



Projet Seine-Aval 6

SARTRE

« Seine-Amont : Réseaux trophiques
estuariens »

ANNEXE I : METHODES ET PROTOCOLES

Mars 2023

Coordination : Michèle Tackx et Evelyne Buffan-Dubau

Co-Auteurs : F. Azémar, A. Bernard, E. Bou, N. Chauvel, Y. Copard,
P. Claquin, J.C. Dauvin, A. Huguet, R. Lafite, E. Parlanti, J.P. Pezy.



GIP Seine-Aval
GROUPEMENT D'INTÉRÊT PUBLIC

I. CAMPAGNES BIMESTRIELLES

Les campagnes en Estuaire de Seine consistent à remonter l'estuaire de Honfleur (49°25'45" N 0°13'50.00" E- PK : 355) jusqu'à Rouen (49°26'33" N 1°4'15.00" – PK : 246) représentant un transect de 110 km environ. Afin de suivre l'évolution spatiale d'une même masse d'eau, les campagnes de transect étaient programmées pour suivre la marée montante avec un coefficient de marée variant de 51 à 96 (moyenne = 80). Une pompe a été utilisée en continu au cours des transects afin de prélever de l'eau. Plusieurs paramètres ont été mesurés à haute fréquence (au maximum 8 minutes d'intervalles) : température, salinité, turbidité et l'oxygène dissous avec une sonde multiparamètre YSI 6600 (YSI, États-Unis), le PAR (RBR solo3 PAR), les nitrates avec l'OPUS (TriOS Mess & Datentechnik GmbH, Allemagne), la fluorescence multispectrale avec une fluoroprobe (BBE -Moldaenke, Allemagne) et les paramètres photosynthétiques avec un fluorimètre single turnover (FRRf or Labstaf Chelsea Technologies, RU). Sur 12 stations définies le long du transect des prélèvements à basse fréquence sont effectués en plus : Chla, sels nutritifs, structure de la communauté phytoplanctonique par des mesures de cytométrie en flux ainsi que la composition de la MOD.

I.1. Dynamique du phytoplancton

Mesure de la chlorophylle a:

Pour la mesure des concentrations en Chla, des échantillons d'eau de volume variable (en fonction de la charge en MES) sont filtrés avec un filtre Whatman, GF/F 47 mm, 0.7 µm en fibre de verre puis congelé (-20 °C) jusqu'au moment de l'analyse. Pour extraire les pigments 10 mL d'acétone à 90 % (v/v) au filtre puis laissés au noir à 4 °C pendant 12 h. Après cette période, les échantillons sont centrifugés deux fois à 1700 g pendant 5 minutes. La concentration en Chla extraite est mesurée avec un fluorimètre Turner Designs (Sunnyvale, EU) selon la méthode de Strickland and Parsons, (1972) en suivant le protocole de référence du SNO SOMLIT (Service d'observation du Milieu Littoral).

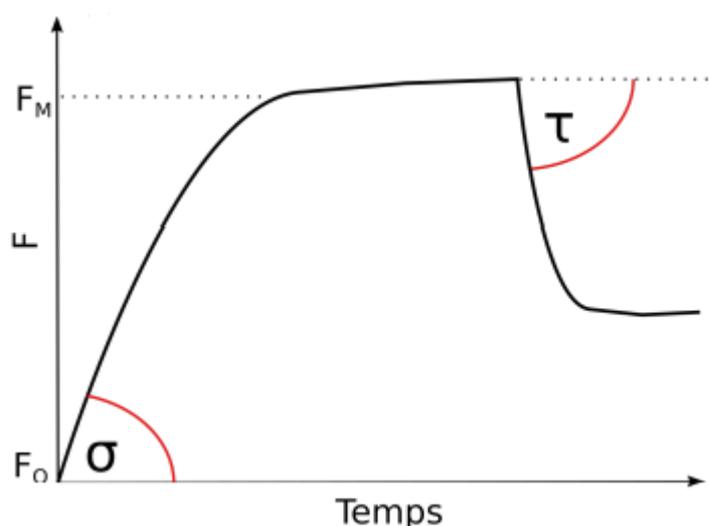
Structure de la communauté phytoplanctonique par cytométrie en flux:

Les communautés ont été caractérisées par cytométrie en flux à l'aide d'un Cytosense (Cytobuoy, Pays-bas). Le Cytosense est un cytomètre automatisé spécialement conçu pour l'étude du phytoplancton. Ce cytomètre permet de mesurer des cellules de 1 à 1000 µm et est équipé de deux lasers : un bleu (452 nm, 50 mW) et un vert (552 nm, 50 mW). Grâce à un double faisceau laser, il est capable de mesurer des profils optiques de chaque cellule permettant d'obtenir des informations supplémentaires et de distinguer les chaînes de cellules par exemple. De plus, une caméra permet de prendre des photos des particules en fonction des caractéristiques cytométriques des cellules, ce qui est une aide précieuse pour caractériser les communautés microphytoplanctoniques. Pour l'estimation de la taille des particules, des billes fluorescentes de 1, 1,5, 2, 5, 10 et 20 µm ont été utilisées. La détermination des groupes de la structure de communauté du phytoplancton peut se faire de plusieurs manières. Pour commencer les particules autotrophes sont séparées du reste des particules grâce au signal de FLR. Des

groupes peuvent être séparés en fonction de classe de taille, la classification de Sieburth et al., 1978 est habituellement utilisée séparant en trois catégories : le picophytoplancton ($< 2 \mu\text{m}$), le nanophytoplancton ($2-20 \mu\text{m}$) et le microphytoplancton ($> 20 \mu\text{m}$). Le protocole appliqué par Serre-Fredj et al (2021) a été utilisé pour caractériser les différents groupes.

Paramètres photosynthétiques

L'estimation de paramètres photosynthétiques via la fluorimétrie variable a été réalisée en utilisant deux fluorimètres de type "single-turnover (ST)" : un Frrf-ACT2 (Chelsea technologies, RU) et un LabSTAF (Chelsea technologies, RU). Avant chaque mesure, les échantillons sont placés au noir permettant ainsi une oxydation des quinones A et une ouverture de la plupart des centres réactionnels. A la fin de la période d'obscurité, la fluorescence minimale F_0 a été mesurée en utilisant une lumière faible non actinique. Une phase de saturation à renouvellement unique (ST) est délivrée avec un flash saturant de $100 \mu\text{s}$ pour mesurer la fluorescence maximale à l'obscurité comme décrit dans Boatman et al., (2019).



ANNEXE I Figure 1 : Courbe de saturation single-turnover

Les échantillons ont été exposés à 12 intensités de PAR croissantes ($0 - 2000 \mu\text{mol photon s}^{-1} \text{m}^{-2}$) avec des intervalles de 30 secondes pour obtenir une courbe de fluorescence-lumière (FLC). Le Tableau I reprend l'ensemble des équations utilisées pour déterminer les paramètres photosynthétiques utilisés pour *in fine* déterminer la productivité primaire.

L'efficacité quantique maximale du PSII (F_v/F_m) a été calculée en utilisant l'équation suivante de (Genty et al., 1989) - équation 5. Les échantillons ont ensuite été exposés à 12 étapes lumineuses de PAR croissant (de 0 à $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant 30 secondes à chaque étape. L'efficacité quantique effective de PSII (équation 6) a été mesurée à chaque étape lumineuse comme (Genty et al., 1989). Le taux de transport d'électrons relatif (rETR, unité relative) a été calculé pour chaque irradiance (E) comme décrit dans l'équation 12. Les variations de ce taux de transport d'électrons relatif en fonction de la lumière sont une des représentations des courbes de FLC.

ANNEXE I Tableau I : Equations servant à décrire les paramètres photosynthétiques d'une communauté microalgale

Symbole	Unité	Description	Equation	Numéro
Paramètres structurels				
[Chl a]	$\mu\text{g Chl a.cm}^{-2}$	Concentration de chlorophylle a	$[\text{Chl a}] = Kx \times \frac{F_0}{F_a} \max \times \left[\frac{F_0 - F_a}{F_a \max} \right] \times \frac{V_{ext}}{V_{filtré}}$	1
n_{PSII}	$\text{mol PSII mol Chl a}^{-1}$	Nombre de photosystèmes II photochimiquement actifs	$n_{PSII} = \frac{[\text{RCII}]}{\mu\text{g Chl a.L}^{-1}}$	2
[RCII]	nmol RCII.m^{-3}	Concentration de centres réactionnels du photosystème II	$[\text{RCII}] = \mu\text{mol O}_2.\text{s}^{-1}.\text{L}^{-1} \times (18 \times 10^{-3} \text{ s Flash}^{-1}) \times (4 \text{ Flash} \times 1 \text{ PSII.O}_2^{-1})$	3
$\mu\text{g chl a / mol RCII}$	$\mu\text{g Chl a.L}^{-1}.\text{nmol RCII.m}^{-3}$	Rapport entre la chlorophylle a et le nombre de centres réactionnels	$\frac{\mu\text{g chl a}}{\text{mol RCII}}$	4
Paramètres de fluorescence				
F_v/F_m	Relative	Rendement quantique maximal du PSII	$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$	5
F_q'/F_m'	Relative	Efficacité de fonctionnement du PSII	$\frac{F_q'}{F_m'} = \frac{(F_m' - F_0)}{F_m'}$	6
NPQ	Relative	Quenching non-photochimique	$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$	7
Paramètres d'absorbance				
a_{LHII}	m^{-1}	Coefficient d'absorption du PSII	$a_{LHII} = Ka \times \frac{F_m \times F_0}{F_m - F_0}$	8
a^*	$\text{m}^2.\mu\text{g Chl a}^{-1}$	Coefficient d'absorption	$a^* = \frac{A \times 100 \times \ln(10)}{\text{chl a}}$	9
σ_{PSII}	$\text{nm}^2 \text{ PSII}$	Absorption fonctionnelle du PSII	Selon Kolber et al., 1998	10
Paramètres relatifs des Courbes Production énergie				
F_q'/F_m' en fonction de E	Relative	Model de Boatman, 2019 appliqué aux mesures de fluorescence	$\frac{F_q'}{F_m'} = [\alpha \times Ek \times (1 - e^{-\frac{E}{EK}}) - \beta \times Ek\beta \times (1 - e^{-\frac{E}{EK\beta}})] \times E^{-1}$	11
rETRm	Relative	Taux de transport maximal relatif des électrons	$rETRmax = \alpha_{webb} \times Ek_{webb}$	12
α	$\mu\text{mol electrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}(\mu\text{mol photons}^{-2}.\text{s}^{-1})^{-1}$	Efficacité photosynthétique	$\alpha = \frac{1}{c}$	13
Paramètres absolue calculés à partir des Courbes Production énergie				
$ETR(II)_{abs}$	$\text{mmol electrons mg Chl a}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Taux de transport d'électrons du PSII selon l'absorbance	$ETR(II)_{abs} = \frac{F_q'}{F_m'} \times E \times \frac{F_m \times F_0}{F_m - F_0} \times K_a \times 10^{-6} \times 3600 \times [\text{chl a}]^{-1}$	14
$ETR(II)_{a^*}$	$\text{mmol electrons mg Chl a}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Taux de transport d'électrons du PSII selon a^*	$ETR(II)_{a^*} = rETRm \times a^* \times 0.7 \times 3.6$	15
$ETR(II)_{\sigma}$	$\text{mmol electrons mg Chl a}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Taux de transport d'électrons du PSII selon la taille de l'antenne (σ)	$ETR(II)_{\sigma} = \frac{F_q'}{F_m'} \times E \times \sigma_{PSII} \times \left(\frac{F_0}{F_m}\right)^{-1} \times 6.022 \times 10^{-4} \times [\text{RCII}] \times 3600 \times [\text{chl a}]^{-1}$	16
JVPPII	$\mu\text{mol e}^{-}.\text{m}^{-3}.\text{s}^{-1}$	Flux du PSII par unité de volume	$JVPPII = a_{LHII} \times \frac{F_q'}{F_m'} \times E$	17

La modélisation de ces données formant alors une courbe, permet d'obtenir des paramètres supplémentaires. Le modèle de (Boatman et al., 2019) (équation 11) a été appliqué. De la modélisation des courbes FLC, on peut estimer au moins deux paramètres : α et E_k , permettant ainsi de calculer le taux de transport maximal d'électrons ($rETR_{max}$) du PSII en y couplant l'algorithme d'absorption d'Oxborough et al., (2012), le flux d'électrons PSII par unité de volume est calculé comme dans l'équation 14 où K_a est une constante inhérente à l'instrument (ici $K_a = 11800$). Le flux PSII par unité de volume ($J_{VII_{max}}$), mmol électrons $m^{-3} h^{-1}$ est calculé comme dans l'équation 17. En appliquant le facteur de conversion du nombre de moles d'électrons en moles de carbone déterminé par (Morelle et al., 2018) en estuaire de Seine on peut estimer la production en $mg C m^{-3} h^{-1}$. En intégrant la production sur la profondeur et dans le temps, nous avons ensuite calculé la production journalière le long du transect en prenant les données lumières de Météo France. Cette production journalière nous a ensuite permis de déterminer la production annuelle comme décrit dans (Morelle et al., 2018).

TEP : Particules exopolymériques transparentes

Pour la mesure des TEP, les échantillons d'eau sont filtrés avec un filtre Millipore 0.4 μm en polycarbonate puis congelés (-20 °C) jusqu'à l'analyse. Selon Claquin et al., (2008) adapté de Passow and Alldredge, (1996), les filtres sont colorés avec une solution de bleu d'Alcian (0.02%) avec 0.06 % d'acide acétique (pH : 2.5). L'excès de bleu d'Alcian est rincé en ajoutant de l'eau puis passant le filtre à la centrifugeuse (3000 g, 19 °C, 15 min). Ce cycle de rinçage est répété deux fois puis 6 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) 80% sont ajoutés. Après 2 heures d'incubation, les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre (Pharmacia Biotech Ultraspec 1000 Spectrophotometer) à 787 nm. La droite de calibration est réalisée en utilisant de la gomme xanthane (10 - 700 μg) comme standard. Les concentrations en TEP sont exprimées en "équivalent Xanthane" (eq. Xanthane) par unité de volume ou par Chla. La concentration de TEP est ensuite transformée en équivalent carbone en prenant un facteur de conversion de 0,45 g C g TEP eq. Xanthane.

