oceanica*

Groot et al. (2002) ont dénombrés 23 fonctions que les écosystèmes naturels peuvent rendre à l'homme, se basant sur la définition suivante : « la capacité d'un processus et composant naturel à fournir des biens et services qui satisfont les besoins humains directs ou indirects » (en anglais « *the capacity of natural processes and components to provide goods and services that satisfy human needs, directly or indirectly* »). Actuellement, ce sont 25 fonctions différentes qui sont catégorisées, pour servir d'habitat pour les animaux, fixer le CO₂, ou encore, purifier l'eau (Nordlund et al. 2016). *P. oceanica* fournit dans l'écosystème Méditerranéen 19 de ces 25 fonctions à elle seule, sachant que les données sont insuffisantes pour pouvoir préciser les six dernières (annexe 1). Ceci démontre l'intérêt important de cette plante pour les services que la Mer Méditerranée rend à l'homme.

Les deux strates formées par l'herbier *P. oceanica*, que sont la matre et la strate foliaire (Figure 7), permettent de structurer et de stabiliser les fonds côtiers. La barrière formée par

l'herbier réduit l'hydrodynamisme, limitant l'érosion du littoral et augmente la sédimentation (Boudouresque et al. 2006; Gobert et al. 2006).

Enfin, d'un point de vue financier, les herbiers de posidonies jouent un rôle économique non négligeable estimé à 19004 \$/ha par an. Cette valeur est estimée sur base d'un ensemble de critères comme la protection contre les tempêtes, le rôle de refuge pour la biodiversité ou encore les activités touristiques et culturelles qu'ils engendrent (Costanza et al. 1997). Cette valeur est par exemple 9.5 fois plus faible pour la forêt tropicale qui est de 2007 \$/ha par an.

d. Bioindicateur

L'Union européenne a mis au point plusieurs directives successives dans le temps afin de protéger et conserver les écosystèmes, dont la Directive Habitats adoptée en 1992 (92/43/ECC), la Directive Cadre de l'Eau adoptée en 2000 (2000/60/EC) et plus récemment la Directive Cadre des Eaux Marines adoptée en 2010 (2010/477/EU). Cette dernière a pour objectif d'atteindre un bon état écologique des océans, mers et zones côtières qui bordent l'UE pour 2020. Afin d'établir le bon état écologique d'une région, des indices biologiques sont utilisés (Personnic et al. 2014). Ils emploient donc différents organismes, appelés des bioindicateurs (Blandin, 1986, dans Personnic et al. 2014). Ils sont définis par un organisme ou un ensemble d'organismes qui permettent de caractériser le statut d'un écosystème via des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, écologiques ou encore éthologiques. *P. oceanica* a été sélectionnée pour servir de bioindicateur, parmi d'autres espèces clés, de l'état de santé de la Mer Méditerranée (Montefalcone 2009).

Différentes mesures destructives comme la biométrie de faisceaux ou non destructives comme l'estimation de la densité de pousse par unité de surface de l'herbier, sont employées (Annexe 2). Ces mesures sont ensuite rassemblées afin de calculer des indices qui quantifient l'état de santé des milieux marins comme le POMI, le BiPo, le PoSte ou encore le PREI (Gobert et al. 2009; Lopez Y Royo et al. 2011). McFarlin et Alber (2013) proposent d'utiliser deux biomarqueurs que sont le rapport du DMSO sur le DMSP, ainsi que la teneur en éléments traces (TE) comme le cuivre, l'aluminium ou encore le plomb, anciennement appelé métaux lourds (Richir and Gobert 2016), comme indicateur de stress chez *S. alterniflora*. Les indicateurs proposés par McFarlin et Alber semblent plus sensibles que les indicateurs

traditionnels, comme l'évolution de la densité, l'étude de la biomasse ou encore la présence de tissus morts. Ils pourraient être d'un grand intérêt également pour *P. oceanica* afin d'évaluer l'état de santé de la plante, et donc *in fine*, de l'écosystème méditerranéen (Richir & Gobert 2014; Richir et al. 2015).

C'est dans ce dernier contexte que le présent travail s'insère, en étudiant plus précisément l'effet d'une exposition au cuivre de *P. oceanica*. Le cuivre est considéré comme un élément essentiel pour les organismes vivants. En effet, il joue différents rôles dans l'organisme, par exemple, dans la chaîne de transport des électrons dans la photosynthèse, dans la régulation des ROS, ou encore, dans la respiration cellulaire (Yruela 2005). Cependant, le Cu devient rapidement toxique à concentration à peine plus haute que celle rencontrée dans l'eau de mer habituellement et empêche alors, entre autres, la photosynthèse de se dérouler correctement via l'inhibition du transport d'électrons au niveau du photosystème II (Llagostera et al. 2016; Prange and Dennison 2000; Ralph and Burchett 1998).

Chapitre II :

Finalité du

mémoire

1. Cycle saisonnier naturel en DMSP & DMSO

Les nombreuses fonctions attribuées au DMSP et ses dérivés résultent de recherches expérimentales. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à l'évolution saisonnière naturelle du DMSP et du DMSO dans un organisme. Ce travail a pour premier objectif d'étudier les fluctuations de concentration de ces deux molécules dans *P. oceanica*, prélevée dans la baie de Calvi à 10 m de profondeur dans des conditions environnementales stables et saines. En parallèle, l'évolution saisonnière de l'activité photosynthétique de la plante est également monitorée.

Une fois le cycle naturel de production du DMSP et du DMSO décrit, ce dernier est comparé au cycle saisonnier de la température, de l'intensité lumineuse et de la radiation photosynthétiquement active, ceci afin de définir les paramètres environnementaux déterminant leur production. De même, il est comparé à l'évolution saisonnière de l'activité photosynthétique de la plante et de sa croissance pour mettre en évidence une éventuelle relation entre ces variables physiologiques.

Le rapport DMSP/DMSO a été proposé comme biomarqueur de stress oxydatif. Cette première partie du présent travail donnera l'évolution saisonnière et naturelle de ce rapport dans un herbier de référence, évolution qui pourra ensuite être utilisée comme ligne de base pour de futures études de terrain et travaux expérimentaux.

2. Utilisation du DMSP & du DMSO comme biomarqueurs de réponse au stress oxydatif induit par le cuivre

Une expérience d'exposition au cuivre à différentes concentrations environnementalement pertinentes de 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ est réalisée en aquarium. L'objectif de ce volet expérimental est d'évaluer la réponse du potentiel biomarqueur qu'est le rapport DMSP/DMSO chez *P. oceanica* soumise au stress oxydatif induit par cet élément trace métallique. En effet, certaines études attribuent la fonction de molécules antioxydantes au

DMSP et au DMSO. Il a de plus été proposé d'utiliser leur rapport pour exprimer le taux d'oxydation du DMSP en DMSO qui varierait en cas de stress.

Pour ce faire, des morceaux d'herbier effondrés suite à l'action érodante des courants sont prélevés en baie de Calvi et contaminés en aquarium. En parallèle au suivi de la production du DMSP et du DMSO, l'évolution de l'activité photosynthétique des pousses est également étudiée. La photosynthèse est, depuis une vingtaine d'années, reconnue comme un biomarqueur efficace de quantification de l'exposition à des facteurs de stress chez les organismes photosynthétiques.

Chapitre III :

Matériels &

méthodes

1. Lieu de l'étude

Le site étudié se situe à proximité de la STATION de Recherche Sous-marines et Océanographique (STARESO), au Nord-Ouest de la Corse, dans la Baie de Calvi (8.725°E 42.580°N) (Figure 12). Une prairie sous-marine de *P. oceanica* s'y étend de 3 m à 38 m de profondeur (Gobert 2002). L'étude a débuté le 30 avril 2015 et se termina le 12 juillet 2016.

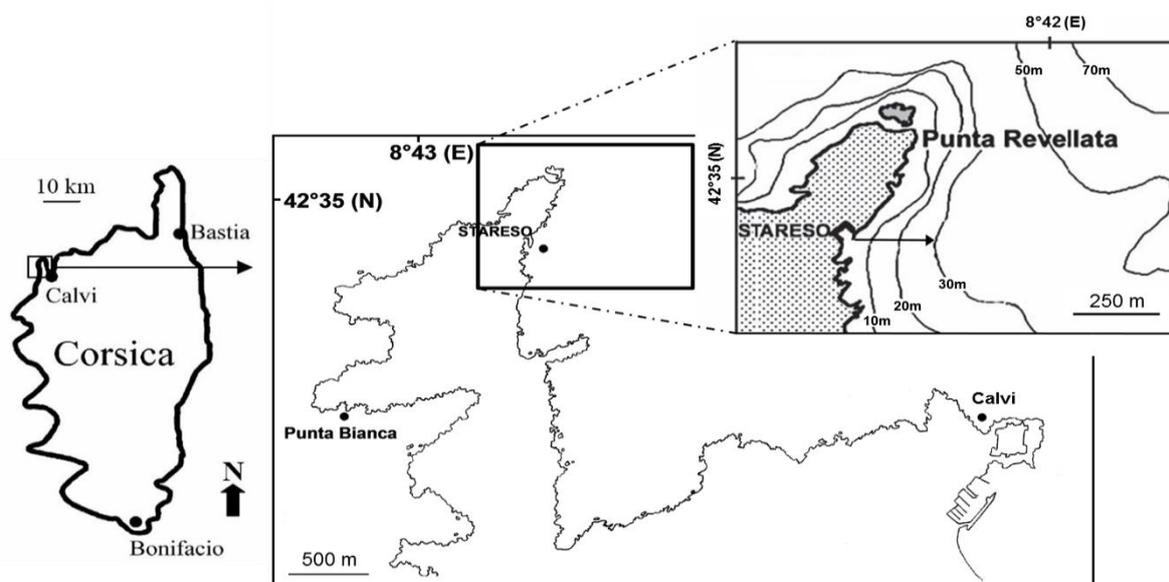


Figure 12 : Représentation cartographique du lieu de l'étude (Calvi, Corse, France) – schéma adapté (Richir et al. 2013).

2. Mesure des paramètres environnementaux

La station de recherche emploie des capteurs et sondes de mesures de paramètres environnementaux, dont la température de l'eau, la lumière et l'oxygène (Figure 13). Deux luxmètres couplés à deux sondes de température (*Temperature/Light Data Logger HOBO Pendant®*) sont utilisés afin de mesurer en continu la température en degré Celsius et la lumière en lx qui représente un flux lumineux par unité de surface. Le premier HOBO est placé à 8 m, à 2 m du fond et au-dessus de la canopée de l'herbier. Le second HOBO est placé à 10 m au pied de l'herbier. Un quantamètre Odyssey est aussi employé afin de mesurer la radiation photosynthétiquement active (PAR) exprimée en $\mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ce dernier est positionné à 10 m de profondeur dans la colonne d'eau, à 2 m du fond au-dessus de la canopée de l'herbier ; il y mesure verticalement le PAR (à la différence du PAR mesuré par le quantamètre du Diving-PAM). Les trois sondes ont enregistré les paramètres température,

intensité lumineuse et PAR toutes les 10 minutes. Les données acquises par les sondes sont récupérées à intervalles réguliers, environ tous les deux mois.



Figure 13 : Photographie des sondes HOBO et Odyssey (photo : Guyliann Engels). À gauche, la sonde HOBO mesurant l'intensité lumineuse (lx) et la température (°C). À droite, la sonde Odyssey mesurant le PAR ($\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3. Mesure *in situ* de l'activité photosynthétique et collecte des échantillons

Dans la membrane des thylakoïdes des chloroplastes, le complexe pigmentaire PSII transfère, lors de la photolyse d'une molécule d'eau en présence d'énergie lumineuse, deux électrons à la chaîne de transport d'électrons. Quant à l'excès d'énergie qui ne peut être dissipé par la voie de la photochimie, il l'est par émission de chaleur et de fluorescence, les trois voies étant employées en même temps par la plante (Hopkins 2003). Ces voies alternatives seront d'autant plus importantes que la plante est exposée à une intensité lumineuse élevée. L'activité photosynthétique est mesurée à partir de la fluorescence émise par la plante. Le Diving-Pam (*Walz Diving Pam underwater chlorophyll fluorometer, Walz, Germany*) permet de réaliser ces mesures *in situ* jusque 50 m de profondeur (Figure 14).

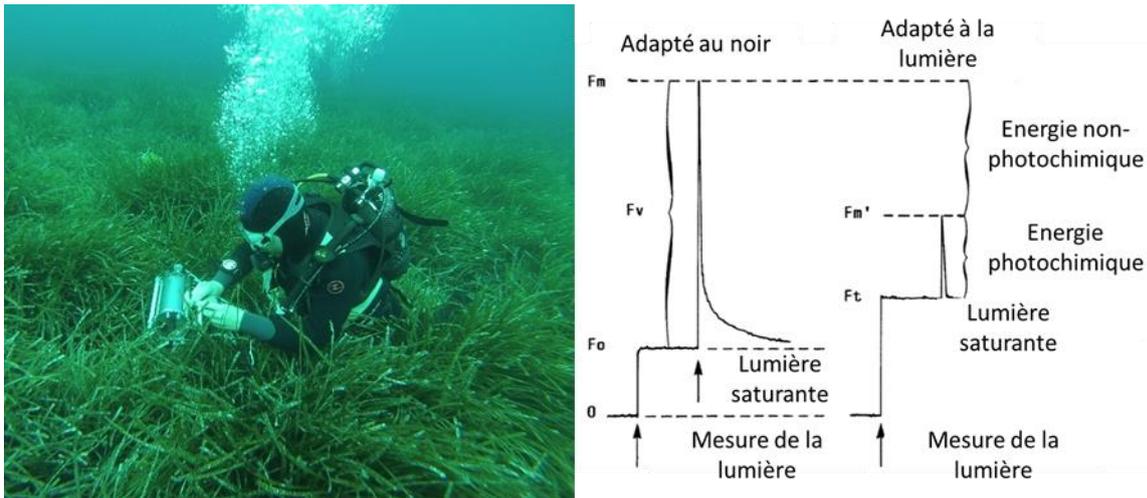


Figure 14 : Mesure de la fluorescence avec le Diving-Pam. A gauche, photographie montrant l'utilisation du Diving-Pam (photo : Antoine Batigny). À droite, principe de la mesure de fluorescence pour les organismes adaptés au noir ou non.

Dans le noir, la fluorescence est minimale et notée F_0 . Les photosystèmes sont relâchés. L'envoi d'une lumière pulsée saturante induit le maximum de fluorescence noté F_m . La relation ci-dessous fournit le rendement photosynthétique maximal (Figure 14).

$$Y = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Exposé à des conditions de lumière naturelle, la plante émet une certaine fluorescence notée F_t . L'envoi d'une lumière pulsée saturante est employé afin d'établir le maximum de fluorescence de cette dernière notée F_m' . La relation ci-dessous fournit le rendement photosynthétique effectif (Figure 14).

$$Y = \frac{F_m' - F_t}{F_m'}$$

F_m' est plus faible que F_m fournie par une plante adaptée au noir. Cette différence s'explique par le fait qu'une partie des centres réactionnels réalisent la photochimie, et ne sont plus disponibles pendant ce laps de temps. De plus, le Diving-PAM est équipé d'un quantamètre accolé à la fibre optique mesurant la fluorescence afin de quantifier les PAR reçues par la plante lors de la prise de mesure.

Le taux de transport d'électrons (*Electron Transport Rate*, ETR) peut être calculé à partir du rendement de photosynthèse effectif et le PAR via les équations suivantes :

$$ETR = PAR \times Y \times 0,5 \times AF$$

Les constantes sont le 0.5 et AF. La première constante représente le partage d'électrons entre le PSI et le PSII et l'énergie lumineuse incidente absorbée par la plante. La seconde constante a une valeur de 0.84 qui représente le facteur d'absorbance (*absorbance factor*, AF) de la lumière incidente photosynthétisable (PAR) estimé pour les plantes terrestres. Cependant, Lassauque (2009) a montré que le AF de *P. oceanica* varie entre 0.7 et 0.9. Afin de ne pas dépendre de l'incertitude existante sur ces deux constantes, il est possible de travailler avec le rETR, soit le taux de transport relatif d'électrons calculé via l'équation simplifiée suivante :

$$rETR = PAR \times Y$$

L'utilisation de rETR se justifie lorsque les constantes ne varient pas, ou très peu, ce que l'on peut supposer généralement en travaillant avec des plantes de la même espèce issues du même site d'étude comme c'est le cas ici. À la suite de la prise de mesure de fluorescence, la troisième feuille de chacune des 18 pousses analysées est prélevée afin d'être utilisée pour réaliser différents dosages biochimiques, dont le dosage du DMSP et du DMSO sur trois d'entre-elles, prises au hasard dans l'échantillon total. Ces troisièmes feuilles sont coupées au-dessus de la ligule (de los Santos et al. 2016). Seuls les 20 premiers centimètres sont gardés, grattés de leurs épiphytes, placés dans des récipients en borosilicate d'un volume de 10 mL et conservés au congélateur à -28 °C jusqu'à analyse.

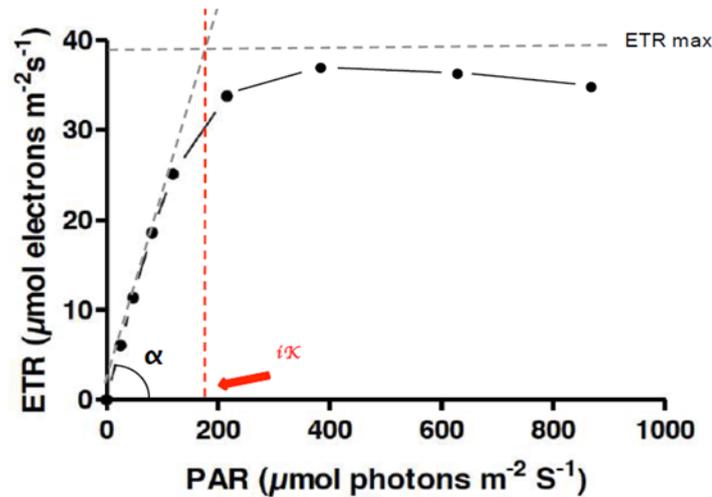


Figure 15 : Exemple de courbe de lumière (RLC) montrant l'évolution du ETR ($\mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) par rapport au intensité croissante de PAR ($\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). α (pente initiale de la courbe), ETRmax (taux de transfert d'électron maximal), iK (valeur de la moitié de la saturation maximale).

Dix pousses sont sélectionnées afin de réaliser des courbes de lumières (*Rapid Light Curves, RLC*). Une RLC consiste en la mesure successive de la fluorescence à des intensités de lumière croissantes et prédéfinies afin de déterminer le ETR pour chaque intensité. Plusieurs modèles mathématiques, comme le modèle PGH ou encore de Webb, sont employés afin de déterminer le taux de transfert maximal (ETRmax), qui rend compte de la plasticité photochimique de la plante. Les pousses sont également prélevées pour analyses biochimiques qui ne seront pas détaillées dans le cadre de ce travail ; étant donné qu'elles ne font pas partie de l'objectif direct de ce dernier.

Les mesures et prélèvements sont réalisés à 10 m de profondeur. Un total de 18 mesures de rendement photosynthétique et 10 courbes de lumière (rapid light curves, ou RLC) sont réalisées avec un Diving-PAM à chaque sortie en plongée (hebdomadaire à bimensuelle). Cet instrument permet de mesurer la fluorescence émise par les organismes photosynthétiques afin d'en déduire l'activité photosynthétique comme expliqué ci-dessus.

Afin d'obtenir des données comparables, le protocole de mesure est standardisé. Les mesures sont réalisées sur le milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille (juvénile exclue), et la mesure est effectuée systématiquement lorsque le soleil est au zénith, par temps calme et ensoleillé.

4. Exposition expérimentale au cuivre en aquarium

L'expérience d'exposition au cuivre en aquarium se déroule du 24 avril 2017 au 5 mai 2017. Après un jour d'acclimatation, les posidonies sont soumises à huit jours d'exposition au Cu du 25 avril à 19 h au 3 mai 12 h suivi de deux jours de récupération du 3 mai 12 h au 5 mai 12 h.

a. Collecte et disposition des organismes

Les faisceaux de posidonies sont prélevés à 14 m de profondeur, dans l'herbier de posidonies face à la station océanographique STARESO, au niveau d'une tâche de sable longiforme naturelle présentant, vers la côte, une falaise de 2 m de hauteur. Ces falaises sont soumises à l'action érodante des courants qui conduisent à l'effondrement de morceaux d'herbier (Gobert et al. 2016). Ainsi, deux fragments d'herbier récemment effondrés de respectivement environ 0.5 et 1.5 m² ont été découpés en 4 morceaux de taille similaires, composés des faisceaux de posidonies et des 20 premiers cm de matte.

La densité de faisceaux à 10m (n = 20, profondeur de référence) et à 12m (n = 20, en bordure de la falaise d'où ont été érodés les morceaux d'herbier), ainsi que la biométrie de 10 faisceaux à 10 m et à 12 m est réalisée.

Avant découpe, la 3^{ème} feuille de 3 faisceaux distincts a été prélevée pour y doser le DMSP, le DMSO et le Cu. Les morceaux d'herbier ont ensuite été ramenés à quai et rapidement placés en aquarium.



Figure 16 : Photographie du site de prélèvement (photo : Guyliann Engels) et disposition en aquarium des faisceaux de *Posidonia oceanica* (photo : Guyliann Engels). À gauche, tâche de sable longiforme à 14m de profondeur dans l'herbier de posidonies. À droite, disposition dans un aquarium d'un des 4 morceaux d'herbier, avec faisceaux et une partie de la matte.

b. Mise en place de l'installation

i. Principe général

Quatre aquariums (Figure 17) sont utilisés afin de réaliser l'expérience de contamination. Un morceau d'herbier constitué de faisceaux de posidonies et des 20 premiers cm de matte est placé dans chacun des quatre aquariums afin d'y subir un traitement d'exposition au Cu (Tableau 2).

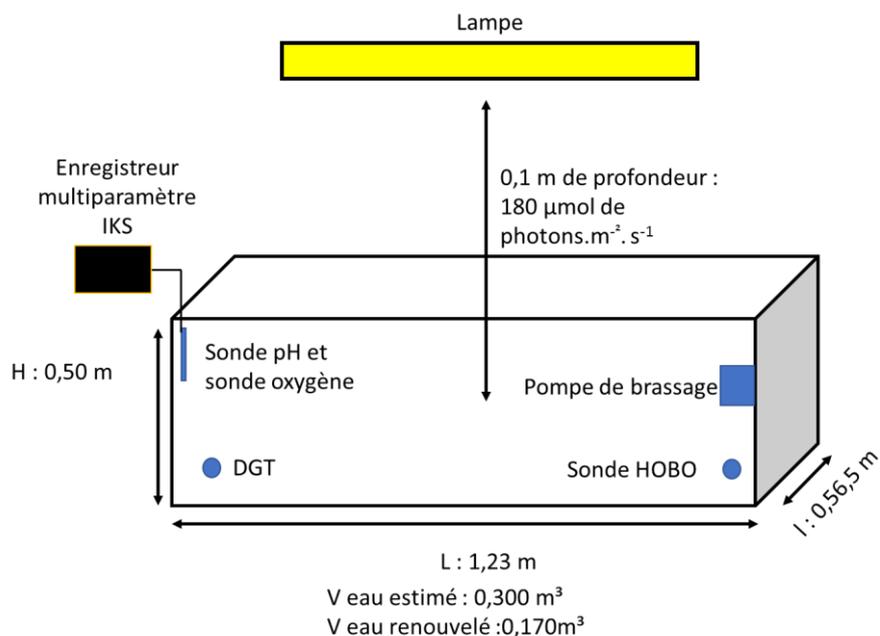


Figure 17 : Schématisation de l'installation des aquariums utilisés pour les différentes expositions au cuivre : 0,5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tableau 2 : Nombre de faisceaux par aquarium en fonction de la concentration en cuivre.

Aquarium	Contamination en cuivre ($\mu\text{g.L}^{-1}$) ¹⁾	Nombre de faisceaux (n=2)
1	0	47 \pm 2.83
2	5	56 \pm 1.41
3	15	55 \pm 1.41
4	50	54 \pm 1.41

ii. Mouvement de l'eau

Afin de respecter au mieux les conditions naturelles auxquelles sont exposés les faisceaux de posidonies, un système de pompe de brassage (Stream 6100.10, Tunze, 67-200L/min) est installé dans chaque aquarium pour mimer l'hydrodynamisme (Figure 18). De plus, ces pompes assurent un brassage continu de l'eau.

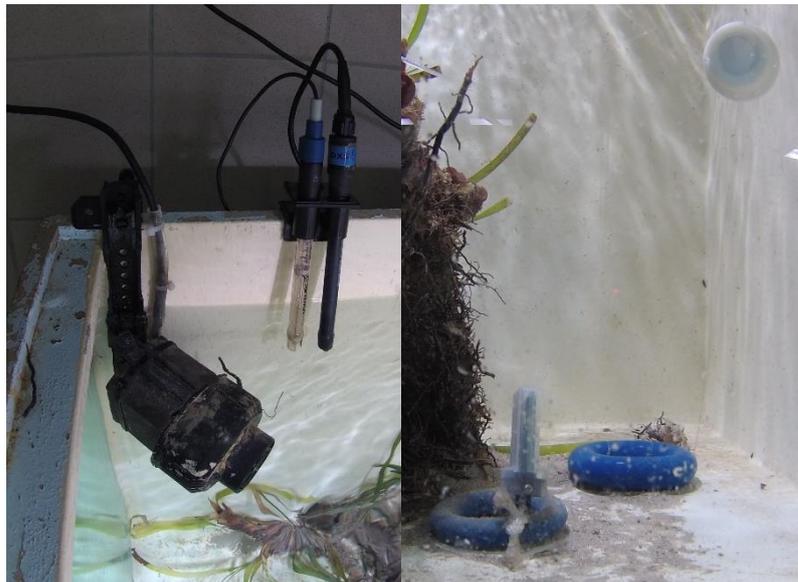


Figure 18 : Photographie de la pompe de brassage, sondes pH, oxygène dissous, température et DGT. À gauche, pompe de brassage, les sondes pH et oxygène reliées à l'enregistreur multiparamètre. À droite, la sonde HOBO et le DGT (photo : Guyliann Engels).

iii. Lumière

Les posidonies sont soumises à un éclairage selon un cycle 12H/12H, jour/nuit. Le rayonnement photosynthétiquement actif reçu par les plantes entre 7h00 à 19h00 (GMT+2) est équivalent, à 10 cm de profondeur dans les aquariums, à celui reçu par les posidonies à 10

m de profondeur durant une journée de fin avril à début mai 2015, soit en moyenne $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figure 13). Chaque aquarium est éclairé à l'aide de deux ampoules HQI 150w (Aqualine 10000, Aquamedic) et de deux TL 39w (T5 blue, Aquamedic).

iv. Renouvellement de l'eau des aquariums

Les aquariums sont remplis avec un volume d'eau de 300L. Durant la phase de contamination (8 jours), un volume de 170L est renouvelé deux fois par jour à 7h00 et à 18h00 (GMT+2) avec de l'eau de mer naturelle provenant d'une cuve remplie en continu par de l'eau pompée dans le port de STARESO.

La phase de récupération (2 jours) débute par deux renouvellements successifs, de l'entièreté de l'eau des aquariums. Ensuite, l'eau des aquariums est renouvelée en système ouvert avec un débit de 100L/h. De plus, les deux renouvellements d'eau journaliers de 170L sont maintenus.

La phase de récupération débute par deux renouvellements successifs, distants d'une heure, de l'entièreté de l'eau des aquariums. Durant la phase de récupération (2J), l'eau des aquariums est renouvelée en système ouvert avec un débit de 100L/h. De plus, les deux renouvellements d'eau de 170L sont maintenus (7h et à 18h (GMT+2)).

v. Apport en nitrates et phosphates

La teneur en nutriment dans la colonne d'eau de l'herbier en face de la station STARESO est de $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de N et $0.05 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de P. L'azote libre dans la colonne d'eau sous forme d'ammonium représente 65% et sous la forme de nitrates et nitrites 35% (Gobert 2002). L'aquarium de 300L contient donc $120 \mu\text{mol}$ de N et $15 \mu\text{mol}$ de P. Un faisceau de posidonies requiert approximativement $7.12 \mu\text{mol}$ de N.J^{-1} et $0.475 \mu\text{mol}$ de P.J^{-1} selon les travaux de Gacia et al. (2002) réalisés dans un herbier de posidonies à 15m de profondeur à Fanals Point ($40^{\circ}41'N$, $2^{\circ}52'E$, Espagne). En multipliant ces valeurs par le nombre de faisceaux dans chaque aquarium, soit 53 faisceaux en moyennes, les besoins par aquariums sont de $620.86 \mu\text{mol N.J}^{-1}$ et $41.03 \mu\text{mol P.J}^{-1}$. Il convient donc d'enrichir l'eau en nutriment afin de respecter au mieux les conditions naturelles et éviter toutes carences des plantes en nutriments.

Les sels employés afin de compenser l'assimilation par les posidonies des nutriments dissous dans l'eau des aquariums sont du chlorure d'ammonium (EMSURE, M.M. 53.49g/mol), du nitrate de sodium (VWR PROLABO, M.M. 84.99g/mol) et du dihydrogénophosphate de sodium (EMSURE, 156.02g/mol). Après le renouvellement de 170L d'eau, 0.05L d'une solution mère préparée avec les trois sels en proportions relatives respectives est ajouté.

c. Exposition au cuivre

Une solution 1000 ppm de cuivre (Cuivre solution étalon, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ dans 0.5molL^{-1} , Merck) est utilisée pour contaminer les aquariums, contrôle exclu, à des niveaux de respectivement 5, 15 et $50\ \mu\text{g.L}^{-1}$ (concentrations nominales, Tableau 2). Les volumes adéquats de solution concentrée de cuivre, dilués dans 50 ml d'eau ultrapure, sont ajoutés matin et soir dans les aquariums après les remplacements d'eau. Les concentrations nominales utilisées, établies sur base des concentrations mesurées *in situ* dans différents sites contaminés de la méditerranée (Richir et al. 2013), sont donc environnementalement pertinentes.

d. Suivi des paramètres physico-chimiques des aquariums et *in situ*

Les paramètres physiques en aquarium et *in situ* en surface sont étudiés en mesurant deux fois par jour (7h00 et 19h (GMT+2)) le pH (826 pH mobile, Metrohm, Swiss made), la salinité (Cond 340i, WTW), la température (Cond 340i, WTW) et l'oxygène dissous (pH/Oxi 340i, WTW).



Figure 19 : Photographie de l'auto-analyseur (photo : Guyliann Engels) et des instruments de mesures des paramètres physicochimiques (photo : Guyliann Engels). À gauche, l'autoanalyseur. À droite, le salinomètre, l'oxymètre et le pHmètre.

La température (C°) et l'intensité lumineuse (lx) sont mesurées en continu avec une sonde HOBO dans chaque aquarium à 10 cm du fond et *in situ* à 10 m de profondeur. Un enregistreur multiparamètre (IKS Aquastar, IKS, Allemagne) est également employé afin de mesurer en continu le pH et l'oxygène dissous dans chaque aquarium.

Des prélèvements d'eaux sont réalisés 2 fois par jours dans les aquariums, ainsi que sur l'eau de renouvellement lors de la prise des paramètres physiques (7h00 et 19h00 (GMT+2)) et quotidiennement vers 13h *in situ* dans la colonne d'eau à 10m de profondeur au-dessus de la canopée de l'herbier. L'ensemble des prélèvements sont conservés à 4°C jusqu'à analyse dans des Falcons (VWR, 50mL centrifuge tubes with screw caps). Les ammoniums, les nitrates, les phosphates, l'azote total et le phosphore total y sont dosés avec un auto-analyseur (Seal AA3) (Figure 19).

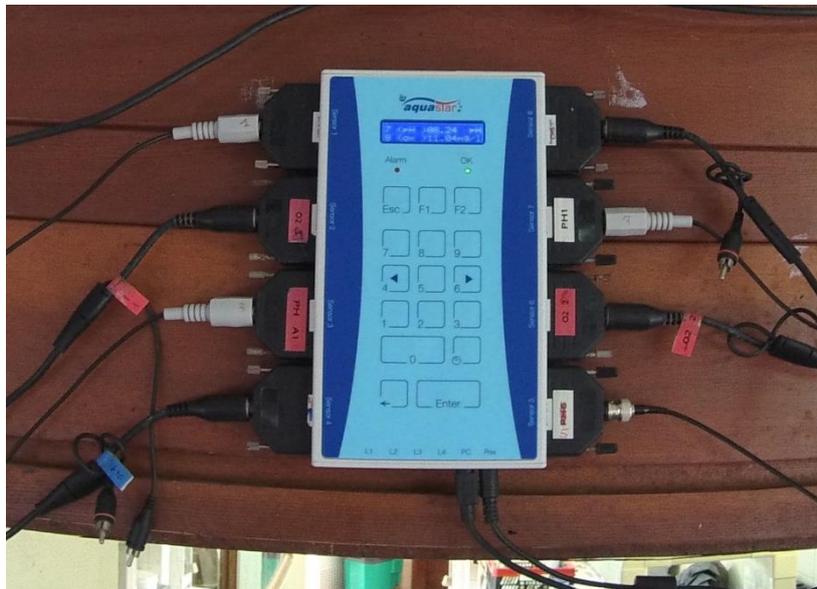


Figure 20 : photographie de l'enregistreur multiparamètre (photo : Guyliann Engels).

Le cuivre biodisponible est quantifié à l'aide de DGT (« *Diffusive gradients in thin films* », Nanjing Yuehai envir. Sci&tech Co., n = 3 excepté durant la phase de récupération en circuit ouvert en aquarium où n = 1 et n = 3 *in situ* durant l'ensemble de l'expérience), des dispositifs contenant une succession de différentes couches fines dont une membrane de protection, un gel de diffusion et une résine échangeuse de cations (chelex 100) (Zhang and Davison 1995). Ces DGT, déployés dans l'herbier ou dans les aquariums, concentrent les éléments traces métalliques biodisponibles labiles et dissous durant la durée de déploiement dans l'eau. Ensuite, une fois récupérés, les DGT sont rincés à l'eau ultrapure et stockés à 4°C jusqu'à analyse. Au laboratoire, la résine échangeuse de cations est extraite des DGT et éluée

dans une solution d'acide nitrique 0.1mol.L^{-1} durant 24h. Les éluas sont enfin analysés par ICP-MS (ELAN DRC II ICP-MS, PerkinElmer).

e. Mesures de l'activité photosynthétique et prélèvements

Chaque jour durant les 12 jours de l'expérience, des mesures de fluorescence et des RLCs sont réalisées avec le Diving-PAM dans chaque aquarium et *in situ* sur les 3^{ème} feuilles de faisceaux orthotropes afin de calculer le rendement de fluorescence effectif (ϕ_{PSII} , $n = 2-6$) et le taux de transfert maximum relatif des électrons ($r\text{ETR}_{\text{max}}$, $n = 2$ et $n=6$ *in situ*) selon le protocole cité précédemment (Figure 21). Les deux premières feuilles analysées pour leur ϕ_{PSII} sont détachées des faisceaux, les faisceaux identifiés (marqué d'un colson). Trois des 6 analysées *in situ* (et identifiées) pour leur activité photosynthétique sont ensuite prélevées. Toutes les feuilles prélevées sont grattées de leurs épiphytes. Après avoir mesuré la longueur de la feuille, les 20 cm du milieu de la feuille sont congelés en vue de l'analyse ultérieure de leur concentration en Cu par ICP-MS (ELAN DRC II ICP-MS, PerkinElmer) ; les 20 premiers cm de la feuille sont disséqués en vue de l'analyse de leur contenu en DMSP et DMSO par chromatographie gazeuse. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à analyse.



Figure 21 : photographie des mesures de fluorescence et des RLCs avec le Diving-Pam en aquarium (photo : Antoine Batigny).

5. Dosage du DMSP et du DMSO par chromatographie en phase gazeuse

Les dosages en DMSP et DMSO sont réalisés indirectement via le dosage du DMS par chromatographie en phase gazeuse au laboratoire d'Océanographie Chimique de l'Université de Liège (Dr Alberto V. Borges). Trois mesures sont effectuées sur chaque prélèvement. Le principe général de la chromatographie repose sur le fait que différentes espèces se séparent suite à l'entraînement de ces dernières par une phase mobile au travers d'une phase stationnaire (Figure 22).

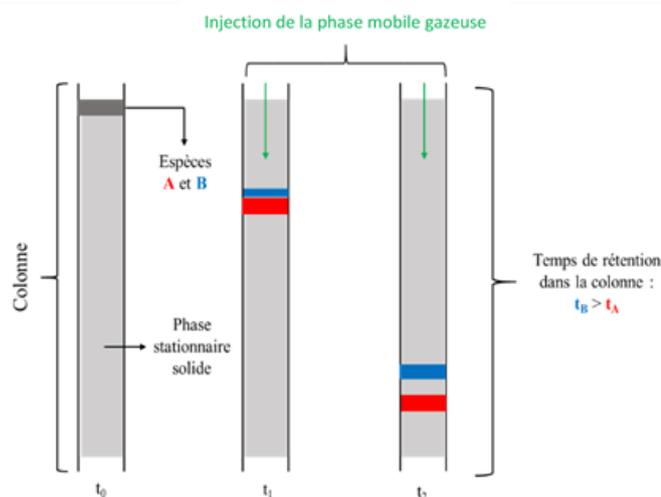


Figure 22 : Schématisation du principe de la chromatographie en phase gazeuse.

L'appareillage chromatographique 7890A GC (Agilent technologie) utilisé est composé d'une colonne capillaire J&W CP-Sil 5 CB (Agilent technologie) d'une longueur de 30m avec un diamètre interne de 0.32mm et une épaisseur de film de 0.5 μ m, qui est maintenue à 60°C (Figure 23). Elle est entièrement composée de diméthylpolysiloxane. Cette dernière est couplée à deux détecteurs distincts dont un à ionisation de flamme (FID) qui reçoit 70% du gaz et un à photométrie de flamme (FPD) qui reçoit 30% du gaz. La phase mobile est de l'hélium (He) avec un débit constant de 2 mL.min⁻¹. Le détecteur employé pour les analyses est le FPD. Ce dernier est gardé à 250°C et emploie une flamme issue de la combustion de 50 mL.min⁻¹ de H₂, 60mL.min⁻¹ d'air synthétique et 1mL.min⁻¹ de N₂ qui va brûler les analytes passant au travers (Borges and Champenois 2015). Cette flamme à haute température va permettre l'atomisation de ces derniers. L'apport d'énergie excite les différentes particules produites qui vont réémettre cette énergie sous forme de lumière. Un filtre spécifique au soufre est employé afin de ne laisser passer que la lumière émise par les atomes soufrés. Cette lumière est envoyée dans un photomultiplicateur qui amplifie le signal afin qu'il soit mesurable.



Figure 23 : Photographie de l'appareil chromatographique (photo : Guyliann Engels).

