



**HAL**  
open science

# Traces d'ADN bactérien et composés volatils comme premiers éléments de traçabilité des sels de terroir de l'océan Atlantique

Clara Donadio

► **To cite this version:**

Clara Donadio. Traces d'ADN bactérien et composés volatils comme premiers éléments de traçabilité des sels de terroir de l'océan Atlantique. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2014. Français. NNT : 2014LARE0006 . tel-01127159

**HAL Id: tel-01127159**

**<https://theses.hal.science/tel-01127159>**

Submitted on 7 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE LA REUNION  
UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIES

THESE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN SCIENCES  
Spécialité Agro-Alimentaire

par

Clara DONADIO

Traces d'ADN bactérien et composés volatils comme premiers  
éléments de traçabilité des sels de terroir de l'Océan Atlantique

Soutenance le 18 septembre 2014 devant le jury composé de :

Xavier FERNANDEZ, Professeur ICN, Université de Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
Fabienne GUERARD, Professeur LEMAR, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Laurent DUFOSSE, Professeur LCSNSA, Université de La Réunion	Directeur de thèse
Anne BIALECKI, Professeur LCSNSA, Université de La Réunion	Co-directrice de thèse



*Pour tous ceux qui n'ont jamais cessé d'y croire.*

« Il ne faut pas mettre du vinaigre dans ses écrits, il faut y mettre du sel. »

*Montesquieu*

# AVANT-PROPOS

---

Ce travail a donné lieu à :

- Deux publications (Annexe 1) :

[1] *Carotenoid-derived aroma compounds of speciality sea salts produced in solar salterns from Saint-Armel (France), a first step towards scientific elements in order to associate salt products with a region of production* - C. Donadio, A. Bialecki, A. Valla, L. Dufossé - Journal of Food Composition and Analysis vol. 24, 801-810, 2011.

[2] *Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on marine salts produced in solar salterns from the French Atlantic Ocean* - L. Dufossé, C. Donadio, A. Valla, J.C. Meile, D. Montet - Food Control vol. 32, 644-649, 2013.

- Deux présentations orales :

[1] *Carotenoid-derived aroma compounds in speciality sea salt products, towards scientific elements in order to associate the products with a region of production* - C. Donadio, A. Bialecki, J. Brune, L. Adama, A. Rochefeuille, A. Shum Cheong Sing, A. Valla, L. Dufossé (6th International congress on pigments in food - Budapest, Hungary, 2010).

[2] *Détermination de l'origine géographique des sels marins* - C. Donadio, J.C. Meile, A. Bialecki, J. Brune, L. Adama, A. Rochefeuille, A. Shum Cheong Sing, A. Valla, D. Montet, L. Dufossé (3<sup>ème</sup> journée internationale QualiREG 2013, Session Qualité et origine - Saint-Pierre de La Réunion, 2013)

- Deux posters (Annexe 1) :

[1] *Carotenoid-derived aroma compounds in speciality sea salt products, towards scientific elements in order to associate the products with a region of production* - C. Donadio, A. Bialecki, J. Brune, L. Adama, A. Rochefeuille, A. Shum Cheong Sing, A. Valla, L. Dufossé (IUFoST 2010 - World congress of food science and technology - Cape Town, South Africa, 2010)

[2] *Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities* - J-C. Meile, C. Donadio, A. Valla, D. Montet, L. Dufossé (Food integrity and traceability conference 2014 - Belfast, England, 2014)

- Trois articles et une communication de vulgarisation scientifique (Annexe 2) :

[1] Revue de la Recherche de l'Université de La Réunion 2011 : *Ma thèse, le Monde et moi* - Clara Donadio, *Le Cap, Afrique du Sud, Août 2010* - Clara Donadio, mars 2011

[2] *Témoignages* du 15 juin 2011 : *La recherche en y associant enseignement et échange de savoir interview de Clara Donadio, doctorante* - Manuel Marchal, juin 2011

[3] *Le Figaro* du 05 juillet 2013 : *Le sel marin a du bouquet* - d'Yves Miserey, juillet 2013

[4] Participation au forum 2011 des Jeunes Chercheurs de La Réunion, *Au delà des frontières : Influence de la géolocalisation sur le sel : un premier pas vers une labellisation du sel. Peut-on relier un produit salin à sa région de production ?* - Clara Donadio, mai 2011

# REMERCIEMENTS

---

Quand je regarde en « arrière », pendant le temps qu'a duré ce travail, tout ce chemin parcouru, je prends tout d'un coup conscience du nombre de personnes ayant gravité autour de moi, avec moi, pour moi. Toutes ces personnes, à leur façon, en raison de nos relations ou nos « aventures » communes, m'ont, sans aucun doute, permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui. J'ai voulu en faire une liste, j'ai voulu les classer, j'ai voulu les ordonner afin de n'oublier personne, afin de tous les remercier.

Peine perdue. Chose vaine. Impossible. Je vais en oublier, c'est sûr... mais je sais que sans eux je ne serais pas là, alors autant commencer par un grand MERCI à tous, à la famille, aux amis, aux institutionnels, aux gens de l'ombre, aux personnes qui sont loin, aux personnes qui sont là : merci. Merci, pour m'avoir soutenue, regardé grandir, regardé murir, me planter, recommencer, avancer et enfin terminer.

Mais reprenons du début, par le commencement.

Je voudrais tout d'abord adresser mes remerciements sincères au Professeur Laurent Dufossé qui m'a offert la possibilité d'effectuer cette thèse malgré mon parcours universitaire atypique. Merci pour sa confiance, ses conseils et pour le temps qu'il m'a accordé.