Sels nutritifs

Mesures des sels nutritifs inorganiques (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , $Si(OH)_4$). Pour la mesure de sels nutritifs, les échantillons d'eau sont filtrés à travers un filtre en acétate de cellulose (ClearLine, CA, 33 mm, 0.45 μm) puis congelés (-20 °C) pour les nitrates et les phosphates, ou placés à -3 °C pour les silicates. Les analyses ont été réalisées avec un auto-analyseur SEAL Analytical AA3 system (Aminot and Kérouel, 2007). Les limites de détections sont de 0.02 $\mu mol.L^{-1}$ pour le PO_4^{3-} de 0.05 $\mu mol.L^{-1}$ pour les (NO_3^- , NO_2^- , $Si(OH)_4$). NH_4^+ était analysé par fluorimétrie selon le protocole d'Oriol et al., (2014). Le rapport N:P a été calculé comme étant (NO_3^- , NO_2^- , + NH_4^+)/ PO_4^{3-} .

EPS : Substances polymériques extracellulaires

Cet échantillon de 10 mL était ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min à 20°C, le culot obtenu était immédiatement congelé à -20°C. Pour l'analyse, 1 mL d'eau MilliQ était ajoutée, puis 1 mL de phénol à 5% et 5 mL d'acide sulfurique à 96% étaient ajoutés (Dubois et al., 1956). Les échantillons étaient ensuite incubés pendant 45 min à température ambiante et les mesures étaient réalisées avec un spectromètre (Ultraspec 1000, Pharmacia Biotech) à 485 nm. Du glucose était utilisé comme standard pour la courbe de calibration. La concentration est exprimée en équivalent glucose. Les polysaccharides des EPS ont été ensuite convertis en carbone, en prenant le facteur suivant 0,4 g C/g de polysaccharide (Rouwenhorst et al., 1991).

I.2. Composition et distribution des MOD

(Auteurs : Edith Parlanti, Zhe-Xuan Zhang, Zoé Hayet, Mahaut Sourzac)

Préparation des échantillons après prélèvement

Lors des 19 campagnes bimestrielles de juin 2019 à novembre 2022, les échantillons d'eau ont été prélevés à un mètre sous la surface puis filtrés sur des filtres en fibre de verre (Whatman, GF/F, 0,7 μm) préalablement pyrolysés à 450°C. Ces filtrations, permettant de séparer les MOD des MOP, ont été réalisées immédiatement après prélèvement sur le bateau. Les échantillons d'eau filtrés ont ensuite été placés au réfrigérateur à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse.

Les MOD sont des mélanges complexes et très hétérogènes de nombreux composants aux propriétés chimiques et masses moléculaires variant sur de larges gammes, rendant difficile sa caractérisation (Canuel and Hardison, 2016). De plus, elle est généralement en faible concentration dans l'eau qui contient également une grande quantité de composés inorganiques qui peuvent interférer lors d'analyses chimiques (Minor et al., 2014). Dans le milieu aquatique, les MOD sont principalement analysées par des techniques de spectroscopie optique (Minor et al., 2014): absorbance UV-Visible et fluorescence.

Analyse par spectroscopie optique

L'analyse des matières organiques dissoutes/colloïdales (MOD) a donc été réalisée par l'étude de ses propriétés optiques (absorption, fluorescence 3D) (Parlanti et al., 2018). Ces techniques de spectroscopie optique qui présentent l'avantage d'être rapides, très sensibles et non invasives, sont utilisées depuis de très nombreuses années et permettent une caractérisation globale des MOD chromophoriques ou fluorescentes (Fellman et al., 2010; Li and Hur, 2017).

Analyse par spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les propriétés générales des MOD ont ainsi été déterminées tout d'abord par spectroscopie d'absorption UV-Visible. La mesure de l'absorbance permet en effet d'obtenir des informations sur la fraction des MOD capables d'absorber la lumière, les MOD chromophoriques (Li and Hur, 2017). Les spectres d'absorbance ont été enregistrés entre les longueurs d'onde de 210 et 700 nm à 200 nm.min⁻¹ à l'aide d'un spectrophotomètre Jasco® V-760. Les analyses ont été effectuées dans une cuve en quartz (Hellma) de trajet optique de 1 cm. Le spectre d'absorbance d'un blanc d'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore) est soustrait du spectre de chaque échantillon.

Afin d'obtenir des informations sur les propriétés des MOD à partir des spectres d'absorbance, différents indices ont été développés et appliqués à l'étude des MOD en milieu aquatique (Parlanti et al., 2018), les principaux indices qui ont été calculés à partir des spectres d'absorbance sont décrits dans le Tableau II.

ANNEXE I Tableau II : Paramètres calculés à partir des spectres d'absorbance UV-Visible

Paramètre	Unité	Calcul	Description	Références
a_{254}	m^{-1}	$a_{254} = 2.303A_{254}/l$	Coefficient d'absorption à 254nm. Indicateur de MOD chromophoriques. Lié à l'aromaticité. Origine terrestre et aquatique/biologique.	(Weishaar et al., 2003; Bianchi et al., 2011)
a_{280}	m^{-1}	$a_{280} = 2.303A_{280}/l$	Coefficient d'absorption à 280nm. Indicateur de MOD chromophoriques. Composés phénoliques	(Fichot et al., 2016)
a_{365}	m^{-1}	$a_{365} = 2.303A_{365}/l$	Coefficient d'absorption à 365nm. Indicateur de MOD chromophoriques. Lié à l'aromaticité, à la concentration en phénols et aux composés de type lignine. Origine terrestre.	(Hernes and Benner, 2003; Hernes et al., 2008; Haywood et al., 2018)
a_{465}	m^{-1}	$a_{465} = 2.303A_{465}/l$	Coefficient d'absorption à 465nm. Indicateur de MOD chromophoriques. Lié à l'aromaticité.	(Peuravuori and Pihlaja, 1997; Chen et al., 2002)
a_{665}	m^{-1}	$a_{665} = 2.303A_{665}/l$	Coefficient d'absorption à 665nm. Indicateur de MOD chromophoriques. Lié à l'aromaticité.	(Peuravuori and Pihlaja, 1997; Chen et al., 2002)
E2/E3		a_{254}/a_{365} A_{254}/A_{365}	Rapport d'absorbance. Inversement corrélé au poids moléculaire et à l'aromaticité	(Giancoli Barreto, S. R. Nozaki and Barreto, 2003; Helms et al., 2008; Minor et al., 2014)
E4/E6		a_{465}/a_{665} A_{465}/A_{665}	Rapport d'absorbance. Indicateur de dégradation/humification. Inversement corrélé avec le poids moléculaire et positivement corrélé avec les rapports O:C et C:N, la teneur en carboxyle et l'acidité totale.	(Chen et al., 2002; Helms et al., 2008; Minor et al., 2014; Sepp et al., 2019)
% aromaticité	$m^{-1}.mol^{-1}.l$	$0.05*(A_{280}/COD) + 6.74$	Pourcentage d'aromaticité (unité COD: mol/l)	(Chin et al., 1994)
SUVA	$m^{-1}.mg^{-1}.l$	$Abs_{254}/(l*[COD])$	Specific UV Absorbance SUVA. Indicateur de l'aromaticité et du caractère hydrophobe ou hydrophile des MOD - $SUVA_{254} > 4$: MOD hydrophobes avec un caractère aromatique fort ; $SUVA_{254} < 3$: MOD hydrophiles. (unité COD: mg/l)	(Weishaar et al., 2003; Matilainen et al., 2011)
$S_{275-295}$	nm^{-1}	Pente du spectre d'absorption sur la gamme de longueur d'onde 275-295 nm	Traceur de source terrigène. Inversement corrélé au poids moléculaire. Lié aux composés de type lignine, de faibles valeurs indiquant des dérivés de la lignine de haut poids moléculaire et inversement. Photodégradation des MOD et transformation de composés de type lignine de hauts poids moléculaires en faibles poids moléculaires.	(Weishaar et al., 2003; Fichot and Benner, 2012; Haywood et al., 2018)
$S_{350-400}$	nm^{-1}	Pente du spectre d'absorption sur la gamme de longueur d'onde 350-400 nm	Inversement corrélé au poids moléculaire des MOD, augmente généralement avec l'irradiation.	(Helms et al., 2008)
S_R		$S_{275-295nm}/S_{350-400nm}$	Rapport de pentes spectrales. Estimation du poids moléculaire des MOD, plus la valeur est forte, plus le poids moléculaire est faible - $S_r > 1$ pour les eaux marines ; $S_r < 1$ MOD terrestres	(Helms et al., 2008)

Les pentes spectrales entre 275 et 295 nm ($S_{275-295}$) et entre 350 et 400 nm ($S_{350-400}$) ainsi que le rapport entre ces deux pentes (SR) ont notamment été calculés et renseignent sur les variations de la masse moléculaire des MOD (Helms et al., 2008). Le rapport SR est négativement corrélé avec la taille des MOD : quand SR augmente, le poids moléculaire diminue (Helms et al., 2008). Pour des échantillons principalement marins, $S_{275-295} > S_{350-400}$ alors qu'il s'agit de l'inverse pour des échantillons à dominance terrestre (Helms et al., 2008).

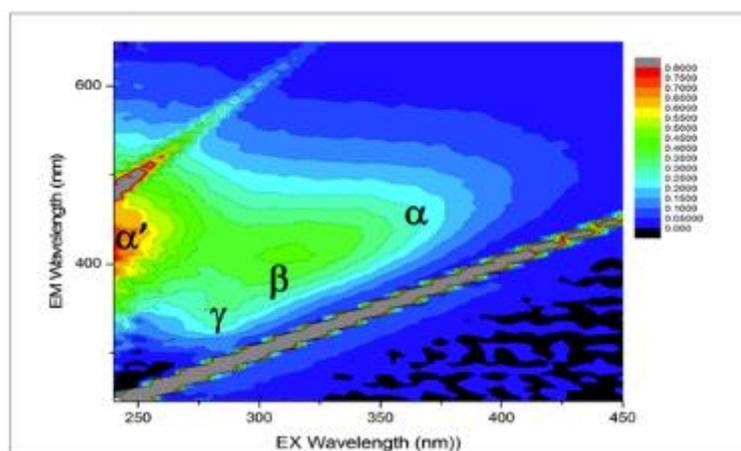
L'absorbance à 254 nm normalisée par la concentration en COD, appelée SUVA (Specific UV Absorbance), est corrélée avec le pourcentage d'aromaticité des MOD (Weishaar et al., 2003). Le SUVA est donc considéré comme un indicateur de l'aromaticité, de la réactivité et du caractère hydrophobe ou hydrophile des MOD en milieu aquatique (Matilainen et al., 2011).

Analyse par fluorescence 3D des MOD

Une partie des MOD chromophoriques, les MOD fluorescentes, peuvent émettre un photon à une certaine longueur d'onde lors de la relaxation depuis un état excité pour retrouver un état stable (Stedmon and Markager, 2005), et peut donc être analysée par spectrofluorimétrie (Li and Hur, 2017). La fluorescence est une technique très sensible qui permet de caractériser les MOD à partir d'un échantillon aqueux de faible volume sans nécessiter d'étapes préalables de concentration ou d'extraction. Depuis plusieurs décennies, la fluorescence tridimensionnelle (ou matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence) est la technique la plus utilisée pour caractériser les MOD et étudier sa dynamique dans les environnements aquatiques (Jaffé et al., 2004; Huguet et al., 2009; Carstea et al., 2010; Tzortziou et al., 2015; Ejarque et al., 2017). Les spectres EEM renseignent sur les propriétés générales des MOD et donnent des informations sur sa source, sa composition chimique, son état de dégradation et sa réactivité (Parlanti et al., 2000; McKnight et al., 2001; Ejarque et al., 2017).

Les échantillons dont le maximum d'absorbance observé sur toute la gamme de longueurs d'onde était supérieur à 0,1 ont été dilués avant l'acquisition des spectres de fluorescence pour éviter les effets de filtre interne lors de l'analyse et garantir que l'intensité de fluorescence soit proportionnelle à la concentration en fluorophores (Huguet et al., 2009).

L'acquisition des spectres de fluorescence EEM des échantillons a été réalisée dans une cuve en quartz (Hellma) de 1 cm de trajet optique thermostatée à 20 °C, à l'aide d'un spectrofluorimètre Aqualog (Horiba Scientific®), équipé d'une lampe à arc xénon 150 W, d'un double monochromateur pour définir les longueurs d'onde d'excitation et d'un détecteur CCD pour l'enregistrement des émissions de fluorescence avec une bande passante de 5 nm. Les échantillons ont été analysés pour des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 240 et 800 nm, avec un pas de 5 nm et un temps d'intégration de 2 s. Le spectre d'émission est enregistré avec un gain élevé du détecteur CCD de 246,16 à 827,70 nm avec un incrément de 1 pixel (environ 0,58 nm). Un blanc de fluorescence effectué dans les mêmes conditions sur de l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore) est ensuite soustrait des spectres de chaque échantillon. L'aire du pic de diffusion Raman de l'eau est calculée quotidiennement pour une excitation de 350 nm et permet de normaliser les spectres. Les intensités de fluorescence sont ainsi exprimées en unités Raman (RU). Un exemple de spectre de fluorescence obtenu est présenté sur la Figure 2.