Une courbe d'étalonnage est réalisée pour le dosage du DMSP et le dosage du DMSO. Du DMSP solide (Research Plus Inc.) est mis en solution avec de l'eau ultrapure type1 MilliQ (Millipore corporation) pour obtenir une solution mère d'une concentration de 2.39 mmol.L^{-1} . Les dilutions utilisées pour la courbe étalon en DMSP sont les suivantes : 143, 129, 114, 71, 28 et $14 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. La solution mère de DMSO est préparée à partir de DMSO (EMSURE, ACS dimethyl sulfoxide) dilué avec de l'eau ultrapure de type 1 MilliQ pour obtenir une concentration de 2.19 mmol.L^{-1} . Les dilutions employées pour la courbe étalon en DMSO sont les suivantes : 43, 39, 35, 21, 8 et $4 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les deux courbes d'étalonnage sont dosées à partir des mêmes échantillons. En effet, les solutions les moins concentrées en DMSO sont ajoutées aux solutions les plus concentrées en DMSP et inversement afin d'obtenir un volume total équivalent pour l'ensemble des points de calibration de la courbe. Une masse entre 20 et 50 mg d'échantillon de posidonie, pesée avec une balance de précision (AND HM200, digital analytical balance) est placée dans des récipients en borosilicate d'un volume de 10mL. Un volume de 2.5mL d'eau ultrapure est ajouté à chaque échantillon. La suite de la procédure est identique pour les étalons et les échantillons.

Un volume de 2.5mL de $\text{NaOH } 12\text{mol.L}^{-1}$ est ajouté afin de transformer le DMSP en DMS, selon la réaction chimique suivante :

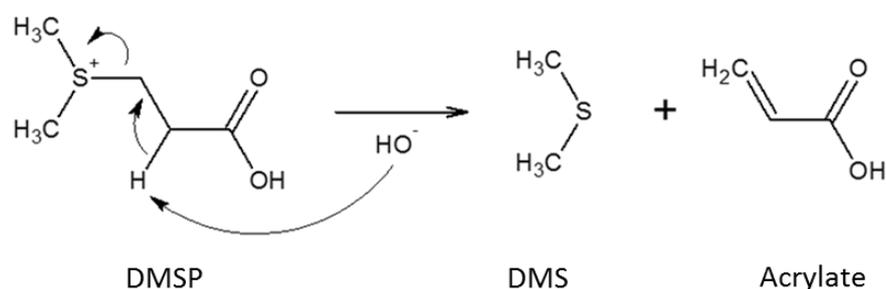


Figure 24 : Mécanisme réactionnel de la formation du DMS à partir du DMSP en condition basique.

Le DMSO n'est pas affecté par cette réaction. Les échantillons sont placés à température ambiante durant 48h avant d'être dosés par chromatographie gazeuse. Un volume de 100µL de gaz est prélevé à l'aide d'une seringue au travers de la membrane en silicone des standards étalons pour établir la droite de calibration, alors que 20µL sont employés pour l'analyse des échantillons. Un bullage à l'air est effectué pendant 30min pour chaque échantillon afin d'éliminer le DMS gazeux produit.

L'étape suivante consiste à réduire le DMSO en DMS (Figure 25). Un volume de 2.5mL de HCl 37% (AnaR NormaPUR, VWR Prolabo chemicals) est employé afin de neutraliser le milieu, et 1ml de TiCl_3 30% (Merck Millipore) est ajouté. Ce dernier est un agent réducteur induisant la formation du DMS à partir du DMSO (Deschaseaux et al. 2014), selon la réaction suivante :

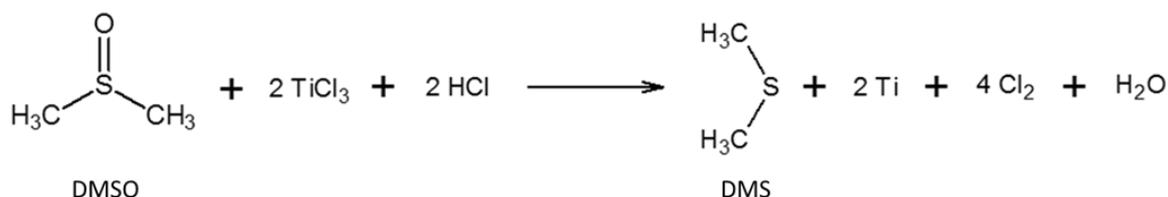


Figure 25 : Mécanisme réactionnel de la réduction du DMSO en DMS suite à l'ajout de l'agent réducteur TiCl_3 .

Les récipients sont à nouveau scellés et mis à incuber durant 48h. 1mL de NaOH (12mol.L^{-1}) est injecté à l'aide d'une seringue au travers de la membrane en silicone pour rendre le milieu basique. Un volume de 500µL de gaz est prélevé et injecté dans le GC.

6. Traitements statistiques

Le programme employé afin de réaliser ce rapport est le programme libre accès Rstudio. Ce dernier permet d'associer un éditeur de texte et le programme d'analyse et de traitement de données statistique R.

Différents coefficients de corrélation sont employés afin de quantifier la relation entre les différentes variables que sont le coefficient de corrélation de Pearson et de Spearman. La force de la corrélation est obtenue par rapport aux travaux de Fowler et Cohen (1998) (Tableau 3).

Tableau 3 : la force des corrélations (Fowler J. et Cohen L. 1998).

Valeur du coefficient de corrélation (positif ou négatif)	Significatif
0.0-0.19	Très faible corrélation
0.20-0.39	Faible corrélation
0.40-0.69	Corrélation modeste
0.70-0.89	Forte corrélation
0.90-1.00	Très forte corrélation

Le test de student et wilcoxon sont appliqué avec un seuil alpha de 0.05. La distribution normale et l'homoscédasticité des valeurs sont respectées lors de l'utilisation du test paramétrique.

L'évolution des paramètres physiologiques suivis : rendement de photosynthèse effectif, rETRmax, DMP, DMSO, DMSP/DMSO a été modélisées pour les 8 jours de la seule phase de contamination par une régression linéaire simple, après vérification des conditions d'application du modèle sur les données brutes ou log transformées. Les pentes des traitements expérimentaux 5, 15 et 50 ppb ont été comparées à celle du traitement contrôle.

Chapitre IV : Résultats

1. Cycle saisonnier naturel

a. Paramètres environnementaux

i. Lumière

L'intensité lumineuse et le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) ont été enregistrés en continu, respectivement avec les sondes Hobo et Odyssey. Des mesures de PAR ont également été réalisées en plongée au moyen du quantamètre du Diving-PAM.

Deux sondes Hobo, le premier situé au-dessus de la canopée de l'herbier de posidonies à 8m de profondeur, le second placé au pied de l'herbier, à l'interface eau-sédiment à 10m de profondeur, rendent compte de la différence d'intensité lumineuse entre les deux positions et de la quantité de lumière absorbée par l'herbier au fil du temps (Figure 26), et donc du cycle de croissance des faisceaux de feuilles des pousses (Figure 9). Au-dessus de la canopée, le maximum de lumière entre 11h et 14h fut enregistré le 15 juin 2015 avec une valeur de 15 810lx et le minimum le 7 décembre 2015 avec 100.3lx. L'intensité lumineuse maximale de 2 327lx au pied des faisceaux de posidonies fut enregistrée le 24 septembre. La densité végétale a réduit donc de plus de 6 fois l'intensité lumineuse qui atteint le sédiment. L'intensité minimale de 22lx fut enregistrée le 5 mars 2016.

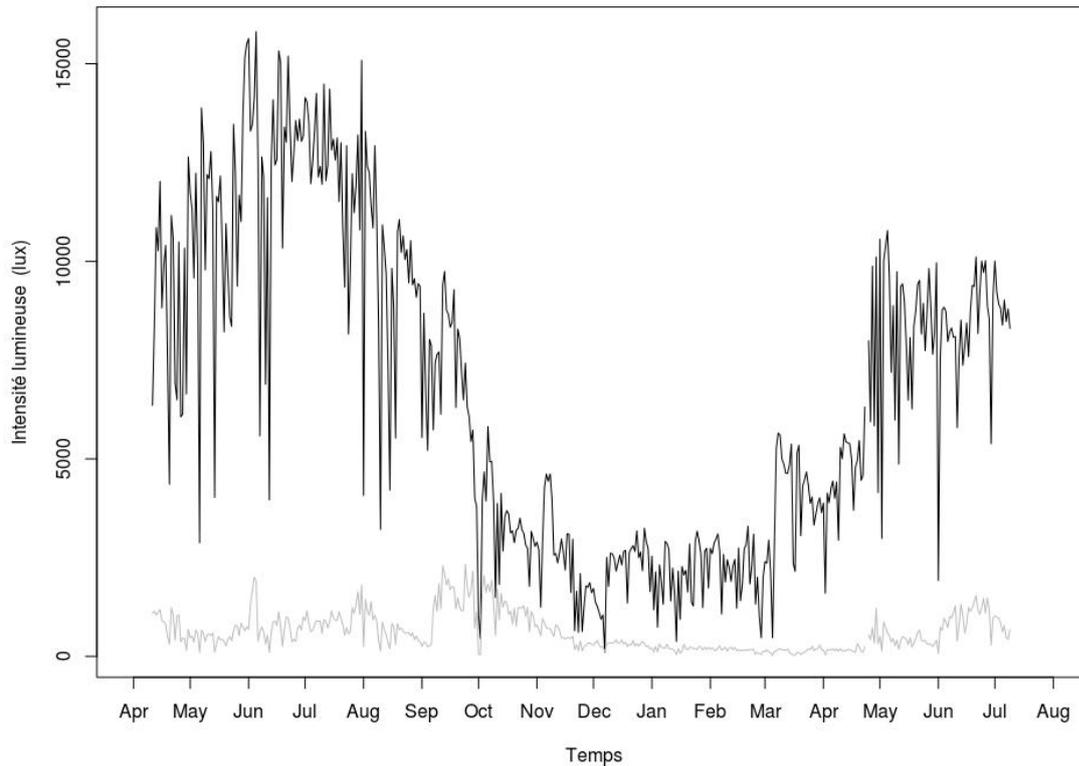


Figure 26 : Evolution de l'intensité lumineuse moyenne (lx) entre 11h et 14h au pied de l'herbier de *Posidonia oceanica* à 10 m de profondeur (gris) et au-dessus de la canopée de l'herbier à 8m de profondeur (noir) au cours du temps.

Le quantamètre Odyssey (Figure 27) mesure le PAR à 10 m de profondeur, au-dessus de la canopée de l'herbier ; cette sonde est donc déployée *in situ* 2m plus profonds que le Hobo équivalent enregistrant l'intensité lumineuse (lx), au-dessus de la canopée à 8m de profondeur. La sonde Odyssey a atteint une valeur de PAR maximale entre 11h et 14h le 16 mai 2015 avec $313 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et un minimum le 14 janvier 2016 avec $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les valeurs nulles sont dues au décrochage de la sonde de sa perche de support lors de fortes tempêtes hivernales.

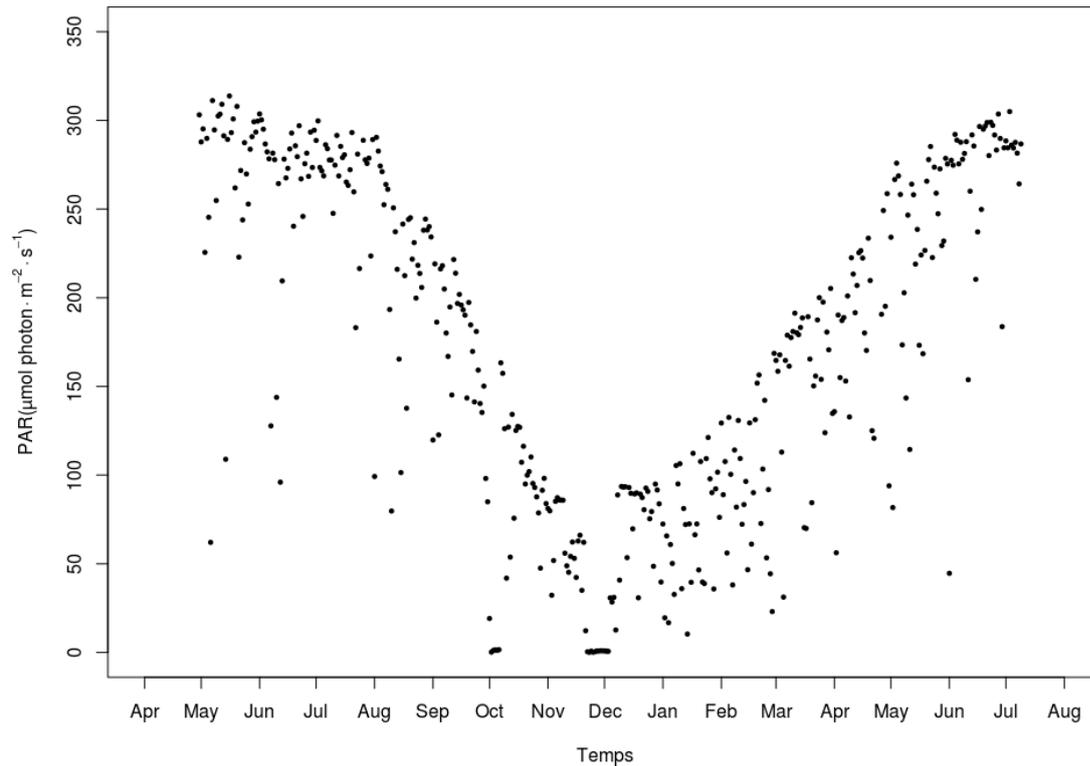


Figure 27 : Evolution du rayonnement photosynthétiquement actif moyen journalier (PAR, en $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) entre 11h00 et 14h00 au-dessus de la canopée de l'herbier de *Posidonia oceanica* à 10 m de profondeur (capteur déployé à la vertical par rapport à la surface).

Les mesures hebdomadaires à bimensuelles de PAR lors des mesures de fluorescence effectuées en plongée avec le quantamètre du Diving-PAM (Figure 28) étaient prises quant-à-elles horizontalement par rapport à la surface (à l'inverse du quantamètre Odyssey, dont le capteur est déployé verticalement par rapport à la surface), à mi-hauteur de la canopée et ce, afin de déterminer les PAR reçu par les faisceaux de feuilles de posidonies dans leur position naturelle dans la colonne d'eau sur 18 faisceaux distincts. La valeur maximale de PAR avec le quantamètre du Diving-PAM a été atteinte 25 août 2015 avec $90 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La valeur minimale a été atteinte le 22 janvier 2016 avec $7 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La valeur maximale enregistrée avec la sonde Odyssey est 3.5 fois plus importante que celle enregistrée avec le Diving-PAM (Figure 27).

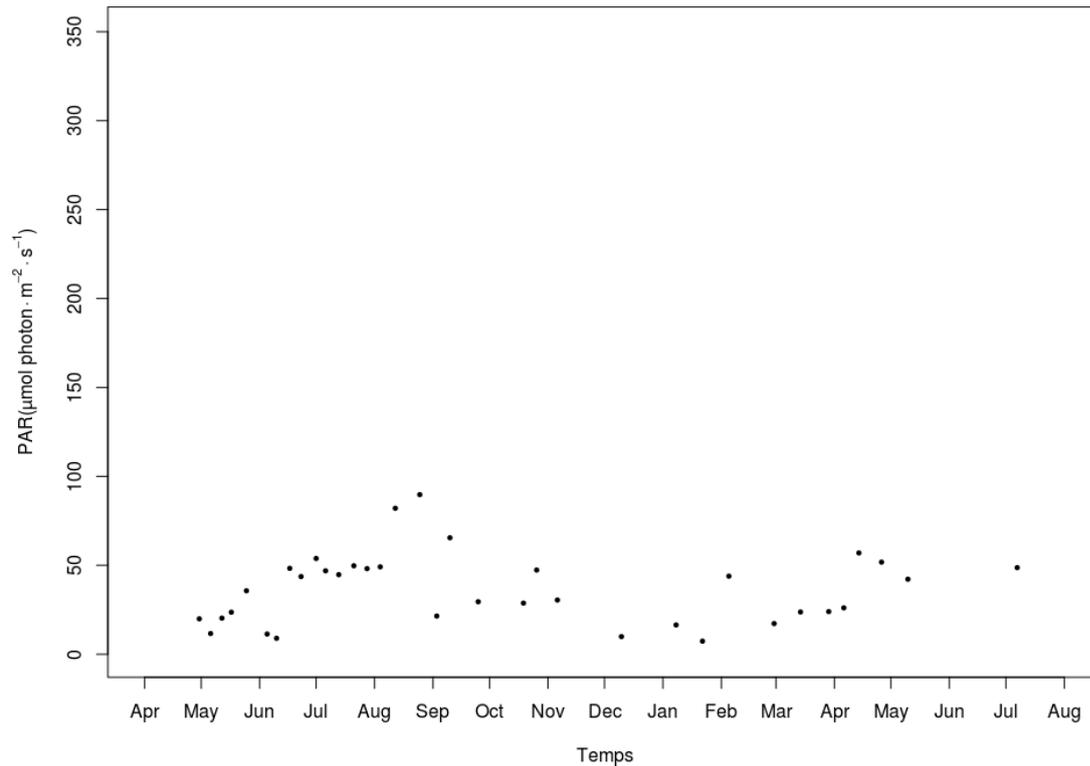


Figure 28 : Variation du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, en $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) mesuré de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier à mi-hauteur du faisceau de feuilles des pousses de *Posidonia oceanica*, avec le quantamètre du Diving-PAM à 10 m de profondeur au cours du temps ($n=18$, mesures prises horizontalement par rapport à la surface).

ii. Température

La sonde Hobo placée à 10 m de profondeur à l'interface eau-sédiment indique une température moyenne maximale de 28.0°C , le 24 juillet 2015 et une minimale de 13.6°C , le 11 mars 2016 (Figure 29). Il y a donc un décalage d'un mois entre les maximums enregistrés en intensité lumineuse et en température. Le décalage pour les valeurs minimums est plus important, soit 3 mois.

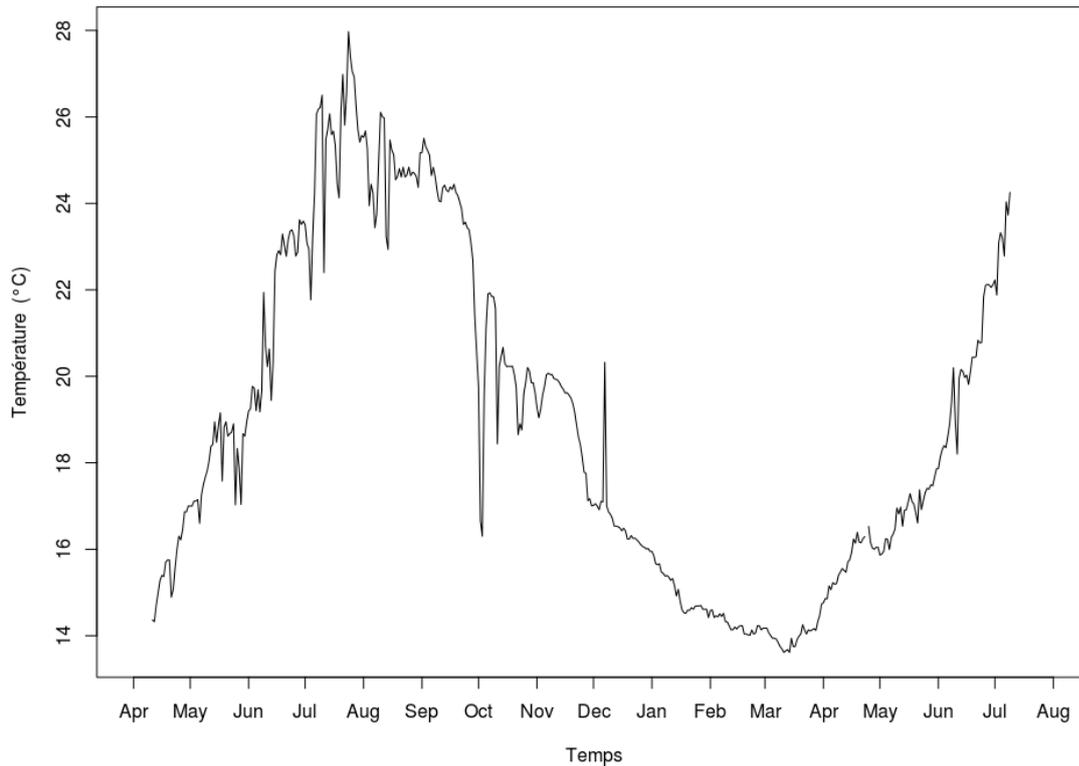


Figure 29 : Evolution de la température (°C) moyenne entre 11h et 14h à l'interface eau-sédiments au pied de l'herbier de *Posidonia oceanica* à 10m de profondeur au cours du temps.

b. Mesure *in situ* de l'activité photosynthétique

i. Rendement effectif de la photosynthèse

Le rendement photosynthétique mesuré au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille des pousses de posidonies montre une certaine homogénéité au cours du temps, avec une valeur moyenne de 0.63 ± 0.09 pour l'ensemble de la période de suivi (Figure 30). La valeur minimum sur les données moyennées par plongée est de 0.50 ± 0.14 et le maximum de 0.73 ± 0.01 . Ce rendement moyen est établi sur 18 mesures.

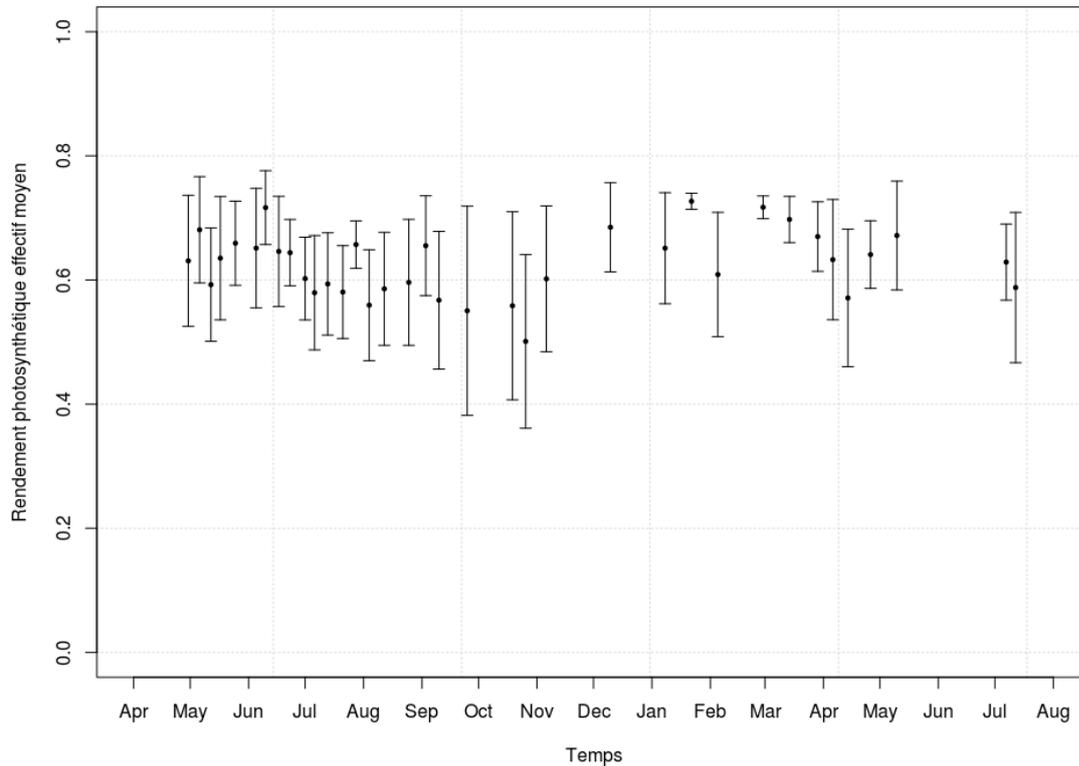


Figure 30 : Variation du rendement photosynthétique effectif moyen, mesuré de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier au milieu de la face convexe de la 3^{ième} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, avec un Diving-PAM à 10m de profondeur au cours du temps (n=18, mesures prises verticalement par rapport à la surface). Les doubles barres représentent les écart-types.

ii. Taux de transferts des électrons

Le taux de transfert d'électron (ETR) tient compte du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR), du rendement photosynthétique (Figure 30) et de deux constantes estimées que sont le partage d'électron entre le PSI et le PSII (0.5) et le facteur d'absorbance des feuilles (0.84). Etant donné l'homogénéité du rendement photosynthétique, le PAR sera le paramètre le plus important pour d'établir l'ETR. Afin d'extraire les deux constantes de l'équation qui ne sont pas définies à l'heure actuelle de façon optimale pour les phanérogames marines (ces constantes moyennes proviennent de plantes terrestres), le taux de transfert d'électron relatif sera utilisé ($rETR = Y \times PAR$).

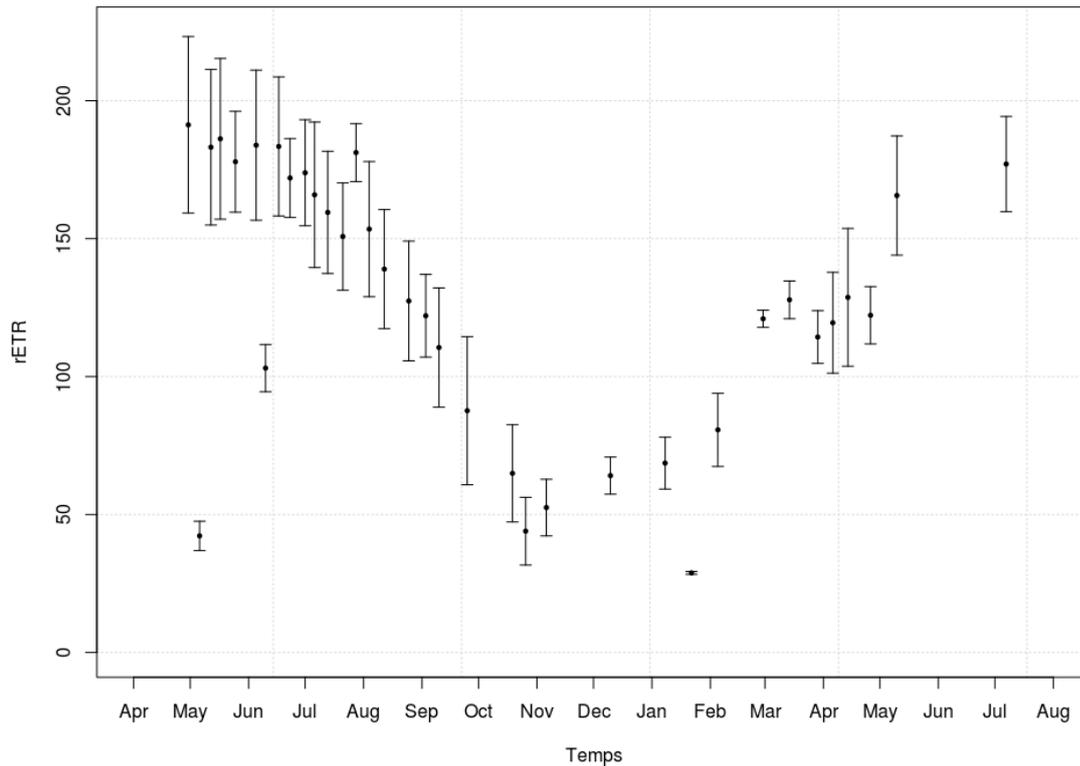


Figure 31 : Variation moyenne du taux de transfert relatif d'électrons (rETR) calculé à partir des mesures réalisées de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, avec un Diving-PAM à 10m de profondeur au cours du temps (n=18, mesures prises verticalement par rapport à la surface). rETR obtenu avec les mesures de PAR de la sonde Odyssey (mesures prises horizontalement par rapport à la surface). Les doubles barres représentent les écarts-types.

Les rETR obtenus par mesure du PAR à l'aide de la sonde Odyssey (Figure 31) débute le 30 avril 2015 avec $191.24 \pm 32.00 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et diminue jusqu'à atteindre $43.95 \pm 12.27 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le 26 octobre. Le rETR augmente ensuite pour atteindre $177.04 \pm 17.25 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le 12 juillet 2016.

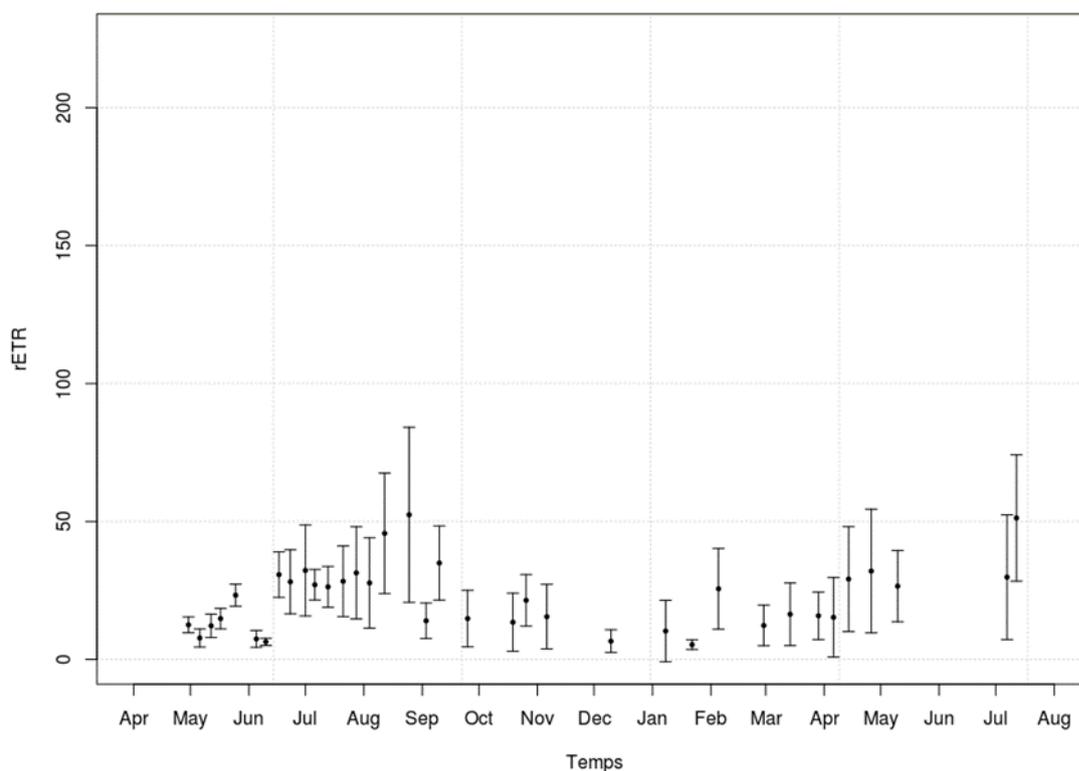


Figure 32 : Variation moyenne du taux de transfert relatif d'électrons (rETR) calculé à partir des mesures réalisées de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, avec un Diving-PAM à 10m de profondeur au cours du temps (n=18, mesures prises verticalement par rapport à la surface). rETR obtenus avec les mesures de PAR du quantamètre du Diving-PAM (mesures prises verticalement par rapport à la surface). Les doubles barres représentent les écart-types.

Les rETR calculés à partir des mesures de PAR enregistrées avec le Diving-PAM (Figure 32) montrent une allure très différente. La valeur maximale est 3 fois plus faible que celle obtenue avec les mesures de PAR du quantamètre Odyssey. Le rETR débute avec une valeur de $12.52 \pm 2.84 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le 30 avril 2015. Il augmente jusqu'à atteindre $52.41 \pm 31.71 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le 25 août. Une diminution est ensuite observable pour atteindre une valeur minimale de $5.33 \pm 1.73 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le 22 janvier 2016. Le rETR repart à la hausse afin d'atteindre $51.25 \pm 22.89 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le 12 juillet qui est la dernière mesure du suivi. Ayant multiplié le rendement de fluorescence constant par l'un ou l'autre PAR, on retrouve le profil des deux sondes tel que présenté à la Figure 27 et 28.

c. Dosage du DMSP et du DMSO par chromatographie en phase gazeuse

i. DMSP

La concentration en DMSP dans la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies évolue au cours du temps (Figure 33). En effet, la concentration est de $155.1 \pm 35.2 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ de poids frais, le 21 avril 2015 et diminue jusqu'au 4 août 2016 avec $61.7 \pm 16.7 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$. Une cassure de pente est observable au cours du mois de septembre, caractérisée par une forte variabilité des teneurs en DMSP entre les feuilles analysées. Un maximum de $205.4 \pm 58.0 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ est atteint le 10 septembre 2015. Il s'en suit d'une diminution constante au cours des mois suivants pour atteindre un minimum le 12 juillet 2016 avec $61.7 \pm 16.7 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$.

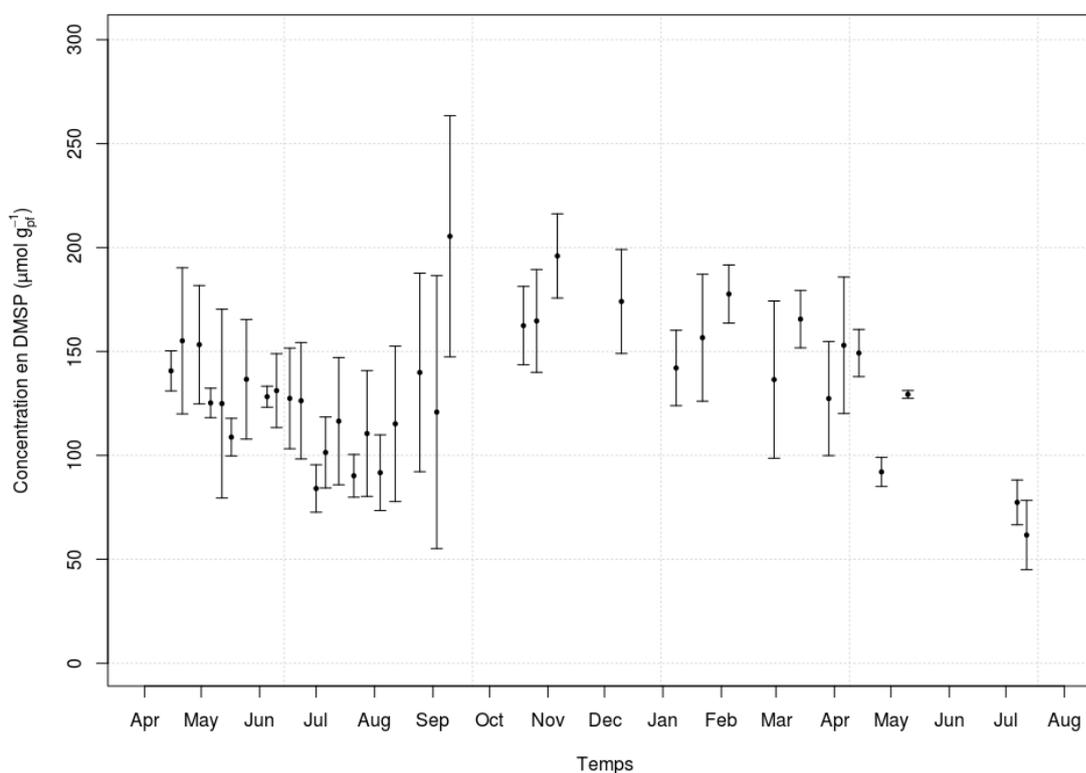


Figure 33 : Variation de la concentration moyenne en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes ($n=3$), prélevés de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée, à 10 m de profondeur au cours du temps. Les doubles barres représentent les écarts-types.

ii. DMSO

La concentration moyenne en DMSO (Figure 34) dans la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies suit la même allure que pour la concentration en DMSP (Figure 33). Cependant, les concentrations sont plus de 10 fois plus faibles que pour ce dernier. La concentration en DMSO était $7.4 \pm 1.8 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$, le 21 avril 2015 ; s'en suivit une diminution continue des concentrations jusqu'à atteindre $3.0 \pm 0.9 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$, le 4 août. Une cassure de pente est à nouveau observable au cours du mois de septembre, caractérisée par une forte variabilité. Un maximum de $8.2 \pm 4.2 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ est atteint le 10 septembre. Ensuite, la concentration diminue de manière régulière jusqu'au 12 juillet 2016 avec $1.6 \pm 0.6 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$.

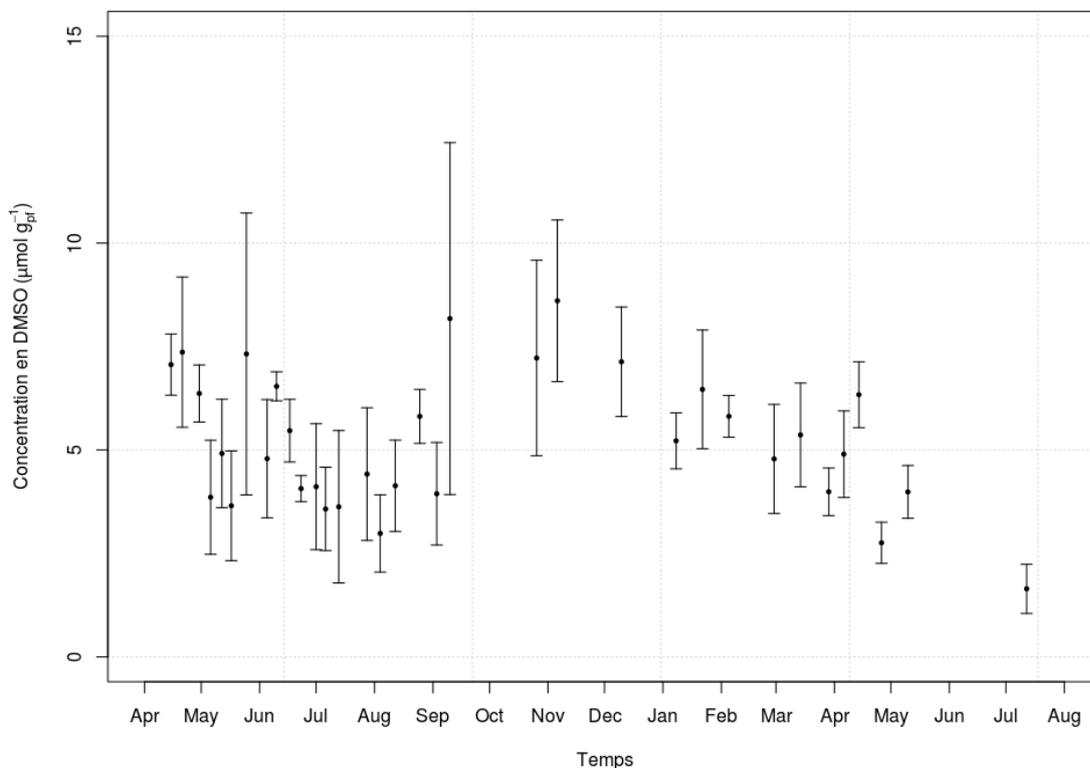


Figure 34 : Variation de la concentration moyenne en DMSO ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes ($n=3$), prélevés de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée, à 10 m de profondeur au cours du temps. Les doubles barres représentent les écart-types.

iii. DMSP/DMSO

L'évolution graphique des concentrations en DMSP et en DMSO ayant des profils similaires, le rapport de l'un par rapport à l'autre reste relativement constant au cours du temps, avec une moyenne de 28.21 ± 6.4 (Figure 35). La valeur minimale est atteinte le 14 avril 2015 avec 20.2 ± 1.0 et la valeur maximale est de 39.2 ± 7.5 , le 12 juillet 2016.

