

Les pigments chlorophylliens : indices d'oligotrophie dans les grottes sous-marines

Renaud FICHEZ

Résumé – Les pigments chlorophylliens ont été dosés durant 16 mois dans une grotte sous-marine méditerranéenne selon la méthode fluorimétrique, et par chromatographie H.P.L.C. en hiver et au printemps. Les pigments chlorophylliens sont essentiellement composés de chlorophylle *a*. La chlorophylle *b* est peu importante et la chlorophylle *c* n'est pas mesurable. Les pigments dégradés sont exclusivement constitués de phéophorbides *a* qui constituent des formes inactives stables (0 à 16% de la concentration totale en chloropigments). Les concentrations en chlorophylle *a* sont comparables à l'entrée et dans la partie semi-obscur de la grotte mais diminuent brusquement dans la partie obscure. Cet appauvrissement ainsi qu'une augmentation de l'importance relative des pigments dégradés impliquent un renouvellement faible de la masse d'eau de la zone obscure. L'appauvrissement faunistique dans les zones isolées des grottes sous-marines pourrait donc s'expliquer, tout au moins en partie, par le confinement entraînant des conditions oligotrophiques. Cet écosystème simplifié peut être considéré comme un modèle prometteur de l'utilisation du flux énergétique par les hétérotrophes en milieu aphotique.

Chloropigments as an oligotrophic index in the study of submarine caves

Abstract – Chlorophyllic pigment titration was performed using a fluorimetric method during a 16 month survey in a Mediterranean submarine cave. A detailed analysis was also carried out in the winter and spring using H.P.L.C. analysis. The most important fraction was composed of chlorophyll *a*. Chlorophyll *b* was of little importance and chlorophyll *c* was below detection limits. Degraded pigments were only composed of pheophorbids *a* (0 to 16% of the chloropigments total amount) which appear to be stable forms of chlorophyll *a* degradation. The amount of chlorophyll *a* was similar at the entrance and in the semi-dark part of the cave. In the following dark part of the cave it suddenly decreased, down to 16% of the mean concentration recorded at the entrance. This decrease, associated with an increase in the relative importance of degraded pigments, involves a slow renewal of dark area water mass. Faunistic decrease in most isolated areas of submarine caves could then at least partly be justified by confinement. This simplified ecosystem could be considered to be an interesting model of heterotrophic pathways in aphotic conditions.

Abridged English Version – Submarine caves show a strong decrease in benthic community density and biomass ([1], [2]). Hard substrata communities of dark submarine caves are characterized by a less than 100% coverage ([3], [4]). This decrease has been tentatively explained by a trophic limitation [4].

Chlorophyll *a* appears to be a good descriptor of primary level biomass [5]. The light dependance of this compound ([6], [7]) seems to be an interesting characteristic for studies focused on exchanges between the photic productive waters of the open-sea and the non-productive waters of dark part of caves. Furthermore, study of the degraded forms of this pigment generated by both grazing and exposition to darkness ([8], [9]) make it possible to evaluate the degradation state of particulate organic matter.

The studied cave (Trémies cave) is located close to Marseille. Water sampling was performed using 3 l PVC sampling bottles at fixed sampling points (*Fig. 1*). Back in the laboratory, water samples were filtered through GF/C Whatman filters (filtered volume between 0.5 and 2l). Chlorophyll *a* was titrated using the Yentsch and Menzel fluorimetric method [10] on a 95% acetonic extract. Detailed analysis of pigment composition was performed using HPLC technique as described by Mantoura and Llewellyn [11] modified by de la Giraudière [12].

Note présentée par Jean-Marie PÉRÈS.

0764-4469/90/03100155 \$ 2.00 © Académie des Sciences



Chlorophyll *a* sampling variations were observed for six samples at both stations 1 and 5. Standard deviation and coefficient of variation appeared to be low indicating that variability was low at each sampling point (Table I).