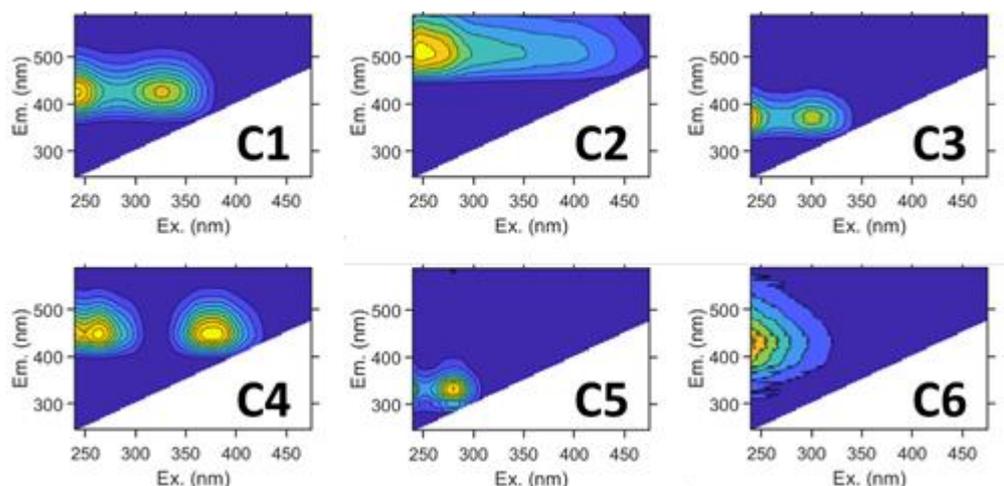
ANNEXE I Figure 2 : Spectre de fluorescence d'un échantillon de Caudebec-en-Caux, juin 2021. Position des principales bandes de fluorescence (α' , α , β , γ).

Les données semi-quantitatives et qualitatives à prendre en compte sont l'intensité (proportionnelle à la concentration des fluorophores) et la position des maxima de fluorescence qui varient en fonction de la nature et de l'origine des MOD et dépendent des espèces moléculaires fluorescentes qu'elle contient. Le traitement des données des spectres EEM obtenus a été effectué avec le logiciel TreatEEM développé par Dario Omanović (Omanovic) qui permet de relever les intensités des principales bandes de fluorescence (α' , α , β , γ) et calculer les indices de fluorescence (HIX, BIX et FI).

Dans un spectre de fluorescence 3D, les pics de fluorescence se superposent et ont des influences les uns sur les autres. Afin d'extraire plus d'informations de ces spectres, une méthode numérique de traitement des spectres a été développée et permet une séparation mathématique des différentes contributions spectrales (Stedmon and Bro, 2008; Murphy et al., 2014; Osburn et al., 2016). L'ensemble des spectres EEM des échantillons ont ainsi été traités par une analyse multivariée PARAFAC dans Matlab R2021b avec la boîte à outils DOMFluor 1.7. Le nombre de composants expliquant la fluorescence globale de l'ensemble du jeu de données est déterminé grâce aux méthodes de validation (split-half analysis) et par examen visuel des résidus et des spectres des composants.

Cette approche statistique de modélisation PARAFAC a permis de déterminer et valider un modèle à 6 composants, (Figure 3), expliquant 99,6 % de la variabilité de l'ensemble du jeu de données pour les 19 campagnes bimestrielles (249 échantillons). Afin d'appréhender les différences de composition en MOD fluorescentes, la fluorescence relative de chaque composant PARAFAC a été calculée en divisant l'intensité de fluorescence de chaque composant par la somme des intensités de fluorescence des 5 (campagnes communes) ou 6 (campagnes bimestrielles) composants et exprimée en pourcentage de la fluorescence totale.

L'identification de ces composants a été faite par comparaison avec ceux enregistrés dans la base de données OpenFluor (Lablicate, 2023) (Murphy et al., 2014) et ceux décrits dans la littérature.



ANNEXE I Figure 3 : Spectres EEM des 6 composants (C1 à C6) déterminés par PARAFAC à partir des 249 échantillons des 19 campagnes de remontée de Seine bimestrielles expliquant l'ensemble du jeu de données.

Les différents paramètres et indices déterminés à partir des spectres de fluorescence sont décrits dans le Tableau III.

ANNEXE I Tableau III : Paramètres et indices déterminés à partir des spectres EEM de fluorescence

Paramètre	Unité	Calcul	Description	Références
$I\alpha'$	RU (Raman Unit)	Intensité maximale pour les longueurs d'ondes d'excitation 250 nm et d'émission 380-500 nm	Bande α' . Mélange de matériel aromatique, ancien, d'origine terrestre ou aquatique et de matériel d'origine aquatique/biologique fraîchement produit dans le milieu.	(Parlanti et al., 2000; Coble, 2007; Haywood et al., 2018)
$I\alpha$	RU (Raman Unit)	Intensité maximale pour les longueurs d'ondes d'excitation 370 nm et d'émission 420-500 nm	Bande α . Matériel aromatique, ancien, d'origine terrestre ou aquatique (différenciation par la position du maximum d'émission de fluorescence)	(Parlanti et al., 2000; Coble, 2007; Haywood et al., 2018)
$I\beta$	RU (Raman Unit)	Intensité maximale pour les longueurs d'ondes d'excitation 310 nm et d'émission 380-400 nm	Bande β . Matériel d'origine aquatique/biologique récent.	(Parlanti et al., 2000; Coble, 2007; Haywood et al., 2018)
$I\gamma$	RU (Raman Unit)	Intensité maximale pour les longueurs d'excitation 270-280 nm et d'émission 300-350 nm	Bande γ . Protéines et activité biologique/microbienne. Corrélation avec la biodégradabilité.	(Parlanti et al., 2000; Coble, 2007; Fellman et al., 2009; Haywood et al., 2018)
$I\alpha'/\text{COD}$	RU.mg ⁻¹ .l	$I\alpha'/\text{COD}$	Intensité de fluorescence par unité de carbone	(Hansen et al., 2016)
$I\alpha/\text{COD}$	RU.mg ⁻¹ .l	$I\alpha/\text{COD}$	Intensité de fluorescence par unité de carbone	(Hansen et al., 2016)
$I\beta/\text{COD}$	RU.mg ⁻¹ .l	$I\beta/\text{COD}$	Intensité de fluorescence par unité de carbone	(Hansen et al., 2016)
$I\gamma/\text{COD}$	RU.mg ⁻¹ .l	$I\gamma/\text{COD}$	Intensité de fluorescence par unité de carbone	(Stedmon et al., 2011; Hansen et al., 2016)

I α /I α		Rapport des intensités maximales des bandes α' et α	Indicateur de la proportion de MOD récentes, de plus faible poids moléculaire par rapport au matériel plus ancien. Augmente avec le caractère récent des MOD	(Coble, 2007; Huguet et al., 2009; Guarch-Ribot and Butturini, 2016)
I β /I α		Rapport des intensités maximales des bandes β et α	Indicateur du caractère autochtone des MOD. Augmente avec la MO d'origine autochtone et l'activité biologique. Lié à la biodégradabilité des MOD.	(Parlanti et al., 2000; Huguet et al., 2009; Wilson and Xenopoulos, 2009)
I γ /I α		Rapport des intensités maximales des bandes γ et α	Indicateur de la proportion de MOD de type protéique par rapport aux MOD plus aromatiques et/ou anciennes (terrestre ou aquatique). Augmente avec les MO autochtones et l'activité biologique dans l'environnement. Lié à la biodégradabilité des MOD.	(Parlanti et al., 2000; Baker et al., 2008; Huguet et al., 2009)
HIX		Rapport de l'aire de l'émission 435-480 nm sur l'aire de l'émission 300-345 nm pour une excitation de 250 nm	Estimation du degré d'aromaticité et d'humification des MOD. De fortes valeurs indiquent la présence de MOD dégradées (polymérisation, polycondensation) alors que des valeurs faibles indiquent des MOD plus récentes et moins aromatiques. HIX>12: caractère aromatique fort - apports terrigènes importants ; HIX<4: origine biologique ou bactérienne aquatique	(Zsolnay et al., 1999; Vacher, 2004; Huguet et al., 2009)
BIX		Rapport de l'intensité à une émission de 380 nm sur l'émission à 430 nm pour une excitation de 250 nm	Estimation de la production de MOD autochtones et la présence de MOD fraîchement produites. Augmente avec l'activité biologique. BIX>0,8: origine biologique ou bactérienne aquatique ; BIX<0.5: faible activité biologique Lié à la biodégradabilité des MOD.	(Vacher, 2004; Huguet et al., 2009; Wilson and Xenopoulos, 2009; Lee et al., 2018)
FI		Rapport de l'intensité à une émission de 450 nm sur l'émission à 500 nm pour une excitation de 370 nm	Estimation des sources de MOD, des valeurs fortes (>1.9) indiquent des MOD microbiennes, alors que des valeurs faibles (<1.3) indiquent des MOD provenant des végétaux supérieurs	(McKnight et al., 2001)
Ci	RU (Raman Unit)	Analyse statistique multivariée des spectres de fluorescence 3D: décomposition des spectres en n composants expliquant l'ensemble du jeu de données	Parallel Factor Analysis (PARAFAC): Permet de déterminer les différents constituants Ci des MOD fluorescentes présents dans un jeu de données et de déterminer leurs sources (allochtone, anthropique, autochtone etc...). Comparaison avec d'autres études grâce à l'OpenFluor database et la littérature.	(Stedmon and Markager, 2005; Stedmon and Bro, 2008; Jaffé et al., 2014)

I.3. Composition et distribution des MOP (METIS)

Les analyses sur les MOP telles que réalisées par METIS sont les mêmes que explicitées dans la section sur les campagnes communes.

II. Campagnes communes

II.1. Facteurs environnementaux

ANNEXE I Tableau IV : Paramètres physico-chimiques mesurés.

Mesurés in situ (CTD M2C)		
Température	Valeurs de température mesurées in situ par CTD	°C
Conductivité	Valeurs de conductivité mesurées in situ par CTD	S m ⁻¹
Conductivité	Valeurs de conductivité mesurées in situ par CTD	S m ⁻¹
Obs	Valeurs d'OBS mesurées in situ par CTD	
Turbidité HACH	Valeurs de turbidité mesurées par turbidimètre HACH	
Mesurés au laboratoire (sondes LEFE)		
Température	Valeurs de température mesurées au labo après transport des échantillons avec une sonde multi-paramètres.	°C
Salinité	Valeurs de salinité mesurées au labo après transport des échantillons avec une sonde multi-paramètres.	
Conductivité	Valeurs de conductivité mesurées au labo après transport des échantillons avec une sonde multi-paramètres.	S m ⁻¹
O2	Concentration en O2	mg L ⁻¹
O2	Saturation de l'eau en O2	%
pH	Valeur de pH	
Analyses faites par le Plateau d'Analyses Physico-Chimiques (PAPC) LEFE		
Phosphore total	Phosphore total	mg L ⁻¹
Dioxyde de silicium (SiO2)	Concentration en Dioxyde de silicium	mg L ⁻¹
F-	Concentration en Fluorure	mg L ⁻¹
Cl-	Concentration en Chlorure	mg L ⁻¹
N-NO2-	Concentration en Nitrite	mg L ⁻¹
Br-	Concentration en Bromure	mg L ⁻¹
N-NO3-	Concentration en Nitrate	mg L ⁻¹
S-SO42-	Concentration en Sulfate	mg L ⁻¹
P-PO43-	Concentration en Phosphate	mg L ⁻¹
Na+	Concentration en Sodium	mg L ⁻¹
N-NH4+	Concentration en Ammonium	mg L ⁻¹
K+	Concentration en Potassium	mg L ⁻¹
Mg2+	Concentration en Magnésium	mg L ⁻¹
Ca2+	Concentration en Calcium	mg L ⁻¹
Analyses faites par CREC		
NH4	Concentration en ammonium	µmol L ⁻¹
NO2	Concentration en nitrites	µmol L ⁻¹
NO3	Concentration en nitrates	µmol L ⁻¹
PO4	Concentration en phosphate	µmol L ⁻¹
Si	Concentration en silicates	µmol L ⁻¹

II.2. Les matières particulaires en suspension (MES)

Composition et distribution des MES (LEFE)

Pour le dosage des MES, POM et PIM, un volume de 250 mL à 1L d'eau de sub-surface a été filtré sur des filtres GF-C pré-pesés de porosité 1,2 µm. Les filtres sont ensuite déposés dans des *Pétri-slides* et conservés au frais pendant le transport au laboratoire où ils sont placés en chambre froide (4°C) en attendant d'être analysés.

Pour l'analyse des MES, les filtres sont séchés à l'étuve à 60°C durant 24 à 48 h. Ils sont ensuite pesés avec une balance de précision. Pour l'analyse des MIP, les filtres sont placés dans des supports en aluminium et mis au four à moufle pendant 5h à 450°C. Ils sont ensuite pesés à la balance de précision. Enfin les MOP sont quantifiées par simple soustraction entre le poids des MES et des MIP.

Mesure des concentrations des MES (Metis)

Les filtres, au nombre de trois par échantillon, sont congelés à -20 °C puis lyophilisés pour éliminer toute trace d'eau. Puis, ces filtres sont grattés à l'aide d'un scalpel. Pour chaque échantillon, le matériel ainsi récupéré est placé dans un flacon préalablement taré. Ce dernier est ensuite pesé pour déterminer la masse de MES, rapportée au volume d'eau filtré.

Mesure des concentrations des MES (M2C)

Un seul échantillon est traité par prélèvement et ramené au laboratoire. Un filtre Whatmann GF-F, diamètre de pore de 0,7µm, est prépesé (PV). L'échantillon est filtré pour un volume variable V de 100 à 1000 mL en fonction de la concentration de MES sur ce filtre GF-F. L'échantillon est rincé par le l'eau distillée avec un volume égal à 10% de l'eau filtrée. Les filtres sont déposés dans des boîtes Pétri qui sont mises à l'étuve à 40°C pendant 48h. Ils sont ensuite pesés (PC). La masse finale est calculée : $(PC - PV) * 1000 / V$

Mesure des distributions de taille (M2C)

Le granulomètre laser *in situ* LISST 100X-C (Laser In Situ Scattering and Transmissometry) a permis de réaliser les spectres granulométriques in situ. Un réducteur a été mis en place sur la tête de mesure pour la station de Tancarville afin de faire la mesure sur une distance plus courte compte-tenu de la turbidité plus élevée. L'acquisition des données se fait avec une fréquence de 1Hz. Le granulomètre est déployé sur la cage d'instrumentation, avec la CTD. Le calcul des paramètres granulométrique a été fait avec le logiciel GRADISTAT.