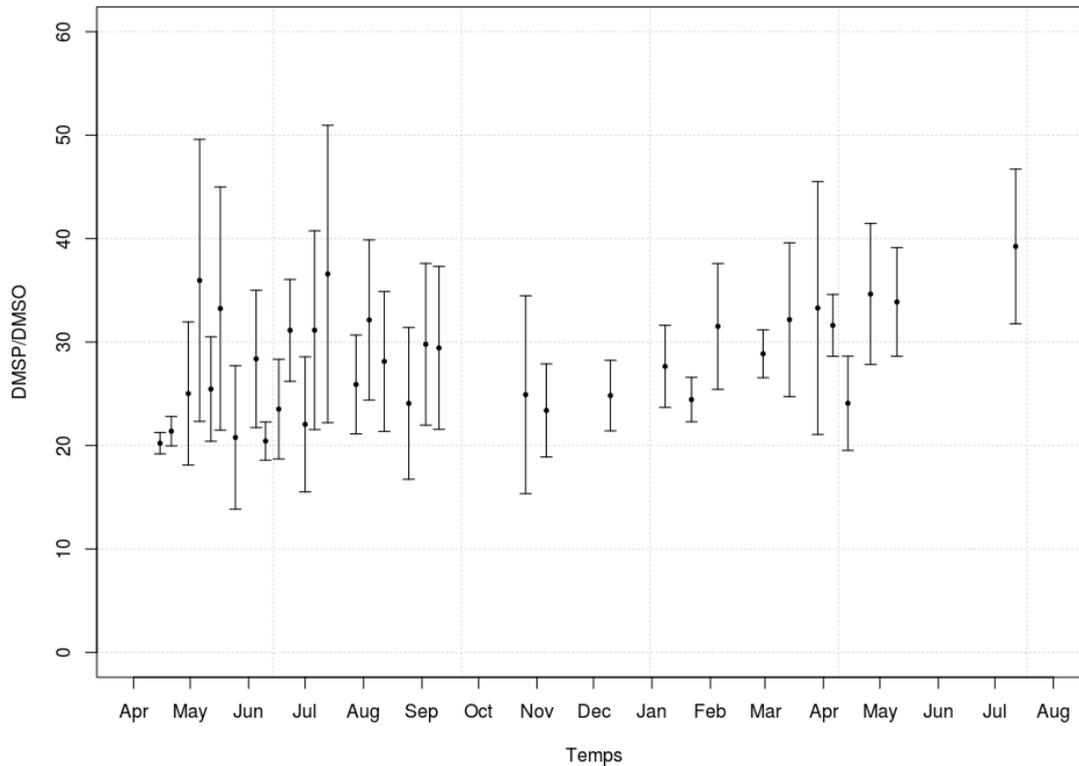


Figure 35 : Variation du rapport des concentrations en DMSP sur celles DMSO, sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes (n=3), prélevé de façon hebdomadaire à bimensuelle, dans la canopée de l'herbier, à 10 m de profondeur au cours du temps. Les doubles barres représentent les écart-types.

d. Analyses statistiques

La matrice de corrélation obtenue avec le coefficient de Pearson calculé au départ des mesures effectuées avec le Diving-Pam et des dosages du DMSP et du DMSO. Les mesures et les dosages ont été réalisés en triplicat de façon hebdomadaire à bimensuelle sur la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies dans l'herbier est réalisée.

	Conc_DMSP	Conc_DMSO					
Conc_DMSP	1						
Conc_DMSO	0.77	1					
Ratio	-0.15	-0.64	1				
Yield	-0.02	-0.16	0.21	1			
ETR	-0.23	-0.2	0.08	-0.18	1		
rETR	-0.23	-0.2	0.08	-0.18	1	1	
rETR_ODY	-0.45	-0.4	0.2	0.27	0.33	0.33	1

Figure 36 : Matrice de corrélation réalisée avec le coefficient de corrélation de Pearson sur les mesures et prélèvements sur la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies réalisés de façon hebdomadaire à bimensuelle dans l'herbier à 10m de profondeur au cours du temps (n= 103). Conc_DMSP (concentration en DMSP), Conc_DMSO (concentration en DMSO), Ratio (DMSP/DMSO), Yield (rendement photosynthétique), ETR (taux de transfert d'électron), rETR (taux de transfert d'électron relatif établi avec la mesure du PAR du Diving-PAM), rETR_ODY (taux de transfert d'électron relatif établi avec la mesure du PAR de la sonde Odyssey).

La matrice de corrélation (Figure 36) indique une corrélation négative modeste entre le rETR obtenu avec les mesures de PAR de la sonde Odyssey et la concentration en DMSP (-0.45). Cette corrélation négative est également observable avec la concentration en DMSO (-0.4). Une corrélation négative modeste est également relevée entre la concentration en DMSO et le rapport entre le DMSP et le DMSO (-0.64). Enfin, une forte corrélation positive est montrée entre la concentration en DMSP et la concentration en DMSO (0.77).

	avg_DMSP						
avg_DMSP	1	avg_DMSO					
avg_DMSO	0.85	1	avg_ratio				
avg_ratio	-0.23	-0.66	1	avg_PAR			
avg_PAR	-0.55	-0.4	0.04	1	avg_Lux10		
avg_Lux10	-0.02	0.15	-0.19	0.53	1	avg_Lux	
avg_Lux	-0.53	-0.32	-0.08	0.84	0.61	1	avg_Temperature
avg_Temperature	-0.35	-0.19	-0.09	0.58	0.59	0.61	1

Figure 37 : Matrice de corrélation réalisée avec le coefficient de corrélation de Pearson sur les mesures et prélèvements moyens sur la 3^{ème} feuille de faisceaux de posidonies dans l'herbier à 10 m de profondeur au cours du temps. (n= 31). avg_DMSP (concentration moyenne en DMSP), avg_DMSO (concentration moyenne en DMSO), avg_ratio (DMSP/DMSO), avg_PAR (PAR moyen entre 11H et 14h avec la sonde Odyssey), avg_Lux10 (Intensité lumineuse entre 11H et 14H à l'interface eau-sédiment), avg_Lux (Intensité lumineuse entre 11H et 14H à 8m de profondeur), avg_Temperature (température moyenne entre 11h et 14h à l'interface eau-sédiments).

La matrice de corrélation réalisée à partir des valeurs moyennes en DMSP et DMSO avec les paramètres environnementaux (Figure 37) indique une corrélation négative modeste entre la concentration en DMSO et les mesures de PAR (-0.4). Il montre également une corrélation négative modeste entre la concentration en DMSP et l'intensité lumineuse mesurée au-dessus de la canopée à 8 m de profondeur (-0.53) et avec les mesures de PAR (-.055). La concentration en DMSO est corrélée négativement avec le rapport entre le DMSP sur le DMSO (-0.66) comme indiqué dans la matrice de corrélation sur l'ensemble des mesures de DMSP, DMSO. Une forte corrélation est à nouveau visible entre la concentration moyenne en DMSP et la concentration moyenne en DMSO (0.85).

	avg_Surf				
avg_Surf	1				
avg_Surf3	0.9	1			
avg_DMSP	-0.64	-0.68	1		
avg_DMSO	-0.48	-0.43	0.81	1	
avg_ratio	0.11	0	-0.15	-0.67	1

Figure 38 : Matrice de corrélation réalisée avec le coefficient de corrélation de Spearman sur les mesures biométriques mensuelles (Bouchachi 2017) et les dosages moyens en DMSP et DMSO sur la 3^{ième} feuille de faisceaux de posidonies dans l'herbier à 10 m de profondeur au cours du temps (n=11). Avg_DMSP (concentration moyenne en DMSP), avg_DMSO (concentration moyenne en DMSO), avg_ratio (DMSP/DMSO), avg_Surf3 (surface foliaire de la 3^{ième} feuille).

La matrice de corrélation réalisée avec le coefficient de corrélation de Spearman entre les mesures biométriques et les concentrations moyennes en DMSP et DMSO (Figure 38) indique une corrélation négative modeste entre la concentration moyenne en DMSO et la surface foliaire totale des faisceaux (-0.48). Une corrélation modeste négative est aussi montrée entre la concentration moyenne en DMSP et la surface foliaire totale des faisceaux (-0.64). Une corrélation modeste négative est mise en avant entre la concentration moyenne en DMSO et la surface foliaire de la 3^{ième} feuille (-0.43). Une corrélation négative modeste est également montrée entre la concentration moyenne en DMSP et la surface foliaire de la 3^{ième} feuille (-0.68). Le modèle linéaire employé (Figure 39) afin d'établir une relation entre ces deux paramètres est significatif (p : 0.0151) et a pour équation :

$$DMSP = (-0,828 \times \text{Surface de la } 3^{\text{ième}} \text{ feuille}) + 175,43$$

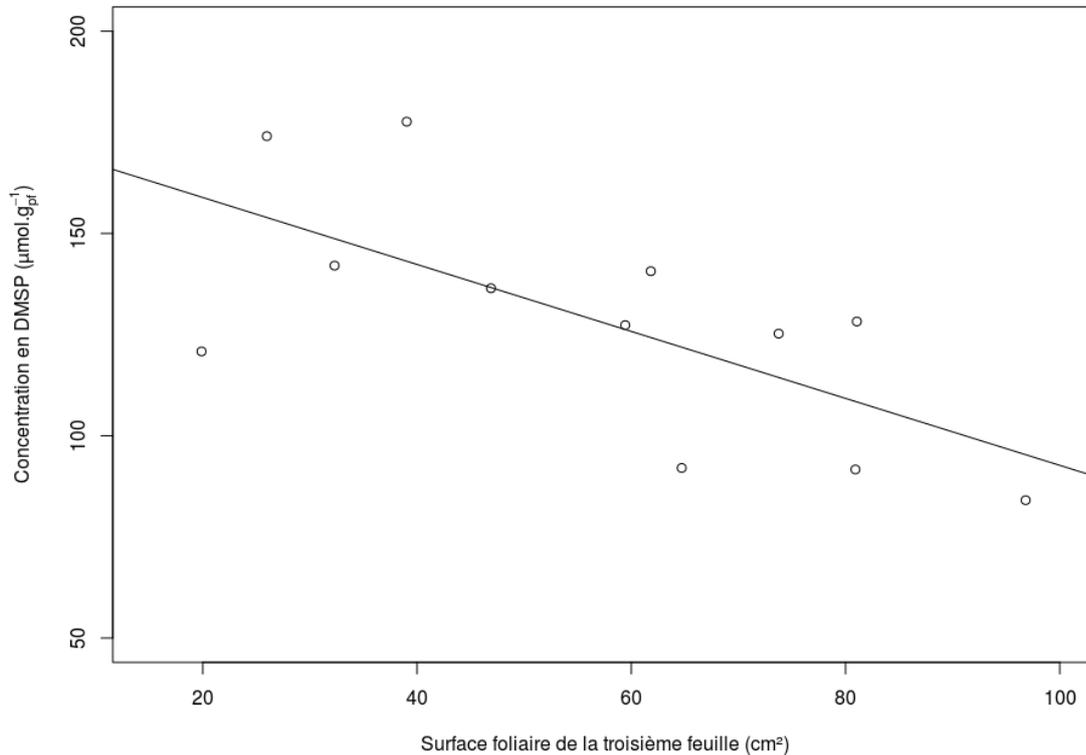


Figure 39 : Evolution de la concentration en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$) par rapport à la surface foliaire de la 3^{ème} feuille de *Posidonia oceanica*. La droite modélise la régression linéaire employé afin d'établir une relation entre ces deux paramètres.

2. Utilisation du DMSP & du DMSO comme biomarqueurs de réponse au stress induit par le cuivre.

a. Paramètres physiques, chimiques et biologiques mesurés *in situ*

L'intensité lumineuse et la température sont enregistrées toutes les 10 minutes du 25 avril au 5 mai 2017 à 10 m de profondeur, juste au-dessus de la canopée de l'herbier. L'intensité lumineuse maximale de 22044 lx est enregistrée le 3 mai à 10 h 30 (Annexe D-1). La température varie quant à elle entre 15.95°C et 17.09°C (Annexe D-2). Le suivi de la salinité, du pH et de l'oxygène dissous en surface est réalisé quotidiennement durant l'étude, 2 à 3 fois par jour. La salinité reste constante, entre 37.2 et 37.4 (Annexe D-3). Le pH oscille entre 7.62 et 8.17 (Annexe D-4). Enfin, l'oxygène dissous fluctue entre 8.98 et 11.63 mg.L⁻¹ (Annexe D-5).

Les nutriments sont analysés dans des échantillons d'eau prélevés juste au-dessus de la canopée de l'herbier à 10 m de profondeur, entre 13 h 00 et 14 h 00. Les PO_4^{3-} varient entre 0.081 et 0.363 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Annexe D-6). Les NO_3^- varient quant à eux entre 0.000 et 0.177 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Annexe D-7). La concentration moyenne en cuivre biodisponible mesurée au niveau de la canopée de l'herbier au moyen des sondes passives DGTs est de 0.047 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

La densité moyenne est de 385 ± 117 (n=65) faisceaux. m^{-2} à 10m de profondeur, profondeur à laquelle a été réalisé le suivi *in situ* de la production de DMSP, DMSO et de l'activité photosynthétique pour comparaison avec le suivi saisonnier 2015-2016. La densité est de 370 ± 89 faisceaux. m^{-2} (n=27) à 12m de profondeur, au niveau du bord érodé de la tâche de sable d'où se sont effondrés les fragments d'herbier utilisés pour l'expérience d'exposition au cuivre en aquariums (Annexe E-1). Il n'y a pas de différence significative entre les 2 profondeurs (test de student, $p = 0.54$). La densité de faisceaux orthotropes est de 243 ± 173 faisceaux. m^{-2} à 10m de profondeur et de 244 ± 96 à 12m de profondeur. La densité de faisceaux plagiotropes est de 80 ± 94 faisceaux. m^{-2} à 10m de profondeur et de 125 ± 62 à 12m de profondeur. Il n'y a à nouveau pas de différence significative entre les densités de faisceaux orthotropes à 10m et 12m de profondeur (test de Wilcoxon, $p = 0.55$), ni entre les densités de faisceaux plagiotropes (test de student, $p = 0.08$) à ces deux profondeurs (Annexes E-2, E-3).

Le rendement photosynthétique effectif moyen des 3^{èmes} feuilles mesuré quotidiennement au zénith reste relativement constant au cours des 12 jours du suivi *in situ*. La moyenne générale de 0.61 ± 0.10 (Annexe F-1). Le rETR maximal des 3^{èmes} feuilles reste également relativement constant. La moyenne générale est de 40.59 ± 3.47 $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Annexe F-2). Les mesures de DMSP et de DMSO n'ont été faites pour des raisons pratiques que sur une partie des échantillons prélevés. Les moyennes générales de la concentration en DMSP, DMSO et le rapport DMSP/DMSO sont respectivement de 72.45 ± 18.20 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$, 3.65 ± 0.70 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et 20.18 ± 5.16 (Annexes F-3, F-4, F-5).

b. Paramètres physicochimiques des aquariums

Le pH et d'oxygène dissous ont été mesurés en continu dans les aquariums au moyen des sondes listées dans la sous-section 4.d du matériel et méthodes. Les données enregistrées nécessitant encore d'être nettoyées de certaines valeurs aberrantes (par exemple, données enregistrées pendant les changements d'eau), les valeurs des 1^{ers} et 3^{èmes} quartiles seront

présentées à la place des minima et maxima pour ces deux paramètres, ainsi que pour la température enregistrée avec les sonde HOBO. Il est à noter que l'enregistreur multiparamètre s'est arrêté entre le 2 mai à 21h et le 3 mai à 16h30. Les données de pH et d'oxygène dissous sont manquantes pour cet intervalle de temps.

La température varie dans l'ensemble des aquariums (Annexe G-1) durant la première phase de contamination de l'aquarium contrôle varie entre 18.52 C° (1^{er} quartile) et 20.14 C° (3^{ième} quartile). Ces variations de températures sont moindres durant la seconde phase de récupération en circuit ouvert, allant de 17.57 C° (1^{er} quartile) à 18.05 C° (3^{ième} quartile). Lors des deux phases de l'expérience, la température augmente graduellement tout au long de la journée, quand les éclairages sont allumés. Les changements d'eau (7h00 et 18h00, GMT+2)) induisent une baisse rapide de la température. On observe une variation cyclique des températures similaires dans les autres traitements. La température varie durant la première phase entre 19.09 C° (1^{er} quartile) et 20.23 C° (3^{er} quartile) alors qu'elle varie durant la seconde phase entre 17.28 C° (1^{er} quartile) et 17.86 C° (3^{ième} quartile) dans l'aquarium contaminé avec 5 µg.L⁻¹ de cuivre. La température varie durant la première phase entre 18.90 C° (1^{er} quartile) et 20.14 C° (3^{er} quartile) alors qu'elle varie durant la seconde phase entre 17.86 C° (1^{er} quartile) et 18.71 C° (3^{ième} quartile) dans l'aquarium contaminé avec 15 µg.L⁻¹ de cuivre. Enfin, la température varie durant la première phase entre 18.71C° (1^{er} quartile) et 19.85C° (3^{er} quartile) alors qu'elle varie durant la seconde phase entre 17.28C° (1^{er} quartile) et 18.76C° (3^{ième} quartile) dans l'aquarium contaminé avec 50 µg.L⁻¹ de cuivre.

L'oxygène dissous augmente tout au long de la journée et diminue la nuit dans l'ensemble des aquariums (Annexe G-3). L'oxygène dissous dans l'aquarium contrôle varie durant la phase de contamination entre 8.67 mg.L⁻¹ (1^{er} quartile) et 10.26 mg.L⁻¹ (3^{ième} quartile) et entre 9.50 (1^{er} quartile) mg.L⁻¹ et 10.59 mg.L⁻¹ (3^{ième} quartile) durant la phase de récupération. L'oxygène dissous suit les mêmes tendances dans les aquariums des traitements 5, 15 et 50 µg.L⁻¹. Ainsi, l'oxygène dissous dans l'aquarium contaminé avec 5 µg.L⁻¹ varie durant la phase de contamination entre 7.97 mg.L⁻¹ (1^{er} quartile) et 9.91 mg.L⁻¹ (3^{ième} quartile) et entre 9.56 (1^{er} quartile) mg.L⁻¹ et 10.52 mg.L⁻¹ (3^{ième} quartile) durant la phase de récupération ; entre 8.41 mg.L⁻¹ (1^{er} quartile) et 10.38 mg.L⁻¹ (3^{ième} quartile) durant la phase de contamination et entre 9.35 (1^{er} quartile) mg.L⁻¹ et 10.20 mg.L⁻¹ (3^{ième} quartile) durant la phase de récupération dans l'aquarium contaminé avec 15 µg.L⁻¹ ; entre 8.26 mg.L⁻¹ (1^{er} quartile) et 10.17 mg.L⁻¹ (3^{ième}

quartile) durant la phase de contamination et entre 9.32 (1^{er} quartile) mg.L⁻¹ et 10.25 mg.L⁻¹ (3^{ième} quartile) durant la phase de récupération dans l'aquarium contaminé avec 50 µg.L⁻¹. Les changements brutaux d'oxygène dissous surviennent lors des changements d'eau et de la manipulation des sondes.

Le pH dans les 4 aquariums varie dans une fourchette étroite entre 7.91 (1^{er} quartile) et 8.01 (3^{ième} quartile) (Annexe G-2). Les changements brutaux du pH surviennent lors des changements d'eau et de la manipulation des sondes. La salinité dans l'ensemble des aquariums reste relativement constante. La salinité de l'aquarium entre 37.30 et 37.70 dans le traitement 0, entre 37.3 et 37.6 dans le traitement 5 µg.L⁻¹ et entre 37.3 et 37.5 dans le traitement 15 µg.L⁻¹ et 50 µg.L⁻¹.

Les dosages en PO₄³⁻ et NO₃²⁻ dans l'eau de renouvellement vont de 0.048 µmol.L⁻¹ à 0.657 µmol.L⁻¹ et de 0.01 µmol.L⁻¹ à 0.54 µmol.L⁻¹ (Annexes G-4 et G-6). Les PO₄³⁻ dans l'aquarium contrôle sont similaires à celles de l'eau de renouvellement, et ont pour valeur minimale 0.031 µmol.L⁻¹ et pour valeur maximale 1.104 µmol.L⁻¹ (Annexe G-5). Les dosages en NO₃²⁻ fluctuent entre 0.003 µmol.L⁻¹ et 0.274 µmol.L⁻¹ durant l'ensemble de l'expérience, avec une valeur moyenne de 0.136 ± 0.082 µmol.L⁻¹ (Annexe G-7). Les renouvellements d'eau et les ajouts de nutriments font augmenter la concentration dans l'aquarium temporairement pour ensuite être consommé endéans l'intervalle de temps jusqu'au renouvellement d'eau suivant.

Les dosages en PO₄³⁻ dans l'aquarium contaminé avec 5 µg.L⁻¹ de cuivre, varient 0.051 µmol.L⁻¹ et 0.351 µmol.L⁻¹ avec une valeur moyenne de 0.187 ± 0.068 µmol.L⁻¹. Les dosages en NO₃²⁻ fluctuent entre 0.009 µmol.L⁻¹ et 0.417 µmol.L⁻¹ durant l'ensemble de l'expérience, avec une valeur moyenne de 0.108 ± 0.093 µmol.L⁻¹. Les renouvellements d'eau et les ajouts de nutriments font augmenter la concentration en NO₃²⁻ dans l'aquarium temporairement pour ensuite être consommée endéans l'intervalle de temps jusqu'au renouvellement d'eau suivant. Les dosages en PO₄³⁻ dans l'aquarium contaminé avec 15 µg.L⁻¹ de cuivre varie entre 0.074 µmol.L⁻¹ et 0.350 µmol.L⁻¹ avec une valeur moyenne de 0.212 ± 0.058 µmol.L⁻¹. Les dosages en NO₃²⁻ fluctuent durant la phase de contamination entre 0.079 µmol.L⁻¹ et 3.400 µmol.L⁻¹, avec une valeur moyenne de 1.088 ± 0.843 µmol.L⁻¹. Les renouvellements d'eau ont pour effet de diminuer la concentration en NO₃²⁻ qui est atténué avec l'ajout de la solution de nutriment. La concentration diminue durant la phase de récupération pour varier entre 0.073 µmol.L⁻¹ et 0.701 µmol.L⁻¹, avec une valeur moyenne de 0.249 ± 0.266 µmol.L⁻¹. Suite aux

renouvellements d'eau et l'ajout de nutriment, les concentrations en NO_3^{2-} sont plus élevées que les valeurs obtenues lors des dosages, ce qui correspond aux observations des aquariums des traitements 0 et $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les dosages en PO_4^{3-} dans l'aquarium contaminé avec $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre varient entre $0.046 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $0.360 \mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une valeur moyenne de $0.258 \pm 0.079 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et reste relativement stable durant l'expérience, comme dans les traitements précédents. Par contre, les NO_3^{2-} augmentent durant l'ensemble de la phase de contamination pour atteindre un maximum de $33.207 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Annexe G-7), et ce malgré le renouvellement d'eau qui réduisait la concentration en NO_3^{2-} comme observé dans le traitement $15 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cette concentration en NO_3^{2-} diminue brusquement lors le phase de récupération en circuit ouvert pour atteindre une valeur moyenne de $0.102 \pm 0.054 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ainsi, dans les différents traitements expérimentaux, l'augmentation des niveaux de contamination en cuivre n'influence pas les profils des concentrations en orthophosphate. Par contre, les concentrations en ions nitrates s'accumulent progressivement dans le traitement $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ et surtout dans le traitement $50 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Le cuivre biodisponible dans l'aquarium contrôle est de $0.241 \pm 0.013 \mu\text{g.L}^{-1}$ sur l'ensemble de l'expérience (Tableau 4). Les deux ajouts journaliers de solution cuivrée dans les aquariums contaminés conduisent à une augmentation progressive du cuivre biodisponible. Ainsi, le cuivre biodisponible durant les deux premiers jours de la phase de contamination est de 0.901, 2.939 et $16.039 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums des traitements 5, 15, $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Tableau 4). Le rapport entre les concentrations nominales ajoutées et biodisponibles sont donc respectivement de 0.18, 0.20 et 0.32. Les concentrations biodisponibles augmentent ensuite pour atteindre, durant les derniers jours de la phase de contamination, 1.183, 4.452 et $27.042 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Tableau 4). Ces concentrations équivalent à respectivement 0.24, 0.30 et 0.54 des concentrations nominales ajoutées. La phase de récupération débute par deux renouvellements complets de l'eau des quatre aquariums expérimentaux, puis de la mise en circuit ouvert du renouvellement d'eau (100L.h^{-1}). Les concentrations biodisponibles dans les aquariums contaminés, bien inférieures à celles de la phase de contamination, ne redescendent cependant pas au niveau de l'aquarium contrôle (Tableau 4).

Tableau 4 : évolution de la concentration en cuivre biodisponible ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans les quatre aquariums expérimentaux durant les phases de contamination et de récupération . Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés.

	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	50 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Phase de contamination (0J-2J)	0.901	2.939	16.039
Phase de contamination (2J-4J)	0.888	4.422	21.230
Phase de contamination (4J-8J)	1.183	4.452	27.042
Phase de récupération (8J-10J)	0.345	0.832	3.470

c. Mesure de l'activité photosynthétique

i. Rendement photosynthétique

Le rendement photosynthétique effectif ($\Delta F/F_m'$) initial (Figure 40), à gauche de la ligne en tiret matérialisant le début de la phase de contamination, montre la variabilité physiologique entre les posidonies acclimatées dans les mêmes conditions dans leur aquarium respectif. Ces mesures de rendement photosynthétique effectif initial se situent pour la plupart entre 0.600 et 0.700, avec une mesure plus basse de 0.404 et deux légèrement plus élevées à 0.720 et 0.728. Le $\Delta F/F_m'$ évolue peu dans l'aquarium contrôle et varie entre 0.497 et 0.700, à l'exception des deux valeurs plus basses 0.300 et 0.395. Le $\Delta F/F_m'$ dans l'aquarium contaminé avec 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre varie entre 0.454 et 0.740, avec trois mesures inférieures à 0.400. Le $\Delta F/F_m'$ varie entre 0.389 et 0.722 dans l'aquarium contaminé avec 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre. Enfin, le $\Delta F/F_m'$ dans l'aquarium contaminé avec 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre varie entre 0.172

et 0.697. Ce traitement 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ donne les valeurs les plus basses mesurées au cours de l'expérience, tous aquariums confondus.

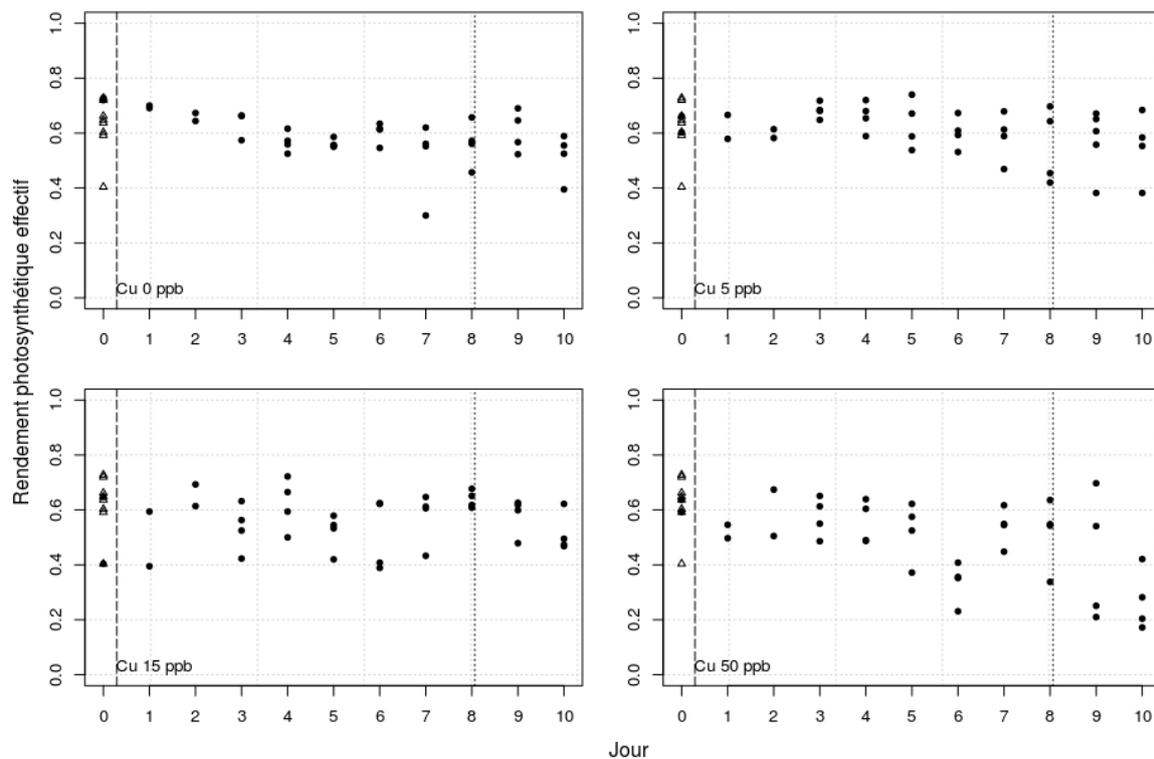


Figure 40 : Variation du rendement photosynthétique effectif ($n = 2-4$) mesuré quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillée représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.

Des modèles linéaires multiples sont employés afin de comparer les pentes entre l'aquarium contrôle et les traitements 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durant la phase de contamination (Figure 41). La pente de la régression linéaire de l'évolution du $\Delta\text{F}/\text{Fm}'$ durant les 8 jours de la phase d'exposition dans l'aquarium contrôle est significative ($p = 0.0497$). Seule la pente du traitement 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ diffère significativement du contrôle ($p = 0.0157$), l'évolution du $\Delta\text{F}/\text{Fm}'$ étant similaire au traitement contrôle pour les traitements 5 et 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

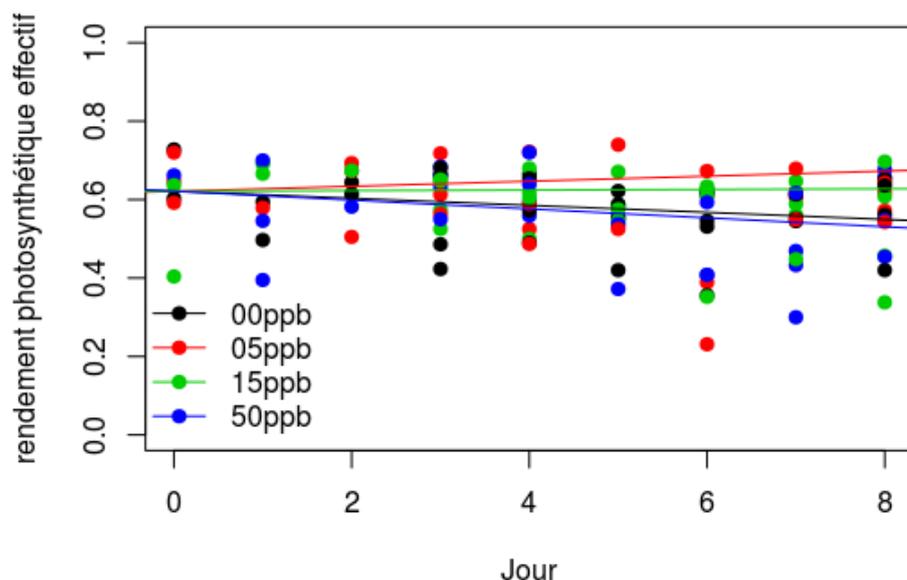


Figure 41 : Variation du rendement photosynthétique effectif ($n = 2-4$) mesuré quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.

Le rendement photosynthétique maximal a également été étudié partiellement durant l'expérience à partir du sixième jour de contamination. Ce dernier reste stable dans les quatre aquariums expérimentaux et ne diffère pas entre la fin de la phase de contamination et la phase de récupération. Le rendement photosynthétique maximal varie, entre 0.638 et 0.757 dans l'aquarium contrôle ; entre 0.696 et 0.756 dans l'aquarium contaminé avec 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre ; entre 0.609 et 0.728 dans l'aquarium contaminé avec 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$; entre 0.529 et 0.747 dans l'aquarium contaminé avec 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre. Les rapports entre ces minima et maxima sont respectivement de 1.18, 1.09, 1.19 et 1.41 pour les traitements 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Annexe H-1).

ii. Taux de transfert maximal relatif des électrons

Le taux de transfert relatif d'électrons maximal (rETRmax) initial, à gauche de la ligne en tiret, matérialisant le début de la phase de contamination (Figure 42), montre la variabilité parmi les plantes acclimatées dans les mêmes conditions dans les quatre aquariums. Il varie entre 21.00 $\mu\text{mol d'e}^{-}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ et 53.24 $\mu\text{mol d'e}^{-}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, soit un rapport de 2.5. Le rETRmax varie, dans l'aquarium contrôle, entre 30.41 $\mu\text{mol d'e}^{-}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ et 66.06 $\mu\text{mol d'e}^{-}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Considérant

l'ensemble de l'expérience, il varie entre 20.72 $\mu\text{mol d'e}^{-\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}}$ et 64.06 $\mu\text{mol d'e}^{-\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}}$ dans l'aquarium contaminé avec 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre $\mu\text{g.L}^{-1}$; entre 28.08 $\mu\text{mol d'e}^{-\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}}$ et 62.98 $\mu\text{mol d'e}^{-\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}}$ dans l'aquarium contaminé avec 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$; entre 21.30 $\mu\text{mol d'e}^{-\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}}$ et 64.55 $\mu\text{mol d'e}^{-\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}}$ dans l'aquarium contaminé avec 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre. Les rapports entre ces minima et maxima sont respectivement de 3, 2.4 et 3 pour les traitements 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. En comparant les évolutions des rETRmax aux 8 points initiaux d'avant contamination, on observe graphiquement que le rETRmax reste relativement constant tout au long de l'expérience quelque soit le traitement.

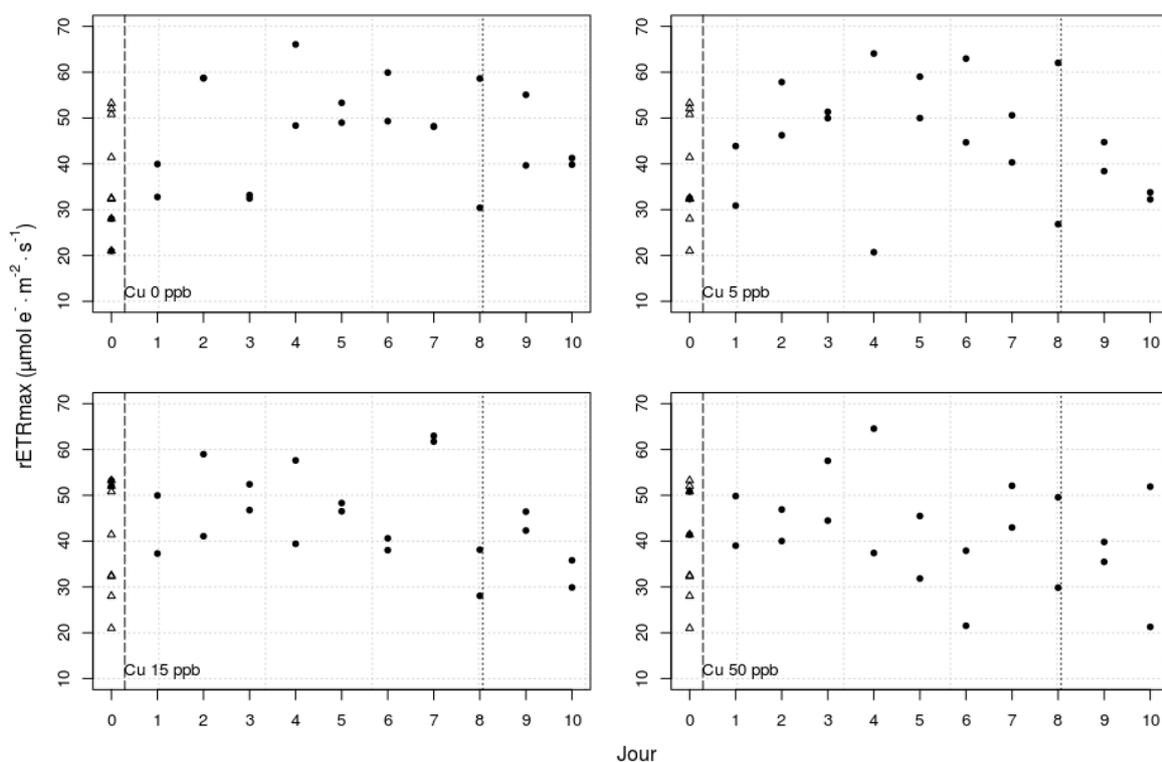


Figure 42 : Variation du taux de transfert d'électron maximal relatif ($r\text{ETRmax}$, $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), calculée à partir des mesures de RLC mesurée quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.

Des modèles linéaires multiples sont employés afin de comparer les pentes entre l'aquarium contrôle et les traitements 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durant la phase de contamination (Figure 43). La pente de la régression linéaire de l'évolution du rETRmax durant les 8 jours de la phase d'exposition dans l'aquarium contrôle est non-significative. Aucune des pentes des trois

régressions modélisées pour les traitements 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ne diffère significativement ($p > 0.05$)

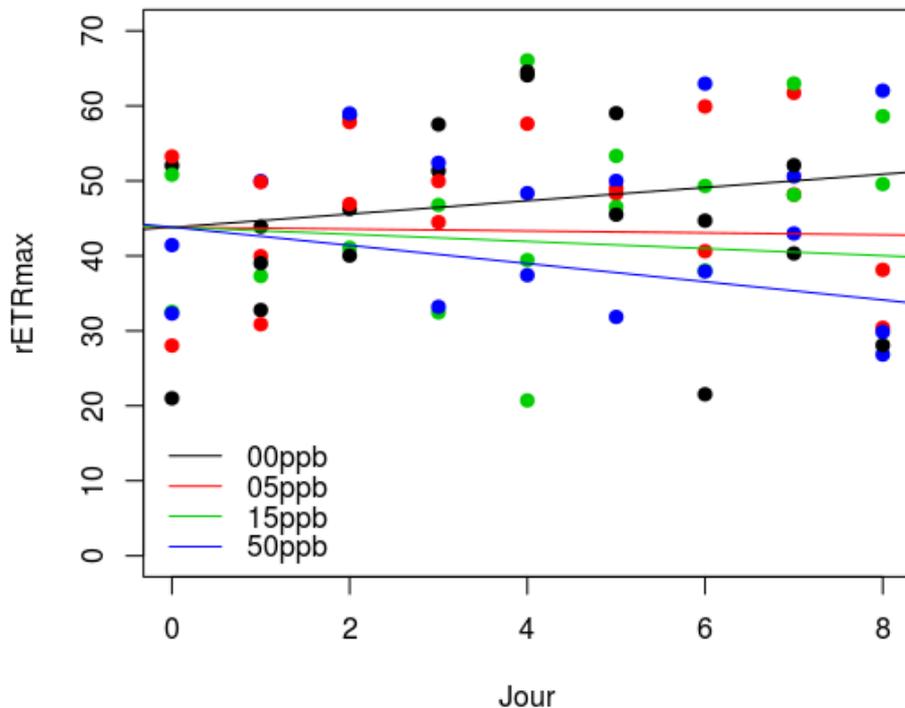


Figure 43 : Variation du taux de transfert d'électron maximal relatif ($rETR_{max}$, $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), calculée à partir des mesures de RLC mesurée quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.

d. DMSP & DMSO

Seule une partie des échantillons prélevés pour le dosage du DMSP et du DMSO a pu être traitée dans le cadre du mémoire. Les échantillons restants seront analysés ultérieurement.

i. DMSP

Les concentrations initiales en DMSP, en bleu à gauche de la ligne rouge matérialisant le début de la phase de contamination (Figure 44), montrent la variabilité parmi les plantes acclimatées dans les mêmes conditions dans les quatre aquariums. Ces concentrations initiales varient entre 44.41 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et 115.54 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$, soit un rapport de 2.5. Les concentrations en DMSP varient entre 41.69 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et 115.54 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans l'aquarium contrôle, soit un rapport de 2.8. Les concentrations varient entre 41.09 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et 112.21 $\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans

l'aquarium contaminé avec $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre ; entre $35.98 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et $104.45 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans l'aquarium contaminé avec $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre ; entre $44.41 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et $85.58 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans l'aquarium contaminé avec $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre. Les rapports entre ces minima et maxima sont respectivement de 2.7 et 3 pour les traitements 5 et $15 \mu\text{g.L}^{-1}$, des rapports proches de celui du traitement contrôle de 2.5. Seul le traitement $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ présente un rapport inférieur de 1.9. Les valeurs minimales enregistrées dans les 4 aquariums sont similaires et proche des $40 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$.