Temporal evolution of chlorophyll *a* values were generally low from July to April and high values were observed in the spring (May-June) (Fig. 2). At station 1 and station 2, values were similar, approximating 1 to 3 $\mu\text{g l}^{-1}$ in spring and 0.2 to 0.4 $\mu\text{g l}^{-1}$ during the rest of the year. As opposed to this, dark station values showed strong decreases, with maximum spring values ranging from 0.3 to 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ and minimum values close to zero.

Mean values over 16 months (Table II) confirmed that concentrations registered at stations 1 and 2 were very similar. A strong decrease was also observed in dark stations. Mean concentration at station 3 represented 25% of mean concentration in station 1. This percentage decreased further to 16% at station 5. Pheopigments were not registered at station 1, but they increased moderately at station 3 (30 ng l^{-1}) and decreased at stations 4 and 5.

HPLC titration was performed during both low values period and spring bloom time (Table III). During the low values period, chloropigments were mostly composed of chlorophyll *a* and the biomass decreased strongly from the entrance to the inner part of the cave. The degraded forms of pigments were mainly pheophorbids *a*. For 03-05/88 sampling, dark cave values were exceptionally close to station 1 values and low values of pheophorbid were observed throughout the cave.

The detailed analysis of chloropigments demonstrated that chlorophyll *a* is the main compound. Pheophorbids only accounted for pigment degradative forms and appeared to be stable compounds ([12], [13]). Chlorophyll *a* titration showed that there was a strong decrease in pigment in the terminal dark parts of the cave. In the semi-dark area high values demonstrated that there was a rapid renewal of the water mass corresponding to a dense filter-feeder community ([4], [14]). On the contrary the dark area showed a strong decrease in chloropigment amount which suggests that the inner water mass was characterized by a low renewal time. Under such conditions, particulate matter might be exposed to degradative processes developed by the planktonic and benthic heterotrophs. The overall confinement of the water mass can occasionally be disturbed. This occurred particularly during spring when the temperature of the surface water increased. A heat imbalance might then occur between inner and high waters and warmer open sea waters; this results in a counterbalancing flow of warm outside water [14]. Such conditions occurred when the amount of particulate organic matter was high and could therefore play a major role in the development and the metabolic processes of the dark cave benthic communities.

A part from these special conditions, the general feature of the decay of the particulate organic matter was confirmed by the spatial evolution of pigment degraded forms. However, degraded pigment titration using fluorimetric method should be treated with caution [15].

Evidence for a strong decrease in chlorophyll *a* amount makes it possible to separate two distinct subassemblages. The semi-dark area presents pigment amounts close to that of the open sea, implying a strong renewal of water. The dark area, where overall concentrations are very low, implies a slow renewal or water mass and a long exposure to heterotrophic degradation. Such a strong decrease can at least partly explain the decrease in benthic communities.

Dark submarine caves can thus be considered to be oligotrophic and aphotic enclosures in the infra-coastal environment. The general simplification of environmental conditions occurring in this type of channeled ecosystem should make it possible to develop a scale model.

INTRODUCTION. — Les grottes sous-marines sont caractérisées par un appauvrissement marqué des peuplements. Les communautés de substrats durs ont été séparées en deux biocénoses distinctes. La biocénose des grottes semi-obscurées est constituée d'un peuplement animal dense dépourvu de macrophytes benthiques à l'exception de certaines algues calcifiées ([1], [2]). La biocénose des grottes obscures est constituée d'un peuplement appauvri d'hétérotrophes dont le pourcentage de recouvrement peut descendre en dessous de 10 % ([3], [4]). L'appauvrissement faunistique de ces peuplements, surtout composés de filtreurs, a été attribué à une limitation trophique [4], cette hypothèse n'avait toutefois jamais été éprouvée.

La chlorophylle *a*, substance spécifique du règne végétal, constitue un indicateur de biomasse de l'échelon primaire [5]. La dépendance de ce composé vis-à-vis de l'énergie lumineuse ([6], [7]) et l'existence de formes dégradées ([8], [9]) en font un paramètre idéal dans l'étude des échanges entre le milieu photique producteur et la masse d'eau de la partie aphotique des grottes sous-marines.