II.3. Composition et distribution des MOP

Analyses élémentaires, isotopiques et moléculaires des matières organiques particulaires (Auteurs : Arnaud Huguet, Zhe-Xuan Zhang, Yoann Copard)

Préparation des échantillons après prélèvement

Après prélèvement, les échantillons d'eau ont été filtrés à 0,7 µm sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/F afin de séparer les MES du matériel dissous. Les filtres ont ensuite été congelés à -20 °C, lyophilisés puis grattés en amont des analyses de la MOP au sein des MES. Le matériel ainsi obtenu est placé dans un flacon

préalablement taré. Ce dernier est ensuite pesé pour déterminer la masse des matières en suspension (MES) rapportée au volume d'eau filtré.

Analyses élémentaires et isotopiques

Un aliquote (40 mg) de chaque échantillon de MES a été soumis à une attaque acide avant la détermination de la teneur en carbone organique et composition isotopique en ^{13}C . Cette étape permet d'éliminer le carbone inorganique présent dans les échantillons. Les MES ont été placées dans un tube à centrifuger de 30 mL, avant ajout de 10 mL d'HCl 3M. Après agitation magnétique pendant 3h, les échantillons ont été centrifugés pendant 5 min à 3000 tr/min et 15°C et le surnageant récupéré. Plusieurs rinçages du résidu avec de l'eau ultrapure (Elga) ont été effectués, l'échantillon étant systématiquement centrifugé et le surnageant éliminé comme précédemment. Ces étapes sont répétées jusqu'à obtention d'une solution de rinçage au pH proche de la neutralité.

En vue des analyses élémentaires et isotopiques, environ 5 mg de MES ont été placés dans des capsules en étain. Les analyses ont été réalisées sur les plateformes ALYES (IRD Bondy) avec un analyseur ThermoFisher Scientific Delta V Advantage. Les teneurs en N et la composition isotopique en N ($\delta^{15}\text{N}$) ont été déterminées directement à partir de l'échantillon brut. Les teneurs en carbone organique et la composition isotopique en C organique ($\delta^{13}\text{C}$) ont été déterminés à partir de l'échantillon préalablement décarbonaté.

Analyses par décomposition thermique des MOP (pyrolyse Rock-Eval 6).

Le Rock-Eval 6 Turbo (Vinci Technologies) est un pyrolyseur issu de l'industrie pétrolière et permet l'acquisition de paramètres géochimiques des MOP (voir les principes et le fonctionnement dans (Espitalié et al., 1985; Lafargue et al., 1998; Baudin et al., 2015)). La procédure est basée sur la succession d'une pyrolyse suivie d'une oxydation dans deux fours distincts d'une quantité de MES comprise entre 40 et 100 mg préalablement séchée à 40°C dans une étuve ventilée et broyée de manière homogène. Durant la pyrolyse qui a lieu sous atmosphère inerte (N_2), les effluents hydrocarbonés sont quantifiés (HC) à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) qui génère deux signaux distincts : S1 et S2 désignant respectivement les hydrocarbures libres volatilés durant 3 minutes à 180°C et les hydrocarbures générés par pyrolyse des MOP entre 180 et 650°C (gradient de 30°C/min). Quand la réponse du FID atteint l'intensité maximale, la température correspondante définit le paramètre Tpeak (°C) ; valeur à laquelle le rendement de pyrolyse est à son maximum. La seconde part des effluents (CO_2 et CO), quantifiés par une cellule infrarouge, fournit respectivement les pics S3 et S3CO. L'ensemble des paramètres sont exprimés en mg d'hydrocarbures (S1 & S2), de CO (S3CO) ou de CO_2 (S3) par gramme d'échantillon. Le résidu de pyrolyse est ensuite oxydé sous une atmosphère artificielle (N_2/O_2 ; 80/20) de 300 à 850°C à 25°C/min libérant du CO_2 et du CO détectés par infrarouge. Ils correspondent aux pics S4CO2 pour le CO_2 et S4CO pour le CO (il existe d'autres paramètres, en particulier pour le Carbone minéral qui ne sont pas utilisés dans cette étude). Cette étape permet de décomposer complètement les MOP.

Le COP (exprimé en % poids) est calculé en additionnant le COP de la pyrolyse (PC) avec celui de la combustion (RC). Enfin des paramètres de la qualité des MOP sont également calculés. Dans ce travail, nous avons utilisé l'indice d'hydrogène (HI, mgHC/gPOC, soit $(\text{S2}/\text{POC}) \times 100$) qui correspond à la quantité d'hydrocarbure pyrolysable rapporté au TOC ou encore l'indice d'oxygène (OI, mg O_2 gPOC $^{-1}$, calculé en intégrant le S3 et le S3CO et en tenant compte de la part de l'oxygène dans ces deux gaz) et correspondant donc à la quantité de O_2 rapporté au POC de l'échantillon. Enfin nous avons utilisé le rapport RC/POC qui correspond à la part de POC libéré pendant l'oxydation, ce ratio permet d'approcher le caractère réfractaire / labile des MOP. Plus ce ratio tend vers 1, plus les MOP sont considérées comme résistantes à la (bio)dégradation (nb : les principes de calculs sont donnés dans les publications de référence en début de paragraphe).

Extraction des lipides

En amont des analyses moléculaires, les lipides (molécules organiques) ont été extraits aux solvants organiques. Pour ce faire, 100-150 mg de matières en suspension préalablement lyophilisées (cf. protocole ci-dessus) ont été extraits 3 fois au bain à ultrasons avec un mélange dichlorométhane (DCM) : méthanol (MeOH) 5/1 (v/v). Le mélange ainsi obtenu a été séché à l'évaporateur rotatif. L'extrait lipidique total a ensuite été séparé en trois fractions de polarité croissante sur une colonne de silice (préalablement activée pendant 1 nuit à 150°C) en utilisant (i) 30 mL d'heptane, (ii) 30 mL d'un mélange heptane/DCM 1/4 et (iii) 30 mL d'un mélange DCM/MeOH 1/1. Chaque fraction a été concentrée à l'évaporateur rotatif, puis transférée dans un vial de 4 mL avec 1 mL d'un mélange DCM/MeOH 1/1.

Analyses moléculaires

Plusieurs familles de molécules, utilisées comme traceurs de sources des MO, ont ensuite été analysées : les *n*-alcanes (hydrocarbures à chaînes linéaires), présents dans la fraction apolaire (fraction 1 après séparation sur colonne de silice), analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ; les acides gras, alcools, stérols et stanols, présents dans la fraction polaire (fraction 3 après séparation sur colonne de silice), analysés par GC-MS ; les alkyl tetraéthers de glycérol également présents dans la fraction polaire et analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS). Les analyses GC-MS ont été réalisées sur un GC modèle TRACE 1310 couplé à un MS simple quadripôle modèle ISQ 7000 de Thermofisher Scientific. Les analyses HPLC-MS ont été réalisées sur un appareil Shimadzu LCMS-2020

Analyses des fractions apolaires par GC-MS

Pour les fractions apolaires, un aliquote (400 µL d'1 mL) a été concentré à sec dans un flacon avec insert de 200 µL, auxquels ont été ajoutés 60 µL de DCM/MeOH (5:1) et 10 µL de tetracosane deutéré à 116 µg/mL, utilisé comme standard interne. 1 µL d'échantillon est injecté en mode splitless à 280°C. Les molécules sont éluées par de l'hélium sur une colonne de 60 mètres (95 % diphényle polysiloxane/5 % diphényle ; 60 m x 0.25 mm ; avec une épaisseur de la phase stationnaire de 0,25 µm). Elle est située dans un four soumis à un programme de température. La température initiale est de 50°C puis elle augmente de 4°C par minute jusqu'à 320°C et est maintenue à 320°C pendant 30 minutes. Les molécules sont ionisées et fragmentées par ionisation électronique à 70 eV en sortie de colonne, puis détectées avec le quadripôle.

Analyse des fractions polaires par GC-MS

Pour les fractions polaires, 300 µL d'extrait lipidique ont été concentrés à sec dans un flacon avec insert de 200 µL. 48 µL de DCM et 2 µL de cholestane à 0,79 µg/mL (utilisé comme standard interne) ont ensuite été ajoutés à l'échantillon, ainsi que 50 µL d'agent silylant (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) qui permet de réduire la polarité des molécules constitutives de l'échantillon et d'augmenter leur volatilité). Le flacon est chauffé à 70 °C pendant 1h sur le passeur. 1 µL d'échantillon est ensuite injecté en mode split 30 mL/min à 280 °C. La séparation en GC est effectuée avec la même colonne que pour les fractions apolaires avec le programme de température suivant : la température initiale est de 70°C pendant deux minutes, et augmente de 20 °C/min jusqu'à 110 °C, puis de 4°C/min jusqu'à 320°C, température finale maintenue pendant 25 min.

Analyse des fractions polaires par HPLC-MS

Afin d'analyser les tetraéthers par HPLC-MS, 400 µL de la fraction polaire (initialement dans un mélange DCM/MeOH 5/1) ont été ajoutés dans un tube Eppendorf d'1,5 mL, puis séchés sous azote. 100 µL de n-heptane ont été ajoutés. L'échantillon est ensuite filtré et centrifugé et 90 µL sont placés dans un insert de 200 µL, auxquels ont été ajoutés 10 µL d'une solution de tétraéther synthétique en C46 à 0,01 mg/mL utilisé comme standard interne.

Les analyses HPLC-MS ont été réalisées avec deux colonnes Waters BEH Hilic (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) placées en série. Un gradient d'élution a été réalisé avec en voie A du n-hexane et en voie B un mélange de n-hexane/isopropanol (9:1). Le programme d'élution est le suivant : on commence avec une élution isocratique à 18 % en B pendant 25 minutes puis on augmente jusqu'à 35 % en B de manière linéaire en 25 minutes. On passe en 30 minutes à 100 % en B puis on diminue à 18 % en 4 minutes et on maintient cette composition pendant 50 minutes (134 minutes au total). Le débit est de 0,2 mL/min et la température du four de 30 °C. 30 µL d'échantillon sont injectés. Les molécules sont ionisées à l'aide d'une source APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique). La détection est réalisée en mode SIM (Single Ion Monitoring), dans lequel seules les masses sélectionnées sont analysées (Huguet et al., 2019). Les différents tétraéthers sont identifiés grâce à leur temps de rétention. Ils sont par la suite semi-quantifiés en intégrant l'aire du pic approprié par rapport à l'aire du standard, de concentration connue.

II.4. Le phytoplancton : distribution, composition, diversité

Analyses pigmentaires du phytoplancton par HPLC

La détermination de la composition algale et de leur concentration est faite par identification et quantification des pigments par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

Préparation des échantillons

Après prélèvement, les échantillons d'eau de surface sont filtrés sur des filtres GF-C de 1,2 µm. Un volume d'environ 200 mL à 1 L est filtré en fonction de la turbidité de l'échantillon, les filtres sont ensuite congelés à -80 °C. Pour l'extraction des pigments les filtres sont déchetés dans l'obscurité et dans la glace dans des tubes coniques de 15 mL à l'aide de pinces à filtres. Les tubes coniques sont ensuite conservés à -80 °C (si la suite de l'extraction n'est pas réalisée immédiatement). Ensuite, 5 mL d'un mélange de méthanol + 2 % acétate d'ammonium sont ajoutés dans chacun des échantillons, qui sont mis au sonicateur pendant 2 min, puis 15 min au congélateur à -20 °C. Cette étape est réalisée une seconde fois avant de filtrer le contenu de l'extraction dans des vials de 2 mL à l'aide de seringue de 1 mL et de filtres à seringue de porosité 0,2 µm, afin d'éliminer de l'échantillon d'éventuelles impuretés qui peuvent colmater les capillaires de l'HPLC.

Analyse HPLC

La concentration et la composition pigmentaire des échantillons est déterminée grâce à une analyse par HPLC à 405 nm, 450 nm, et 665 nm car la grande majorité des pigments phytoplanctoniques sont identifiables à ces longueurs d'ondes (Wright, 1991). Le programme d'élution utilisé est celui de (Barlow et al., 1996). Les chromatogrammes issus de cette analyse sont analysés à l'aide du logiciel HP ChemStation (version A, Agilent Technologies inc.). Les pigments phytoplanctoniques sont identifiés en fonction du temps de rétention, de la longueur d'onde et du spectre du pic obtenu sur le chromatogramme. La concentration en chlorophylle a est considérée comme mesure de la biomasse totale de phytoplancton (Stauber and Jeffrey, 1988). Pour les communautés les pigments marqueurs utilisés sont :

- Pour les diatomées: la Chlc, la fucoxanthine, la diadinoxanthine et la diatoxanthine (Stauber and Jeffrey, 1988; Roy, 2011).
- Pour les algues vertes: la lutéine, la zéaxanthine, la violaxanthine et la Chlb (Gieskes, 1988; Stauber and Jeffrey, 1988).
- Pour les cryptophycées: l'alloxanthine et la cantaxanthine (Pennington, 1985).

Calcul de la concentration en pigment

Afin d'estimer la concentration des différents pigments phytoplanctoniques, une calibration a été effectuée pour l'ensemble des pigments ce qui a permis de déterminer une limite de quantification et un coefficient de calibration pour chacun des pigments. Ainsi, on peut calculer la concentration des pigments phytoplanctoniques dans un échantillon d'eau filtré d'après l'Équation 1.

$$C = \left(\frac{A \times C_c \times V_{MeOH} \times 1000}{V_i} \right) \times \frac{1}{V_f}$$

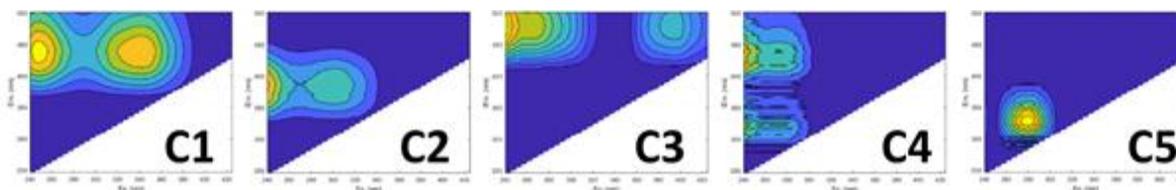
Équation 1 : Calcul de la concentration des pigments phytoplanctoniques. C = Concentration du pigment ($\mu\text{g/L}$) ; A = Aire du pic (mv/s) ; C_c = Coefficient de calibration ; V_{MeOH} = Volume de méthanol = 10 mL ; V_f = Volume filtré (mL) ; V_i = Volume injecté (mL).