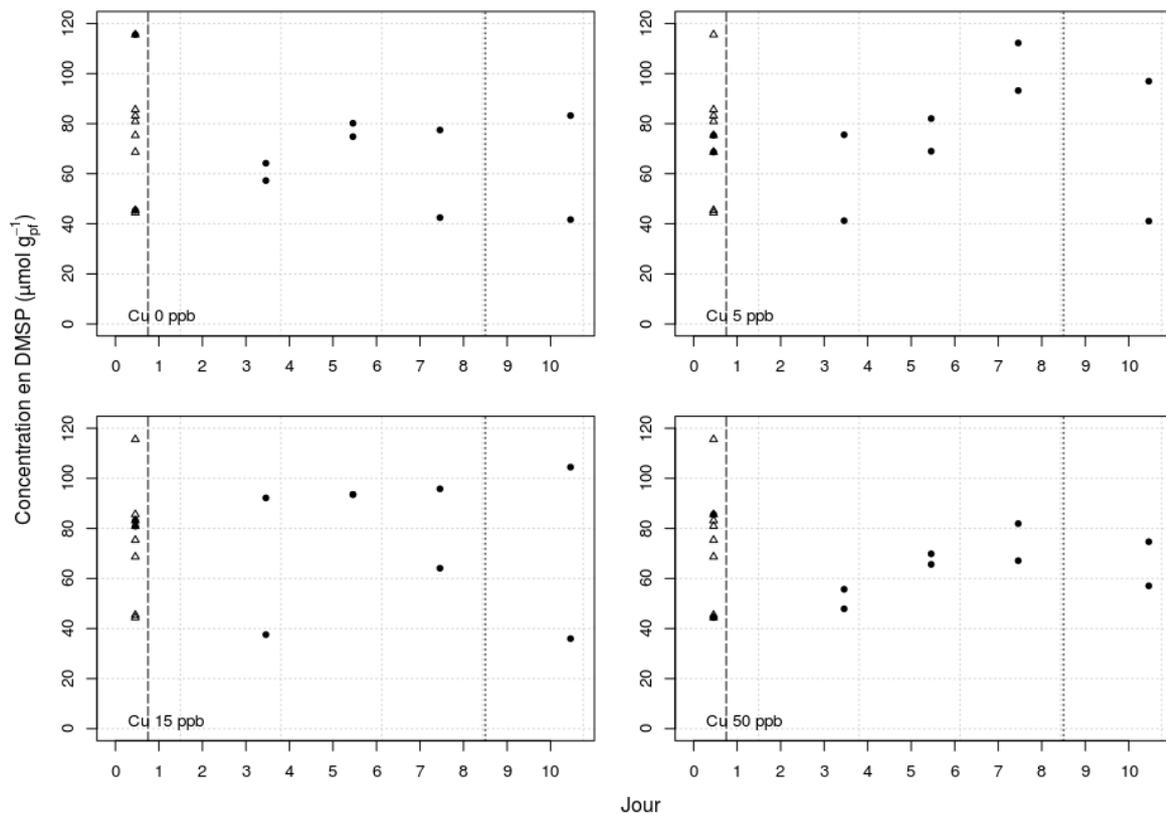


Figure 44 : Variation de la concentration en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5 , 15 et $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.

Des modèles linéaires multiples sont employés afin de comparer les pentes entre l'aquarium contrôle et les traitements 5 , 15 , $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ durant la phase de contamination (Figure 45). La pente de la régression linéaire de l'évolution de la concentration en DMSP durant les 8 jours de la phase d'exposition dans l'aquarium contrôle est non-significative. Aucune des

pentés des trois régressions modélisées pour les traitements 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ne diffère significativement ($p > 0.05$).

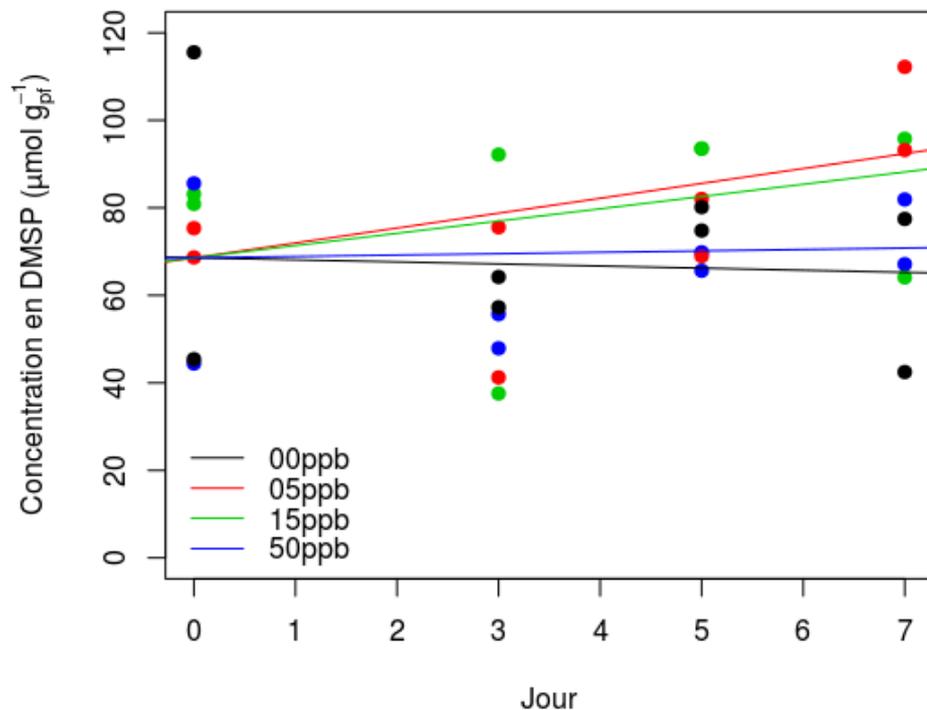


Figure 45 : Variation de la concentration en DMSP ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.

ii. DMSO

Les concentrations initiales en DMSO, en bleu à gauche de la ligne rouge matérialisant le début de la phase de contamination (Figure 46), montrent la variabilité parmi les plantes acclimatées dans les mêmes conditions dans les quatre aquariums. Ces concentrations initiales varient entre $3.01 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et $4.74 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$, avec une mesure particulièrement élevée de $7.90 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ soit un rapport de 1.65. Les concentrations en DMSO varient entre $3.08 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et $7.91 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans l'aquarium contrôle, soit un rapport de 2.5. Les concentrations varient entre $1.22 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et $8.68 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans l'aquarium contaminé avec 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre ; entre $1.65 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et $5.28 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans l'aquarium contaminé avec 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre ; entre $3.15 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ et $5.22 \mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$ dans l'aquarium contaminé avec 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre. Les rapports entre ces minima et maxima sont respectivement de 7.1, 3 et 1.7 pour les traitements 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

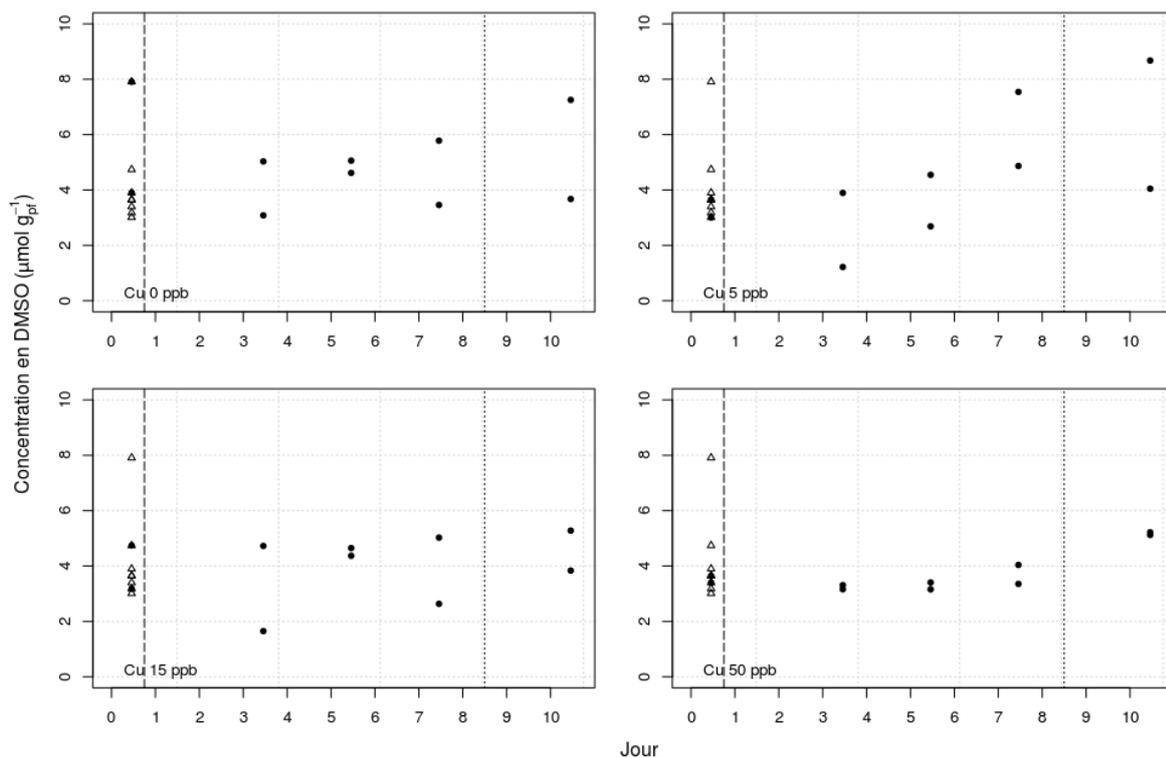


Figure 46 : Variation de la concentration en DMSO ($\mu\text{mol.g}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.

Des modèles linéaires multiples sont employés afin de comparer les pentes entre l'aquarium contrôle et les traitements 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durant la phase de contamination (Figure 47). La pente de la régression linéaire de l'évolution de la concentration en DMSP durant les 8 jours de la phase d'exposition dans l'aquarium contrôle est non-significative. Aucune des pentes des trois régressions modélisées pour les traitements 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ne diffère significativement ($p > 0.05$).

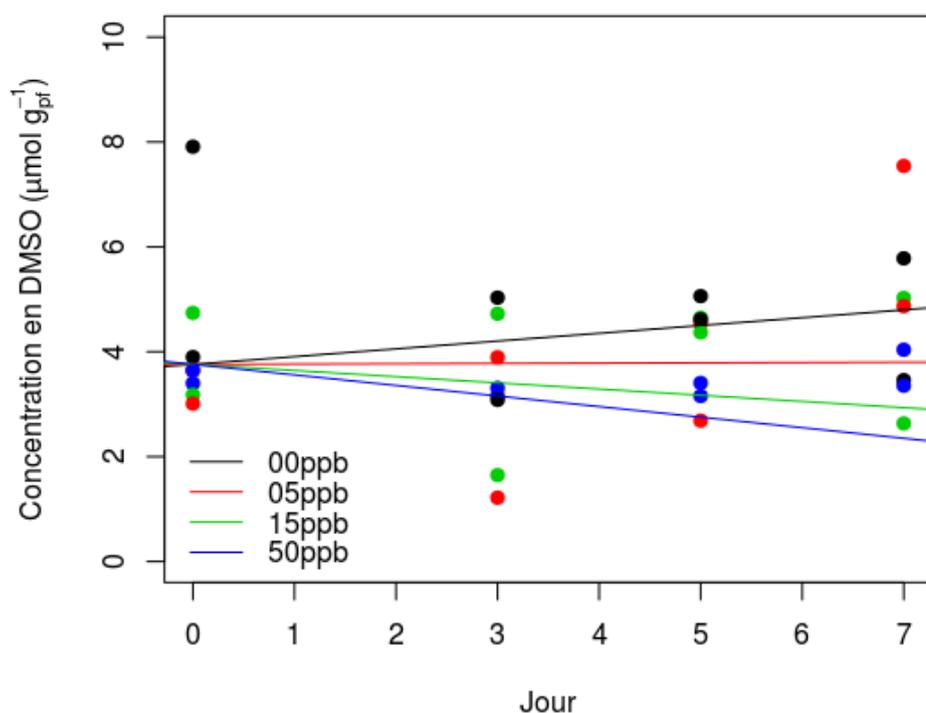


Figure 47 : Variation de la concentration en DMSO ($\mu\text{mol.g}_{\text{pf}}^{-1}$), sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.

iii. DMSP/DMSO

Les rapports initiaux du DMSP sur le DMSO, en bleu à gauche de la ligne rouge matérialisant le début de la phase de contamination (Figure 48), montrent la variabilité parmi les plantes acclimatées dans les mêmes conditions dans les quatre aquariums. Ces concentrations initiales varient entre 11.71 et 26.16, soit un rapport de 2.2. Les rapports DMSP/DMSO varient entre 11.29 et 19.10 dans l'aquarium contrôle, soit un rapport de 1.7. Les rapports varient entre 10.40 et 33.32 dans l'aquarium contaminé avec 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre ; entre 9.34 et 26.16 dans l'aquarium contaminé avec 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre ; entre 11.16 et 24.57 dans l'aquarium contaminé avec 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre. Les rapports entre ces minima et maxima sont respectivement de 3.2, 2.8 et 2.2 pour les traitements 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

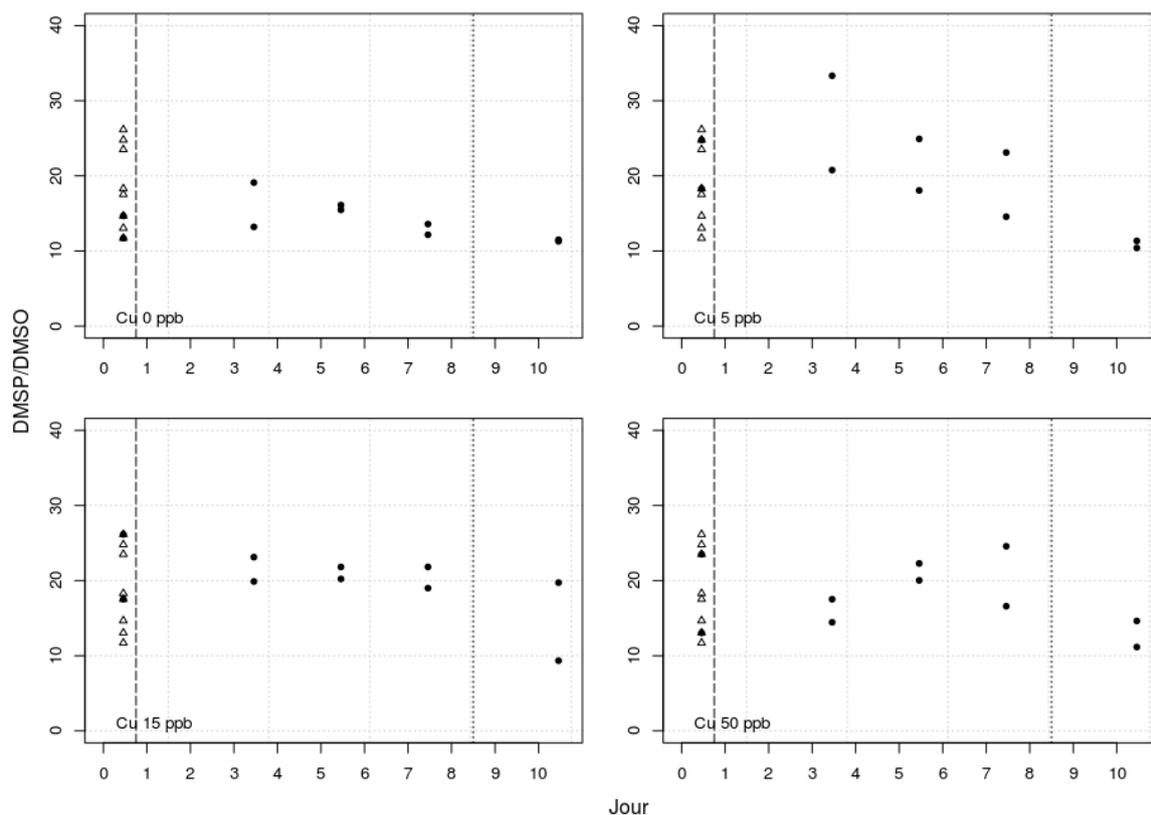


Figure 48 : Evolution du rapport des concentrations en DMSP sur celles en DMSO, sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les triangles représentent les huit mesures de rendement photosynthétique effectif initial après 20:00 heures d'acclimatation dans les quatre aquariums. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.

Des modèles linéaires multiples sont employés afin de comparer les pentes entre l'aquarium contrôle et les traitements 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durant la phase de contamination (Figure 49). La pente de la régression linéaire de l'évolution du logarithme du rapport DMSP/DMSO durant les 8 jours de la phase d'exposition dans l'aquarium contrôle est significative ($p = 0.0415$). Les pentes des traitements 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ diffèrent significativement du contrôle ($p = 0.0151, 0.0140, 0.0374$).

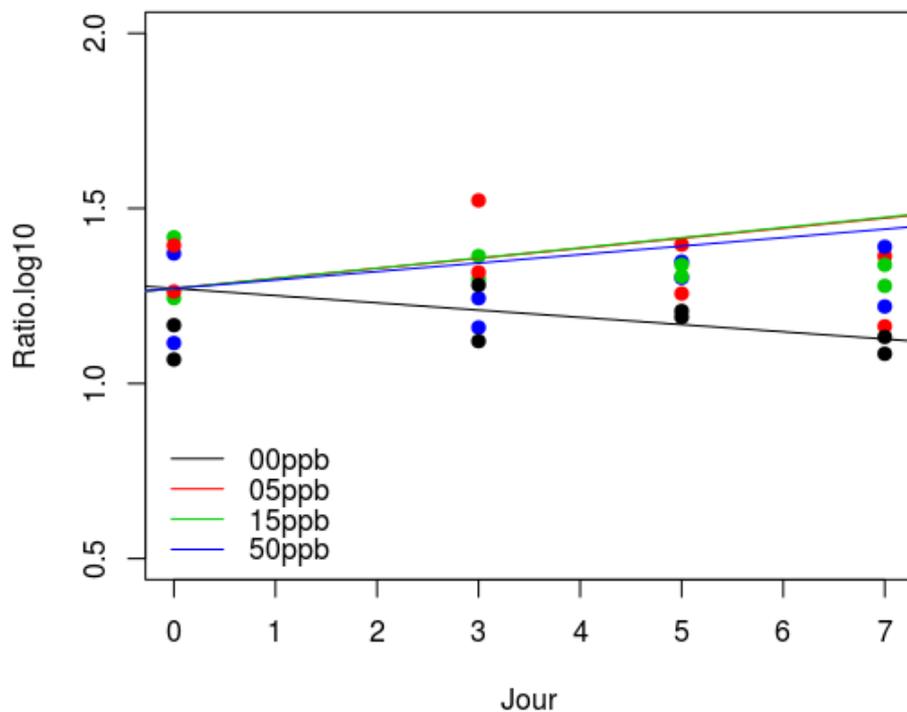


Figure 49 : Variation du logarithme rapport de la concentration en DMSP sur celle du DMSO, sur les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyés de leurs épiphytes, maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. Les droites représentent les modélisations linéaires des données dans chaque traitement durant la phase de contamination.

Chapitre V : Discussion

1. Cycle saisonnier naturel

a. Paramètres environnementaux

L'interception de la lumière par la canopée de l'herbier est importante tout au long de l'année. Ainsi, l'intensité lumineuse au-dessus de la canopée est jusqu'à 6 fois plus élevée qu'à l'interface eau-sédiment à 10m de profondeur (Figure 26). De plus, un décalage de 2 mois entre les maxima est observé. L'intensité lumineuse mesurée à l'interface eau-sédiment au pied des faisceaux de posidonies augmente lorsque la surface foliaire des faisceaux de posidonies, et donc l'effet d'ombrage, commence à décroître (Figures 26 et 47).

L'évolution des PAR au cours du temps entre les mesures enregistrées à l'horizontale par rapport à la surface par la sonde Odyssey et à la verticale par le quantamètre du Diving-PAM montre des profils différents (Figure 27 et 28). Les mesures enregistrées dans la canopée par le quantamètre du Diving-PAM à mi-hauteur des feuilles rendent compte des PAR reçues par la plante dans sa position naturelle verticale dans la colonne d'eau. La sonde Odyssey, placée au-dessus de la canopée de l'herbier, mesure pour sa part les PAR qui arrivent au niveau de l'herbier, avant toute interception par la canopée de l'herbier. Les maxima mesurés avec la sonde Odyssey sont dès lors jusqu'à 3.5 fois plus importants que ceux mesurés avec le quantamètre du Diving-PAM. Un même décalage s'observe entre les deux quantamètres que pour les sondes Hobo, résultat de l'effet d'ombrage par les faisceaux de feuilles qui diminue lorsque la surface foliaire des pousses diminue.

Le cycle de la température de l'eau et de la lumière enregistrée avec les sondes Hobo se suivent avec un décalage d'un mois (Figure 26 et 29). Ainsi, les maxima sont respectivement atteints le 15 juin pour la lumière et le 24 juillet pour la température. Ce décalage, plus important pour les minima, est de 3 mois ; ils sont atteints le 7 décembre 2015 pour la lumière et le 11 mars 2016 pour la température. L'inertie thermique de l'eau induit une diminution plus tardive de la température de la colonne d'eau ; il en va de même pour le réchauffement et la stratification progressive de la colonne d'eau sous l'action du soleil. Le mouvement de la thermocline à la profondeur de 10m est mis en évidence par des pics de température de 16.3 C°, le 3 octobre 2015 et 20.03 C°, le 7 décembre sur le profil de la Figure 29.

b. Mesure *in situ* de l'activité photosynthétique

Le rendement photosynthétique effectif $\Delta F/F_m'$ de la posidonie mesuré de façon hebdomadaire à bimensuelle, à 10m de profondeur, au zénith, par mer calme et temps ensoleillé, reste relativement constant au cours du temps (Figure 30). Les travaux s'étant intéressés à la saisonnalité du rendement photosynthétique des magnoliophytes marines sont quasi inexistantes. Seul Figueroa *et al.* (2002) ont étudié l'évolution journalière du rendement photosynthétique de faisceaux de posidonies à 2.5m de profondeur, respectivement en septembre 1996 et février 1997 (Figure 50). Ils observèrent une diminution de ce rendement du matin à midi et un retour aux valeurs initiales en fin de journée, cette diminution étant plus marquée en septembre (diminution de 18%) qu'en février (diminution de 6%). Ils expliquèrent ces différences de cycles journaliers et de rendement de photosynthèse au zénith par une augmentation de la radiation solaire et une plus grande transparence de l'eau en septembre qu'en février.

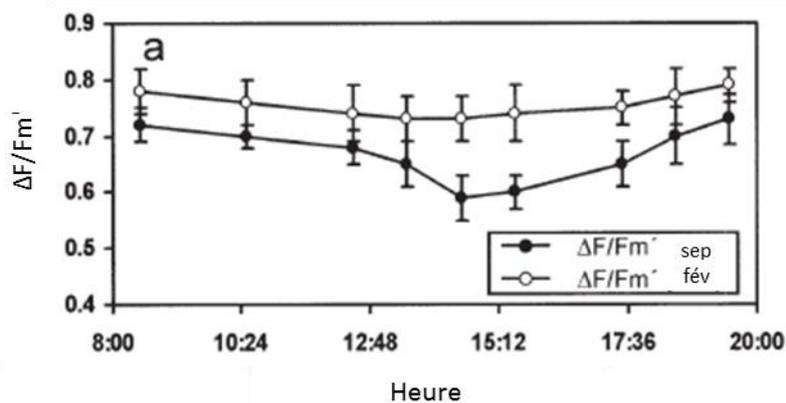


Figure 50 : Evolution du rendement photosynthétique effectif moyen ($n = 4$) sur des faisceaux de *Posidonia oceanica*, mesuré en septembre 1996 et en février 1997 à 2.5m de profondeur au cours d'une journée (Figueroa *et al.* 2002).

Notre suivi s'intéresse aux posidonies par 10m de profondeur. Celles-ci ne se trouvent donc jamais confrontées à des intensités lumineuses aussi élevées au zénith que celles rapportées par Figueroa *et al.* (2002), soit des intensités 8 fois plus élevées en septembre ($1800 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, estimation graphique) et 5 fois plus élevées en février ($800 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, estimation graphique) par rapport à notre étude. Ces différences de conditions, au zénith, peuvent expliquer d'une part la différence de rendement photosynthétique, inférieure dans notre étude pour le mois de février, et la relative constance des mesures au cours de l'année à 10m de profondeur. D'autres auteurs ont pour leurs parts

étudiés, dans le cadre de travaux écotoxicologiques, la variation journalière du rendement de photosynthèse de magnoliophytes marines transplantées en aquariums. De par la quasi absence de données comparatives prises *in situ*, la comparaison avec les mesures de ces derniers, prises dans les aquariums contrôles de leurs expériences, se justifient. Ainsi, Ralph et Burchett (1998) n'observèrent pas d'évolution notable du rendement photosynthétique chez *Halophila ovalis* (R. Brown) J.D. Hooker (1858) éclairée durant 3 jours avec une valeur de PAR constante de 120 μmol de photon $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Li et al. (2012) n'observèrent également pas de variation du rendement photosynthétique chez *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascherson (1871) éclairée durant 10 jours avec une valeur de PAR constante de 250 μmol de photon $\text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$. Les intensités lumineuses employées lors de ces deux études sont dans la gamme des valeurs de PAR moyens journaliers enregistrées entre 11h00 et 14h00 à 10m de profondeur dans notre étude en février 2016 et en août 2015 par exemple. La constance du rendement de photosynthèse rapportée par ces auteurs après 3 et 10 jours d'éclairement continu à des intensités de PAR moyennes constantes s'est observée, dans notre étude, tout au long du suivi, et ce malgré le cycle annuel naturel de la lumière. On peut donc en conclure que, pour les intensités lumineuses, à 10m de profondeur, mesurées dans notre étude, la posidonie ne s'est trouvée à aucun moment dans des conditions de lumière trop faible ou trop intense, ce qui expliquerait la constance du rendement photosynthétique mesuré (Lassauque 2009).

Lorsque l'on calcule le taux de transfert d'électrons relatif (rETR), en multipliant le $\Delta F/F_m'$ par les PAR mesurés *in situ* soit avec la sonde Odyssey (Figure 31), soit avec le quantamètre du Diving-PAM (Figure 32), on retrouve le même profil pour ces deux paramètres physiologiques que les profils environnementaux (figure 27 et 28). Ce résultat s'explique aisément, car multiplier une variable présentant un cycle annuel, en l'occurrence les PAR, par une valeur relativement constante tout au long de l'année, soit $\Delta F/F_m'$, ne peut donner qu'un résultat similaire, à une constante près. Figueroa et al (2002) obtinrent des résultats en adéquation avec notre étude, pour leur cycle non pas annuel mais journalier. L'évolution de taux de transfert d'électrons (ETR) rapportées par ces derniers était directement proportionnelle au cycle du PAR journalier. Les valeurs maximales d'ETR mesurées au zénith étaient par ailleurs bien plus hautes en septembre qu'en février, quand la radiation solaire et la transparence de l'eau étaient plus élevées. Notons qu'en comparaison à ces auteurs, nous employons le rETR dans notre étude afin de ne pas tenir compte des deux constantes que sont

l'absorbance et le partage des électrons dans les deux photosystèmes et pour lesquelles une incertitude existe. L'ETR maximal calculé par ces auteurs en septembre et proche des 500 $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ est, en tenant compte à titre de comparaison des ces deux constantes dans nos calculs (*i.e.* en calculant l'ETR et non plus le rETR), 5.5 fois plus important que notre étude à période équivalente (Figure 51). Cela s'explique à nouveau par les différences de profondeur et donc d'intensité de PAR entre les deux études, soit 2.5m pour Figueroa et al (2002) et 10m dans notre suivi.

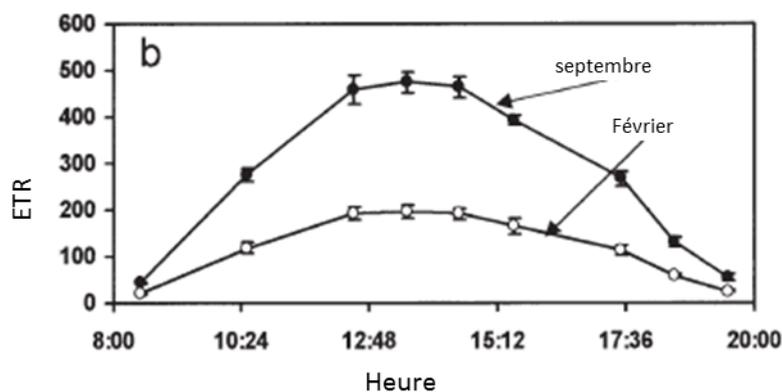


Figure 51 : Evolution du taux de transfert d'électrons moyen (ETR, en $\mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) au cours d'une journée sur des faisceaux de posidonies mesurés en septembre 1996 et en février 1997 à 2.5m de profondeur à Playazo de Rodalquilar (Cabo de Gata, Espagne) cours d'une journée ($n = 4$) (Figueroa et al. 2002).

c. Dosage du DMSP & du DMSO par chromatographie en phase gazeuse

i. DMSP

Anciennement, la présence de DMSP dans les feuilles de plantes marines (*Halodule wrightii* Ascherson (1868), *Syringodium filiforme* Kütz (1860) et *Thalasia testudinum* K.D. Koenig (1805)) n'était attribuée qu'aux seuls épiphytes végétaux poussant sur ces dernières (Dacey et al. 1994). Les travaux de Borges et Champenois (2015) sur la posidonie sont venus contredirent cette hypothèse. Il est important de noter que leur étude est, à notre connaissance, la première et la seule à s'être intéressée à ces molécules organosoufrées dans la posidonie. Ces derniers mesurèrent, dans des feuilles de posidonies débarrassées de leurs épiphytes, la présence de DMSP. Le DMSP se retrouvait également dans les racines et les rhizomes de la plante mais en moindre quantité que dans les feuilles. De plus, Jacquemart et Demoulin (2006) ont montré dans leur inventaire des macroalgues épiphytes des feuilles de

posidonies que l'ordre dominant était les algues rouges ; or ces dernières ne produisant que de très faibles quantités de DMSP (Kamenos *et al.*, 2008), ce qui vient appuyer les observations de Borges et Champenois (2015).

Les résultats du présent travail ne sont pas directement comparables à ceux publiés par Borges et Champenois (2015) en un point. Ces auteurs ont employé le protocole de préparation des échantillons utilisé dans la grande majorité des études liées au DMSP, et proposé par Karsten (1992) et Van Alstyne *et al.* (2003) pour les macroalgues. Selon ce protocole, le dosage du DMSP se fait sur des échantillons végétaux séchés à l'étuve. Or, dans notre étude, au lieu de sécher les échantillons à 60°C durant 48h (Borges et Champenois, 2015), les feuilles de posidonies fraîchement échantillonnées et débarrassées de leurs épiphytes furent directement stockées au congélateur à -28°C jusqu'à analyse. Le maximum de concentration en DMSP obtenu par Borges et Champenois (2015) sur des échantillons de posidonies étuvés était de 33.9 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de poids sec, soit 6.8 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de poids frais (considérant que les feuilles de posidonies contiennent 80% d'eau) ; il est 205.4 \pm 58.0 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de poids frais dans le cadre de ce travail, ce qui représente une différence de plus de 30 fois les valeurs obtenues par Borges et Champenois (2015). L'étape de séchage des échantillons est donc à proscrire du protocole de préparation des échantillons. Quant au délai de temps avant analyse, le stockage des échantillons permet de stabiliser la molécule (Champenois, comm. pers.). Notre étude est par ailleurs la première à s'intéresser à la variation des concentrations en DMSP chez un organisme échantillonné à fréquence hebdomadaire à bimensuelle, sur une durée de 15 mois. En effet, la littérature scientifique sur l'évolution saisonnière du DMSP dans des organismes étudiés dans leur environnement naturel est pauvre. Les premiers à s'y être intéressés sont Lyons *et al.* (2010) chez *Codium fragile* (Suringar) Hariot (1889) suivi de Borges et Champenois (2015) chez *P. oceanica*. Les premiers observèrent une augmentation de la concentration en DMSP à la fin de l'hiver, début du printemps, deux fois plus importante qu'en automne. Ils attribuèrent ces différences saisonnières aux variations de température. De plus, Lyons *et al.* (2010) réalisèrent différentes expériences pour mettre en évidence le lien entre la concentration en DMSP et la lumière, la température et le broutage des oursins. Ils mesurèrent une augmentation du DMSP dans une eau refroidie à 3°C par rapport à une eau à 13 ou 17°C. Karsten *et al.* (1992) mesurèrent au contraire une diminution du DMSP dans des algues vertes de l'Antarctique acclimatées à des

températures plus élevées, soit 10°C. Notre étude sur la posidonie ne suit pas cette explication liée à l'effet cryoprotectant du DMSP. En effet, le faible coefficient de corrélation de Pearson entre la température et la concentration en DMSP, de -0.35, ne permet pas de mettre en lumière un lien évident entre les deux (Figure 37). Lyons et al. (2010) rapportèrent également que la prédation par les oursins avait pour effet d'augmenter légèrement la concentration en DMSP chez *C. fragile*. Cependant, cette augmentation ne dépendait pas du nombre d'oursins placés dans l'aquarium, et donc de la pression globale de broutage exercée par ces derniers. De plus, cet effet du broutage sur l'augmentation sensible de la concentration en DMSP ne devrait pas s'observer chez la posidonie. En effet, Borges et Champenois (2015) mesurèrent un gradient décroissant de concentrations entre le bas et le haut des feuilles de posidonies. Or, l'oursin violet *Paracentrotus lividus* broute de préférence la partie apicale des feuilles de posidonies (Prado et al. 2007), pauvre en DMSP contrairement à leur partie basale en croissance (croissance acropétale des feuilles de posidonies (Boudouresque et al. 2006)). La pression de broutage par les oursins sur les parties développées, adultes, voire sénescentes de la feuille (Giraud, 1979) n'induirait donc pas la production de DMSP chez la posidonie. Borges et Champenois (2015) ont par ailleurs observé une augmentation de la concentration en DMSP de février à août dans la partie basale des feuilles de posidonies, suivie d'une diminution jusqu'en novembre (Figure 46). Dans le cadre de ce travail, la concentration en DMSP mesuré dans la partie basale de la 3ème feuille (Figure 33) est maximale en septembre pour ensuite diminuer de façon continue jusqu'en août, contredisant les observations et explications avancées par ces auteurs. À nouveau, une première explication de ces différences relatives entre les deux études résulte de la perte importante de la molécule d'intérêt liée au séchage à l'étuve des échantillons.

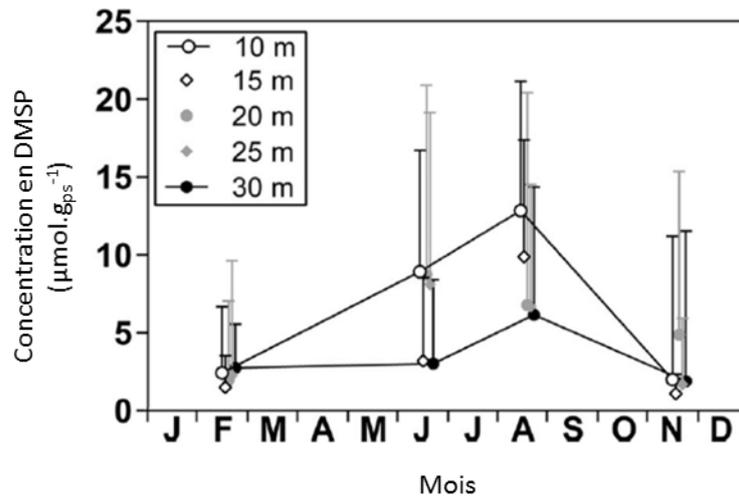


Figure 52 : Variation du DMSP ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids sec) dans la partie basale (0-10cm) de l'ensemble des feuilles de 2 à 3 faisceaux de *Posidonia oceanica*, prélevé à 10, 15, 20, 25, 30 m de profondeur en baie de Calvi, Corse (France), de février 2012 à novembre 2013 (Borges & Champenois 2015).

Malgré les nombreuses études expérimentales portant sur l'impact de stress lumineux (Galindo et al. 2016), UV (Darroch et al. 2015) ou thermique (Deschaseaux et al. 2014), la variation saisonnière naturelle des paramètres environnementaux enregistrés que sont la température (Figure 29), la lumière (Figure 26) et le PAR (Figure 27) ne semblent pas être les éléments déterminants des variations du DMSP dans les feuilles de posidonies. En effet, les indices de corrélation de Pearson, négatifs, sont faibles pour la température (-0.35) et modestes pour l'intensité lumineuse (-0.53) et la PAR (-0.55) (Figure 37). Il en est de même pour l'activité photosynthétique (Figure 36). Selon Sunda (2002), le DMSP serait une molécule capable de capter les radicaux libres qui sont entre-autres produits durant la photosynthèse lors de la photolyse des molécules d'eau par le photosystème II (Lesser 2006). Cependant, la corrélation négative et la corrélation modeste, entre la concentration en DMSP et le taux de transfert relatif d'électrons de la posidonie (-0.45), tendent à démontrer que cette variable physiologique, au même titre que les paramètres environnementaux suivis, ne soient pas déterministes dans le processus de production de DMSP par la plante.

La variation des concentrations en DMSP au cours du temps semble par contre liée à une variable biométrique de la plante, soit la surface foliaire totale du faisceau de feuilles. En effet, la surface foliaire des faisceaux de posidonies (Figure 53) augmente d'avril 2015 à juillet 2015. Cette dernière a ensuite diminué jusqu'à atteindre, un minima en octobre, pour ensuite repartir à la hausse jusqu'au mois de mars 2016. La surface foliaire de la seule 3^{ème} feuille suit

une évolution temporelle similaire. La chute de la surface foliaire de la 3^{ème} feuille, est brusque entre août et septembre. Ces résultats sont issus du travail de mémoire de Mlle N. Bouchachi.