MÉTHODES. — La grotte des Trémies est située sur la côte calcaire marseillaise. A 30 m de l'entrée une brusque remontée du plancher (*fig. 1*) conduit aux zones obscures.

Les prélèvements d'eau sont effectués à l'aide de bouteilles de PVC d'une capacité de 3 l et à des stations fixes numérotées de 1 à 5 (*fig. 1*). Les bouteilles sont conservées au frais jusqu'au laboratoire où l'eau est filtrée sur filtre GF/C. Le transvasement a été évité afin d'empêcher tout stimulus lumineux ainsi que tout phénomène d'adsorption lié à la présence de bulles d'air.

La chlorophylle *a* et les phéopigments sont dosés par la méthode fluorimétrique de Yentsch et Menzel [10]. Une analyse détaillée de la composition pigmentaire a été effectuée ultérieurement en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) selon la méthode de Mantoura et Llewellyn [11] modifiée par de la Giraudière [12].

RÉSULTATS. — *Variabilité.* — La variabilité de la concentration en chlorophylle *a* dans le milieu a été étudiée aux stations 1 et 5 (tableau I). Pour chaque station, six prélèvements distincts ont été effectués et filtrés séparément. L'écart-type reste faible comparé à la moyenne : le coefficient de variation se situe autour de 5 %. Ceci autorise l'utilisation de prélèvements isolés lors de l'étude de l'évolution temporelle et spatiale des pigments chlorophylliens dans le milieu considéré.

Évolution temporelle. — La tendance générale du cycle annuel se traduit par des pics printaniers de biomasse en mai-juin (*fig. 2*). Les concentrations mesurées aux stations 1 (extérieure) et 2 (semi-obscurée) évoluent de façon identique. Les pics printaniers présentent des valeurs maximales d'environ $1 \mu\text{g l}^{-1}$ en 1986 et $3 \mu\text{g l}^{-1}$ en 1987. Les valeurs de juillet à avril se situent entre 0,2 et $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$. Les stations obscures (3, 4 et 5) présentent en revanche des concentrations nettement plus faibles. L'influence des poussées printanières y est moins importante ($0,3$ à $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$) et on observe un asynchronisme (plusieurs jours) entre le pic de concentration de la zone obscure et celui du milieu extérieur en juin 1986. Entre deux poussées printanières, les valeurs se rapprochent souvent de zéro. L'ensemble formé par les stations 1 et 2 s'oppose à l'ensemble formé par les stations obscures (3, 4 et 5), surtout entre octobre et avril. Cette opposition est en revanche moins tranchée durant la poussée planctonique (mai et juin).

Concentrations moyennes. — La moyenne des concentrations pour chaque station est calculée sur l'ensemble des 17 données obtenues sur 16 mois (tableau II). Les concentrations en chlorophylle *a* des stations 1 et 2 sont très proches. Un net appauvrissement

TABLEAU I

Variabilité de la concentration en chlorophylle *a* (ng l^{-1}) dans deux séries de six échantillons simultanées prélevés à l'extérieur (station 1) et dans le fond de la grotte (station 5).

Sampling variability of chlorophyll a concentration (ng l^{-1}) for two series of six samples from the open sea (station 1) and the terminal dark part of the cave (station 5).

	Station 1.	Station 5
Moyenne	524	96
Écart-type.	29	4,5
Coeff. variation	5.5 %	4,8 %

TABLEAU II

Valeurs moyenne sur 16 mois ($n=17$) exprimées en ng l^{-1} pour la chlorophylle *a* et les phéopigments et valeurs des écarts-types.

Mean values over 16 months ($n=17$) expressed in ng l^{-1} for chlorophyll a and pheopigments and standard deviation values.

	Stat. 1	Stat. 2	Stat. 3	Stat. 4	Stat. 5
<i>Chlorophylle a</i>					
Moyenne	482	461	119	89	78
Écart-type.	645	650	155	108	103
<i>Phéopigments</i>					
Moyenne	0	15	30	15	10
Écart-type.	0	31	66	28	14

TABLEAU III

Composition de l'ensemble des chloropigments (ng l^{-1}) déterminée par la technique HPLC pour chacune des cinq stations de la grotte des Trémies et pour les prélèvements de mai 1988 et de février 1989.