II.5. Composition et distribution des MOD

Pour les 5 campagnes communes (juin et juillet 2019, septembre 2020, mai et juin 2021), les échantillons ont été prélevés à un mètre de la surface et un mètre du fond aux trois différentes phases de marées décrites à la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** du rapport puis filtrés sur filtres en fibre de verre (Whatman, GF/F, 0,7 μm) dans la journée au laboratoire comme décrit dans la partie I.2 de l'ANNEXE I.

Le protocole analytique pour la caractérisation des propriétés optiques des MOD est le même que celui décrit pour les campagnes bimestrielles dans la partie I.1.2.

L'analyse multivariée PARAFAC des spectres de fluorescence 3D des 130 échantillons des 5 campagnes communes a permis de déterminer un modèle à 5 composants, (Figure 4), expliquant 99,73 % de la variabilité de l'ensemble du jeu de données.



ANNEXE I Figure 4 : Spectres EEM des 5 composants (C1 à C5) déterminés par PARAFAC et expliquant l'ensemble du jeu de données des 130 échantillons prélevés au cours des 5 campagnes communes.

Mesure de la chlorophylle a:

Pour la mesure des concentrations en Chla, des échantillons d'eau de volume variable (en fonction de la charge en MES) sont filtrés avec un filtre Whatman, GF/F 47 mm, 0.7 μm en fibre de verre puis congelé (-20 °C) jusqu'au moment de l'analyse. Pour extraire les pigments 10 mL d'acétone à 90 % (v/v) au filtre puis laissés au noir à 4 °C pendant 12 h. Après cette période, les échantillons sont centrifugés deux fois à 1700 g pendant 5 minutes.

La concentration en Chla extraite est mesurée avec un fluorimètre Turner Designs (Sunnyvale, EU) selon la méthode de Strickland and Parsons, (1972) en suivant le protocole de référence du SNO SOMLIT (Service d'observation du Milieu Littoral).

Paramètres photosynthétiques

L'estimation de paramètres photosynthétiques a été réalisée comme indiqué précédemment pour les campagnes bimestrielles à l'aide d'un PAM-WALZ comme décrit dans Morelle et al (2018) et d'un Labstaf (Boatman et al., 2019). Cependant les mesures ont été effectuées sur des échantillons discrets prélevés en surface et au fond. Les mesures auraient dû se faire directement sur le bateau au moment de l'échantillonnage mais pour des questions de place à bord ces mesures n'ont pas pu avoir lieu. Les échantillons n'étant pas mesurés directement comme lors des campagnes in situ, une modification de la photobiologie des cellules peut se produire. Nous avons calculé, en utilisant les FLC, un indicateur de production potentielle de carbone ($\text{mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en estimant la quantité de carbone fixé pour une irradiance égale à E_k (coefficient de lumière saturante égale à $rETR_m/\alpha$).

TEP : Particules exopolymériques transparentes

Pour la mesure des TEP, les échantillons d'eau sont filtrés avec un filtre Millipore 0.4 μm en polycarbonate puis congelés ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) jusqu'à l'analyse. Selon Claquin et al., (2008) adapté de Passow and Alldredge, (1996), les filtres sont colorés avec une solution de bleu d'Alcian (0.02%) avec 0.06 % d'acide acétique (pH : 2.5). L'excès de bleu d'Alcian est rincé en ajoutant de l'eau puis passant le filtre à la centrifugeuse (3000 g, $19\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min). Ce cycle de rinçage est répété deux fois puis 6 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) 80% sont ajoutés. Après 2 heures d'incubation, les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre (Pharmacia Biotech Ultraspec 1000 Spectrophotometer) à 787 nm. La droite de calibration est réalisée en utilisant de la gomme xanthane (10-700 μg) comme standard. Les concentrations en TEP sont exprimées en "équivalent Xanthane" (eq. Xanthane) par unité de volume ou par Chla. La concentration de TEP est ensuite transformée en équivalent carbone en prenant un facteur de conversion de 0,45 g C g TEP eq. Xanthane.

EPS : Substances polymériques extracellulaires

La teneur en exopolysaccharides solubles dit « colloïdaux » (S-EPS) a été mesurée à l'aide de la méthode de Dubois (Dubois et al., 1956), le glucose étant le standard. Ainsi, après une filtration de 10 à 50 mL sur filtre GF/F, les filtrats ont été considérés comme contenant les S-EPS et ont été congelés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ pour une analyse ultérieure. En parallèle des S-EPS, des EPS liées (B-EPS) ont été extraits les filtres. Pour ce faire, les filtres ont été placés dans des tubes de centrifugation de 15 mL avec 12 mL d'eau MilliQ. Dans chaque tube, environ 1 g de résine cationique activée (Dowex Marathon C, Na^+ ; Sigma-Aldrich) est ajouté. Les tubes sont ensuite agités doucement pendant 1 heure à $4\text{ }^\circ\text{C}$ à l'obscurité, puis centrifugés à 3000 g à $4\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 10 minutes. Les surnageants ont été recueillis et conservés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ pour l'analyse ultérieure des B-EPS. Le dosage des S-EPS est réalisé sur 1 mL d'échantillon décongelé, alors que pour les B-EPS 1 mL d'eau MilliQ est ajouté au culot décongelé. Ensuite, pour les S-EPS et B-EPS, 1 mL de phénol à 5% et 5 mL d'acide sulfurique à 96% (Dubois et al., 1956) sont ajoutés à l'échantillon. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 45 min à température ambiante et les mesures sont réalisées avec un spectromètre (Ultraspec 1000, Pharmacia Biotech) à 485 nm. La concentration est exprimée en équivalent glucose. Les polysaccharides des EPS ont été ensuite convertis en carbone, en prenant un facteur de 0,4 g C / g de polysaccharide (Rouwenhorst et al., 1991).

II.6. Le zooplancton : composition, distribution et diversité (LEFE)

Échantillonnages

Pour évaluer la composition, l'abondance et la biomasse de la communauté zooplanctonique, 50 litres d'eau sont pompés en surface et au fond et filtrés sur un filet de 50 μm . A chaque échantillonnage, trois échantillons de plus grands volumes sont pris en plaçant un filet de 150 μm de vide de maille à contre-courant pendant 5 à 20 minutes afin de collecter un nombre suffisant d'organismes pour effectuer des mesures d'isotopie, de biométrie et de contenus stomacaux. Le zooplancton collecté est conservé dans de l'éthanol (70 % concentration finale) pour les abondances et dans le formol (4% concentration finale) pour la biométrie dans des pots plastique de 250 mL et transporté au laboratoire pour analyse. Les échantillons destinés aux analyses isotopiques et des contenus stomacaux sont conservés dans l'azote liquide.

Évaluation de la diversité, de l'abondance et des biomasses

En laboratoire, les crustacés (sauf stades nauplii) sont déterminés dans la mesure du possible à l'espèce et comptés à la loupe binoculaire par sous-échantillons successifs, jusqu'à atteindre au moins 200 individus pour un taxon. Les rotifères et nauplii sont dénombrés selon le même protocole mais sous microscope optique. L'abondance de chaque taxon est calculée en nombre d'individus par m^3 .

La biomasse en poids sec (*dry weight*) d'*Eurytemora affinis* est estimée distinctement pour les mâles, femelles et stades copépodites en utilisant les résultats du projet SENTINELLES (SENTINELLES, Souissi (coord) et al., 2021). Pour les autres espèces, des données de la littérature ont été utilisées (Tableau IV à VI).

Les valeurs (en $\mu\text{g DW/individu}$) sont répertoriées pour chaque taxons dans les tableaux IV à VI. Pour les crustacés (sauf stade nauplii), un facteur de conversion de 0.48 a été utilisé pour convertir le poids sec en poids carbone. Pour les autres taxons, des facteurs de conversion spécifiques retrouvés dans la littérature sont utilisés. Les poids sec et carbone de la population zooplanctonique sont calculés comme la somme des poids de tous les taxons.

ANNEXE I Tableau V : Calcul de la biomasse et du carbone des cladocères

Taxa			Individual weight (µg)			DW/WW conversion		Carbon ratio		
Name	Stage	Gender	Weight estimate	Type weight estimate	Source	DW %W W	Source	C% Weight type	Weight type	Source
<i>Acroperus angustatus</i>	Adult	Unknown	2.07	dry	according to Dumont, 1979			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Alona</i>	Adult	Unknown	1.37	dry	according to all species, Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Alona affinis</i>	Adult	Unknown	2.31	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Alona guttata</i>	Adult	Unknown	0.26	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016, for <i>Alona rectangulara</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Alona quadrangularis</i>	Adult	Unknown	1.18	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016, for <i>Alona rectangulara</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Alona rectangulara</i>	Adult	Unknown	0.81	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Bosmina coregoni</i>	Adult	Unknown	1.62	dry	according to Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Bosmina longirostris</i>	Adult	Unknown	1.62	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Ceriodaphnia</i>	Adult	Unknown	6.13	dry	according to Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Ceriodaphnia quadrangula</i>	Adult	Unknown	7.58	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Chydorus sphaericus</i>	Adult	Unknown	3.25	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Daphnia</i>	Adult	Unknown	10.6	dry	according to all species Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Daphnia cucullata</i>	Adult	Unknown	1.43	dry	according to weight/length ratio from Dumont et al., 1975 for <i>Daphnia galeata</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Daphnia galeata</i>	Adult	Unknown	10.32	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Daphnia longispina</i>	Adult	Unknown	6.5	dry	according to weight/length ratio from Dumont et al., 1975 for <i>Daphnia galeata</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Daphnia obtusa</i>	Adult	Unknown	5.1	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Daphnia pulex</i>	Adult	Unknown	3.88	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	Adult	Unknown	2.58	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Disparalona leei</i>	Adult	Unknown	1.65	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for <i>Acroperus harpae</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Disparalona rostrata</i>	Adult	Unknown	1.65	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for <i>Acroperus harpae</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Graptoleberis testudinaria</i>	Adult	Unknown	1.4	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Ilyocryptus agilis</i>	Adult	Unknown	4.77	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for <i>Macrothrix</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Ilyocryptus sordidus</i>	Adult	Unknown	3.7	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for <i>Macrothrix</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Leptodora kindtii</i>	Adult	Unknown	14.5	dry	Cummins et al., 1969			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Leydigia acanthocercoides</i>	Adult	Unknown	2	dry	estimation d'après Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Maina micrura</i>	Adult	Unknown	5.51	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Monaspilus dispar</i>	Adult	Unknown	6.14	wet	according to weight/length ratio from	0.1	Bottrell et al., 1976	0.08	wet	Bledzki and Rybak, 2016
<i>Phreatalona protzi</i>	Adult	Unknown	10.76	wet	according to weight/length ratio from	0.1	Bottrell et al., 1976	0.08	wet	Bledzki and Rybak, 2016
<i>Pleuroxus aduncus</i>	Adult	Unknown	3.08	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Scapholeberis mucronata</i>	Adult	Unknown	7.5	dry	Dumont et al., 1975			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied

ANNEXE I Tableau VI : Calcul de la biomasse et du carbone des copépodes

Taxa			Individual weight (µg)			Carbon ratio				
Name	Stage	Gender	Weight estimate	Type weight estimate	Source	C% Weight type	Weight type	Source		
<i>Acartia bifilosa inermis</i>	adult+ copepoditC5	mixte	3.98	dry	Uriarte et al., 1998			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
Calanoida	copepodit (C1-C4)	Unknown	1.18	dry	SENTINNELLES, Souissi et al., 2021			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Eudiaptomus gracilis</i>	adult+ copepoditC5	mixte	10.2	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Eurytemara affinis</i>	adult+ copepoditC5	female	7.6	dry	SENTINNELLES, Souissi et al., 2021			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Eurytemara affinis</i>	adult+ copepoditC5	male	5.46	dry	SENTINNELLES, Souissi et al., 2021			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Eurytemara velox</i>	adult+ copepoditC5	female	7.6	dry	SENTINNELLES, Souissi et al., 2021			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Eurytemara velox</i>	adult+ copepoditC5	male	5.46	dry	SENTINNELLES, Souissi et al., 2021			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Acanthocyclops americanus</i>	adult+ copepoditC5	mixte	2.58	dry	SARTRE, 2023. Weight measured in this studied			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
Cyclopoida	adult+ copepoditC5	Unknown	7.5	dry	overage according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for Cyclopoida			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
Cyclopoida	copepodit (C1-C4)	Unknown	1.18	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Cyclops</i>	adult+ copepoditC5	female	20.55	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for Cyclopoida			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Cyclops vicinus vicinus</i>	adult+ copepoditC5	mixte	20.55	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for Cyclopoida			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Haliencyclops rotundipes</i>	adult+ copepoditC5	male	1.73	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016 for Cyclopoida			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Mesocyclops leuckarti</i>	adult+ copepoditC5	female	7.2	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Mesocyclops leuckarti</i>	adult+ copepoditC5	mixte	7.2	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Oithona</i>	adult+ copepoditC5	male	1.21	dry	according to weight/length ratio from Bledzki & Rybak, 2016 for "Cyclopoida female without eggs"			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Paracyclops fimbriatus</i>	adult+ copepoditC5	female	3.6	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Thermocyclops crassus</i>	adult+ copepoditC5	mixte	3.35	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Thermocyclops oithonoides</i>	adult+ copepoditC5	mixte	3.63	dry	according to weight/length ratio from Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
Nauplii	Larva	Unknown	0.24	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.06	wet	Bledzki and Rybak, 2016
<i>Attheyella crassa</i>	adult+ copepoditC5	female	4.57	dry	according to weight/length ratio from Goodman, 1980			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
Ectinosomatidae	adult+ copepoditC5	Unknown	0.17	dry	according to weight/length ratio from Ara, 2001			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Epaotaphanes richardi</i>	adult+ copepoditC5	Unknown	0.26	dry	according to weight/length ratio from Ara, 2001			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Halectinossoma</i>	adult+ copepoditC5	Unknown	2.69	dry	according to espece H carticorne			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Halectinossoma curticarne</i>	adult+ copepoditC5	mixte	2.69	dry	according to weight/length ratio from Goodman, 1980			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
Harpacticoida	adult+ copepoditC5	mixte	2.22	dry	according to weight/length ratio from Goodman, 1980 for <i>Nitokra hibernica</i>			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
Harpacticoida	copepodit (C1-C4)	Unknown	1.18	dry	Bledzki and Rybak, 2016			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Nannapus</i>	adult+ copepoditC5	mixte	3.65	dry	according to weight/length ratio from Goodman, 1980			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Nitokra hibernica</i>	adult+ copepoditC5	mixte	2.22	dry	according to weight/length ratio from Goodman, 1980			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied
<i>Tachidius discipes</i>	adult+ copepoditC5	mixte	2.34	dry	Goodman, 1980			0.48	dry	SARTRE, 2023. Ratio measured in this studied