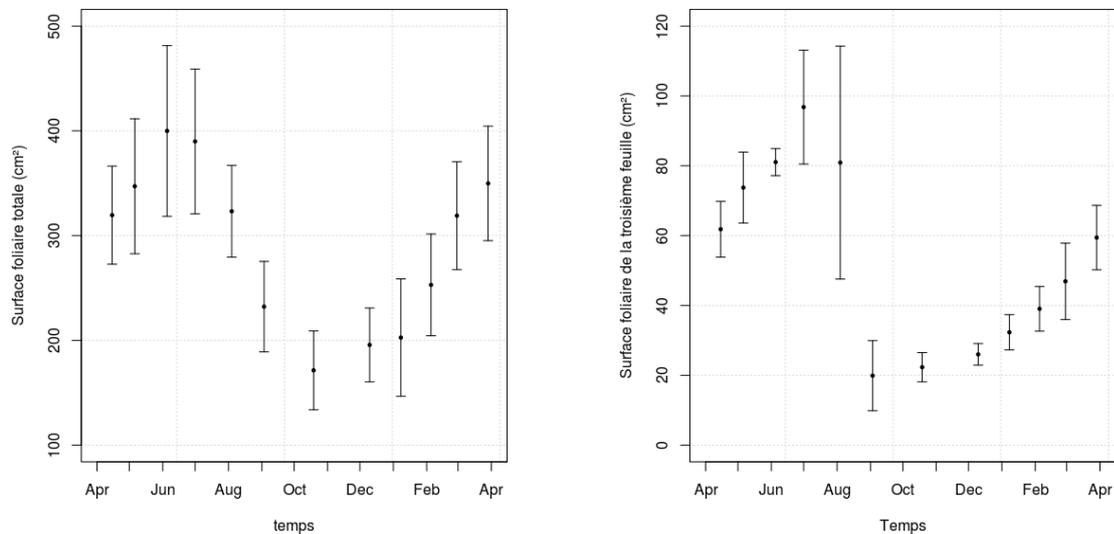


Figure 53 : Variation de la surface foliaire totale et de la 3^{ème} feuilles de faisceaux de *Posidonia oceanica* ($n=10$, moyenne \pm écart-type) prélevé de façon mensuelle (à l'exception du mois de juillet comprenant 2 prélèvements) à 10 m de profondeur au cours du temps (Bouchachi 2017).

La surface foliaire de la 3^{ème} feuille (Figure 53), dont la partie basale fut analysée dans le présent travail sur d'autres échantillons que ceux destinés à la biométrie, est minimale lorsque la concentration en DMSP est maximale, et inversement. Une forte corrélation négative existe entre ces deux variables (-0.68) (Figure 38). Bien que la posidonie soit une plante décidue dont les feuilles poussent et chutent toutes au long de l'année, la fin de la période estivale se caractérise par une chute massive des feuilles adultes et sénescentes et un renouvellement, un rajeunissement général de l'ensemble du faisceau de feuilles (Boudouresque et al. 2006; Gobert et al. 2006). Les 3^{ème} feuilles de septembre sont donc des feuilles jeunes, de petite taille, contrairement à leurs homologues de juillet-août, âgées et de grande taille. Il apparait donc qu'une feuille plus jeune produit plus de DMSP qu'une feuille plus âgée. Cette observation corrobore les résultats publiés par Borges et Champenois qui, de même, mesurèrent des concentrations en DMSP plus basse dans des fragments de feuilles plus âgées (Figure 54). Par ailleurs, travaillant sur les 20 premiers centimètres de la 3^{ème} feuille dans le présent travail, il est intéressant de noter que cela correspond, durant les périodes de faible surface foliaire de septembre-octobre à l'entièreté de la feuille.

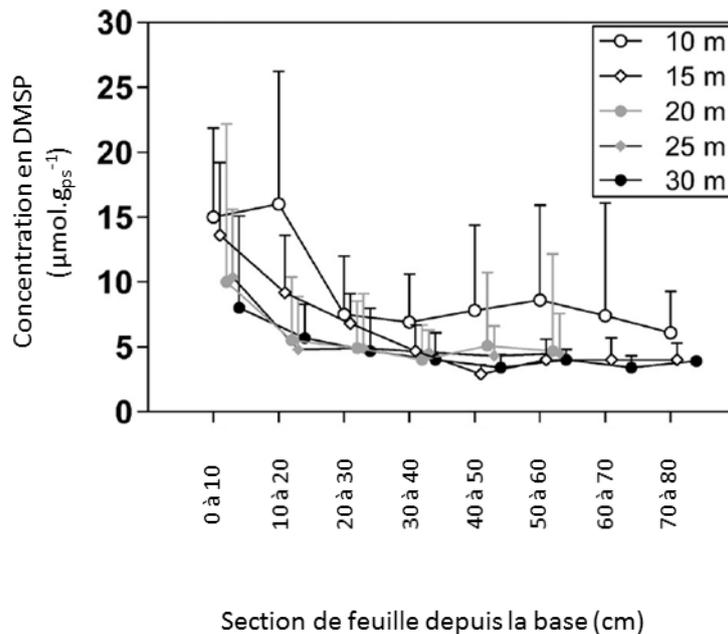


Figure 54 : Variation moyenne du DMSP ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids sec) dans les feuilles de 2 à 3 faisceaux de *Posidonia oceanica* par sections (environ 10 cm) à 10, 15, 20, 25 et 30m de profondeur dans la baie de Calvi (Corse, France), en août 2013 (Borges & Champenois 2015).

Les raisons de cette concentration élevée en DMSP fin septembre dans la 3^{ème} jeune feuille du faisceau renouvelé sont incertaines et différentes hypothèses peuvent être formulées. La plante va allouer un maximum de ressources aux tissus plus importants et donc plus jeunes (Rhoades, 1979) afin d'augmenter ces chances de survie. Parmi l'ensemble des fonctions connues de la production de DMSP (Tableau 1), la protection contre les brouteurs ou encore contre les ROS pourraient expliquer ces concentrations plus élevées dans les jeunes tissus de la 3^{ème} feuille en début de croissance, qui tendent à diminuer avec le vieillissement de celles-ci (Figure 39). En effet, Prado et al. (2007) a montré l'importance de la réduction de la biomasse foliaire de posidonies liée à *Sarpa salpa* L. (1758), principal prédateur herbivore de cette espèce. Ce poisson se nourrit principalement de jeunes feuilles (contrairement à l'oursin violet qui, comme expliqué plus haut, broute essentiellement la partie apical de vieilles feuilles dont il assimile les épiphytes); la production plus élevée de DMSP permettrait donc de réduire cette pression de broutage par les *S. Salpa* sur les jeunes feuilles de posidonie en début de croissance. De plus, Alcoverro et al (1998) ont mis en évidence une plus haute productivité (rapport entre l'oxygène produit et consommé) dans la partie jeune de la feuille, la partie jeune de la feuille à croissance acropétale étant sa partie basale (Boudouresque et al. 2006). Cette productivité élevée implique un plus haut taux de photosynthèse, et donc une production primaire accrue. Cependant, on n'observe pas une variation du rendement

photosynthétique dans les feuilles plus jeunes. La production d'oxygène, tout comme les mesures du rendement photosynthétique rendent compte de l'importance de la photosynthèse.

ii. DMSO

Husband and Kiene (2007) ont dosés à la fois le DMSP et le DMSO sur de mêmes échantillons chez *S. alterniflora*. D'un point de vue analytique, la méthodologie de dosage identique utilisée dans notre étude permet une comparaison directe des données. Ainsi, les concentrations en DMSO dans *S. alterniflora* rapportées par ces auteurs est d'un ordre de grandeur inférieur à celles mesurées dans les feuilles de posidonies de notre étude.

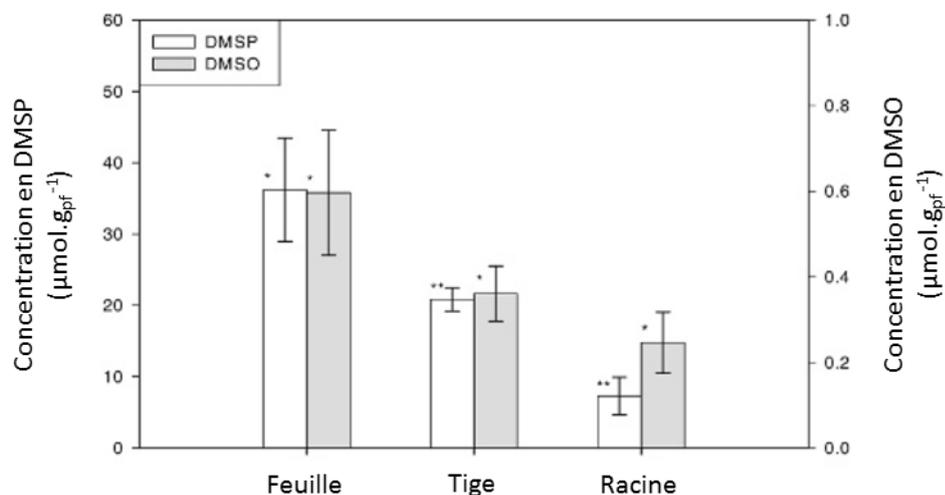


Figure 55 : Variation moyenne des concentration ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids frais) de DMSO et de DMSP dans la moitié de la 2^{ème} feuille, les tiges et les racines de *Spartina alterniflora* à Dauphin Island (Alabama, USA) ($n=4$) (Husband & Kiene 2007).

Le présent travail est par ailleurs le premier à s'intéresser à la variation du DMSO au cours du temps chez un organisme et le premier à le doser chez la posidonie. Les études sur la production de DMSO sont récentes et peu abondantes par rapport aux nombreux travaux réalisés sur le DMSP. Husband et Kiene (2007) émettent l'hypothèse que le DMSO serait un indicateur du taux d'oxydation du DMSP. Lors de stress, la concentration en DMSO devrait augmenter au dépend du DMSP. Dans le cadre de ce travail, dans les conditions naturelles de lumière et de température, on n'observe pas de diminution du DMSP (Figure 55) au profit du DMSO, les deux profils saisonniers étant tout à fait comparables (Figures 33 et 34). La concentration en DMSO est fortement corrélée positivement avec la concentration en DMSP (0.77) (Figure 37). Cette haute corrélation confirme les études montrant que le DMSP est le

précurseur du DMSO (Simo and Vila-Costa 2006). Enfin, de même que pour le DMSP, les paramètres environnementaux que sont la lumière et la température ainsi que le taux de transfert d'électrons relatif ne sont que faiblement corrélés négativement (-0.55 et -0.45, respectivement) avec la concentration en DMSO.

iii. DMSP/DMSO

McFarlin et Alber (2013) ont utilisé le rapport DMSO/DMSP comme biomarqueur de stress chez *S. alterniflora*. En effet, ils mesurèrent une augmentation significative de ce rapport dans des zones soumises à différents stressseurs environnementaux (dépérissement, broutage par les chevaux, augmentation de la densité d'escargots, ensevelissement par les sédiments) par rapport à des zones de contrôle (Tableau 5). Afin de comparer leurs résultats avec nos données, nous avons recalculé le rapport DMSP/DMSO à partir des concentrations publiées par ces auteurs. Inversant le rapport, on observe dès lors dans l'étude de McFarlin et Alber (2013) une diminution du rapport DMSP/DMSO dans les zones affectées par rapport aux zones de bordures et préservées.

Tableau 5 : Concentration en DMSP et DMSO et rapport de leur concentrations (n=6-10, moyenne ± écart-type) dans les feuilles de Spartina alterniflora collectées dans des zones affectées par 4 types de stressseurs environnementaux: dépérissement visible, le broutage par les chevaux, l'augmentation de la densité d'escargots et l'ensevelissement par les sédiments, en bordures de ces zones de perturbations et dans des zones préservées (McFarlin & Alber 2013).

Type de perturbation	Zone	Teneur en DMSP dans les feuilles		Teneur en DMSO dans les feuilles		Rapport DMSP/DMSO
		Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type	
Dépérissement	Affectée	-	-	-	-	-
	Bordure	13.45	3.62	1.06	0.30	12.69
	Saine	17.44	2.41	1.05	0.28	16.61
Broutage par les chevaux	Affectée	11.32	0.97	1.25	0.36	9.06
	Bordure	12.56	1.53	0.63	0.09	19.94
	Saine	21.74	2.48	1.66	0.42	13.10
	Affectée	10.71	3.48	0.90	0.20	11.90
	Bordure	15.61	1.27	0.50	0.08	31.22

<i>Augmentation de la densité des Escargots</i>	<i>Saine</i>	<i>14.97</i>	<i>1.22</i>	<i>0.57</i>	<i>0.08</i>	<i>26.26</i>
<i>Ensevelissement par les sédiments</i>	<i>Affectée</i>	<i>10.13</i>	<i>1.64</i>	<i>0.80</i>	<i>0.26</i>	<i>12.66</i>
	<i>Bordure</i>	<i>17.81</i>	<i>3.04</i>	<i>0.93</i>	<i>0.37</i>	<i>19.15</i>
	<i>Saine</i>	<i>15.22</i>	<i>2.11</i>	<i>0.67</i>	<i>0.10</i>	<i>22.72</i>

La variation du rapport DMSP/DMSO de la présente étude (Figure 35) reste relativement constante au cours du temps et reflète la stabilité du rapport des niveaux de concentration de ces deux molécules dans les feuilles de posidonies. On peut donc en déduire, d'après les travaux de McFarlin et Alber (2013) qu'aucun évènement stressant d'importance n'a touché l'herbier de posidonies au cours de notre étude. Cependant, l'affirmation d'une telle hypothèse nécessiterait d'étudier de façon expérimentale l'évolution du rapport de ces concentrations dans des conditions stressantes connues et maîtrisées.

L'ensemble des indices biotiques de la qualité des eaux côtières méditerranéennes reposant principalement sur les métriques de faisceaux des herbiers de posidonies comme le POMI, le BiPo, le PoSte ou encore le PREI (Lopez y Royo et al. 2010; Lopez Y Royo et al. 2011; Gobert et al. 2009) indique, pour la Baie de Calvi, un indice de qualité de l'eau bon (PoSte) à élevé (les trois autres indices). Sur cette base, on pourrait considérer le rapport DMSP/DMSO moyen de 28.21 ± 6.4 constant au cours de l'année comme étant une valeur de référence reflétant un bon état de santé d'un herbier non perturbé. Néanmoins, les indices précités, reflètent essentiellement l'impact d'une dégradation des paramètres physiques et chimiques de la colonne d'eaux que sont la diminution de la transparence et l'eutrophisation. Or le rapport DMSP/DMSO en tant que biomarqueur précoce d'exposition au stress serait susceptible de varier à une plus large gamme de stressseurs environnementaux tel qu'un stress thermique ou une contamination chimique au métaux (Richir et al. 2013). Dès lors il faudrait considérer ces indicateurs comme complémentaires dans l'étude des stressseurs environnementaux il est donc important d'éviter les amalgames trop rapides entre les indices de qualité de l'eau et les biomarqueurs précoces.

De plus, plusieurs études ont montrés qu'une diminution du rendement de photosynthèse reflétait un état de stress particulier chez la posidonie (Lassauque 2009; Li et

al. 2012). Ce biomarqueur mesuré *in situ* à 10m de profondeur reste constant dans notre étude au cours du temps, à une valeur moyenne de 0.63 ± 0.09 révélatrice d'un bon état de santé de l'herbier (Li et al. 2012; Ralph and Burchett 1998) et peut dès lors être également considéré comme ligne de base de comparaison avec d'autres travaux dans des environnements perturbés. Ces différents indicateurs confirment ainsi la qualité du site échantillonné.

2. Utilisation du DMSP & DMSO comme biomarqueurs de réponse au stress oxydatif induit par le cuivre

a. Paramètres physicochimiques

La température dans l'herbier à 10m de profondeur entre le 24 avril et 5 mai varie entre 15.95 et 17.09°C (Annexe D-2). Dans les aquariums expérimentaux, durant la phase de contamination en circuit fermé avec deux renouvellements d'eau quotidiens, la température est entre 1.5°C à 3.15°C plus élevée que la température à 10m de profondeur. Durant la seconde phase expérimentale de récupération en circuit ouvert (100l/h de renouvellement) avec maintien des deux renouvellements d'eau quotidiens, la température est entre 0.20°C et 0.95°C plus élevées que la température à 10m de profondeur (Annexes G-1, G-2, G-3, G-4). Les températures sont donc certes plus élevées dans les aquariums que dans le milieu naturel entre fin avril et début mai, mais correspondent à des températures telles que mesurables à la fin mai et durant le mois de juin, ou entre les mois de septembre et d'octobre (Figure 29). La salinité reste relativement constante dans l'ensemble des aquariums, entre 37.3 et 37.7, des valeurs similaires aux mesures en sub-surface allant de 37.2 à 37.4. Cette observation est également valable pour le pH qui varie entre 7.91 et 8.09 dans les aquariums et entre 7.62 et 8.17 en sub-surface (Annexes D-4, G-5, G-6, G-7, G-8). L'oxygène dissous est supérieur de 0.4 mg.L⁻¹ à 0.8 mg.L⁻¹ pour les valeurs hautes enregistrées dans les aquariums durant la phase de contamination par rapport à l'oxygène dissous mesuré à 9m de profondeur au-dessus de la canopée de l'herbier de posidonies entre les mois d'avril et de mai (Annexes G-9, G-10, G-11, G-12, Figure 56). Durant la seconde phase expérimentale de récupération des posidonies, cet

écart s'intensifie. En effet, les valeurs les plus faibles enregistrées dans les aquariums correspondent aux valeurs hautes d'environ 9.5 mg.L^{-1} mesurées *in situ*. Le renouvellement d'eau en continu (100L.h^{-1} pour un volume total par aquarium de 300 L) durant la phase de récupération a induit cette augmentation de l'oxygène dissous par rapport à la phase de contamination en circuit fermé. Cependant, ces valeurs élevées restent réalistes, de telles valeurs ayant déjà été mesurées dans la colonne d'eau au-dessus de l'herbier en face de la station STARESO par Champenois entre 2006 et 2014 (Champenois, données non publiées).

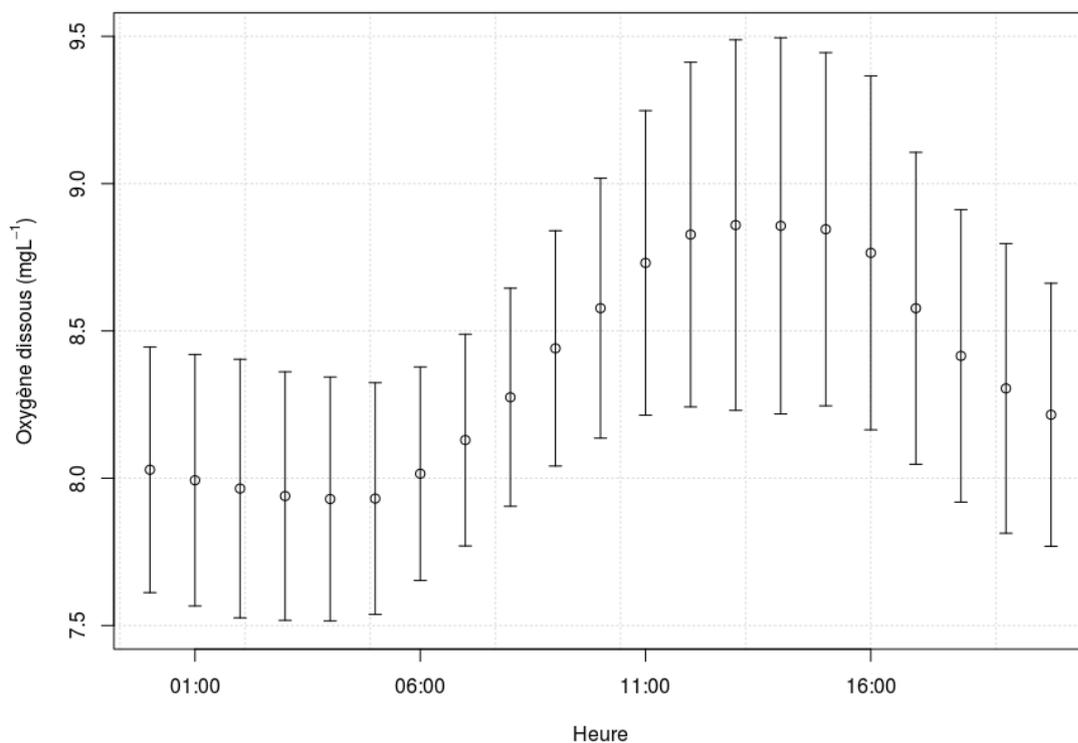


Figure 56 : Cycle journalier moyen de l'oxygène dissous (mg.L^{-1}) dans la colonne d'eau au-dessus de la canopée de l'herbier de *Posidonia oceanica* dans la baie de Calvi (Corse, France), entre les mois d'avril et mai, de 2006 à 2014 (Champenois, données non publiées).

Les nitrates dissous dans l'eau à 10 m de profondeur dans la baie de Calvi entre juin 2006 et mai 2008 ont été mesurés par Richir et al. (2012). Les concentrations sont inférieures, à $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excepté à deux reprises en mai 2006 et aout 2008 dans la colonne d'eau. Des échantillons d'eau libre prélevé entre avril 2015 et mai 2015 sur le même site que celui suivi *in situ* dans le présent travail ont été analysés pour les orthophosphates et les nitrates. Leurs concentrations varient respectivement entre 0.02 et 0.05 pour les orthophosphates et entre 0.04 et 0.33 pour les nitrates (Richir, données non publiées ; mesures réalisées au moyen d'un autoanalyseur SAN-Skalar, adapté pour les eaux oligotrophes suivant la méthode de Grasshoff

et al. (1999)). Les données mesurées dans le présent travail entre le 24 avril et le 5 mai 2017 sur le même site de prélèvements varient respectivement pour ces 2 ions entre 0.081 et 0.363 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et entre 0.000 et 0.177 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (mesures effectuées au moyen d'un autoanalyseur SEAL). Les orthophosphates atteignent des valeurs maximales 7 fois plus importantes par rapport au résultat de Richir *et al.* (2012) et Richir (données non publiées) (Annexes D-6, D-7). L'eau de renouvellement employé lors de l'expérience est prélevée dans le port de la station STARESO et stockée dans une cuve d'où elle alimente les conduites en eau de mer de la station. Ses concentrations maximales en PO_4^{3-} et NO_3^{2-} sont plus importantes que celle de l'eau libre prélevée à 10 m de profondeur dans l'herbier à l'extérieur du port de respectivement 2 et 3 fois (Annexes G-13, G-18, G-23).

Les renouvellements d'eau et l'ajout de la solution en nutriment dans les 4 aquariums a permis de couvrir les besoins métaboliques des posidonies sans pour autant augmenter de façon sensible les teneurs en PO_4^{3-} . Ainsi, les concentrations mesurées en PO_4^{3-} dans les aquariums expérimentaux allant de 0.2 et 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ correspondent aux concentrations mesurées dans les échantillons d'eau libre prélevés dans l'herbier (Annexes D-6, G-14, G-15, G-16, G-17). Après le renouvellement d'eau et l'ajout de la solution de nutriments dans les aquariums, les teneurs en nitrates varient entre 0.6 et 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Elles diminuent ensuite pour revenir à des valeurs similaires à celles mesurées *in situ* dans l'aquarium contrôle et le traitement 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cuivre avant le renouvellement d'eau et l'enrichissement suivant (Annexes D-7, G-19, G-20). On peut donc déduire de ces cinétiques que les nitrates sont consommés par les organismes présents dans ces 2 aquariums. Les aquariums des traitements 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et plus particulièrement 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ montrent une toute autre cinétique des nitrates, avec une augmentation de ces derniers dans pour atteindre jusqu'à 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Annexes G-21 et G-22). Ce comportement disparaît durant la phase de récupération. Les 8 renouvellements journaliers équivalents en circuit ouvert à un débit de $100\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ évite toute nouvelle accumulation des nitrates.

Selon Marín-Guirao *et al.* (2011), l'acclimatation de faisceaux de posidonies du milieu naturel en aquariums est réputée complexe, et leur dépérissement s'observe rapidement. Ces auteurs ont mis au point un système d'aquariums en circuit fermé permettant le maintien de posidonies pendant plus de 2 mois et ce, sans aucun impact sur leur rendement photosynthétique maximal. Ils utilisent pour ce faire des fragments importants d'herbiers

comprenant entre 40 et 60 faisceaux avec leurs sédiments. Les plus petits fragments montrent rapidement des signes de dépérissement au bout de 2 semaines. Ils regroupent ces fragments jusqu'à obtenir 450 faisceaux de posidonies dans des aquariums de 1500L, dans lesquels les teneurs en nitrates et phosphates sont équivalentes à celles du milieu de prélèvement. Ces auteurs ne mentionnent cependant pas dans leur étude ni ajout de nutriments, ni renouvellement en eau de mer. Dans le cadre de notre expérience, la quantité de posidonies dans les aquariums est 2 fois plus faible à volume équivalent et les plantes sont supplémentées en nutriments afin de respecter au mieux leurs besoins métaboliques. La majorité des études de contamination sur les plantes marines sont de courtes durées (moins de 2 semaines) et ne portent que peu d'intérêt aux conditions trophiques dans les aquariums (Llagostera et al. 2016; Marín-Guirao et al. 2011; Prange and Dennison 2000). L'activité photosynthétique des posidonies (effective et maximale) restant relativement constante dans l'aquarium contrôle tout au long de l'expérience, on peut considérer que la transplantation et le maintien des plantes 12 jours en aquariums s'est déroulé dans de bonnes conditions (Annexes H-1 et H-9).

La concentration en cuivre biodisponible mesurée *in situ* dans la canopée de l'herbier à 10m de profondeur est égale à $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tableau 4). Cette concentration est équivalente aux valeurs rapportées par Richir et al. (2013) pour ce même herbier. Elle est par ailleurs 12 fois plus faible que la moyenne des mesures réalisées en 28 sites de la Méditerranée, ce qui confère à la baie de Calvi son statut de sites de référence pour le suivi de la contamination notamment en cet élément trace métallique. La concentration en cuivre biodisponible dans l'aquarium contrôle est 6 fois supérieure à celle mesurée *in situ* dans l'herbier de posidonies (Tableau 4), mais reste cependant toujours inférieure à la concentration moyenne mesurée en cet élément en Méditerranée (Richir et al., 2013). La teneur en cuivre biodisponible semblable entre les phases de contamination et de récupération permet d'émettre l'hypothèse que cette concentration plus élevée dans le traitement contrôle par rapport au milieu ambiant ne provient pas d'une contamination lors de la manipulation des solutions de contaminants. La présence de canalisation en fonte (bien qu'essentiellement en pvc) dans les circuits de distribution de l'eau de mer de la station STARESO pourrait expliquer cette légère contamination résiduelle dans le traitement contrôle.

Les rapports entre les concentrations nominales ajoutées dans les aquariums et leurs fractions biodisponibles mesurées au moyen des sondes passives DGTs correspondent

également avec les observations de Richir et al. (2013). Ces auteurs ont injecté *in situ* sous cloche à 10 m de profondeur du cuivre parmi d'autres éléments traces et ont mesuré un rapport 1/5 entre les concentrations biodisponibles et injectées dans leur dispositif expérimental. La concentration maximale biodisponible mesurée durant les quatre derniers jours de la phase de contamination de l'aquarium 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en cuivre est égale à 27,04 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette concentration, 90 fois plus élevée que la valeur moyenne rapportée pour la Méditerranée, reste néanmoins 2.8 fois plus basses que celle rapportée pour le site particulièrement pollué de l'estuaire de Huelva (Morillo and Usero 2008). Les concentrations biodisponibles mesurées au cours de cette expérience de contamination reste donc des gammes de valeurs environnementalement pertinentes.

b. Mesure de l'activité photosynthétique

Différents travaux ont étudié l'impact de l'exposition de plantes marines aux éléments traces. Or, l'activité photosynthétique est un biomarqueur tout indiqué pour étudier l'état de santé des organismes photosynthétiques. De nombreuses méthodes et techniques ont été utilisées à cette fin avec leurs avantages et inconvénients respectifs (Annexe I-1). Parmi ces méthodes, la mesure de la fluorescence et plus généralement le calcul du rendement photosynthétique qui en découle sont de plus en plus communs et tendent à s'imposer comme technique de suivi. L'utilisation de fluorimètres submersibles rend par ailleurs possible la mesure de l'activité photosynthétique des plantes et algues marines aussi bien *in situ* que lors d'expérience en laboratoire. Cette technique est par ailleurs non-intrusive. Elle ne fournit cependant pas d'information sur la consommation et la production O_2 ou de CO_2 (Silva et al. 2009), bien que certains modèles récents de fluorimètres combinent à la fois mesures de fluorescence et d' O_2 .

Le rendement photosynthétique effectif ($\Delta F/F_m'$) rend compte de l'activité photosynthétique d'un organisme dans les conditions de luminosité prévalant lors des mesures de fluorescence. D'autres paramètres de photosynthèse ont également été rapportés dans la littérature, dont le rendement photosynthétique maximal mesuré après adaptation au noir qui rend compte de la capacité maximale de l'organisme à photosynthétiser (Han et al. 2008). La RLC fournit une information différente et inédite à notre connaissance dans la cadre d'une étude toxicologique d'exposition d'une plante marine à un

métal, soit la capacité de l'organisme à tolérer des variations brusques de lumière. Il est important de ne pas confondre les RLCs avec les courbes de lumières (plant physiological ecology) qui, à partir du même principe d'exposition à des intensités croissantes de lumière s'intéresse à la photosynthèse à travers la mesure des échanges gazeux de CO₂ et de O₂ (Ralph and Gademann 2005). Actuellement, à notre connaissance, aucune expérience toxicologique de l'effet d'une exposition aux éléments traces sur l'activité photosynthétique de la posidonie n'a été réalisée.

i. Rendement photosynthétique effectif

Ralph et Burchett (1998) ont étudié l'effet du cuivre sur *Halophila ovalis* maintenue en aquarium durant 96H00 (Figure 57). Pour ce faire, ils ont ajouté en début d'expérience une solution cuivrée dans les aquariums pour atteindre des niveaux de contamination de respectivement 1, 5 et 10 mg.L⁻¹. La durée de l'expérience et les concentrations employées sont très différentes par rapport à la présente expérience. En effet, la concentration la plus faible utilisée par Ralph et Burchett est 20 fois plus importante que la concentration maximale employée dans le cadre de ce travail (Tableau 4). Ces auteurs ont observé une sénescence prématurée des plantes exposées à 5 et 10 mg.L⁻¹ et une diminution du $\Delta F/F_m'$ dans le traitement 1mg.L⁻¹ qui au bout de 5h se stabilise.

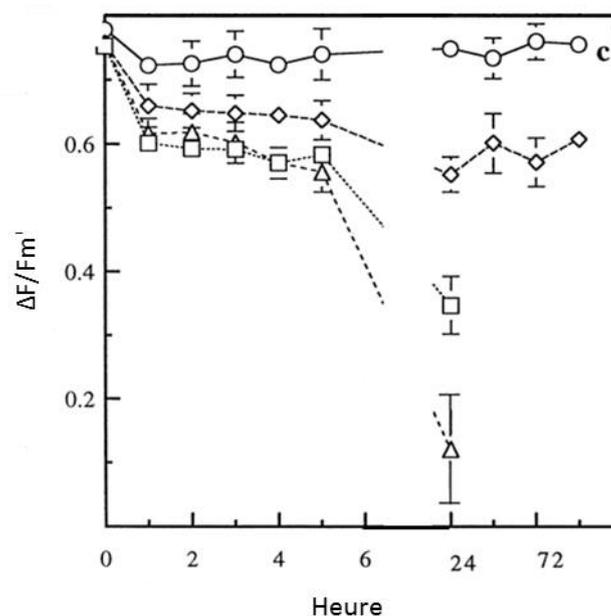


Figure 57 : Variation du rendement photosynthétique effectif $\Delta F/F_m'$ de *Halophila ovalis*, prélevée à Taylor's Bay (Sydney, Australie) et exposée à différentes concentrations de cuivre : 0 (rond), 1 (losange), 5 (triangle) et 10 (rectangle) mg.L⁻¹ durant 96h (n = 4) (P. J. Ralph and Burchett 1998).

Macinnis-Ng et Ralph (2002) ont réalisé une expérience de contamination similaire à celle de Ralph et Burchett (1998). Ils ont exposé *in situ* sous cloche durant 10h *Zostera capricorni* à différents traitements au cuivre (Figure 58). Ces chercheurs ont décidé d'utiliser des concentrations expérimentales de 0.1 et 1 mg.L⁻¹. Ils ont observé une diminution rapide endéans deux heures du $\Delta F/F_m'$ pour les deux traitements. Ce dernier continue de fluctuer durant la phase de récupération de 86h00 sans pour autant récupérer les niveaux d'activité photosynthétique des contrôles. La plus basse concentration employée dans cette seconde expérience reste par ailleurs encore deux fois supérieure au traitement 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu employé dans ce travail (Tableau 4).

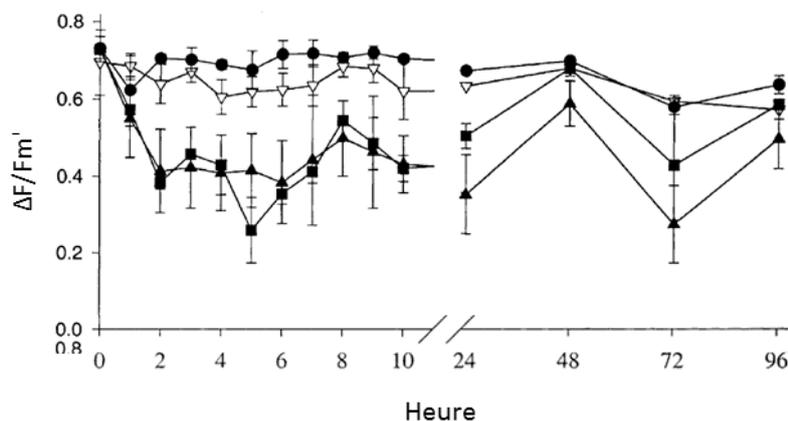


Figure 58 : Variation du rendement photosynthétique de *Zostera capricorni* exposée *in situ* sous cloche à Paradise beach (Pittwater, Australie) à différentes concentrations de cuivre : 0.1, 1mg.L⁻¹. La 1^{ère} phase d'exposition de 10h00 est suivie d'une phase de récupération de 86h00 (Macinnis-Ng et Ralph 2002).

Li *et al.* (2012) ont étudié l'effet de l'exposition au cuivre chez *Thalassia hemprichii* sur une durée similaire à notre étude de 10 jours (Figure 59). Cependant, ils ne renouvelaient pas l'eau durant l'expérience. Ils ont ajouté de même une solution de nutriments en début d'expérience, contenant l'ensemble des micro- et macro-nutriments nécessaire au maintien de la plante pour la durée de l'expérience. Ils ont exposé les plantes aux concentrations suivantes en cuivre : 0, 10, 50, 100 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, ce qui équivaut à 0, 630, 3150, 6300 et 9450 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Un effet léthal est observé pour les concentrations supérieures à 630 $\mu\text{g.L}^{-1}$, avec une sénescence prématurée au bout de deux jours pour les deux traitements aux concentrations les plus élevées. La solution est injectée une fois en début d'expérience. Il est intéressant de mettre en avant que le $\Delta F/F_m'$ ne diffère que peu du contrôle dans le

traitement $630 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre. Or, cette concentration, la plus faible reste tout de même 12 fois supérieur au traitement $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ employé dans le cadre de ce travail.

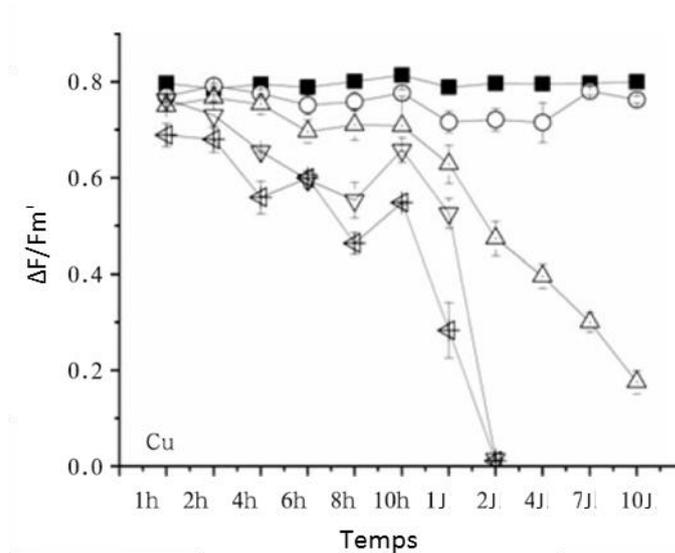


Figure 59 : Variation du rendement photosynthétique de *Thalassia hemprichii* prélevée dans la baie de Xincun (Hainan, Chine) et exposée en aquarium durant 10 jours à différentes concentrations de cuivre : 0, 10, 50, 100 et $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($n = 3$) (Li et al. 2012).

Papathanasiou *et al.* (2015) ont étudié l'effet de l'exposition au cuivre sur le rendement photosynthétique de *Cymodocea nodosa*. Ils utilisent une eau de mer synthétique de salinité 35 contenant $0.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NO_3^{2-} et $0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PO_4^{3-} (Figure 60). Les traitements expérimentaux au cuivre sont de 0, 1.6, 4.7 et $7.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ce soit 0, 100, 300 et $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les plantes sont prélevées dans les 3 herbiers de Brasida, Nea karvali et Thasos en mer Egée, à 3m de profondeur. Les herbiers de Brasida et Thasos sont situés dans une zone dont la qualité de l'eau est bonne ; l'herbier de Nea karvali est dans une zone dont la qualité de l'eau est modérée. Le $\Delta F/F_m'$ en fin d'expérience sont similaires dans les aquariums contrôles (environ 0.75). Cependant, les plantes provenant de l'herbier de Nea karvali dont l'eau est de moins bonne qualité répondent au stress induit par l'ajout de cuivre 2 jours plus tôt que les plantes provenant des deux autres herbiers. Le $\Delta F/F_m'$ moyen en fin d'expérience est également plus faible, soit 0.359 ± 0.027 par rapport au valeurs moyennes de 0.593 ± 0.019 et 0.522 ± 0.022 des plantes de Brasida et Thaso. La diminution de ce rendement est progressive sur les 3 sites de prélèvements. Les plus basses concentrations employées dans cette expérience évite toute chute à 0 du $\Delta F/F_m'$ telle qu'observé pour certains traitements des études citées précédemment. De plus, ces auteurs ont mis en avant que la qualité de la

colonne d'eau, et donc l'état de santé de l'herbier dont les plantes étaient issues est facteur déterminant dans la réponse à l'exposition au cuivre.