Chloropigment composition (ng l^{-1}) performed using HPLC techniques at five sampling points of Trémies cave in spring (May 1988) and winter (February 1989).

	Chlorophyllides	Chlorophylle <i>c</i>	Phéophorbides	Chlorophylle <i>b</i>	Chlorophylle <i>a</i>
14/02/88					
Station 1.	DéTECTABLES	DéTECTABLES	8	10	203
Station 2.	DéTECTABLES	DéTECTABLES	21	17	211
Station 3.	0	0	0	0	21
Station 4.	0	0	0	0	11
Station 5.	0	0	0	0	9
03/05/88					
Station 1.	DéTECTABLES	DéTECTABLES	34	6	180
Station 2.	DéTECTABLES	DéTECTABLES	25	11	191
Station 3.	0	0	2	2	67
Station 4.	0	0	9	2	78
Station 5.	0	0	12	3	105

apparaît pour l'ensemble des stations obscures (3, 4 et 5); la concentration mesurée à la station 3 représente 25 % de la concentration à l'extérieur, ce pourcentage passe à 16 % à la station 5. La concentration en phéopigments, nulle à l'extérieur, augmente progressivement jusqu'à la station 3 (30 ng l^{-1}) et décroît ensuite vers le fond de la grotte.

Analyses en H.P.L.C. — Une première série a été effectuée en période hivernale et une seconde au printemps lorsque les valeurs observées sont élevées (tableau III). La série hivernale confirme la pauvreté de la partie obscure. Elle met en évidence l'importance

largement majoritaire de la chlorophylle *a* puisque la chlorophylle *b* ne représente au maximum que 7 % de la concentration totale en chloropigments et que la présence de chlorophyllides *a* et de chlorophylle *c* peut être détectée mais non quantifiée. Les pigments dégradés dosables sont exclusivement constitués de phéophorbides *a*. La phéophytine *a* n'a jamais pu être mise en évidence. Les phéophorbides présentent des concentrations faibles (4 à 8 % de la somme des pigments) et ne sont rencontrées que dans les échantillons des stations 1 et 2.

En mai 1988, la proportion en phéophorbides est élevée dans toutes les stations et la chlorophylle *a* mesurée dans les stations obscures augmente fortement.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Les formes de dégradation de la chlorophylle *a* sont exclusivement constituées de phéophorbides *a*, les chlorophyllides étant seulement décelables. Ceci semble confirmer que les phéophytines, absentes de nos prélèvements, ne sont que des formes transitoires de dégradation à l'inverse des phéophorbides ([12], [13]).

L'étude des concentrations en chlorophylle *a* met en évidence un appauvrissement brutal de la masse d'eau dans le fond de la grotte. Dans la partie semi-obscure les concentrations sont proches de celles de l'entrée, ce qui laisse supposer un renouvellement rapide de la masse d'eau. A cette richesse relative en chlorophylle correspond un peuplement de filtreurs encore dense ([4], [14]). Dans la partie obscure, la concentration moyenne en chlorophylle *a* diminue brutalement et coïncide avec un peuplement de filtreurs très appauvri. Cette brusque diminution permet de penser que le matériel particulaire effectue un séjour prolongé à l'obscurité (plusieurs jours) et qu'il est dégradé par les hétérotrophes benthiques et planctoniques. Ceci implique un temps de renouvellement long de la masse d'eau obscure. L'isolement de la zone obscure peut toutefois être occasionnellement brisé par une homogénéisation partielle de la masse d'eau. En dehors des fortes tempêtes, ces cas de renouvellement actif des eaux sont surtout rencontrés au cours du printemps et sont vraisemblablement attribuables au réchauffement des eaux de surface qui doit entraîner un déséquilibre thermique entre les eaux des stations 1 et 2 (14 m de profondeur) et la masse d'eau interne (7 à 4 m). Il doit y avoir alors un remplacement de la masse d'eau interne par des eaux plus chaudes et donc plus légères provenant du milieu extérieur [14]. Ces phénomènes se produisent à une période où la matière organique particulaire est riche, ce qui permet de supposer qu'ils ont une forte influence sur le développement et le métabolisme des populations en place.