ANNEXE I Tableau VII : Calcul de la biomasse et du carbone des rotifères

Taxa			Individual weight (µg)			DW/WW conversion		Carbon ratio		
Name	Stage	Gender	Weight estimate	Type weight estimate	Source	DW %WW	Source	C% Weight type	Weight type	Source
<i>Asplanchna brightwellii</i>	Adult	Unknown	160.93	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.039	Dumont et al, 1975	0.0055	wet	according to Telesh et al., 1998, for <i>A. priodonta</i>
<i>Asplanchna priodonta</i>	Adult	Unknown	19.69	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.039	according to Dumont et al., 1975	0.0055	wet	Telesh et al., 1998
<i>Bdelloidea</i>	Adult	Unknown	1.1	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998.	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Brachionus</i>	Adult	Unknown	2.05	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Brachionus angularis</i>	Adult	Unknown	0.52	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Brachionus bidentatus</i>	Adult	Unknown	2.05	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Brachionus calyciflorus</i>	Adult	Unknown	2.2	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Brachionus rubens</i>	Adult	Unknown	2.05	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Brachionus urceolaris</i>	Adult	Unknown	2.7	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Cephalodella</i>	Adult	Unknown	0.8	wet	Ejmont-Karabin, 1998 (C. gibba)	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Dicranophoridae</i>	Adult	Unknown	0.95	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Dicranophorus epicharis</i>	Adult	Unknown	0.83	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Encentrum</i>	Adult	Unknown	0.39	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Epiphanes</i>	Adult	Unknown	22.06	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Euchlanis</i>	Adult	Unknown	1.75	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Euchlanis dilatata</i>	Adult	Unknown	1.75	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Filinia</i>	Adult	Unknown	0.49	wet	according to especes	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Keratella cochlearis</i>	Adult	Unknown	0.11	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Keratella quadrata</i>	Adult	Unknown	0.85	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Lecane</i>	Adult	Unknown	0.23	wet	according to les especes	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Lecane bulla</i>	Adult	Unknown	0.39	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Lecane closteroerca</i>	Adult	Unknown	0.1	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Lecane hamata</i>	Adult	Unknown	0.12	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Lecane tenuiseta</i>	Adult	Unknown	0.08	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Lepadella</i>	Adult	Unknown	0.23	dry	according to Dumont, 1975			0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Monogononta</i>	Adult	Unknown	0.39	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998 pour <i>Encentrum</i> spp	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Monommata</i>	Adult	Unknown	0.74	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Mytilina</i>	Adult	Unknown	0.67	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Nathalco squamula</i>	Adult	Unknown	0.3	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Notommatidae</i>	Adult	Unknown	1.79	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Polyarthra</i>	Adult	Unknown	0.62	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Pompholyx sulcata</i>	Adult	Unknown	0.24	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Praedidae</i>	Adult	Unknown	0.8	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Rotaria</i>	Adult	Unknown	0.48	dry	overage according to Dumont et al., 1975 and Bottrell et al., 1976			0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Rotaria neptunia</i>	Adult	Unknown	0.75	dry	Dumont et al., 1975			0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Synchaeta</i>	Adult	Unknown	1.18	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Synchaeta bicornis</i>	Adult	Unknown	0.59	wet	according to Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Trichaerca pusilla</i>	Adult	Unknown	0.11	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Trichaerca tenuiar</i>	Adult	Unknown	0.17	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Trichotria pacillum</i>	Adult	Unknown	0.58	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)
<i>Trichotria tetractis</i>	Adult	Unknown	0.73	wet	Ejmont-Karabin, 1998	0.1	Doohan 1973, according to Bottrell et al. 1976	0.075	wet	in Telesh et al., 1998 according to Latja & Salonen (1978)

II.7. Le suprabenthos : composition, distribution et diversité

Échantillonnages

Pour le suprabenthos, un total de cinq campagnes a été réalisé dans le cadre du projet SARTRE. Celles-ci ont été retenues afin d'être les plus représentatives de l'ensemble des saisons. Ainsi, les échantillonnages de juin, juillet 2019 et septembre 2020 correspondent respectivement au début, milieu et la fin de l'été, mars 2021 l'échance de l'hiver et mai 2021 le commencement du printemps. Les échantillonnages ont tous étaient réalisés dans des conditions marégraphiques similaires, durant l'étape et le flot de la marée, avec un coefficient moyen (compris entre 71 et 87). En parallèle des prélèvements, les paramètres abiotiques du milieu (température, salinité, oxygénation, turbidité) ont été mesurés avec une sonde CTD Sea-bird®. Le suprabenthos a été collecté à l'aide d'un traîneau suprabenthique monté sur deux patins, l'élevant de 10 cm au-dessus du substrat. Un filet d'un maillage de 500 µm et de 30x60 cm d'ouverture a été ajusté sur ce traîneau. Le temps de contact entre le substrat et le collecteur était de 3x5 minutes pour la diversité et de 15 minutes pour l'isotopie, pour une vitesse d'environ 1,5 nœud marin. Un volucompteur associé au dispositif permettait de déterminer le volume d'eau filtré. Une fois récoltés, les individus ont été rincés et stockés dans de l'éthanol à 70 % (pour l'étude de la diversité) ou congelés à -18 °C (isotopie).

Évaluation de la diversité, de l'abondance et des biomasses suprabenthiques

Les organismes ont ensuite été triés, dénombrés et identifiés jusqu'à l'espèce lorsqu'une telle précision était possible. Autrement, les identifications s'arrêtaient au genre, toutes ayant été réalisées à l'aide de clés de détermination (Tattersall and Tattersall, 1951; Lincoln, 1979; Hayward and Ryland, 1990; Smaldon et al., 1993). La richesse taxonomique (nombre total de taxa par station) ainsi que l'abondance (nombre d'organismes pour 100 m³ d'eau) des organismes suprabenthiques pour chaque station et chaque date ont ainsi pu être évaluées. La

biomasse des organismes (pour 100 m³) aux différentes dates et stations a été obtenue à partir de la mesure du Poids Sec Libre de Cendre (PSLC), souvent décrite comme étant l'indicateur le plus approprié pour évaluer la biomasse (Stirn, 1981). Ainsi, les individus (de chaque espèce) ont été séchés à 60°C pendant 24h, refroidis à température ambiante dans un dessiccateur puis pesés avec une balance de précision Mettler® AE200 (détermination du poids sec - PS). Ensuite, les échantillons ont été calcinés à 500°C pendant 5h dans un four de laboratoire (Nabertherm® B180). Consécutivement, les cendres résultantes ont été refroidies à 60°C dans le four éteint, puis dans un dessiccateur jusqu'à atteindre la température ambiante. La masse a de nouveau été mesurée (détermination du poids de cendre - PC), permettant alors de déterminer la biomasse avec la formule présentée ci-dessous, calculée à partir du PSLC pour 100m³ d'eau (Mouny et al., 2000; Pezy et al., 2017).

$$Biomasse = \frac{(PS-PC)}{V} \times 100$$

Traitements des résultats et statistique

Des ANOVA ont été réalisées afin de tester l'effet du site d'échantillonnage et de la date sur la diversité spécifique, l'abondance et la biomasse des organismes prélevés. Les conditions d'applications de l'ANOVA (*i.e.* homoscedasticité des variances et normalité des données) ont été vérifiées avec des tests statistiques adaptés (test de Bartlett et Shapiro-Wilk respectivement). Les ANOVA significatives ont été suivies d'un test post-hoc (test HSD de Tukey) dans le but de déterminer précisément quelles stations ou dates présentaient des différences significatives d'abondance, de biomasse ou de diversité. Si les conditions d'applications ne pouvaient pas être vérifiées, une transformation en logarithme décimal (log₁₀) a alors été effectuée. Si celle-ci s'avérait insuffisante, un test de Kruskal-Wallis (KW) suivi d'un test de Dunn ont alors été appliqués. Tous les tests statistiques ont été effectués sur le logiciel R.

II.8. Le fonctionnement trophique

Quantification de l'activité de broutage du zooplancton : Méthode de contenu pigmentaire intestinal

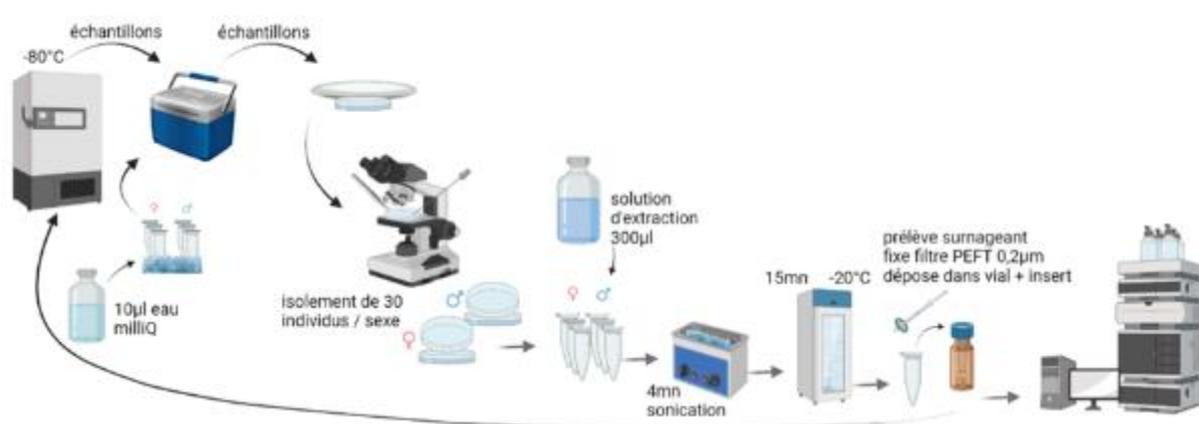
Sur les stations estuariennes, les contenus pigmentaires intestinaux des organismes dominants (*E. affinis* pour Tancarville, Caudebec-en-Caux et Val-des-Leux, un mélange de copépodes et cladocères pour Oissel) ont été quantifiés par HPLC.

Préparations des échantillons

Les échantillons sont prélevés à l'aide d'un filet de 150 µm de maille et sont congelés à -80°C sous forme de morceaux de boues/sédiments (cf. II.5). Une fois au laboratoire les individus adultes de l'espèce *Eurytemora affinis* sont triés à l'exception de la station en amont Oissel où la proportion d'*E. affinis* dans la population était trop faible pour isoler suffisamment d'individus. Dans ces échantillons, les 30 premiers individus rencontrés ont été identifiés au genre ou à l'espèce et isolés. Afin de pouvoir comparer avec les expériences d'incubations du projet GPMR, les individus ont été différenciés par sexe lorsqu'il s'agissait d'*E. affinis*. Dans ce cas 30 mâles et 30 femelles sont isolés, nous avons considéré la moyenne pour les résultats SARTRE.

Des sous échantillons sont décongelés et rincés à l'eau milliQ froide. Cette eau est ensuite prélevée au fur à mesure dans un verre de montre placé sous un loupe binoculaire où les individus sont triés à l'aide de pique-

aiguille. Les individus triés sont ainsi placés dans une plaque en verre à cavité et remplie d'eau milliQ. Ces différentes étapes permettent de se débarrasser des particules ou matières supplémentaires. 3 répliques de 30 individus sont réalisés et placés dans des tubes Eppendorf contenant 10µl d'eau milliQ. Pour le maintien au froid, les verres de montre sont posés dans de la glace pilée elle-même posée sur des boîtes de pétri réfrigérantes et les tubes Eppendorf conservés dans la glace. Les pigments sont ensuite extraits sur ultrasons durant 4 minutes par sonicateur après ajout de 300 µL de méthanol 98 % (2 % d'acétate d'ammonium 1M) et mis 15 minutes à -20 °C. Toutes ces étapes constituant le tri et l'extraction sont réalisées dans l'obscurité afin d'éviter toute dégradation des échantillons. La solution pigmentaire finale sera obtenue après filtration (filtre seringue PTFE 0,2 µm) dans des vials avec inserts et analysée par HPLC (Fig. 5). Le détail de l'analyse HPLC est précisé dans la partie II.3.



ANNEXE I Figure 5 : Schéma explicatif du protocole GUT (exemple d'échantillons provenant d'incubation)

Calcul de l'ingestion de la population zooplanctonique

A partir des taux d'ingestion de la Chla et de ses produits de dégradation (phéopigments), des rations journalières (*daily ration*, DR) exprimé en carbone ont été calculé à l'aide des biomasses mesurées dans le projet SENTINELLES (SENTINELLES, Souissi (coord) et al., 2021) pour *E. affinis* et la littérature pour les autres espèces. En appliquant ces DRs sur la biomasse zooplanctonique, l'ingestion de la communauté zooplanctonique a été estimée et exprimée en % par jour de la biomasse phytoplanctonique et de la production primaire maximale à chaque échantillonnage.