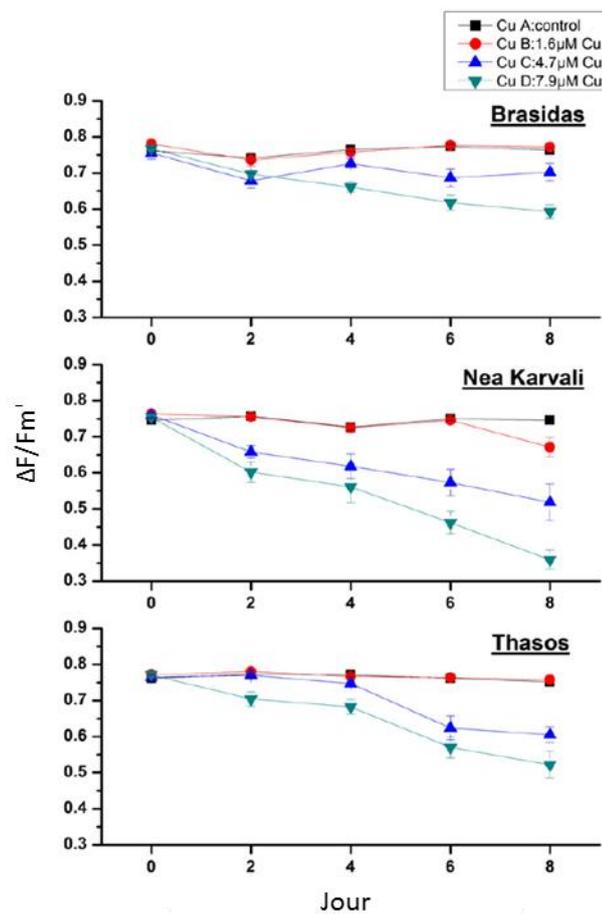


Figure 60 : Variation du rendement photosynthétique effectif de *Cymodocea nodosa* prélevée dans les herbiers de Brasidas, Nea Karvali et Thasos en mer Egée et exposée en aquariums à différentes concentrations de cuivre : 0, 1.6, 4.7 et 7.9 μ M, avec ajout de 0.3 μ M de nitrates et 0.02 μ M d'orthophosphates (Papathanasiou, Orfanidis, and Brown 2015).

Les expériences d'exposition au cuivre citées ci-dessus ont pour objectif d'étudier l'effet d'une contamination importante à partir d'une unique injection sur de courtes (heures) à moyennes (jours) périodes de temps. Dans le cadre de ce travail, nous avons pris le parti de réaliser des contaminations avec des concentrations environnementalement pertinentes, définies à partir de niveaux de contamination mesurés en Méditerranée (Richir et al. 2013), mais dès lors plus basses. Ainsi, la concentration nominale maximale de 50 μ g.L⁻¹ employée est 2 à 200 fois plus basse que pour les précédentes études d'exposition au cuivre de magnoliophytes marines. De ce fait, pour éviter toute déplétion en cuivre dans les différents traitements, les contaminations furent renouvelées deux fois par jours lors des changements partiels (rapport) en eau des aquariums. Aucun des 3 traitements de 5, 15 et 50 μ g.L⁻¹ ne

provoque de chute marquée du $\Delta F/F_m'$. On observe par contre une lente diminution continue du $\Delta F/F_m'$ des posidonies exposées au traitement $50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cette observation corrobore celles de Papathanasiou *et al.* (2015) pour *C. nodosa* exposées à des concentrations en cuivre allant de 100 à $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Aucune sénescence prématurée des feuilles n'a été observée dans notre étude. Quant aux seuls deux jours de la phase de récupération, ils ne permettent pas d'observer un retour du niveau du $\Delta F/F_m'$ à sa valeur initiale comme observé par Macinnis *et al.* (2002) pour *Z. capricorni*. Quant aux concentrations relativement faibles de 5 et $15 \mu\text{g.L}^{-1}$, elles nécessitent probablement une exposition de plus longue durée pour avoir un effet mesurable sur le $\Delta F/F_m'$ des posidonies. De plus, Papathanasiou *et al.* (2015) ont montré que l'herbier d'où les plantes sont prélevées a un impact non négligeable dans la réponse à l'exposition au cuivre. L'état écologique de la zone en Baie de Calvi d'où sont échantillonnées les posidonies pour l'expérience est bon à excellent (Gobert *et al.* 2009). Cela renforce l'hypothèse que la durée de l'expérience fut trop courte pour les traitements inférieurs à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ que pour observer un effet clair et marqué sur le $\Delta F/F_m'$ des plantes. La prochaine étape de ce travail consistera à doser le cuivre bioaccumulé par les plantes pour compléter les informations relatives aux concentrations en cuivre nominales et biodisponibles des différents traitements. Les prélèvements ont été réalisés à cette fin.

La quantité de faisceaux utilisée diffère fortement des expériences de contamination en aquarium citées précédemment. Notre expérience utilise des fragments d'herbier qui comprennent une cinquantaine de faisceaux, de la matrice (entremêlée de racines, rhizomes et sédiments) et des macroorganismes associés à ces morceaux d'écosystèmes dont des ophiures, des alevins de poissons ou encore des crabes qui n'ont pas été retirés des aquariums, comme cela a pu être le cas dans d'autres expériences. Certaines études ont également gratté les épiphytes des feuilles et conservé uniquement les rhizomes et racines à nu, débarrassés des sédiments associés. Ces précautions prises assurent que seule la plante marine d'intérêt accumule le cuivre ; mais ce conditionnement expérimental est très éloigné des conditions du milieu naturel et peuvent également expliquer dans une certaine mesure la différence de réponses avec nos observations.

ii. Taux de transfert maximal d'électrons

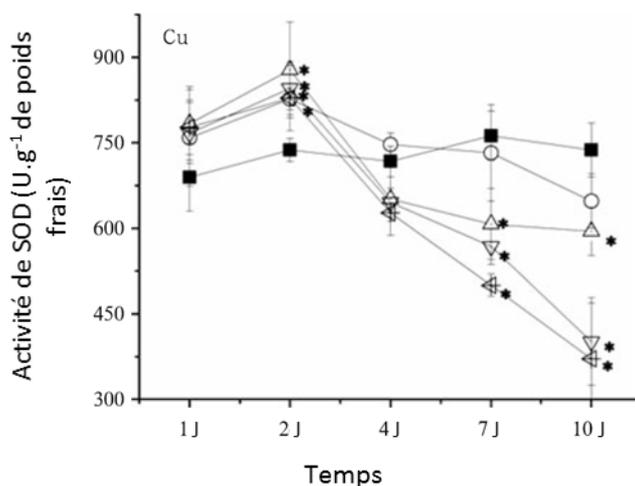
Les RLCs permettent de déterminer le taux de transfert maximal d'électrons (ETRmax) d'un producteur primaire. Elles ne sont cependant que peu appliquées dans la littérature scientifique malgré l'information intéressante qu'elles fournissent. En comparaison à une mesure de $\Delta F/F_m'$ qui ne prend que quelques secondes, la réalisation d'une RLC nécessite beaucoup plus de temps. Ce temps est limitant lors de suivi et d'expérience *in situ* de par l'environnement contraignant du travail subaquatique. Il peut s'agir là d'une possible raison à sa moindre utilisation par la communauté scientifique.

Gera et al. (2012) comparent 4 sites le long de la côte Est espagnole que sont Jugadora, Montjoi, Salou et Sitges à partir de mesures du rendement photosynthétique maximal et de l'ETRmax de posidonies. C'est à notre connaissance la seule étude qui utilise le ETRmax comme indicateur potentiel de stress chez une magnoliphyte marine. Les deux premiers subissent de faibles pressions anthropiques alors que les deux derniers sont fortement anthropisés. Leurs statuts écologiques sont, dans l'ordre cité, élevé, bon, modéré et faible. Aucune différence statistique n'est observée entre les RETmax des sites respectivement fortement ou faiblement impactés par les activités anthropiques. Le rendement photosynthétique maximal varie pour sa part significativement entre les deux regroupements de sites. Il serait donc, selon ces auteurs, un paramètre plus sensible que l'ETRmax dans l'utilisation éventuelle des capacités photosynthétiques de la plante comme biomarqueur de stress.

Le rETRmax mesuré dans la présente étude ne montre pas de tendance évolutive nette chez les posidonies exposées aux différentes concentrations en cuivre. Les faibles concentrations employées, ainsi que la durée relativement courte de l'expérience n'ont pas été des conditions suffisamment stressantes que pour observer une baisse du rETRmax. Par ailleurs, à titre de comparaison, celui-ci varie, au cours du cycle saisonnier naturel de la plante suivi dans l'herbier de STARESO à 10m de profondeur, entre 26.53 et 81.64 (Annexe C-1). Cette gamme de valeurs mesurées *in situ* sur un an, aussi large que celle observée dans les aquariums expérimentaux, rend compte de la variabilité de ce paramètre et donc de la plus grande difficulté de l'utiliser comme biomarqueur de stress.

c. Évolution du DMSP, DMSO et DMSP/DMSO suite à l'exposition au cuivre

Selon Sunda *et al.* (2002), le DMSP, le DMS, le DMSO et l'acrylate forment ensemble un système antioxydant très performant. Il est dès lors envisageable d'observer une augmentation ou une diminution des concentrations en DMSP et/ou en DMSO chez des organismes synthétisant ces molécules et exposés à des facteurs de stress oxydant, dont l'exposition au cuivre. Li *et al.* (2012) mesurent dans leur expérience d'exposition de *T. hemprichii* à des concentrations de 0, 10, 50, 100 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cuivre, en parallèle au $\Delta\text{F/Fm}'$, l'activité d'enzymes antioxydantes dont la superoxyde dismutase (SOD). Ces auteurs observent une augmentation de l'activité SOD les deux premiers jours d'exposition par rapport au traitement contrôle, suivi d'une chute significative pour les contaminations 50, 100 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Cet exemple illustre l'effet oxydant du cuivre mis en évidence au travers du dosage d'un biomarqueur de stress, en l'occurrence l'activité SOD. Cependant, à notre connaissance, aucune expérience autre que le présent travail n'a à ce jour démontré expérimentalement l'effet d'un stress oxydant sur la production de DMSP et/ou de DMSO.



Aucune évolution nette de la production de DMSP et de DMSO n'a été observée au cours de cette étude dans les posidonies exposées aux trois niveaux de contamination en cuivre de 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. De même, le rapport DMSP/DMSO n'a pas montré de variation marquée. Cependant, le logarithme des rapports indique des pentes significativement différentes du contrôle. L'ensemble des échantillons prélevés lors de l'expérience de contamination n'ont pu être analysés à ce jour. L'analyse prévues des séries complètes

d'échantillons révélera peut-être certaines tendances et effets à ce stade peu observables, notamment concernant le rapport DMSP/DMSO (Figure 43).

McFarlin et Alber (2013) montrent des variations significatives du rapport DMSO/DMSP chez *S. alterniflora* exposées à des stressseurs environnementaux de nature diverses. Les plantes analysées proviennent de trois stations distinctes le long d'un gradient de ces stressseurs. Ainsi, la première est marquée visuellement par un stress multifactoriel de broutage par les cheveux, d'ensevelissement par les sédiments etc., la seconde est en bordure de cette première zone de stress, et la dernière une dizaine de mètres en recul de cette bordure. Si, comme observés pour *S. alterniflora*, le stress subit par la posidonie exposée au cuivre doit s'accompagner d'altérations visibles de la plante (e.g. sénescence des feuilles), alors il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que ce biomarqueur n'est pas assez sensible dans les conditions de la présente expérience. Cependant, de nombreux travaux sont encore à réaliser pour affirmer ou infirmer l'efficacité de ce biomarqueur, à commencer par l'analyse des séries complètes d'échantillons prélevés dans le cadre de ce travail, aussi bien pour le DMSP et le DMSO que pour le cuivre bioaccumulé par les feuilles analysées.

Chapitre VI :

Conclusion et

perspectives

La présente étude est la première à s'être intéressée à la production de DMSP et de DMSO par la posidonie. Elle est par ailleurs la première à avoir établi le cycle saisonnier du DMSP, du DMSO et du rapport de leur concentration dans la posidonie à une fréquence d'échantillonnage élevée, soit hebdomadaire à bimensuelle. Ces molécules sont à leur niveau de concentration le plus élevé dans la partie basale des 3^{èmes} feuilles de posidonies analysées fin septembre, lors du renouvellement massif des faisceaux de feuilles ; ces concentrations sont donc maximales dans les jeunes tissus foliaires et tendent ensuite à diminuer tout au long du vieillissement du faisceau de feuilles jusqu'à leur renouvellement à la fin de l'été suivant. Cette dynamique se traduit par une haute corrélation observée entre les concentrations en DMSP et en DMSO avec la surface foliaire de la 3^{ème} feuille, augmentant au fur et à mesure que la feuille vieillit.

Le choix du site d'échantillonnage n'est pas le fruit du hasard, puisque l'herbier de posidonies en face de la station de recherches sous-marines et océanographiques STARESO est considéré en bon, voire très bon état écologique. Le suivi du cycle saisonnier du rendement photosynthétique effectif ($\Delta F/F_m'$) de la posidonie et de son taux de transfert d'électrons relatif (rETR) mesurés parallèlement au dosage du DMSP et du DMSO sont également des premières. Le $\Delta F/F_m'$ reste stable au cours de l'année à la profondeur d'échantillonnage de 10m ; le rETR étant le produit du $\Delta F/F_m'$ et de la radiation photosynthétiquement active (PAR), tous deux présentent les mêmes profils saisonniers. Ces mesures de l'activité photosynthétique de la posidonie avaient été jusqu'à présent essentiellement utilisés en tant que biomarqueurs dans des études écotoxologiques ; mais aucune étude ne s'était encore penchée sur le cycle saisonnier naturel de ces indicateurs physiologiques chez les magnoliophytes marines.

Les résultats issus de la première partie de cette étude fournissent dès lors les lignes de base de la production de DMSP et de DMSO et de l'activité photosynthétique à 10 m de profondeur de la posidonie dans un herbier sain. Ces lignes de base pourront servir de références lors d'ultérieures études comparatives, notamment dans des milieux moins bien préservés et soumis à des pressions environnementales diverses. Mais les perspectives issues des résultats de ce suivi dépassent largement ce seul aspect de monitoring environnemental.

Ainsi, il serait tout d'abord intéressant de réaliser une étude comparative de dosage du DMSP et du DMSO entre des échantillons étuvés ou stockés au congélateur, et ce afin de

quantifier avec exactitude la perte en ces molécules lors de l'étuvage. De fait, les auteurs de très nombreuses études ont séché 48h à l'étuve leurs échantillons avant analyse, tel que décrit dans Karsten (1992) et Van Alstyne et al. (2003), rendant de fait toutes analyses quantitatives impossibles.

Il serait intéressant de doser le DMSP et le DMSO dans les différentes feuilles de faisceaux de posidonies, mais également dans différentes sections verticales de ces mêmes feuilles. Ce type d'étude permettrait de valider ou d'infirmer notre hypothèse selon laquelle plus les tissus foliaires sont âgés, moins ces derniers produisent de molécules organosoufrés.

De nombreuses fonctions ont été attribuées dans la littérature au DMSP et au DMSO chez différents organismes, telles que des propriétés osmorégulatrices, cryoprotectrices ou encore antioxydantes. Le présent travail se voulait essentiellement descriptif, avait pour objectif de décrire le cycle naturel de ces molécules dans la posidonie au cours d'une année. Ce travail ayant été réalisé avec succès et ayant permis de définir des lignes de base pour ces molécules chez la posidonie, il serait intéressant maintenant d'investiguer leurs fonctions chez cette espèce.

Il serait enfin intéressant d'étudier différents stressseurs environnementaux susceptibles de faire varier le rapport DMSP/DMSO de la posidonie, et ce afin de valider ou d'invalider son utilisation potentielle en tant que biomarqueur de stress générique chez cette espèce, comme démontré pour *Spartina alterniflora*. Le développement d'un tel biomarqueur précoce et/ou générique, peu invasif (car ne nécessitant le prélèvement que d'une feuille) nécessiterait ensuite une comparaison et une intercalibration avec les différents indices biotiques employés actuellement, mais calculés à partir de métriques traduisant déjà un effet délétère sur l'écosystème. L'objectif fixé par l'Union Européenne est d'atteindre le bon statut écologique de l'ensemble de ses masses d'eaux à l'horizon 2020. Les indices du suivi de la qualité des eaux côtières renvoient à 5 statuts écologiques qualifiés d'élevé, de bon, de moyen, de pauvre ou de mauvais. Il sera donc nécessaire, dans cette même optique, d'établir avec précision au-dessus et/ou en-dessous de quel seuil le rapport DMSP/DMSO ne serait plus considéré comme bon ou élevé mais comme moyen, pauvre ou mauvais. Pour ce faire, une première étape consisterait à mesurer ce potentiel biomarqueur de stress en des sites où les indices biotiques conventionnels de la qualité de l'eau ont déjà été établis et à le comparer à ces derniers.

Le second objectif de ce travail a été d'investiguer la fonction antioxydante proposée pour le DMSP et le DMSO dans la littérature scientifique. L'exposition au cuivre est reconnue comme inducteur de stress oxydant. L'expérience toxicologique réalisée en seconde partie de ce travail est la première étude, à notre connaissance, visant à quantifier l'effet d'un stress oxydant induit par l'exposition au cuivre sur la production de DMSP et de DMSO par la posidonie et sur son activité photosynthétique .

Les faibles variations des différents biomarqueurs suivis a permis de mettre en avant l'importance des concentrations employées de contaminants. En effet, dans les traitements de respectivement 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, seul le dernier a permis de mesurer un réel effet quantifiable sur le rendement photosynthétique effectif. L'utilisation de concentration environnementalement pertinente sur des morceaux d'herbier en bon état écologique a démontré la capacité de la posidonie à résister à ce facteur de stress sur une période de moyenne durée (11 jours). Cependant, la légère accumulation des nitrates (et donc la diminution de leur assimilation par le morceau d'herbier) dans l'aquarium contaminé avec 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre et celle, importante, dans le traitement 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ laisse envisager qu'un stress a bien eu lieu dès 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Les résultats issus de ce second volet ouvrent de nombreuses perspectives. L'augmentation de la durée de la phase d'exposition au cuivre permettrait de confirmer sa toxicité à des concentrations aussi basses que 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, voire 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$. En effet, il se peut que la diminution observée de l'assimilation en nitrates se traduise, sur le plus long terme, en une diminution de l'activité photosynthétique des plantes. De même, une contamination chronique en cuivre sur plusieurs semaines serait à même d'apporter plus de certitude quant à l'utilisation du rapport DMSP/DMSO comme biomarqueur de stress oxydant. Seule une petite partie des échantillons récoltés au cours de l'expérience ont pu à ce stade être analysés pour le DMSP et le DMSO. Or, les analyses provisoires réalisées montrent une évolution différente de ce rapport entre le traitement contrôle et les expositions au cuivre. Cela nous conforte à poursuivre nos investigations, et tout d'abord à terminer les analyses pour compléter les cinétiques partielles disponibles.

Bibliographie :

- Ackman, R G, and H.J. Hingley. 1967. "The Occurrence and Retention of Dimethyl-B-Propiothetin in Some Filter-Feeding Organisms." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 25(2): 267–84.
- Ackman, R G, J Hingley, and K T MacKay. 1972. "Dimethyl Sulphide as an Odour Component in Nova Scotia Fall Mackerel." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29: 1085–88.
- Van Alstyne, Kathryn L., and Letise T. Houser. 2003. "Dimethylsulfide Release during Macroinvertebrate Grazing and Its Role as an Activated Chemical Defense." *Marine Ecology Progress Series* 250: 175–81.
- Van Alstyne, Kathryn L., and Melany P. Puglisi. 2007. "DMSP in Marine Macroalgae and Macroinvertebrates: Distribution, Function, and Ecological Impacts." *Aquatic Sciences* 69(3): 394–402.
- Van Alstyne, Kathryn L., Peter Schupp, and Marc Slattery. 2006. "The Distribution of Dimethylsulfoniopropionate in Tropical Pacific Coral Reef Invertebrates." *Coral Reefs* 25(3): 321–27.
- Apel, Klaus, and Heribert Hirt. 2004. "Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction." *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373–99.
- Arnold, Hayley E., Philip Kerrison, and Michael Steinke. 2013. "Interacting Effects of Ocean Acidification and Warming on Growth and DMS-Production in the Haptophyte Coccolithophore *Emiliana Huxleyi*." *Global Change Biology* 19(4): 1007–16.
- Balestri, Elena, Francesco Cinelli, Christopher E. Spiese, and Elvira A. Tatarkov. 2003. "Sexual Reproductive Success in *Posidonia Oceanica*." *Aquatic Botany* 75(1): 21–32.
- Bolin, B., and R.B. Cook. 1983. *The Major Biogeochemical Cycles and Their Interactions. Scope 21*. Mishawaka: John Wiley & Sons Ltd.
- Borges, A. V., and W. Champenois. 2015. "Seasonal and Spatial Variability of Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the Mediterranean Seagrass *Posidonia Oceanica*." *Aquatic Botany* 125: 72–79.

- Boudouresque, C.F. et al. 2006. *Préservation et Conservation Des Herbiers À Posidonia Oceanica*. Groupement. RAMOGE pub.
- Boudouresque, C.F., and A. Meinesz. 1982. "Cahier Du Parc National de Port Cros." In , 79.
- Broadbent, A. D., G. B. Jones, and R. J. Jones. 2002. "DMSP in Corals and Benthic Algae from the Great Barrier Reef." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55(4): 547–55.
- Butow, Barbara et al. 1998. "The Synergistic Effect of Carbon Concentration and High Temperature on Lipid Peroxidation in Peridinium Gatunense." *Journal of Plankton Research* 20(2): 355–69.
- Bywood, R., and F. Challenger. 1953. "The Evolution of Dimethyl Sulphide by Enteromorpha Intestinalis. Isolation of Dimethyl-Beta-Carboxyethyl Sulphonium Chloride from the Alga." *Biochemical Journal* 53(4): XXV–XL.
- Cantoni, G.L., and D.G. Anderson. 1956. "Enzymatic Cleavage of Dimethylpropiothetin by Polysiphonia Lanosa." *journal of biological chemistry* 222(1): 171–77.
- Celebi, B et al. 2006. "Hydrographic Indications to Understand the Absence of Posidonia Oceanica in the Levant Sea (Eastern Mediterranean)." *Biologia Marina Mediterranea* 13(4): 34–38.
- Challenger, F., and M. I. Simpson. 1948. "Studies on Biological Methylation. A Precursor of the Dimethyl Sulphide Evolved Bu Polysiphonia Fastigiata." *Journal of the Chemical Society* 3: 1591–97.
- Charlson, Robert J., James E. Lovelock, Meinrat O. Andreae, and Stephen G. Warren. 1987. "Oceanic Phytoplankton, Atmospheric Sulphur, Cloud Albedo and Climate." *Nature* 326: 655–61.
- Costanza, Robert et al. 1997. "The Value of the World ' S Ecosystem Services and Natural Capital." *Nature* 387: 253–60.
- D. Todd, Jonathan et al. 2007. "Structural and Regulatory Genes Required to Make the Gas Dimethyl Sulfide in Bacteria." *Science* 315: 666–69.
- Dacey, J. W H, G. M. King, and P. S. Lobel. 1994. "Herbivory by Reef Fishes and the Production of Dimethylsulfide and Acrylic Acid." *Marine Ecology Progress Series* 112(1–

2): 67–74.

- DeBose, Jennifer L., and Gabrielle A. Nevitt. 2007. "Investigating the Association between Pelagic Fish and Dimethylsulfonylpropionate in a Natural Coral Reef System." *Marine and Freshwater Research* 58(8): 720–24.
- Dell'Araccia, Gaia et al. 2014. "Olfactory Foraging in Temperate Waters: Sensitivity to Dimethylsulfide by Shearwaters in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea." *Journal of Experimental Biology* 217: 1701–9.
- Deschaseaux, E. S M et al. 2014. "Dimethylsulphoxide (DMSO) in Biological Samples: A Comparison of the TiCl_3 and NaBH_4 Reduction Methods Using Headspace Analysis." *Marine Chemistry* 164: 9–15.
- Diaz-Almela, Elena, Nuria Marbà, and Carlos M. Duarte. 2007. "Consequences of Mediterranean Warming Events in Seagrass (*Posidonia Oceanica*) Flowering Records." *Global Change Biology* 13(1): 224–35.
- Dickschat, Jeroen S., Patrick Rabe, and Christian A. Citron. 2015. "The Chemical Biology of Dimethylsulfonylpropionate." *Organic and Biomolecular Chemistry* 13: 1954–68.
- Dickson, D, and G Kirst. 1987. "Osmotic Adjustment in Marine Eukaryotic Algae: The Role of Inorganic Ions, Quaternary Ammonium, Tertiary Sulphonium and Carbohydrate Solutes. I. Diatoms and a Rhodophyte." *The New Phytologist* 106(4): 645–55.
- Diggelen, J. Van, J. Rozema, D.M.J. Dickson, and R. Broekman. 1986. "B-3-Dimethylsulfonylpropionate, Proline and Quaternary Ammonium Compounds in *Spartina Anglica* in Relation to Sodium Chloride, Nitrogen and Sulphur." *New Phytologist* 103: 573–86.
- Dring, Matthew J. 2005. "Stress Resistance and Disease Resistance in Seaweeds: The Role of Reactive Oxygen Metabolism." *Advances in Botanical Research* 43(5): 175–207.
- Dummermuth, A. L. et al. 2003. "Responses of Marine Macroalgae to Hydrogen-Peroxide Stress." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289(1): 103–21.
- Galindo, Virginie et al. 2016. "Contrasted Sensitivity of DMSP Production to High Light Exposure in Two Arctic under-Ice Blooms." *Journal of Experimental Marine Biology and*

Ecology 475: 38–48.

Gera, Alessandro et al. 2012. “Exploring the Utility of *Posidonia Oceanica* Chlorophyll Fluorescence as an Indicator of Water Quality within the European Water Framework Directive.” *Environmental Monitoring and Assessment* 184(6): 3675–86.

Gobert, Sylvie. 2002. These “Variations Spatiale et Temporelle de L’herbier À *Posidonia Oceanica*.” Université de Liège.

———. 2006. “Biology of *Posidonia*.” In *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, eds. Anthony W. D. Larkum, Robert J. Orth, and Carlos Duarte. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 387–408.

———. 2009. “Assessment of the Ecological Status of Mediterranean French Coastal Waters as Required by the Water Framework Directive Using the *Posidonia Oceanica* Rapid Easy Index: PREI.” *Marine Pollution Bulletin* 58(11): 1727–33.

———. 2016. “Temporal Evolution of Sand Corridors in a *Posidonia Oceanica* Seascape: A 15-Years Study.” *Mediterranean Marine Science* 13(3): 777–83.

Greene, Ronald C. 1962. “Biosynthesis of Dimethyl-B-Propiothetin.” *Journal of Biological Chemistry* 237(7): 2251–54.

De Groot, Rudolf S., Matthew A. Wilson, and Roelof M J Boumans. 2002. “A Typology for the Classification, Description and Valuation of Ecosystem Functions, Goods and Services.” *Ecological Economics* 41(3): 393–408.

Haas, P. 1935. “The Liberation of Methyl Sulphide by Seaweed .” *Biogeochemical Journal* 29: 1297–99.

Han, Taejun et al. 2008. “Physiological Responses of *Ulva Pertusa* and *U. Armoricana* to Copper Exposure.” *Aquatic Toxicology* 86(2): 176–84.

Hanson, A D, J Rivoal, L Paquet, and D A Gage. 1994. “Biosynthesis of 3-Dimethylsulfoniopropionate in *Wollastonia Biflora* (L.) DC. Evidence That S-Methylmethionine Is an Intermediate.” *Plant Physiology* 105(1): 103–10.

Hatton, Angela D. et al. 2012. “Metabolism of DMSP, DMS and DMSO by the Cultivable Bacterial Community Associated with the DMSP-Producing Dinoflagellate *Scrippsiella*

- Trochoidea." *Biogeochemistry* 110(1–3): 131–46.
- Hawkesford, Malcolm J, and Luit J. De Kok. 2007. *Sulfur in Plants*. annals of. eds. M.J. Hawksford and L.J. De Kok. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Hopkins, F. E. 2003. *Physiologie Végétale*. Bruxelles: De Boeck.
- Husband, J Daniel, and Ronald P Kiene. 2007. "Occurrence of Dimethylsulfoxide in Leaves, Stems, and Roots of *Spartina Alterniflora*." *Wetlands* 27(2): 224–29.
- Husband, Joseph D., Ronald P. Kiene, and Timothy D. Sherman. 2012. "Oxidation of Dimethylsulfonylpropionate (DMSP) in Response to Oxidative Stress in *Spartina Alterniflora* and Protection of a Non-DMSP Producing Grass by Exogenous DMSP+acrylate." *Environmental and Experimental Botany* 79: 44–48.
- James, F et al. 1995. "Evidence Implicating Dimethylsulfonylpropionaldehyde as an Intermediate in Dimethylsulfonylpropionate Biosynthesis." *Plant physiology* 108: 1439–48.
- Jones, Graham B., Esther Fischer, Elisabeth S M Deschaseaux, and Peter L. Harrison. 2014. "The Effect of Coral Bleaching on the Cellular Concentration of Dimethylsulphonylpropionate in Reef Corals." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 460: 19–31.
- Karsten, U., G. O. Kirst, and C. Wiencke. 1992. "Dimethylsulphonylpropionate (DMSP) Accumulation in Green Macroalgae from Polar to Temperate Regions: Interactive Effects of Light versus Salinity and Light versus Temperature." *Polar Biology* 12(6–7): 603–7.
- Kasai, Atsushi, Shuichi Yano, and Akio Takafuji. 2005. "Prey-Predator Mutualism in a Tritrophic System on a Camphor Tree." *Ecological Research* 20(2): 163–66.
- Keller, M.D., R.P. Kiene, G.O. Kirst, and P.T. Visscher. 1996. *Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds*. eds. M.D. Keller, R.P. Kiene, G.O. Kirst, and P.T. Visscher. Springer US.
- Keller, Maureen D. 1989. "Dimethyl Sulfide Production and Marine Phytoplankton: The Importance of Species Composition and Cell Size." *Biological Oceanography* 6(5–6): 375–82.

- Kiehn, Whitney M., and James T. Morris. 2010. "Variability in Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) Concentrations in *Spartina Alterniflora* and the Effect on *Littoraria Irrorata*." *Marine Ecology Progress Series* 406: 47–55.
- Kiene, R. P., L. J. Linn, and J. A. Bruton. 2000. "New and Important Roles for DMSP in Marine Microbial Communities." *Journal of Sea Research* 43(3–4): 209–24.
- Kirst, G.O. et al. 1991. "Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in Icealgae and Its Possible Biological Role." *Marine Chemistry* 35(1–4): 381–88.
- Lassauque, J. 2009. "Ecophysiological Early Bio-Indicators of Anthropic-Induced Stress on *Posidonia Oceanica* Meadows."
- Levasseur, M et al. 1994. "Oceanographic Basis of a DMS-Related Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) Fishery Problem: Blackberry Feed." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51(4): 881–89.
- Li, Lei, Xiaoping Huang, Devajit Borthakur, and Hui Ni. 2012. "Photosynthetic Activity and Antioxidative Response of Seagrass *Thalassia Hemprichii* to Trace Metal Stress." *Acta Oceanologica Sinica* 31(3): 98–108.
- Llagostera, Izaskun et al. 2016. "Effects of Copper Exposure on Photosynthesis and Growth of the Seagrass *Cymodocea Nodosa* : An Experimental Assessment." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 97(3): 374–79.
- Lopez Y Royo, C. et al. 2011. "The Seagrass *Posidonia Oceanica* as Indicator of Coastal Water Quality: Experimental Intercalibration of Classification Systems." *Ecological Indicators* 11(2): 557–63.
- de los Santos, Carmen B. et al. 2016. "Ontogenic Variation and Effect of Collection Procedure on Leaf Biomechanical Properties of Mediterranean Seagrass *Posidonia Oceanica* (L.) Delile." *Marine Ecology* 37(4): 750–59.
- Marín-Guirao, Lázaro, José M. Sandoval-Gil, Juan M. Ruíz, and José L. Sánchez-Lizaso. 2011. "Photosynthesis, Growth and Survival of the Mediterranean Seagrass *Posidonia Oceanica* in Response to Simulated Salinity Increases in a Laboratory Mesocosm System." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92(2): 286–96.

- McFarlin, Caroline R., and Merryl Alber. 2013. "Foliar DMSO:DMSP Ratio and Metal Content as Indicators of Stress in *Spartina Alterniflora*." *Marine Ecology Progress Series* 474: 1–13.
- Meinesz, A. et al. 2009. "Posidonia Oceanica in the Marmara Sea." *Aquatic Botany* 90(1): 18–22.
- Montefalcone, M. et al. 2013. "Flowering of the Seagrass *Posidonia Oceanica* in the NW Mediterranean: Is There a Link with Solar Activity?" *Mediterranean Marine Science* 14(2): 416–23.
- Montefalcone, Monica. 2009. "Ecosystem Health Assessment Using the Mediterranean Seagrass *Posidonia Oceanica*: A Review." *Ecological Indicators* 9(4): 595–604.
- Morillo, J., and J. Usero. 2008. "Trace Metal Bioavailability in the Waters of Two Different Habitats in Spain: Huelva Estuary and Algeciras Bay." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(3): 851–59.
- Mtwana Nordlund, Lina, Evamaria W. Koch, Edward B. Barbier, and Joel C. Creed. 2016. "Seagrass Ecosystem Services and Their Variability across Genera and Geographical Regions." *PLoS ONE* 11(10): 1–23.
- Otte, Marinus L., and James T. Morris. 1994. "Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) in *Spartina Alterniflora* Loisel." *Aquatic Botany* 48(3–4): 239–59.
- Otte, Marinus L., Graham Wilson, James T. Morris, and Bridget M. Moran. 2004. "Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) and Related Compounds in Higher Plants." *Journal of Experimental Botany* 55(404): 1919–25.
- Papathanasiou, Vasillis, Sotiris Orfanidis, and Murray T. Brown. 2015. "Intra-Specific Responses of *Cymodocea Nodosa* to Macro-Nutrient, Irradiance and Copper Exposure." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 469(March 2016): 113–22.
- Papenbrock, Jutta. 2012. "Highlights in Seagrasses Phylogeny, Physiology, and Metabolism: What Makes Them Special?" *International Scholarly Research Network Botany 2012*: 1–15.
- Paquet, L. et al. 1994. "Accumulation of the Compatible Solute 3-

- Dimethylsulfoniopropionate in Sugarcane and Its Relatives, but Not Other Gramineous Crops." *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 37–48.
- Personnic, Sebastien et al. 2014. "An Ecosystem-Based Approach to Assess the Status of a Mediterranean Ecosystem, the Posidonia Oceanica Seagrass Meadow." *PLoS ONE* 9(6).
- Prange, J. A., and W. C. Dennison. 2000. "Physiological Responses of Five Seagrass Species to Trace Metals." *Marine Pollution Bulletin* 41(7–12): 327–36.
- Raina, Jean-Baptiste et al. 2013. "DMSP Biosynthesis by an Animal and Its Role in Coral Thermal Stress Response." *Nature* 502(7473).
- Ralph, P. J., and M. D. Burchett. 1998. "Photosynthetic Response of Halophila Ovalis to Heavy Metal Stress." *Environmental Pollution* 103(1): 91–101.
- Ralph, Peter J., and Rolf Gademann. 2005. "Rapid Light Curves: A Powerful Tool to Assess Photosynthetic Activity." *Aquatic Botany* 82(3): 222–37.
- Richir, J. 2012. Laboratory of Oceanology "Coastal Pollution of the Mediterranean and Extension of Its Biomonitoring to Trace Elements of Emerging Concern." University of Liège.
- Richir, J. et al. 2013. "Experimental in Situ Exposure of the Seagrass Posidonia Oceanica (L.) Delile to 15 Trace Elements." *Aquatic Toxicology* 140–141: 157–73.
- Richir, J., and S. Gobert. 2014. "A Reassessment of the Use of Posidonia Oceanica and Mytilus Galloprovincialis to Biomonitor the Coastal Pollution of Trace Elements: New Tools and Tips." *Marine Pollution Bulletin* 89(1–2): 390–406.
- . 2016. "Trace Elements in Marine Environments: Occurrence, Threats and Monitoring with Special Focus on the Coastal Mediterranean." *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 6(1): 1–19.
- Richir, J., M. Salivas-Decaux, and C. Lafabrie. 2015. "Bioassessment of Trace Element Contamination of Mediterranean Coastal Waters Using the Seagrass Posidonia Oceanica." *Journal of Environmental Management* 151: 486–99.
- Ross, Cliff, and Kathryn L Van Alstyne. 2007. "Intraspecific Variation in Stress-Induced Hydrogen Peroxide Scavenging by the Ulvoid Macroalga Ulva Lactuca." *Journal of*

Phycology 43(3): 466–74.

- Savoca, Matthew S., and Gabrielle A. Nevitt. 2014. "Evidence That Dimethyl Sulfide Facilitates a Tritrophic Mutualism between Marine Primary Producers and Top Predators." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(11): 4157–61.
- Sieburth, John. 1961. "Antibiotic Properties of Acrylic Acid, a Factor in the Gastrointestinal Antibiosis of Polar Marine Animals." *Journal of Bacteriology* 82(1): 72–79.
- Sieg, R. Drew, and Julia Kubanek. 2013. "Chemical Ecology of Marine Angiosperms: Opportunities at the Interface of Marine and Terrestrial Systems." *Journal of Chemical Ecology* 39(6): 687–711.
- Silva, João, Yoni Sharon, Rui Santos, and Sven Beer. 2009. "Measuring Seagrass Photosynthesis: Methods and Applications." *Aquatic Biology* 7(1–2): 127–41.
- Simó, Rafel. 2001. "Production of Atmospheric Sulfur by Oceanic Plankton: Biogeochemical, Ecological and Evolutionary Links." *Trends in Ecology and Evolution* 16(6): 287–94.
- Simo, Rafel, and Maria Vila-Costa. 2006. "Ubiquity of Algal Dimethylsulfoxide in the Surface Ocean: Geographic and Temporal Distribution Patterns." *Marine Chemistry* 100(1–2): 136–46.
- Stefels, J. 2000. "Physiological Aspects of the Production and Conversion of DMSP in Marine Algae and Higher Plants." *Journal of Sea Research* 43(3–4): 183–97.
- Strom, Suzanne et al. 2003. "Chemical Defense in the Microplankton II: Inhibition of Protist Feeding by SS-Dimethylsulfoniopropionate(DMS)." *Limnology and Oceanography* 48(1): 230–37.
- Sunda, W, D J Kieber, R P Kiene, and S Huntsman. 2002. "An Antioxidant Function for DMSP and DMS in Marine Algae." *Nature* 418(6895): 317–20.
- Telesca, Luca et al. 2015. "Seagrass Meadows (*Posidonia Oceanica*) Distribution and Trajectories of Change." *Scientific reports* 5: 1–14.
- Timothy S. Bates, Robert J. Charlson, and Richard H. Gammon. 1987. "Evidence for the Climatic Role of Marine Biogenic Sulphur." *Nature* 330: 74–77.

- Tomasello, Agostino et al. 2009. "Seagrass Meadows at the Extreme of Environmental Tolerance: The Case of *Posidonia Oceanica* in a Semi-Enclosed Coastal Lagoon." *Marine Ecology* 30(3): 288–300.
- Turner, Suzanne M., Philip D. Nightingale, W. Broadgate, and Peter S. Liss. 1995. "The Distribution of Dimethyl Sulphide and Dimethylsulfoniopropionate in Antarctic Waters and Sea Ice." *Deep-Sea Research II* 42(4–5): 1059–80.
- Yruela, Inmaculada. 2005. "Copper in Plants." *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1): 145–56.
- Zhang, Hao., and William Davison. 1995. "Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution." *Analytical Chemistry* 67(19): 3391–3400.