En dehors de ces phénomènes temporaires, le vieillissement du matériel particulaire en suspension est confirmé par l'augmentation des pigments dégradés entre le milieu extérieur (0 % de la concentration totale en chloropigments) et le début de la zone obscure (20 % station 3). Cette valeur décroît vers le fond de la grotte (11 % station 4, 14 % station 5). Toutefois, la méthode fluorimétrique entraîne une sous-estimation des formes dégradées si la concentration en chlorophylle active est élevée, et une sur-estimation si la concentration en chlorophylle active est faible. Certaines réserves doivent donc être émises quant à la méthode fluorimétrique après acidification [15].

La mise en évidence d'un appauvrissement brutal de la concentration en chlorophylle *a* permet de séparer deux sous-ensembles distincts. Le sous-ensemble semi-obscure présente des concentrations et des compositions pigmentaires équivalentes à celles du milieu extérieur, qui mettent en évidence un renouvellement rapide des eaux autorisant une survie des photoautotrophes en condition d'éclairement faible. En revanche, dans la zone obscure les pigments chlorophylliens effectuent un séjour prolongé (plusieurs jours) et une grande partie d'entre eux sont dégradés. L'établissement de telles conditions d'oligotrophie

explique au moins en partie l'appauvrissement faunistique qui caractérise la biocénose des grottes obscures. Les parties les plus reculées des grottes sous-marines constituent donc des enclaves aphotiques oligotrophes dans le système côtier infralittoral, déjà réputé pauvre en Méditerranée.

La simplification générale des paramètres du milieu dans les grottes obscures pourrait permettre de bâtir un modèle cohérent du fonctionnement trophique de cet écosystème canalisé. Il semble donc nécessaire d'accorder à ces milieux aphotiques et oligotrophiques un intérêt qui dépasse largement leur faible importance géographique.

Note remise le 22 novembre 1989, acceptée après révision le 15 janvier 1990.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J.-M. PERES et J. PICARD, *C. R. Soc. Biogéogr.*, 227, 1949, p. 42-45.
- [2] J. LABOREL et J. VACELET, *Bull. Inst. Océanogr.*, Monaco, 55, (1120), 1958, p. 1-20.
- [3] J. LABOREL et J. VACELET, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 248, 1959, p. 2619-2621.
- [4] J. G. HARMELIN, J. VACELET et P. VASSEUR, *Tethys*, 11, (3-4), 1985, p. 214-229.
- [5] D. SAUTRIOT, *Th. Doct. État*, Univ. Aix-Marseille-II, 1977, 115 p.
- [6] C. S. YENTSCH, *Deep-Sea Res.*, 12, 1965a, p. 653-666.
- [7] C. S. YENTSCH, *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 18 suppl., 1965b, p. 323-346.
- [8] N. A. WELSCHMEYER et C. J. LORENZEN, *Limnol. Oceanogr.*, 30, 1985, p. 1-21.
- [9] C. M. MORETH et C. S. YENTSCH, *J. Exp. mar. Biol. Ecol.*, 4, 1970, p. 238-249.
- [10] C. S. YENTSCH et D. W. MENZEL, *Deep-Sea Res.*, 10, 1963, p. 221-231.
- [11] R. F. C. MANTOURA et C. A. LLEWELLYN, *Anal. Chim. Acta*, 151, 1983, p. 297-314.
- [12] I. DE LA GIRAUDIÈRE, *Th. Doct. 3^e cycle*, Univ. Aix-Marseille-II, 1987, 169 p.
- [13] J. FOLACK, B. BERLAND et M. R. PLANTE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 307, série III, 1988, p. 337-340.
- [14] R. FICHEZ, *Th. Doct.*, Univ. Aix-Marseille-II, 1989, 251 p.
- [15] J. NEVEUX et G. DEBILLY, *Deep-Sea Res.*, 33, (1), 1986, p. 1-14.