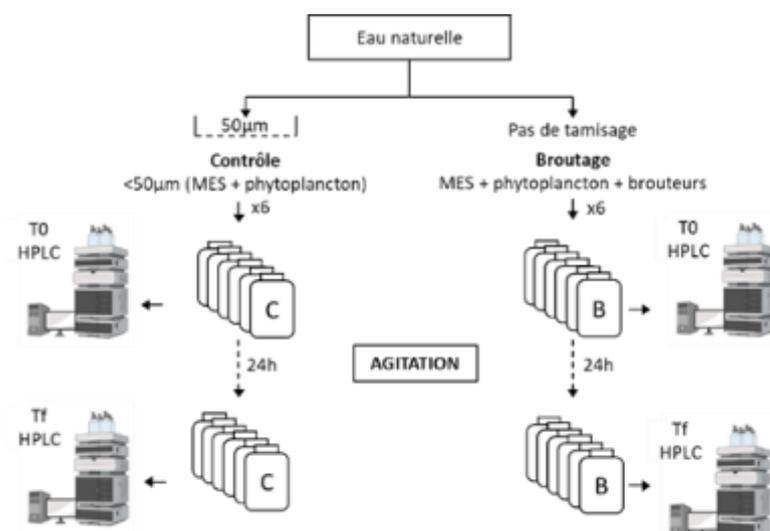
Quantification de l'activité de broutage du zooplancton : expériences d'incubation

L'activité de broutage a été quantifiée pour les stations Caudebec-en-Caux, Val-des-Leux et Oissel.

Préparation des échantillons

A chaque station, 30 litres d'eau naturelle sont pris en surface pendant le premier échantillonnage (A). La moitié de l'eau naturelle collectée est filtrée sur un tamis de 50 ou 70 µm pour exclure le zooplancton. Cette eau constitue le contrôle. Le reste de l'eau n'est pas filtrée, elle contient le zooplancton et permet de mesurer l'activité de broutage (Fig 6). Six bouteilles de 1 L en polycarbonate sont remplies jusqu'à 900 mL pour la condition contrôle et six autres pour la condition broutage et insérées dans un incubateur qui effectue une rotation. De l'eau de chacune des bouteilles est filtrée sur des filtres en fibre de verre GF/C au début de l'expérience (t_0) et à la fin après

24h d'incubation (tf). Les filtres sont ensuite stockés dans de l'azote liquide pour de futures analyses HPLC. Le détail de l'analyse HPLC est précisé dans la partie II.3.



ANNEXE I Figure 6 : Schéma des expériences d'incubation.

Calcul du grazing

A base des concentrations obtenues, les taux de broutage (Équation 2) et le taux de croissance du phytoplancton (Équation 3) sont calculés pour la chlorophylle *a* et pour chaque pigment marqueur ainsi que pour la somme des pigments marqueurs de groupes de phytoplancton. En analysant les valeurs de *g* sur les différents pigments marqueurs, on obtient une indication de la sélectivité du broutage: une valeur de *g* supérieure sur un des groupes de pigments marqueurs que pour les autres ou pour la Chl_a, représente une ingestion disproportionnée des algues caractérisées par ce(s) marqueur(s).

$$g = \frac{1}{t} \times \ln \frac{\bar{C}_t}{C_{zt}}$$

Équation 2 : Calcul du taux de broutage moyen. \bar{C}_t = Concentration moyenne du pigment dans les bouteilles contrôles à la fin de l'expérience ; C_{zt} = Concentration du pigment dans chaque bouteille broutage ; t = durée d'incubation en jours.

$$\bar{k} = \frac{1}{t} \times \ln \frac{\bar{C}_t}{C_0}$$

Équation 3 : Calcul du taux de croissance moyen. \bar{C}_t = Concentration moyenne du pigment dans les bouteilles contrôles à la fin de l'expérience ; t = durée d'incubation en jours ; C_0 = Concentration moyenne du pigment dans toutes les bouteilles au début de l'expérience.

Dans le cas où les concentrations des pigments des bouteilles contrôles et broutages sont différentes à t_0 alors g est calculé avec un théorique (Équation 4).

$$\bar{C}_t \text{ théorique} = \bar{C}_t \times e^{(k-g)t}$$

Équation 4 : Calcul de la concentration moyenne en pigment théorique.

La comparaison du taux de croissance du phytoplancton sans broutage (k) avec celui avec broutage (k-g) permet de voir si l'activité du zooplancton diminue la croissance du phytoplancton ou au contraire la renforce.

Contenus stomacaux du suprabenthos

Les amphipodes ont été plongés dans du liquide de Hertwig (pendant 3 à 4h à 62°C), correspondant à un milieu de Hoyer modifié (contenant 270 g d'hydrate de chloral, 19 mL d'acide chlorhydrique à 1N, 150 mL d'eau distillée et 60 mL de glycérine). Il a été à de nombreuses reprises décrit comme étant idéal pour l'étude des contenus stomacaux de ces organismes (Bello and Cabrera, 1999; Torrecilla Roca and Guerra García, 2012; Navarro-barranco et al., 2013; Vázquez-Luis et al., 2013; Guerra-garcía et al., 2014; Terrón-Siglera et al., 2016), permettant en effet de rendre la cuticule transparente, mais aussi moins rigide, facilitant ainsi les dissections. Toutefois, un tel protocole n'a, à notre connaissance, jamais été employé pour l'analyse des contenus stomacaux des mysidacés et des décapodes. Cette démarche exploratoire a donc été initiée dans le cadre du projet SARTRE. Une fois transparents, les individus ont été disséqués sous loupe binoculaire dans de la glycérine, et leur pourcentage de remplissage (%) a été estimé à partir de la formule présentée ci-dessous.

$$\% \text{ remplissage} = \frac{\text{longueur (ou surface) pleine de l'estomac}}{\text{longueur (ou surface) totale de l'estomac}}$$

Les observations des contenus stomacaux ont été effectuées au grossissement x100 sous un microscope optique Olympus® BX43. Celles-ci ont permis de calculer, pour chaque catégorie de composants (*i.e.* détrit, détrit macrophytiques, proies animales, proies végétales et pollen), la proportion relative de chacun d'eux au sein d'un estomac. Pour cela, la surface de chacun d'eux a été mesurée à l'aide d'un oculaire micrométrique, au grossissement x200, et ce sur 10 réplicats. En complément, les contenus stomacaux ont aussi été observés en microscopie électronique à balayage afin d'affirmer ou d'infirmer les observations faites en microscopie optique. Pour cela, les échantillons ont été placés dans de l'eau distillée puis filtrés sur un filtre d'une porosité de 0,2 µm. Ils ont ensuite été métallisés (carbone palladium) puis observé directement sous un Zeiss® EVO40 sur la plateforme MEB de la FR SCALE du M2C de Rouen. Les résultats des analyses des contenus stomacaux ont été statistiquement traités d'une manière similaire à celle employée pour les abondances et biomasses (*i.e.* ANOVA puis HSD de Tukey ou Kruskal-Wallis puis Dunn).

Analyses isotopiques

La composition en carbone (¹³C) et en azote (¹⁵N) ont été analysées pour les MOP, le mésozooplancton et le suprabenthos. La méthodologie pour les MOP est explicitée en 1.2.1.

Analyses isotopiques du zooplancton (Kling et al., 1992; Smyntek et al., 2007)

Au laboratoire, pour éviter toute contamination, l'ensemble du matériel est nettoyé à l'éthanol et le manipulateur porte une blouse en coton ainsi que des gants non poudrés. Du papier d'essuyage ne donnant pas de fibres est également utilisé (Kimwipes).

3 répliques par échantillon sont réalisés. Des sous échantillons sont décongelés dans des verres de montres et rincés dans de l'eau milliQ. Cette eau sert ensuite à l'isolement des individus sous loupe binoculaire. Afin d'obtenir un poids sec au moins égal à 0,5 mg environ une centaine d'individus copépodes/cladocères adultes sont prélevés. Les individus isolés sont déposés dans un verre de montre avec de l'eau milliQ pour enlever toutes les matières restantes, ils sont ensuite introduits dans des capsules en étain pré-pesés de 4 x 6 mm. 10 µl d'eau milliQ peuvent être déposés au préalable dans les capsules pour faciliter l'introduction des individus.

Les capsules sont refermées de sorte à former des boules de 3mm au maximum et placées dans une plaque 96 puits recouverte d'aluminium pour être congelées à -80 °C. Enfin les échantillons sont lyophilisés à -55 °C pendant au moins 24h, puis pesés. Les échantillons ont été conservés dans un dessiccateur sous vide à température ambiante le temps de l'envoi vers les plateformes d'analyses ALYES (IRD Bondy).

Analyses isotopiques du suprabenthos

Les échantillons ont été décongelés et rincés avec de l'eau distillée. Les têtes et queues des organismes, ainsi que les parties carbonatées (e.g. cuticules, arêtes ...) ont été ôtées lorsque la taille et la robustesse de l'individu le permettaient. Dès que possible, les échantillons étaient replacés à -20°C afin de limiter le développement microbien. Ils ont ensuite été lyophilisés pendant 24h à -62,3°C dans un Virtis® BenchTop 4K Freeze Dryer, puis broyés dans un vibro-broyeur Retsch® MM400. Les poudres obtenues ont alors été décarbonatées par ajout de quelques gouttes de HCl à 1N jusqu'à ce que l'effervescence cesse, puis séchées à 62°C. Le broyat ainsi formé a par la suite été encapsulé dans des capsules en étain. Les signatures isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ ont ensuite été mesurées à l'aide d'un analyseur élémentaire EuroVector® EA3000, couplé à un spectromètre de masse Elemental® IsoPrime au PLATeau d'Isotopie de Normandie (PLATIN, SFR ICORE) de Caen. Les standards de l'azote et du carbone étaient, respectivement, le diazote atmosphérique et le carbone de Belemnite de Pee Dee (PDB). Les signatures isotopiques ont été statistiquement traitées d'une manière similaire à celle employée pour les abondances et biomasses (i.e. ANOVA puis HSD de Tukey ou Kruskal-Wallis puis Dunn). En complément, un modèle de mixage isotopique utilisant la méthode de Monte-Carlo par chaînes de Markov (500 000 itérations) a été appliqué sur les données isotopiques des grands représentants du suprabenthos (*Palaemon longirostris* et *Pomatoschistus* spp.) afin de déterminer les probabilités de contribution des sources suprabenthiques, du zooplancton et des matières organiques au régime alimentaire de ces organismes. L'ensemble de ces analyses ont été réalisées sur R, en utilisant le package MixSIAR (Stock et al., 2018).

BIBLIOGRAPHIE

- Aminot A, Kérouel R** (2007) Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu, Quae.
- Ara, K.** (2001). Length-weight relationships and chemical content of the planktonic copepods in the Canan beta a Lagoon estuarine system, Sao Paulo, Brazil. *Plankton Biology and Ecology*, **48**(2), 121-127.
- Baker A, Tipping E, Thacker SA, Gondar D** (2008) Relating dissolved organic matter fluorescence and functional properties. *Chemosphere* **73**: 1765–1772
- Barlow R, Cummings D, Gibb S** (1996) Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls a and b and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. *Mar Ecol Prog Ser* **161**: 303–307
- Baudin F, Disnar J, Aboussou A, Savignac F** (2015) Guidelines for Rock-Eval analysis of recent marine sediments. *Org Geochem* **86**: 71–80
- Bello CL, Cabrera MI** (1999) Uso de la técnica microhistol gica de Cavender y Hansen en la identificación de insectos acu ticos. *Boletín Entomol Venez* **14**: 77–79
- Bianchi TS, Cook RL, Michael PE, Kolic PE, Green N, Zhang Y, Smith RW, Kolker AS, Ameen A, King G, et al** (2011) Impacts of diverted freshwater on dissolved organic matter and microbial communities in Barataria Bay, Louisiana, U.S.A. *Mar Environ Res* **72**: 248–257
- Bledzki, LA, Rybak, JI** (2016). Zooplankton de crustacés d’eau douce d’Europe: Cladocera & Copepoda (Calanoida, Cyclopoida) Clé de l’identification des espèces, avec des notes sur l’écologie, la distribution, les méthodes et l’introduction   l’analyse des données. Springer.
- Boatman TG, Geider RJ, Oxborough K** (2019) Improving the Accuracy of Single Turnover Active Fluorometry (STAF) for the Estimation of Phytoplankton Primary Productivity (PhytoPP). *Front Mar Sci* **6**: 319
- Bottrell, H. C.** (1976). Un examen de certains problèmes dans les  tudes de production de zooplancton. *Norw J Zool*, **24**, 419-456.
- Canuel EA, Hardison AK** (2016) Sources, Ages, and Alteration of Organic Matter in Estuaries. *Exam Annu des Sci la mer* **8**: 409–434
- Carstea EM, Baker A, Bieroza M, Reynolds D** (2010) Continuous fluorescence excitation–emission matrix monitoring of river organic matter. *Water Res* **44**: 5356–5366.
- Chen J, Gu B, LeBoeuf EJ, Pan H, Dai S** (2002) Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* **28**: 1853–1858
- Chin YP, Aiken GR, O’Loughlin E** (1994) Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environ Sci Technol* **28**: 1853–1858
- Claquin P, Probert I, Lefebvre S, Veron B** (2008) Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquat Microb Ecol* **51**: 1–11
- Coble PG** (2007) Marine Optical Biogeochemistry: The Chemistry of Ocean Color. *Chem Rev* **107**: 402–418
- Cummins KW, Costa RR, Rowe RE, Moshiri GA, Scanlon RM, Zajdel RK** (1969). Ecological energetics of a natural population of the predaceous zooplankter *Leptodora kindtii* Focke (Cladocera). *Oikos*, 189-223.