Annexe B :

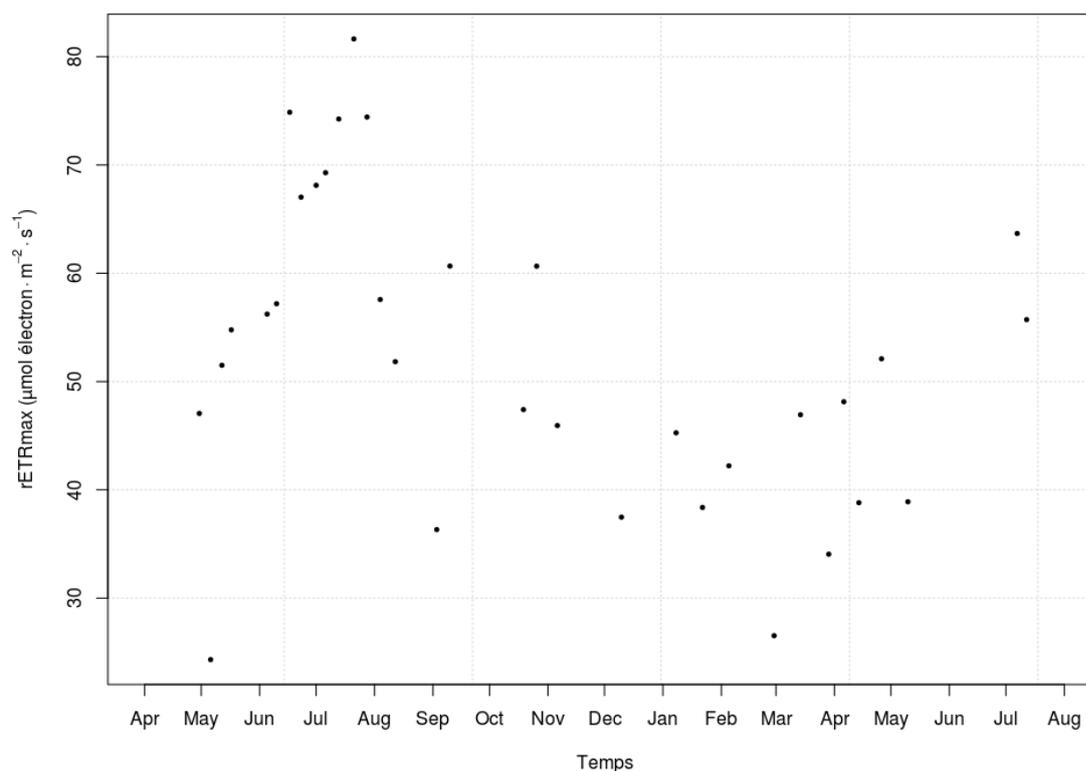
Tableau récapitulatif des analyses destructives et non destructives de routines les plus employé sur *Posidonia oceanica* (Monica Montefalcone 2009).

Table 1 – The analyses on *Posidonia oceanica* most routinely employed by the Mediterranean research laboratories, separated in destructive and not destructive techniques.

Destructive techniques	Not destructive techniques
<p>Epiphytic assemblages of leaves and rhizomes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Quantitative analysis of biomass (Buia et al., 2004) and coverage (Morri, 1991) • Qualitative analysis of specie composition (Balata et al., 2007) <p>Leaf biometry and related descriptors (Giraud, 1977):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Type of leaves (adult, intermediate or juvenile) • Number of leaves per shoot • Length and width of leaves • Leaf surface area per shoot and per square metre (the latter defined as the "Leaf Area Index") • Presence of dead brown tissue • Percentage of broken leaves (Coefficient A) and the cause of their damage (water movement or grazing), referring to the protocol of Boudouresque and Meinesz (1982) <p>Indirect estimation of the past primary production of leaves and rhizomes, throughout:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lepidochronology (Pergent, 1990) • Internodal length (Peirano, 2002) • Plastochrone interval (Cebrian et al., 1994) 	<p>Shoot density (number of shoots per square metre) and its classification following the absolute scales by Giraud (1977) and by Pergent et al. (1995)</p> <p>Upper and lower limits of the meadow:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bathymetric position of limits • Typology of the lower limit, according to Meinesz and Laurent (1978) and to Pergent et al. (1995) • Monitoring the position of limits over time, throughout fixed marks ("balise"), in situ photographs, aerial diachronic photographs (Pergent-Martini et al., 2005) <p>Structure of the matte:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Presence of intermatte channels and of dead matte • Measuring the baring of the rhizomes as defined by Boudouresque et al. (2006) • Evaluating the homogeneity and the compactness of the matte and measuring the percentage of plagiotropic rhizomes and the thickness of the matte (Pergent-Martini et al., 2005) <p>Percentage of bottom covered by living <i>P. oceanica</i> (see also Table 2)</p> <p>Relative shoot density (number of shoots per square metre multiplied for the cover of living <i>P. oceanica</i>) (Romero, 1986)</p> <p>Mobile fauna associated to the meadow and the presence of other macrophytes (Pergent-Martini et al., 2005)</p>

Annexe C :

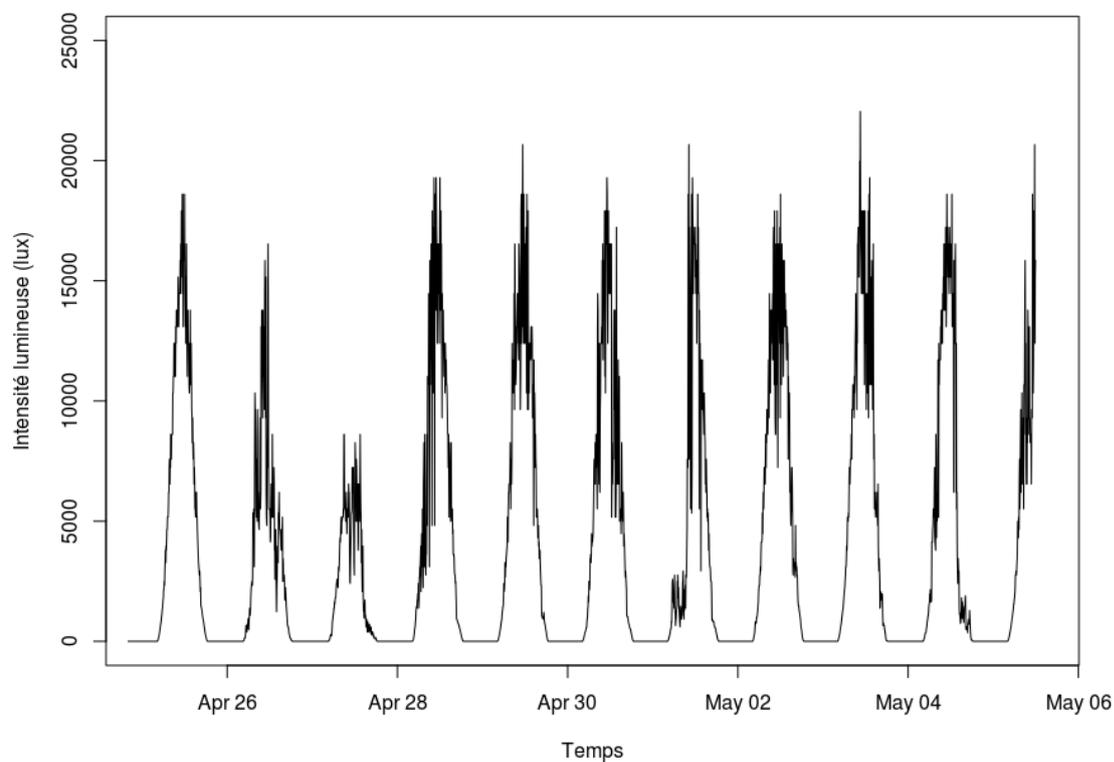
Cycle saisonnier naturel du taux de transfert maximal sur des faisceaux de *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813) dans la canopée de l'herbier de la baie de Calvi (Corse, France) à 10 m de profondeur au cours du temps.



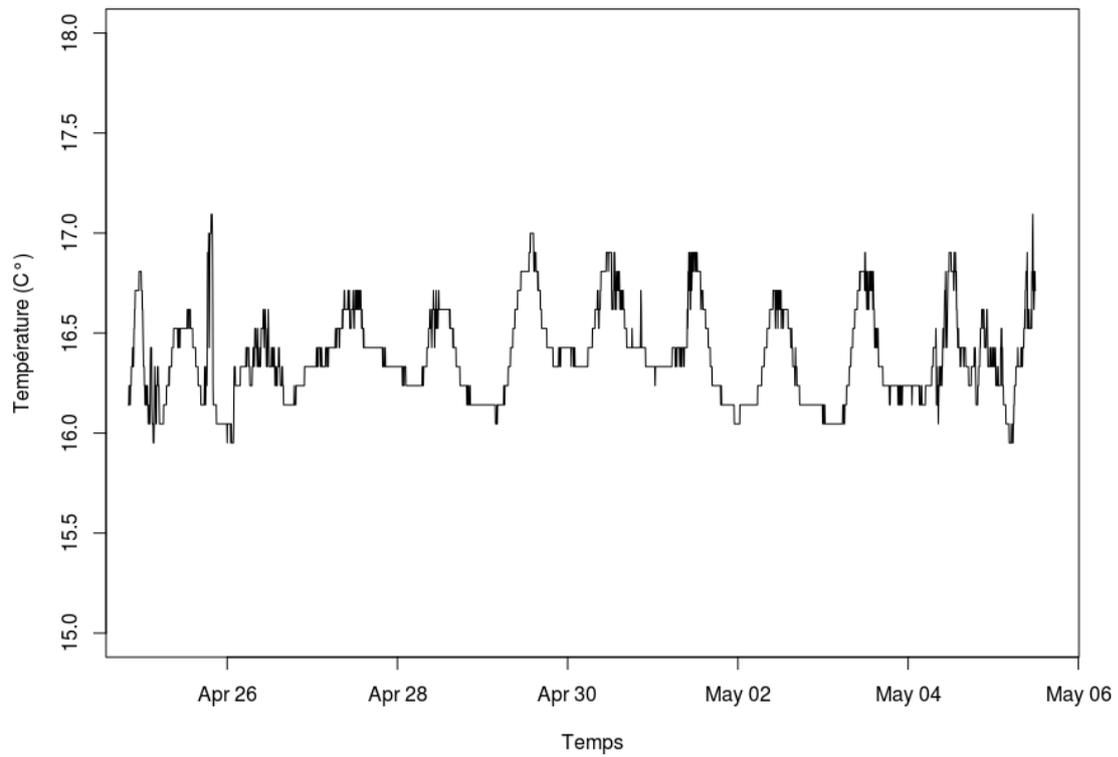
*Annexe C-1 : Variation du taux de transfert d'électron maximal relatif (rETRmax, μmol d'électron.m⁻².s⁻¹), mesurée de façon hebdomadaire à bimensuelle et calculée à partir des mesures de RLC au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* avec un Diving-Pam à 10 m de profondeur au cours du temps (n=10, mesure prises verticalement par rapport à la surface).*

Annexe D :

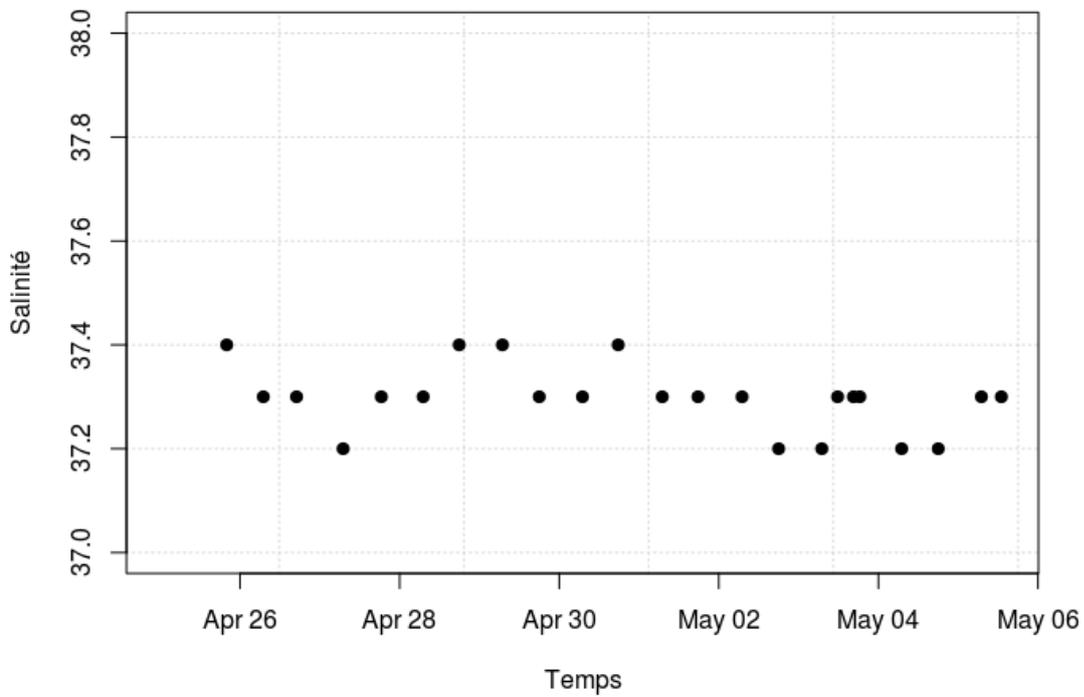
Evolution des paramètres physicochimiques de profondeur dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10 m de profondeur entre le 25 avril 2017 et le 5 mai 2017.



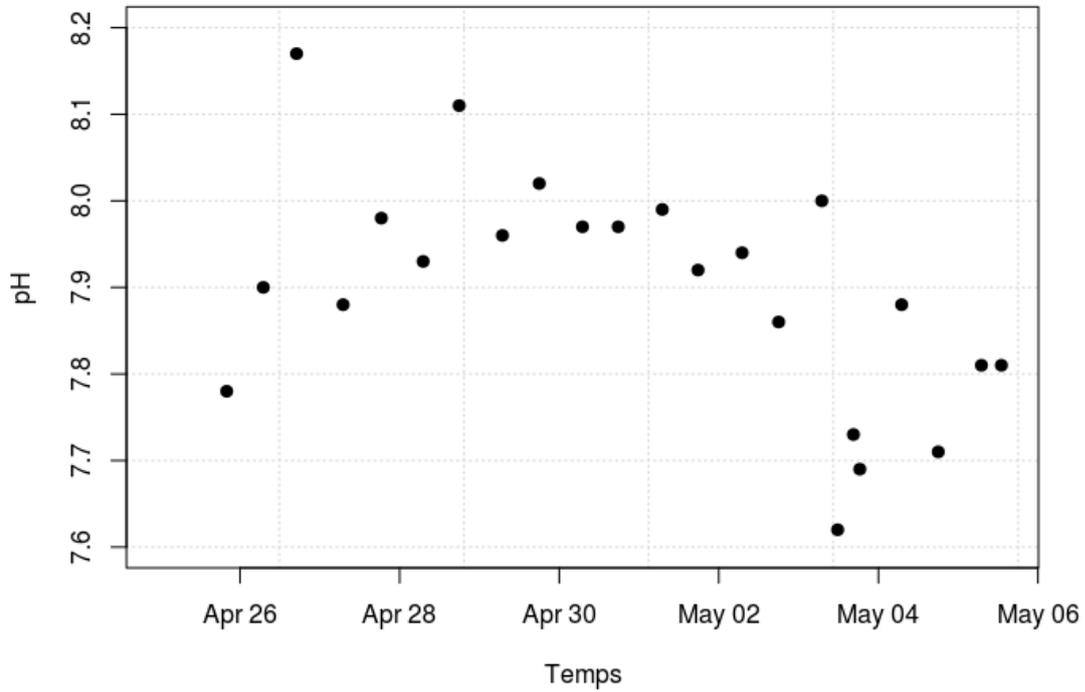
Annexe D-1 : Evolution de l'intensité lumineuse (lx) dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10m de profondeur du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



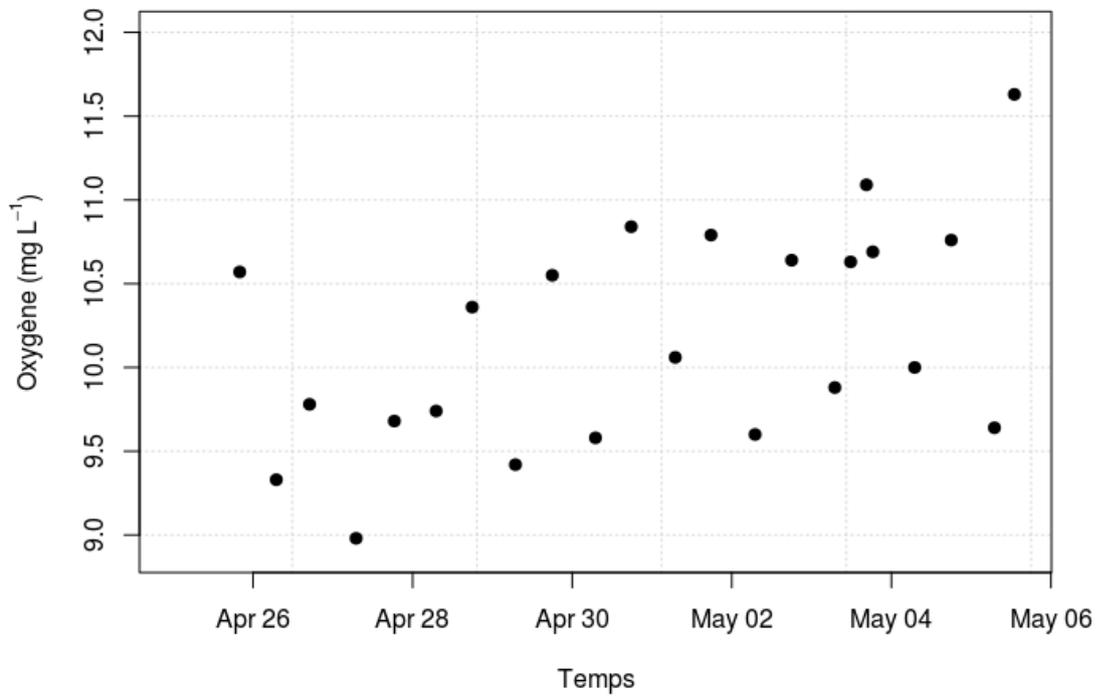
Annexe D-2 : Evolution de la température (C°) dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10m de profondeur du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



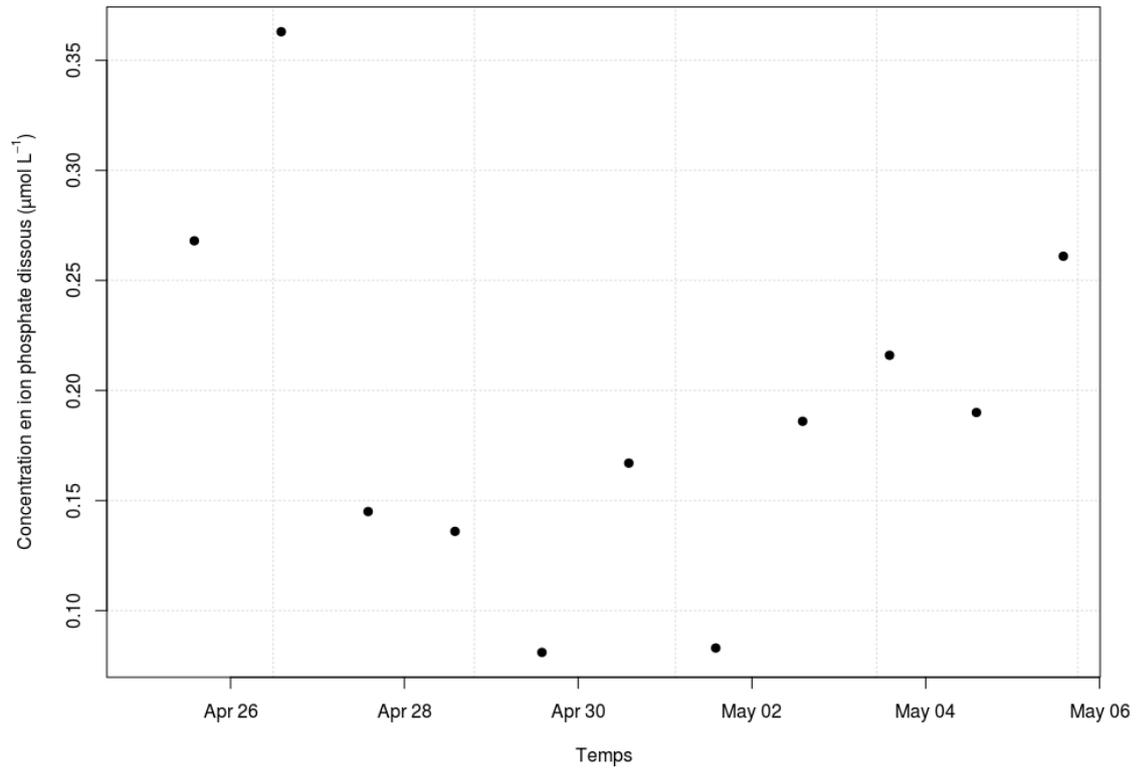
Annexe D-3 : Evolution de la salinité (PSU) dans la baie de Calvi (Corse, France) en sub-surface du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



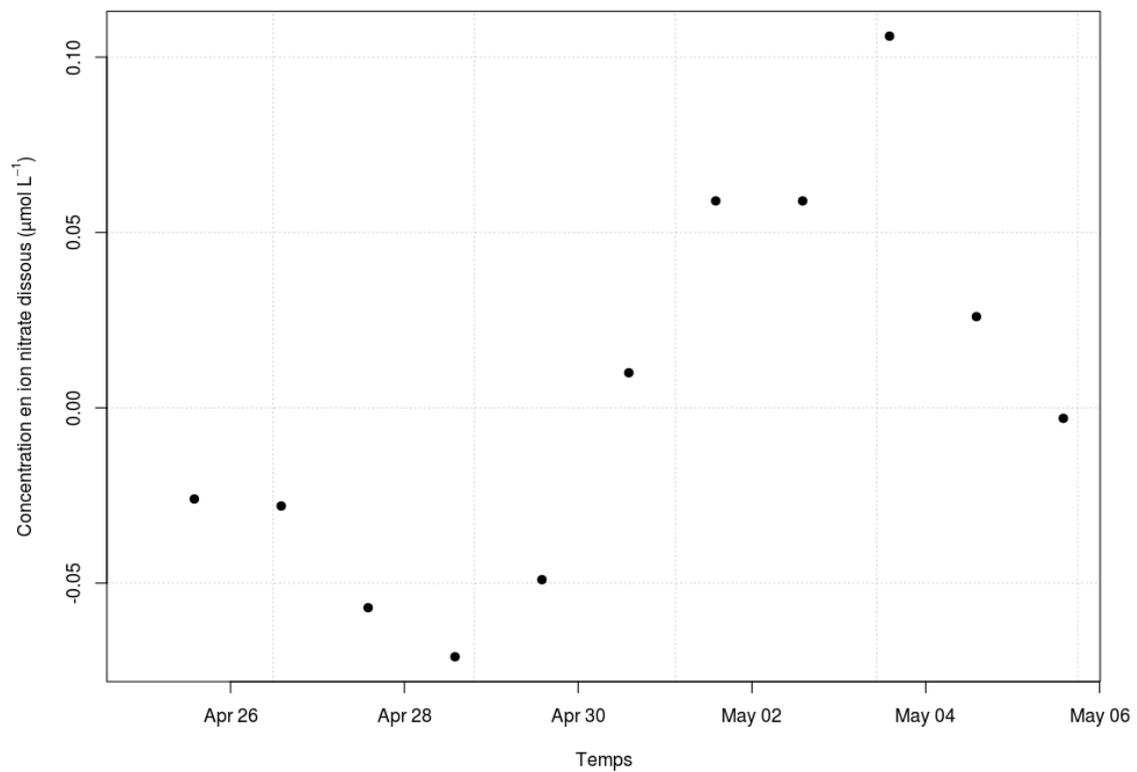
Annexe D-4 : Evolution du pH dans la baie de Calvi (Corse, France) en sub-surface du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



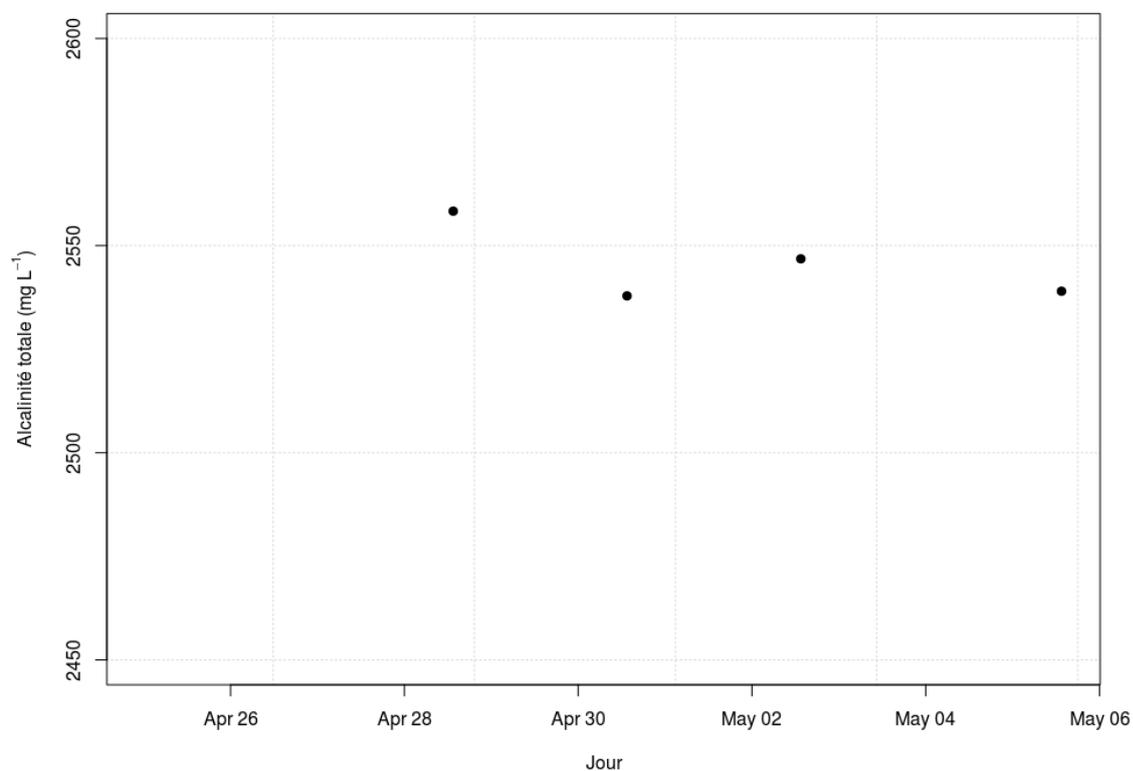
Annexe D-5 : Evolution de l'oxygène dissous (mgL⁻¹) dans la baie de Calvi (Corse, France) en sub-surface du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



Annexe D-6 : Evolution de la concentration en PO_4^{3-} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10m de profondeur du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



Annexe D-7 : Evolution de la concentration en NO_3^{2-} (μmolL^{-1}) dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10m de profondeur du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



Annexe D-8 : Evolution de l'alcalinité totale (mgL^{-1}) dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10m de profondeur du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.

Annexe E :

Comparaison des données métriques de l'herbier à 10m au centre de l'herbier et à 12m en bordure de ce dernier dans la baie de Calvi (Corse, France) entre le 25 avril 2017 et le 5 mai 2017.

Annexe E-1 : Densité totale, des faisceaux orthotropes et plagiotrope (nombre.m⁻²) de faisceaux de Posidonia oceanica (L.) Delile (1813) dans l'herbier en bordure du port de STARESO à 10m et 12m de profondeur dans la baie de Calvi (France, Corse).

Densité	10m			12m		
	Total (n=65)	Orthotrope (n=13)	Plagiotrope (n=13)	Total (n=27)	Orthotrope (n=27)	Plagiotrope (n=27)
Minimum	90	50	0	180	10	30
1 ^{er} quartile	310	150	20	315	165	65
Médiane	370	220	40	380	250	130
Moyenne	385.2	243.8	80.77	370	244.1	125.9
3 ^{ème} quartile	450	270	90	440	325	170
Maximum	710	700	300	550	400	290

Annexe E-2 : Nombre de feuilles, longueur maximale, poids secs des faisceaux et des épiphytes, coefficient A et indice foliaire de faisceaux de Posidonia oceanica (L.) Delile (1813) dans l'herbier en bordure du port de STARESO à 10m de profondeur dans la baie de Calvi (France, Corse).

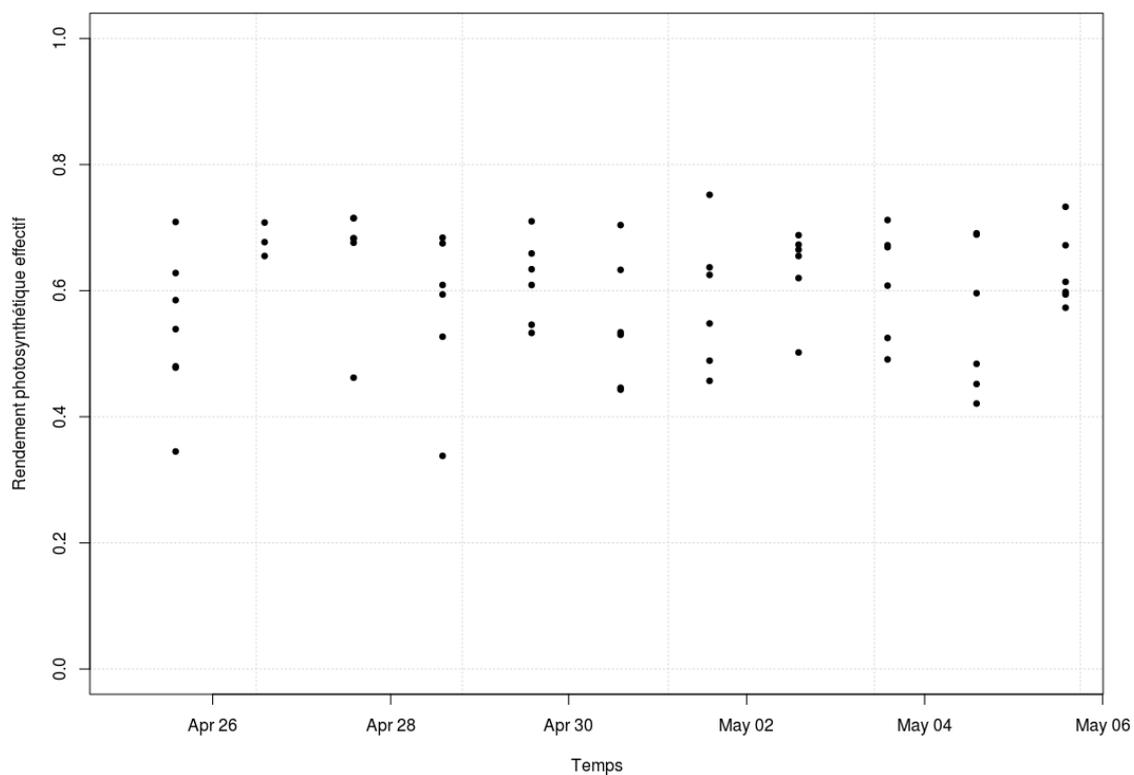
10m	Nombre de feuilles	Longueur maximal	Poids secs faisceaux	Poids secs épiphytes	Coefficient A	Indice foliaire
Minimum	4	66.0	2.925	2.090	16.67	10.85
1 ^{er} quartile	6	78.7	3.091	2.106	16.67	11.24
Médiane	6	85.0	3.167	2.165	29.17	12.78
Moyenne	6	82.5	3.207	2.154	29.40	12.84
3 ^{ème} quartile	6	88.1	3.316	2.180	40.48	13.83
Maximum	6	94.4	3.634	2.241	50.00	15.88

Annexe E-3 : Nombre de feuilles, longueur maximale, poids secs des faisceaux et des épiphytes, coefficient A et indice foliaire de faisceaux de Posidonia oceanica (L.) Delile (1813) dans l'herbier en bordure du port de STARESO à 10m de profondeur dans la baie de Calvi (France, Corse).

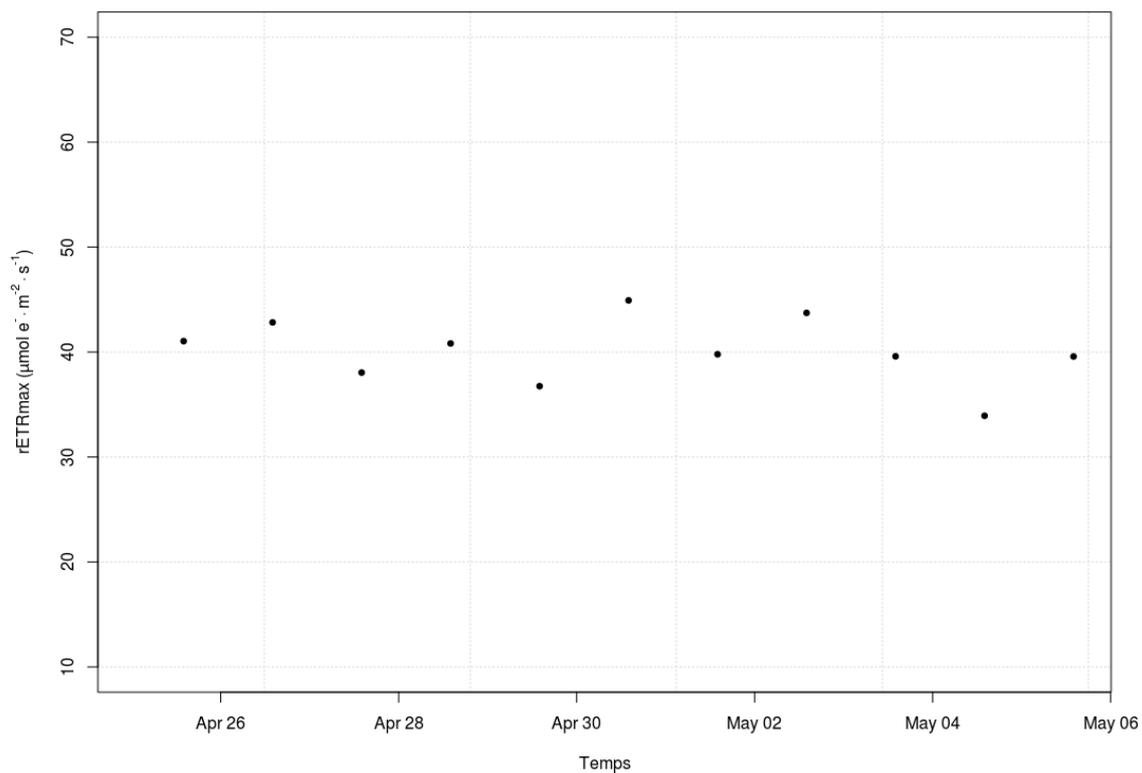
12m	Nombre de feuilles	Longueur maximal	Poids secs faisceaux	Poids secs épiphytes	Coefficient A	Indice foliaire
Minimum	5	37.6	2.721	1.290	0.00	4.89
1 ^{er} quartile	6	42.7	2.876	1.337	22.14	5.42
Médiane	6	50.9	3.295	1.398	50.00	8.45
Moyenne	6.6	51.6	3.156	1.398	38.71	8.24
3 ^{ème} quartile	7	58.1	3.389	1.447	55.36	10.75
Maximum	10	73.4	3.450	1.519	60.00	12.13

Annexe F :

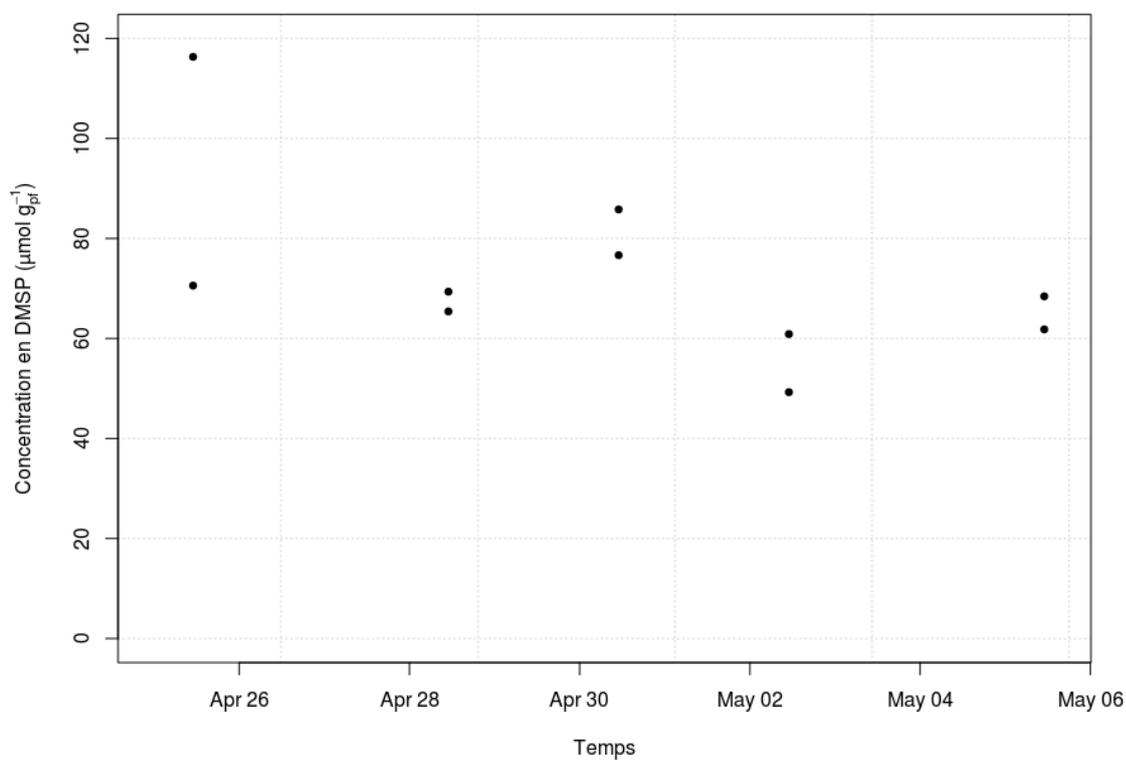
Evolution des paramètres biologiques établis sur les 3^{ème} feuilles de faisceaux de *Posidonia oceanica* de l'herbier en bordure du port de STARESO dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10 m de profondeur entre le 25 avril 2017 et le 5 mai 2017.



Annexe F-1 : Evolution du rendement photosynthétique effectif mesuré au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* avec un Diving-PAM dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10m de profondeur du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.