*Centre océanologique de Marseille, Station marine d'Endoume, C.N.R.S.-U.A. 41,
rue de la Batterie-des-Lions, 13007 Marseille.*

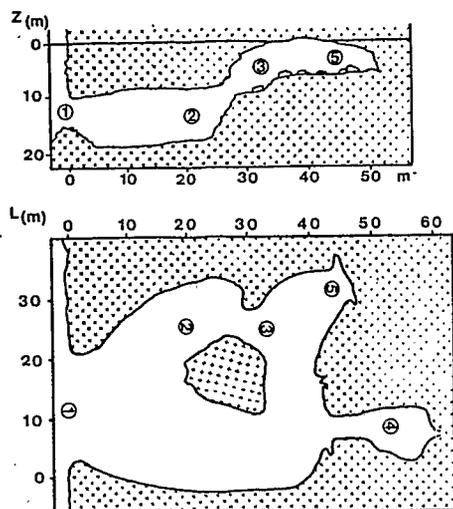


Fig. 1. — Plan de la grotte des Trémies en projection verticale puis en projection horizontale. Les stations de prélèvement sont numérotées de 1 à 5.

Fig. 1. — Map in the vertical and horizontal plan of the Trémies cave. Sampling points are numbered from 1 to 5.

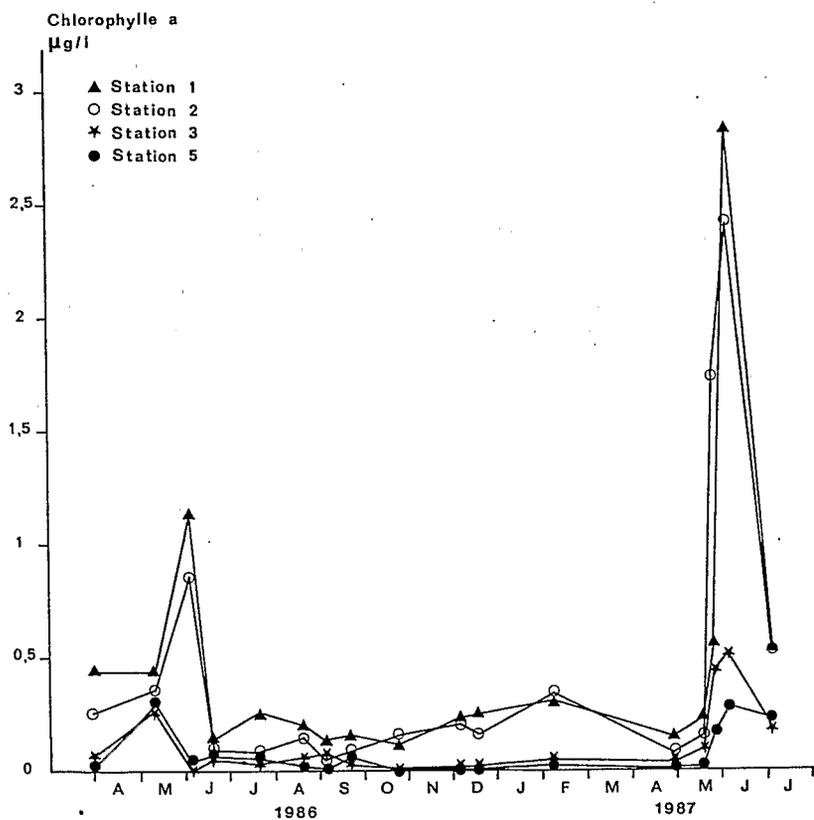


Fig. 2. — Évolution temporelle sur 16 mois ($n=17$) de la concentration en chlorophylle a ($\mu\text{g l}^{-1}$) dans la grotte des Trémies pour les stations 1, 2, 3 et 5.

Fig. 2. — Temporal evolution over 16 months ($n=17$) of chlorophyll a amount ($\mu\text{g l}^{-1}$) in Trémies cave at stations 1, 2, 3 and 5.