- Doohan, M.** (1973). Énergétique des rotifères planctoniques appliquée aux populations dans les réservoirs. Université de Londres, Royal Holloway College (Royaume-Uni).
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**: 350–356
- Dumont, H. J, Van de Velde, I, Dumont, S.** (1975). The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, **19**(1), 75-97.
- Dumont, H. J, Laureys, P, Pensaert, J.** (1979). Anostraca, conchostraca, cladocères et copépodes de Tunisie. *Hydrobiologia*, **66**, 259-274.
- Ejarque E, Freixa A, Vazquez E, Guarch A, Amalfitano S, Fazi S, Romaníe AM, Butturini A** (2017) Quality and reactivity of dissolved organic matter in a Mediterranean river across hydrological and spatial gradients. *Sci Total Environ* **599–600**: 1802–1812
- Ejsmont-Karabin, J.** (1998). Empirical equations for biomass calculation of planktonic rotifers. *Polskie Archiwum Hydrobiologii/Polish Archives of Hydrobiology*, **45**(4), 513-522.
- Espitalié J, Deroo G, Marquis F** (1985) La pyrolyse Rock-Eval et ses applications. Deuxième partie. *Revue de l'Institut français du Pétrole*. Deuxième partie *Rev l'Institut français du Pétrole* **40**: 755–784
- Fellman JB, Hood E, Edwards RT, D'Amore D V** (2009) Changes in the concentration, biodegradability, and fluorescent properties of dissolved organic matter during stormflows in coastal temperate watersheds. *J Geophys Res Biogeosciences* **114**: G01021
- Fellman JB, Hood E, Spencer RGM** (2010) Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnol Oceanogr* **55**: 2452–2462
- Fichot CG, Benner R** (2012) The spectral slope coefficient of chromophoric dissolved organic matter (S 275-295) as a tracer of terrigenous dissolved organic carbon in river-influenced ocean margins. *Limnol Oceanogr* **57**: 1453–1466
- Fichot CG, Benner R, Kaiser K, Shen Y, Amon RMW, Ogawa H, Lu J** (2016) Predicting Dissolved Lignin Phenol Concentrations in the Coastal Ocean from Chromophoric Dissolved Organic Matter (CDOM) Absorption Coefficients. *Front Mar Sci* **3**: 7
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Gen Subj* **900**: 87–92
- Giancoli Barreto SR, Nozaki J, Barreto WJ** (2003) Origin of Dissolved Organic Carbon Studied by UV-vis Spectroscopy. *Acta Hydrochim Hydrobiol* **31**: 513–518
- Gieskes WWC** (1988) Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the banda sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints. *Netherlands J Sea Res* **22**: 123–137
- Goodman, K. S.** (1980). The estimation of individual dry weight and standing crop of harpacticoid copepods. *Hydrobiologia*, **72**, 253-259.
- Guarch-Ribot A, Butturini A** (2016) Hydrological conditions regulate dissolved organic matter quality in an intermittent headwater stream. From drought to storm analysis. *Sci Total Environ* **571**: 1358–1369
- Guerra-garcía JM, Figueroa JMT, De Navarro-barranco C, Ros M** (2014) Dietary analysis of the marine Amphipoda (Crustacea: Peracarida) from the Iberian Peninsula. *J Sea Res* **85**: 508–517
- Hansen AM, Kraus TE, Pellerin BA, Fleck JA, Downing BD, Bergamaschi BA** (2016) Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic

- degradation. *Limnol Oceanogr* **61**: 1015–1032
- Hayward PJ, Ryland JS** (1990) Handbook of the marine fauna of North-West Europe.
- Haywood BJ, White JR, Cook RL** (2018) Investigation of an early season river flood pulse: Carbon cycling in a subtropical estuary. *Sci Total Environ* **635**: 867–877
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor, Elizabeth C, Kieber DJ, Mopper K** (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* **53**: 955–969
- Hernes PJ, Benner R** (2003) Photochemical and microbial degradation of dissolved lignin phenols: Implications for the fate of terrigenous dissolved organic matter in marine environments. *J Geophys Res Ocean* **108**: C9
- Hernes PJ, Spencer RGM, Dyda RY, Pellerin BA, Bachand PAM, Bergamaschi BA** (2008) The role of hydrologic regimes on dissolved organic carbon composition in an agricultural watershed. *Geochim Cosmochim Acta* **72**: 5266–5277
- Huguet A, Coffinet S, Roussel A, Gayraud F, Anquetil C, Bergonzini L, Bonanomi G, Williamson D, Majule A, Derenne S, et al** (2019) Evaluation of 3-hydroxy fatty acids as a pH and temperature proxy in soils from temperate and tropical altitudinal gradients. *Geol Ultraiectina*. doi: doi.org/10.1016/j.orggeochem.2019.01.002
- Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond, JM, Parlanti E** (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org Geochem* **40**: 706–719
- Jaffé R, Boyer JN, Lu X, Maie N, Yang C, Scully NM, Mock S** (2004) Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove-dominated estuary by fluorescence analysis. *Mar Chem* **84**: 195–210
- Jaffé R, Cawley KM, Yamashita Y** (2014) Applications of Excitation Emission Matrix Fluorescence with Parallel Factor Analysis (EEM-PARAFAC) in Assessing Environmental Dynamics of Natural Dissolved Organic Matter (DOM) in Aquatic Environments: A Review. in ACS Symposium Series (ed. Rosario-Ortiz. Am Chem Soc **1160**: 27–73
- Kling GW, Fry B, Brien WJO** (1992) Stable Isotopes and Planktonic Trophic Structure in Arctic Lakes. *Wiley Intersci* **73**: 561–566
- Kolber ZS, Prášil O, Falkowski, PG** (1998). Mesures de la fluorescence variable de la chlorophylle à l'aide de techniques de taux de répétition rapide: définition de la méthodologie et des protocoles expérimentaux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1367**(1-3), 88-106.
- Lablicate** (2023) OpenFluor. 1
- Lafargue E, Marquis F, Pillot D** (1998) Rock-Eval 6 Applications in Hydrocarbon Exploration, Production, and Soil Contamination Studies. *Rev l'institut français du pétrole* **53**: 421–437
- Lee M-H, Osburn CL, Shin K-H, Hur J** (2018) New insight into the applicability of spectroscopic indices for dissolved organic matter (DOM) source discrimination in aquatic systems affected by biogeochemical processes. *Water Res* **147**: 164–176
- Li P, Hur J** (2017) Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol* **47**: 131–154
- Lincoln RJ** (1979) British Marine Amphipoda: Gammaridea.
- Matilainen A, Gjessing ET, Lahtinen T, Hed L, Bhatnagar A, Sillanpää M** (2011) An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere* **83**: 1431–1442
- McKnight DM, Boyer EW, Westerhoff PK, Doran PT, Kulbe T, Andersen DT** (2001)

- Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol Oceanogr* **46**: 38–48
- Minor EC, Swenson MM, Mattson BM, Oyler AR** (2014) Structural characterization of dissolved organic matter: a review of current techniques for isolation and analysis. *Environ Sci Process impacts* **16**: 2064–2079
- Morelle J, Schapira M, Françoise S, Courtay G, Orvain F, Clauquin P** (2018) Dynamics of exopolymeric carbon pools in relation with phytoplankton succession along the salinity gradient of a temperate estuary (France). *Estuar Coast Shelf Sci* **209**: 18–29
- Mouny P, Dauvin JC, Zouhiri S** (2000) Benthic boundary layer fauna from the seine estuary (eastern English Channel, France): Spatial distribution and seasonal changes. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* **80**: 959–968
- Murphy KR, Stedmon CA, Wenig P, Bro R** (2014) OpenFluor– an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Anal Methods* **6**: 658–661
- Navarro-barranco C, Tierno-de-figueroa JM, Guerra-garcía JM, Sánchez-tocino L, García-gómez JC** (2013) Feeding habits of amphipods (Crustacea: Malacostraca) from shallow soft bottom communities: Comparison between marine caves and open habitats. *J Sea Res* **78**: 1–7
- Omanovic D** TreatEEM. <https://sites.google.com/site/daromasoft/home/treateem>
- Oriol L, Garcia N, Cariou T, Ferreira S, Jolly O** (2014) Dosage de l'azote ammoniacal en milieu marin par fluorimétrie. *SOMLIT* 1–14
- Osburn CL, Boyd T, Montgomery MT, Bianchi TS, Coffin RB, Paerl HW** (2016) Optical Proxies for Terrestrial Dissolved Organic Matter in Estuaries and Coastal Waters. *Front Mar Sci* **2**: 127
- Oxborough K, Moore CM, Suggett DJ, Lawson T, Chan HG, Geider RJ** (2012) Direct estimation of functional PSII reaction center concentration and PSII electron flux on a volume basis : a new approach to the analysis of Fast Repetition Rate fluorometry (FRRf) data. *Limnol Oceanogr Methods* **10**: 142– 154.
- Parlanti E, Sourzac M, Baratelli F, Varrault G, Flipo N** (2018) Propriétés optiques de la matière organique dissoute (MOD): traçage de ses sources et dynamique dans la plaine de la Bassée.
- Parlanti E, Wörz K, Geoffroy L, Lamotte M** (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Org Geochem* **31**: 1765–1781
- Passow U, Alldredge AL** (1996) A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Oceanogr Lit Rev* **7**: 669
- Pennington FC** (1985) Carotenoids of cryptophyceae. *Biochem Syst Ecol* **13**: 215–219
- Peuravuori J, Pihlaja K** (1997) Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal Chim Acta* **337**: 133–149
- Pezy JP, Baffreau A, Dauvin JC** (2017) What are the factors driving long-term changes of the suprabenthos in the Seine estuary? *Mar Pollut Bull* **118**: 307–318
- Rouwenhorst R, Frank J, Scheffers W, Van Dijken J** (1991) Determination of protein concentration by total organic carbon analysis. *J Biochem Biophys Methods* **22**: 119–128
- Roy S** (2011) *Phytoplankton Pigments*. Etats-Unis
- Sepp M, Kõiv T, Nõges P, Nõges T** (2019) The role of catchment soils and land cover on dissolved organic matter (DOM) properties in temperate lakes. *J Hydrol* **570**: 281–291
- Sieburth JM, Smetacek V, Lenz J** (1978) Pelagic ecosystem structure : Heterotrophic

- compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnol Oceanogr* **23**: 1256–1263.
- Smaldon G, Holthuis LB, Franssen CHJM** (1993) Coastal Shrimps and Prawns: Keys and Notes for Identification of the Species.
- Smyntek PM, Teece MA, Schulz KL, Thackeray SJ** (2007) A standard protocol for stable isotope analysis of zooplankton in aquatic food web research using mass balance correction models. *Limnol Oceanogr* **52**: 2135–2146
- Souissi S (coord), Azémar F, Combes T, Le Coz M, Mouneyrac C, Tackx M, Tlili S** (2021) Projet SENTINELLES : Fonctionnement des écosystèmes de l’embouchure de l’estuaire de la Seine à travers une étude interdisciplinaire ciblant le zooplancton et le macro-zoobenthos. Rapport de recherche du programme Seine-Aval 6.
- Stauber JL, Jeffrey SW** (1988) Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. *J Phycol* **24**: 158–172
- Stedmon CA, Bro R** (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnol Oceanogr Methods* **6**: 572–579
- Stedmon CA, Markager S** (2005) Résolution de la variabilité de la fluorescence de la matière organique dissoute dans un estuaire tempéré et son bassin versant à l’aide de l’analyse PARACA. *Limnol Oceanogr* **50**: 686–697
- Stedmon CA, Seredyńska-Sobecka B, Boe-Hansen R, Le Tallec N, Waul CK, Arvin E** (2011) Une approche potentielle pour surveiller la qualité de l’eau potable des systèmes d’eau souterraine en utilisant la fluorescence de la matière organique comme alerte précoce en cas d’événements de contamination. *Water Res* **45**: 6030–6038
- Stirn J** (1981) Ecological assessment of pollution effects. In *FAO fisheries technical paper*, ed, Man. methods Aquat. Environ. Res. pp 1–190
- Stock BC, Jackson AL, Ward EJ, Parnell AC, Phillips DL, Semmens BX** (2018) Analyzing mixing systems using a new generation of Bayesian tracer mixing models. *PeerJ Prepr* **6**: e5096
- Strickland J, Parsons T** (1972) A practical handbook of seawater analysis.
- Tattersall WM, Tattersall OS** (1951) The British Mysidacea.
- Telesh, I. V, Rahkola, M, Viljanen, M.** (1998). Carbon content of some freshwater rotifers. In *Rotifera VIII: A Comparative Approach: Proceedings of the VIIIth International Rotifer Symposium*, held in Collegeville, Minn., USA, 22–27 June 1997 (pp. 355-360). Springer Netherlands.
- Terrón-Siglera A, León-Muez D, Peñalver-Duque P, Torre FE** (2016) Diets of peracarid crustaceans associated with the orange coral *Astroides calycularis* in southern Spain. *Mediterr Mar Sci* **17**: 170–173
- Torrecilla Roca I, Guerra García JM** (2012) Feeding habits of the peracarid crustaceans associated to the alga *Fucus spiralis* in Tarifa Island, Cádiz (Southern Spain). *Zool Baetica* **23**: 39–47
- Tzortziou M, Zeri C, Dimitriou E, Ding Y, Jaffé R, Anagnostou E, Pitta E, Mentzafou A** (2015) Colored dissolved organic matter dynamics and anthropogenic influences in a major transboundary river and its coastal wetland. *Limnol Oceanogr* **60**: 1222–1240
- Uriarte, I, Cotano, U, & Villate, F.** (1998). Egg production of *Acartia bifilosa* in the small temperate estuary of Mundaka, Spain, in relation to environmental variables and population development. *Marine Ecology Progress Series*, **166**, 197-205.
- Vacher L** (2004) Étude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens: cas des estuaires de la Gironde et de la Seine. Bordeaux 1

- Vázquez-Luis M, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere J** (2013) Does the invasion of *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* affect the feeding habits of amphipods (Crustacea: Amphipoda)? *J Mar Biol Assoc United Kingdom* **93**: 87–94
- Weishaar JL, Aiken GR, Bergamaschi BA, Fram MS, Fujii R, Mopper K** (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ Sci Technol* **37**: 4702–4708
- Wilson HF, Xenopoulos MA** (2009) Effects of agricultural land use on the composition of fluvial dissolved organic matter. *Nat Geosci* **2**: 37–41
- Wright SW** (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* **77**: 183–196
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F** (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* **38**: 45–50

■ ■ ■ ■ ■ POUR PLUS D'INFORMATIONS SUR LE GIP SEINE-AVAL

www.seine-aval.fr

CONTACT

GIP Seine-Aval
Hangar C - Espace des Marégraphes
CS 41174
76176 ROUEN Cedex 1
Tél : 02 35 08 37 64
gipsa@seine-aval.fr

En cas d'utilisation de données ou d'éléments de ce rapport, il devra être cité sous la forme suivante :

Tackx M.. & Buffan-Dubau E. (Coord.), 2023, SARTRE : Seine Amont : Réseaux Trophiques Estuariens – Annexes 1 : méthodes et protocoles , Annexe de rapport du programme Seine-Aval 6, 32 p.

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.

Pour tout renseignement, veuillez contacter le GIP Seine-Aval.

Les membres financeurs du GIP Seine-Aval sont :