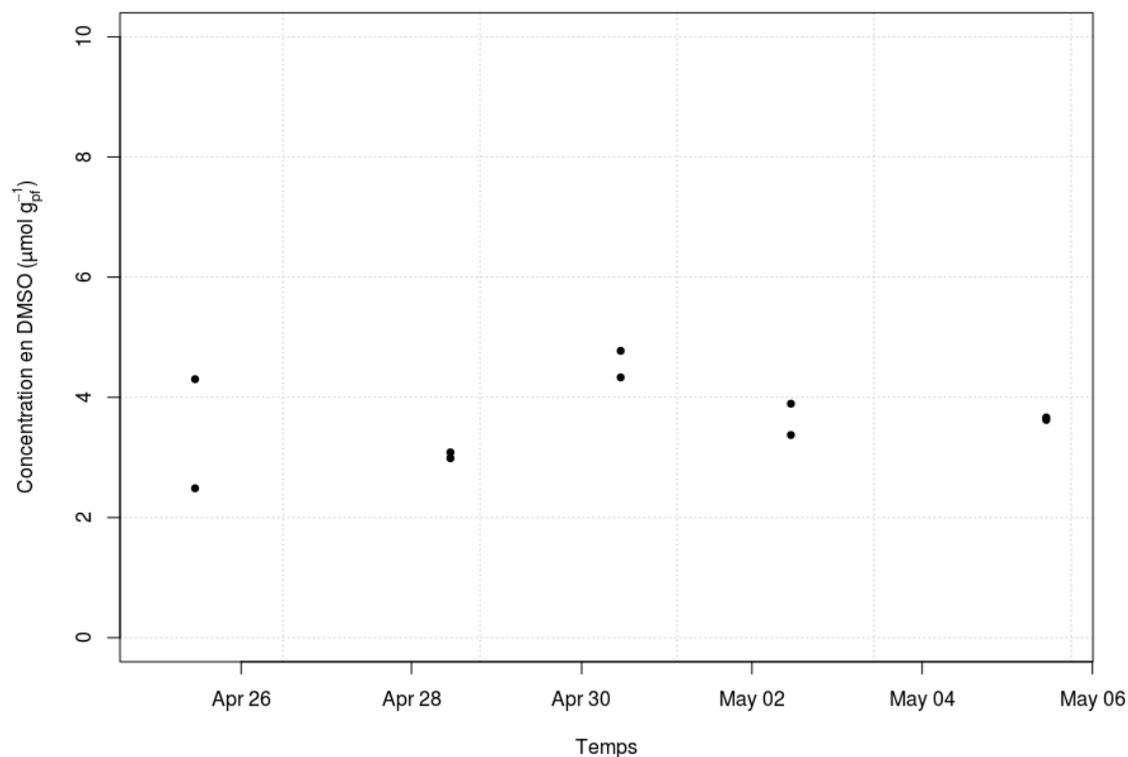


Annexe F-2 : Evolution du taux de transfert maximal ($\mu\text{mol d'électron} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) mesuré au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, avec un Diving-PAM dans la baie de Calvi (Corse, France) à 10m de profondeur du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.

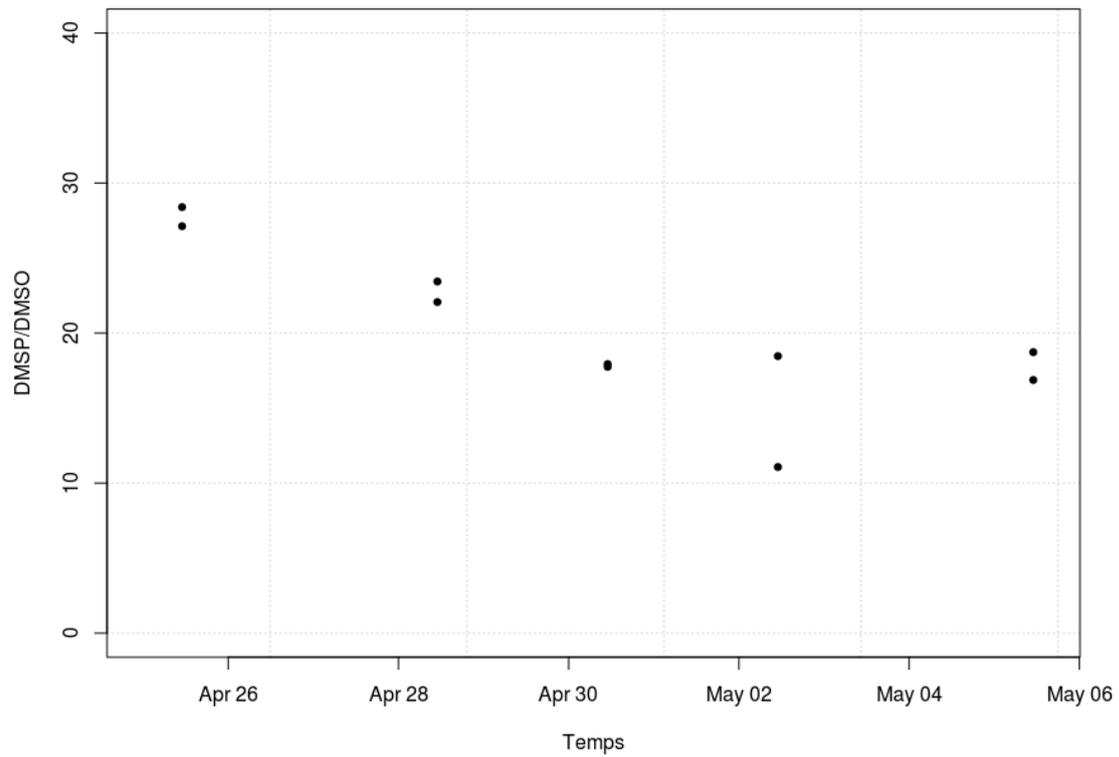


Annexe F-3 : Evolution de la concentration en DMSP ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) dans les 20 premiers cm de la partie basale de

la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes (n=2), prélevée à 10 m de profondeur dans l'herbier de la baie de Calvi (Corse, France) du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



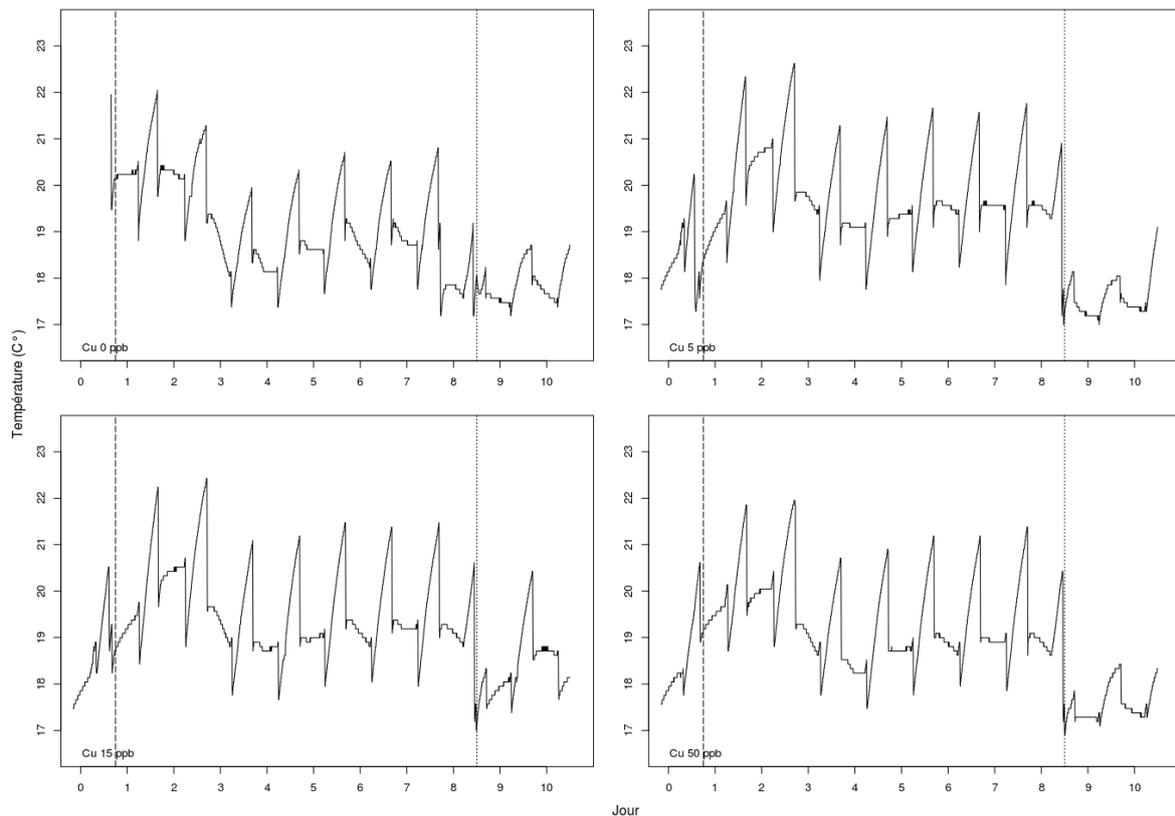
Annexe F-4 : Evolution de la concentration en DMSO (µmol.g⁻¹) dans les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes (n=2), prélevée à 10 m de profondeur dans l'herbier de la baie de Calvi (Corse, France) du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.



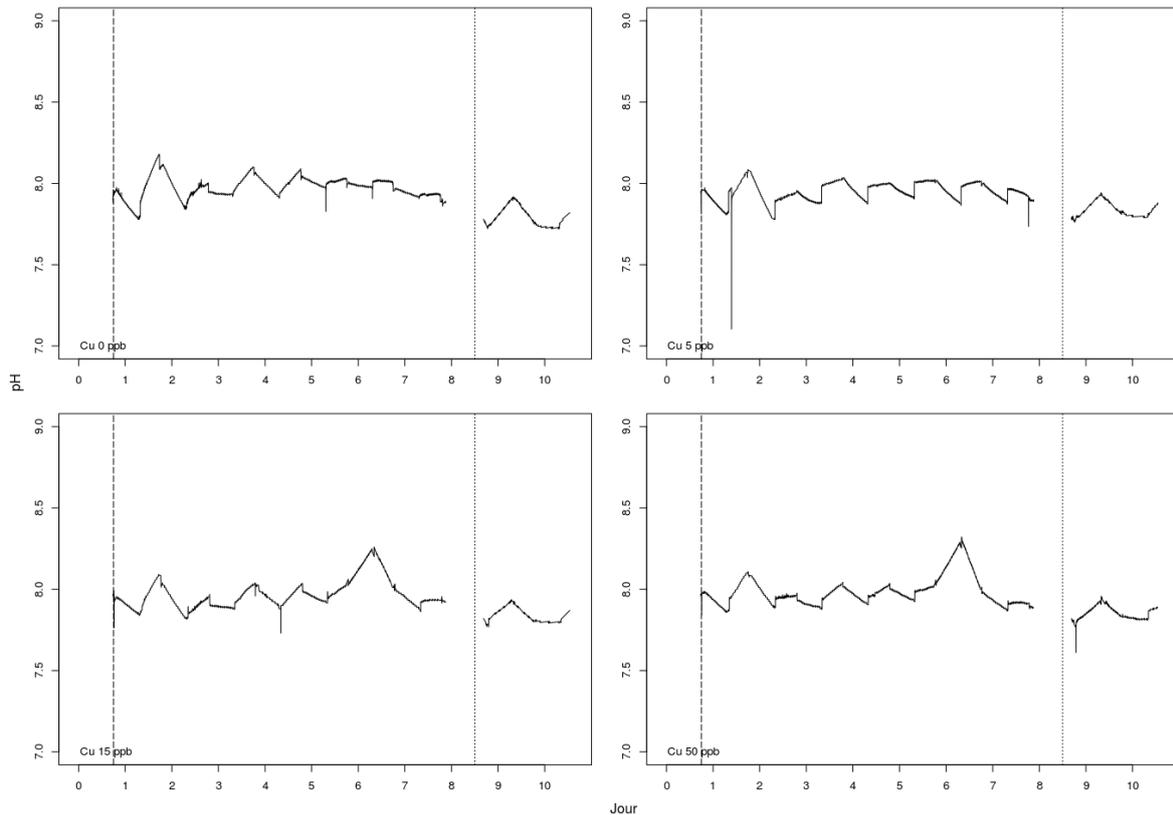
*Annexe F-5 : Evolution du rapport des concentrations en DMSP sur celles en DMSO dans les 20 premiers cm de la partie basale de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica*, nettoyées de leurs épiphytes (n=2), prélevée à 10 m de profondeur dans l'herbier de la baie de Calvi (Corse, France) du 25 avril 2017 au 5 mai 2017.*

Annexe G :

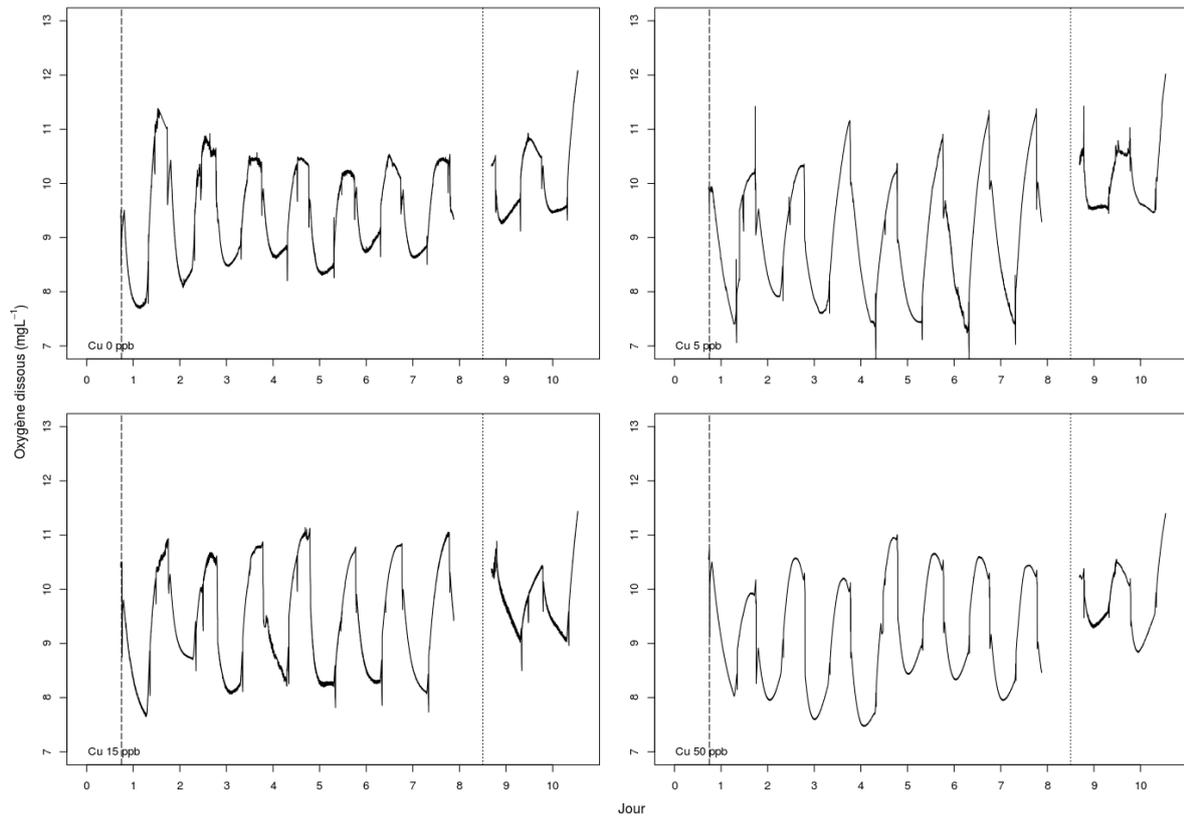
Evolution des paramètres physicochimiques dans les aquariums exposés à différentes concentrations de cuivre : 0, 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Durant la phase de contamination, l'eau de ces derniers est partiellement renouvelé, deux fois par jour (7:00-18:00 (GMT+2)) suivi de l'ajout d'une solution de cuivre. Durant la phase de récupération, les deux renouvellements d'eau sont maintenus et un renouvellement d'eau en continu (100 L/h) est également utilisé.



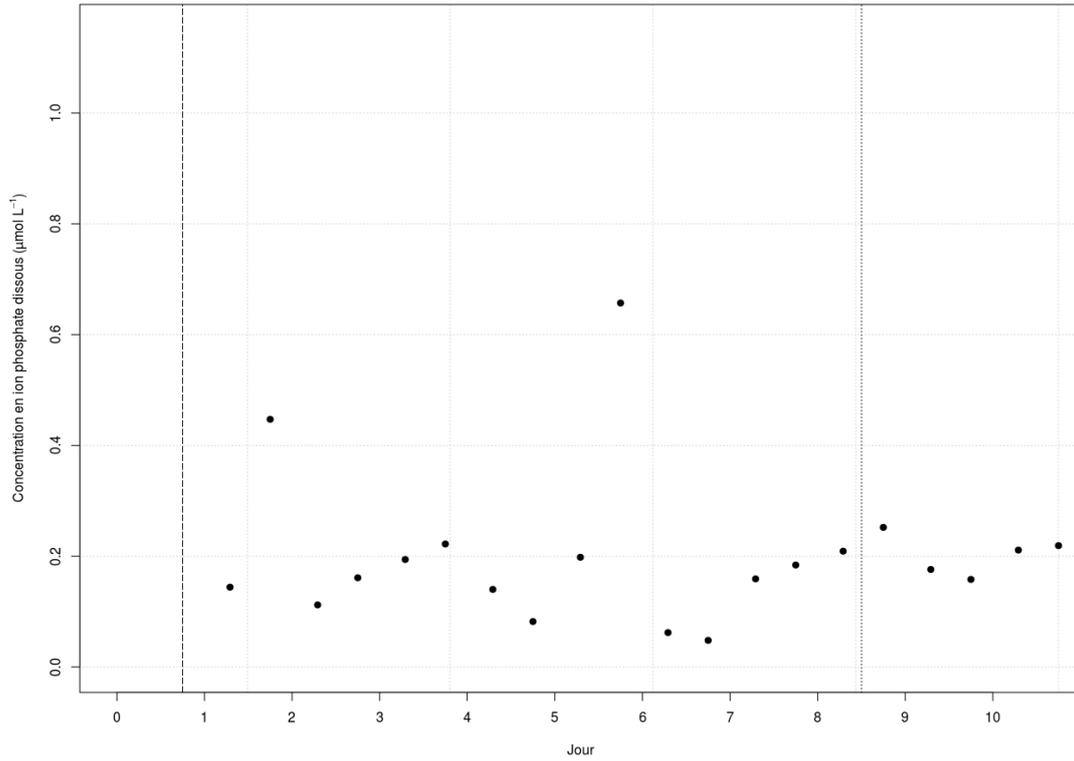
Annexe G-1 : Variation de la température (C°) mesurée en continu dans les aquariums contenant des faisceaux de Posidonia oceanica maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillée représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération avec la mise en renouvellement continu (100L.h⁻¹).



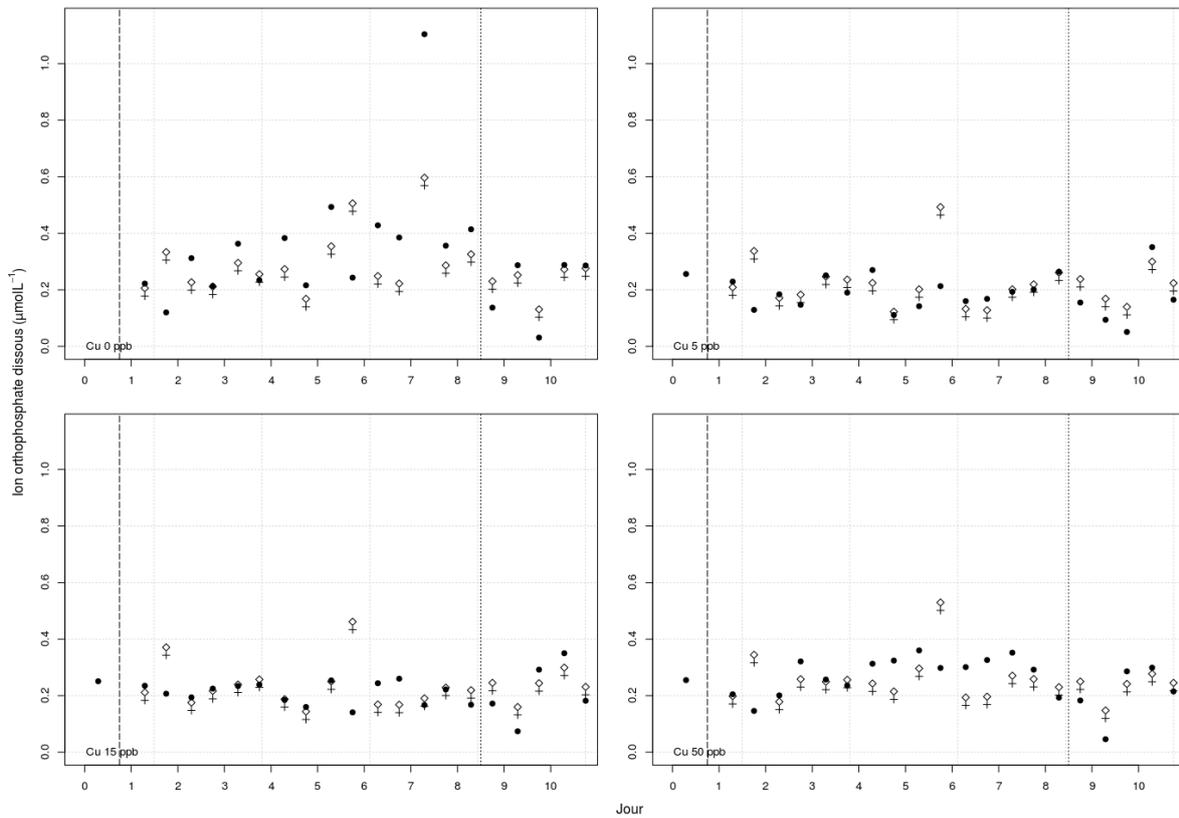
*Annexe G-2 : Variation du pH mesuré en continu dans les aquariums contenant des faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillée représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération avec la mise en renouvellement continu ($100\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$).*



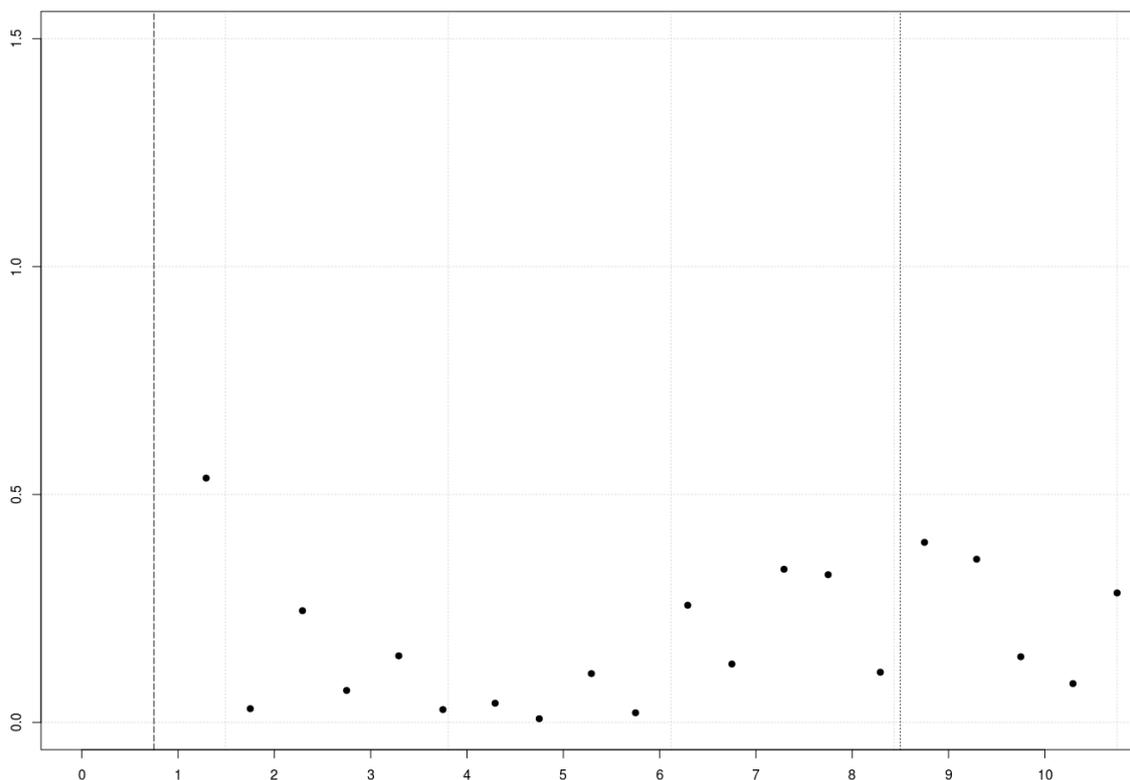
*Annexe G-3 : Variation de l'oxygène dissous (mg.L^{-1}) mesuré en continu dans les aquariums contenant des faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillée représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération avec la mise en renouvellement continu (100L.h^{-1}).*



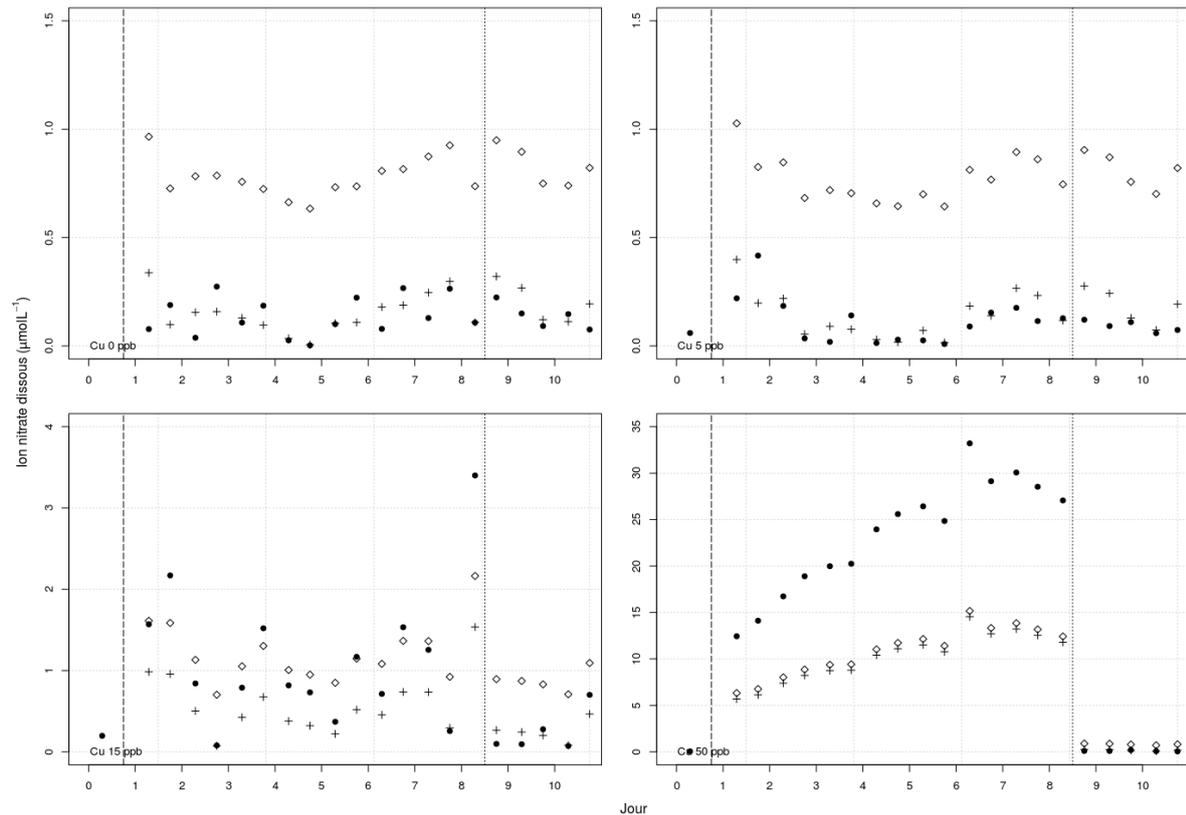
Annexe G-4 : Variation de la concentration en NO_3^- (μmolL^{-1}) dans l'eau de renouvellement des aquariums. La ligne en tiret représente le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase récupération.



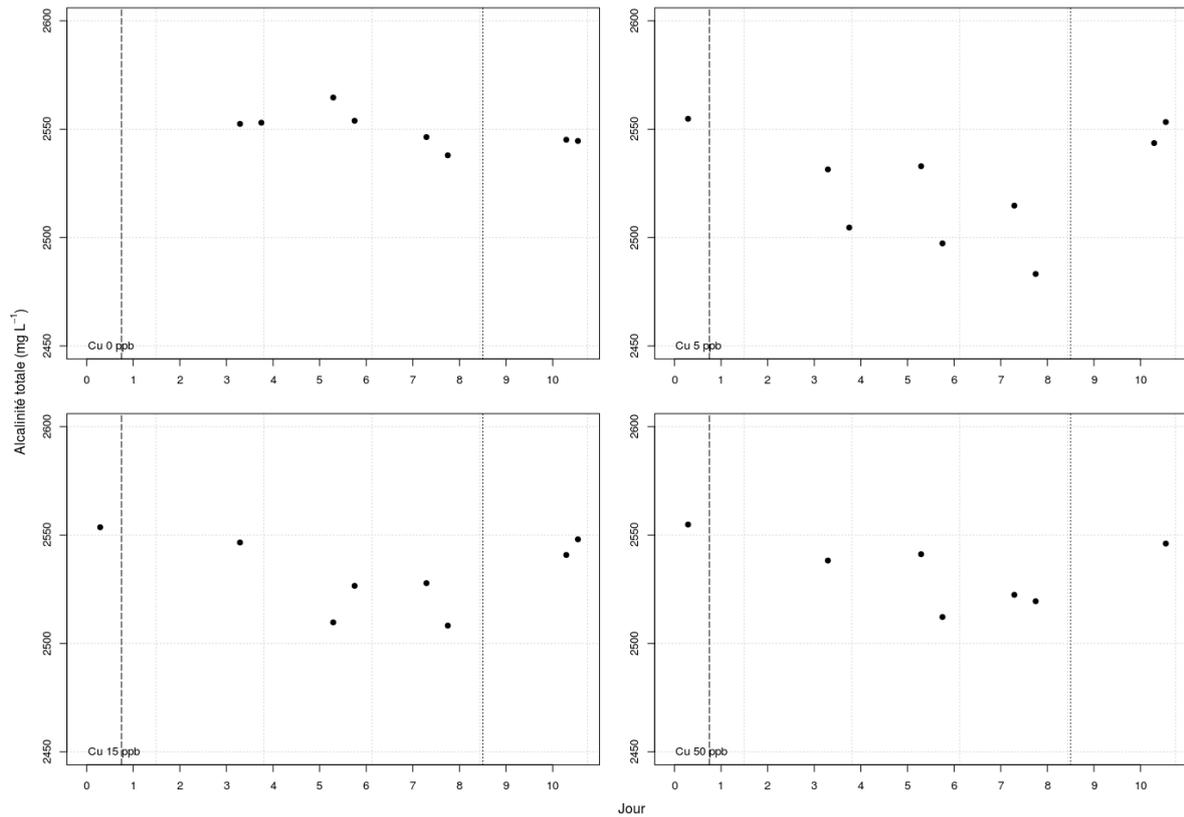
Annexe G-5 : Variation de la concentration en PO_4^{3-} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), prélevé deux fois par jour avant les renouvellements d'eau, dans les aquariums contenant des faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération avec la mise en renouvellement continu ($100\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) des aquariums. Les points indique les concentrations en PO_4^{3-} dissous mesuré. Les croix représentent la concentration calculée en PO_4^{3-} après le renouvellement d'eau. Les losanges représentent la concentration calculée en PO_4^{3-} après le renouvellement d'eau et l'ajout de la solution en nutriment.



Annexe G-6 : Variation de la concentration en NO_3^- ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dans l'eau de renouvellement des aquariums. La ligne en tiret représente le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase récupération.



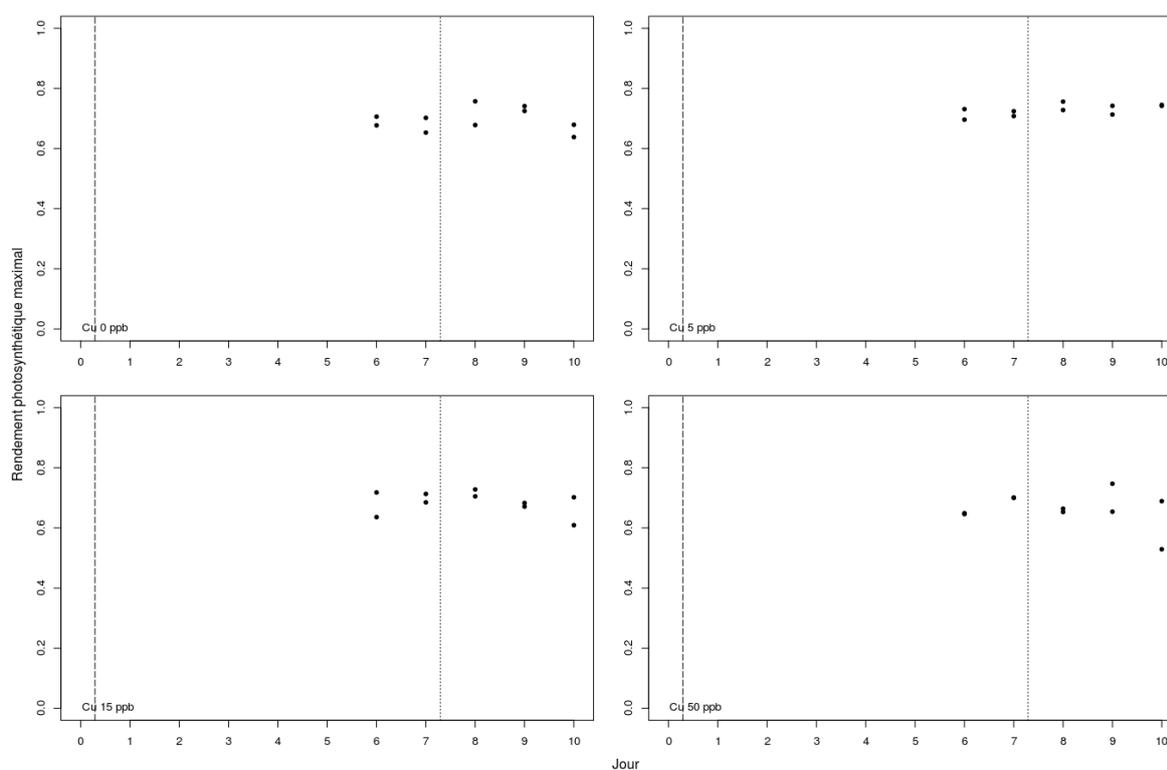
Annexe G-7 : Variation de la concentration en NO_3^{2-} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), prélevé deux fois par jour avant les renouvellements d'eau, dans les aquariums contenant des faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération avec la mise en renouvellement continu (100L.h^{-1}) des aquariums. Les points indique les concentrations en NO_3^{2-} dissous mesuré. Les croix représentent la concentration calculée en NO_3^{2-} après le renouvellement d'eau. Les losanges représentent la concentration calculée en NO_3^{2-} après le renouvellement d'eau et l'ajout de la solution en nutriment.



Annexe G-8: Variation de l'alcalinité totale (mg L^{-1}), prélevé deux fois par jour avant les renouvellements d'eau, dans les aquariums contenant des faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillé représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération avec la mise en renouvellement continu (100L.h^{-1}) des aquariums.

Annexe H :

Evolution des paramètres biologiques établis sur les 3^{ème} feuilles de faisceaux de *Posidonia oceanica* (L.) Delile (1813) prélevé dans l'herbier en bordure du port de STARESO dans la baie de Calvi (Corse, France) à 12 m de profondeur puis mis en aquariums exposés à différentes concentrations de cuivre : 0, 5, 15, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Durant la phase de contamination, l'eau de ces derniers est partiellement renouvelé, deux fois par jour (7:00-18:00 (GMT+2)) suivi de l'ajout d'une solution de cuivre. Durant la phase de récupération, les deux renouvellements d'eau sont maintenus et un renouvellement d'eau en continu (100 L/h) est également utilisé.



Annexe H-1 : Variation du rendement photosynthétique maximal ($n = 2$) mesuré quotidiennement au milieu de la face convexe de la 3^{ème} feuille de faisceaux de *Posidonia oceanica* maintenues en aquariums et exposées au cuivre. Les deux renouvellements d'eau quotidiens (7:00-18:00 (GMT+2)) sont suivis de l'ajout d'une solution 1000 ppm de cuivre équivalent à des concentrations nominales de respectivement 0, 5, 15 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les aquariums contaminés. La ligne en tiret matérialise le début de la phase de contamination. La ligne en pointillée représente la fin de la phase de contamination et le début de la phase de récupération.

Annexe I

Tableau récapitulatif des analyses et techniques employées afin d'étudier la photosynthèse chez les plantes marines (Silva et al. 2009).

Method	Applications	Advantages	Disadvantages
O ₂ titration (Winkler)	<ul style="list-style-type: none"> • Photosynthesis and dark respiration of whole plants or leaf cuts incubated in bottles (laboratory or <i>in situ</i>) • O₂ analysis of water samples from benthic chambers (field) 	<ul style="list-style-type: none"> • High accuracy • Low price 	<ul style="list-style-type: none"> • Intrusive (if plants are incubated in bottles) • Problems related to containment in closed chambers • Initial and final O₂ concentrations only • Cumbersome
O ₂ electrodes coupled to small reaction chambers	<ul style="list-style-type: none"> • Photosynthesis and dark respiration of leaf cuts (laboratory) 	<ul style="list-style-type: none"> • High resolution • High accuracy • Continuous O₂ measurements • Highly controlled conditions • Possibility to manipulate the incubation medium 	<ul style="list-style-type: none"> • Intrusive • Highly artificial • Spectral quality of artificial light sources
O ₂ microelectrodes	<ul style="list-style-type: none"> • O₂ consumption by below-ground tissues (<i>in situ</i>) • O₂ leakage into the rhizosphere (<i>in situ</i>) • O₂ production or consumption in custom-made chambers • Used in the eddy correlation technique (<i>in situ</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Not very intrusive (small diameter electrodes) • Fast response time • Positioning possibilities 	<ul style="list-style-type: none"> • Small spatial resolution • Fragile in field conditions
O ₂ optodes	<ul style="list-style-type: none"> • O₂ mapping of seagrass rhizosphere (<i>in situ</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Not very intrusive • 2-dimensional measurements • Very sensitive at low O₂ concentrations • Does not consume O₂ • Long-term stability 	<ul style="list-style-type: none"> • Slower response than microelectrodes • Technique still under development
PAM fluorescence	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In situ</i> and laboratory measurements of photosynthetic efficiency at the plant level 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-intrusive • Portability • Autonomous underwater equipment • Possibility of continuous measurements 	<ul style="list-style-type: none"> • Measures light reactions only • Does not allow respiration measurements or thus production estimates
CO ₂ evolution	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In situ</i> measurements of community uptake and release of CO₂, in incubation chambers 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-intrusive • Integration of whole-community metabolism • Highly reliable in air-exposed conditions 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibility of underestimating CO₂ uptake in underwater conditions • Problems related to containment in closed chambers
Geo-acoustics	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In situ</i> large-scale estimation of community O₂ production 	<ul style="list-style-type: none"> • Large-scale application, suitable for ecosystem level studies • Continuous measurements 	<ul style="list-style-type: none"> • Underdeveloped technique
Eddy correlation	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In situ</i> sediment–water fluxes of dissolved O₂ • Community level O₂ fluxes metabolic studies 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-intrusive • Autonomous underwater equipment • Good surface integrating capacity • Continuous measurements 	<ul style="list-style-type: none"> • Underdeveloped technique