Merci aussi aux directeurs successifs du LCSNSA, le Professeur Jacqueline Smadja et le Professeur Bertrand Illien, qui m'ont acceptée au sein de leur laboratoire bien qu'ayant suivi une formation en biologie et non en chimie. Ils ont su me trouver une petite place et me permettre de réaliser ce travail de thèse au milieu des extractions de plantes et organismes marins. Merci également au Professeur Jacqueline Smadja au Dr-HDR Isabelle Grondin, pour leur aide lors de l'exploitation de mes données statistiques.

Un immense merci également au Professeur Anne Bialecki qui m'a vu débarquer de nulle part, des questions plein la tête, un paquet d'ignorance et beaucoup d'espérances. Elle m'a acceptée, écoutée, guidée, conseillée et toujours soutenue, même dans mes phases les plus sombres de cette période, celles où j'avais juste envie de tout abandonner. Merci pour tout son investissement, son soutien et sa gentillesse.

Merci aux rapporteurs le Professeur Fabienne Guérard et le Professeur Xavier Fernandez pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Ce travail n'aurait jamais pu se faire sans eux, leur connaissance et leur passion, merci donc aux personnes qui ont fourni la matière première de ce travail, merci : M. Olivier Chenelle (Saint-Armel), M. Pascal Donini, Mme. Sophie Bonnet-Questiau, M. Michel Coquard (Guérande), M. Jean-Michel Pelin (Ile de Ré), l'Office du Tourisme de Saint-Leu (La Réunion) et autres paludiers d'Europe... Votre or blanc est vraiment un sujet plein d'inspiration.

Merci aussi à vous, bien sûr, les autres membres du LCSNSA, laboratoires alentours et au personnel de l'ESIROI-IDAI : administratifs, chercheurs, chercheurs associés, laborantin (Emmanuel, Cathie, combien de fois ma sauveuse ?) et même stagiaires (Benoît, Inès, Anne-Laure...) et autres thésards... c'est tout un pool de compétences, un environnement de découverte qui vous stimule et vous donne envie de toujours avancer. Merci en particulier à Jean Volsan pour sa gentillesse, son envie de partager ses passions et sa culture : soufflage de verre et créole n'ont (presque) plus de secret pour moi. Merci aussi à Arnaud Marvilliers, un ami plus qu'un prof pour moi, pour l'écoute, le soutien, l'aide à la récupération de données (et ses petits « soucis ») et autres petites anecdotes de ma vie de thésarde. Merci justement, à mes collègues thésards qui m'ont patiemment écouté râler, qui m'ont permis d'avancer grâce à leurs amitiés et à leur envie de découvrir : Sabrina, Marie, David, Eric (et le Sud !), Sophie (et ses vidéos et chansons pour tous les pots de thèse), William (mon coloc de fortune qui aimait tant mes petits « plats zoreille » et son fameux coup de main pour mes composés en folie), Sébastien (et son rapport à la thèse si proche du mien...) et Emmanuelle (et ses conseils look... pour faire de moi une « vraie » fille, celle qui partage mon bureau et aussi pas mal de fous rires).

Et parce que j'ai eu la chance de débiter ma thèse dans une école doctorale pluridisciplinaire, merci aussi aux thésards d'ailleurs pour avoir ouvert mes horizons et partager avec moi leur soif de recherche, leurs passions et ce, sans ternir compte de notre filière : les frères et sœur Sébastien et leur génie informatique, Zarah et sa folie volcanique, Ulrich et sa cartographie réunionnaise, Dan et ses bulles de savon (ah bon c'était pas sur ça ton doctorat ?), Aurélie et Romain, juristes de choc. Merci aussi Sandrine, nos thèses n'étaient qu'un prétexte, tu m'as contaminée par ta passion, l'équipe Kosplé LaKour a ponctué ces dernières années de défilés riches en émotions. Merci enfin à Natasha, Lilian et Méry, trois thésards de choc et surtout des amis en or pour avoir toujours été là malgré toutes mes gaffes et ma « bouletitude »

générale ! Combien de fois vous m'avez ramassée à la petite cuillère et combien de fois vous m'avez regonflée à bloc ? Mille mercis pour tout !

Et parce que dans la vie « y'a pas que la thèse, y'a aussi les soirées et les week-ends », je souhaiterais également remercier tous ces gens qui ont su me faire garder force, courage et surtout sourire. Aux gens comme ça, Isaure, Xavier, Titom, Nomak, Jérémy, Gé, Mathilde, Ottavia, LVQP, Doc pour avoir partagé un petit peu de ma vie quotidienne, merci. A Emma, Anaïs, Arnaud, Laurent, Moniri, Stéphane, Romain, Clovis, Farah, mes copains les artistes qui me font toujours voyager à travers leur dessin et leur musique, je dis un merci tout en poésie et en douceur. A Mélodie, je dis un « merci » à part (vu comme tu dessines et vu comme tu chantes), juste pour m'avoir accompagnée dans mes aventures yeux fermés et tête la première ! A l'impro et à tous les improvisateurs, je dis un grand merci pour votre bouffée d'air frais. Zendélirs, Yo, François, Sophie, Petite Hélène, Julien... mes premiers pas, mon imagination, ma folie je vous la dois. La Meute, mes loups, Marie (la liste est trop longue), Marie-Laure (et ses conseils de fille), Kitty, Louis, Gérald, Fabien (Oltréééé), Florian, Guillaume, Alex, Pierre (agent double)... merci pour ce second souffle, pour votre amitié et pour avoir été là chacun à votre façon. Un grand vraiment très grand ahou de remerciement. A Arnaud, Cathy, Marjorie, Sylvain, Nico, Mary, Aurélie, Mickaël, Sté et Seb, mes amis de métropole, parce que les kilomètres n'éloignent pas vraiment, depuis tout ce temps, on en a vu d'autres, des bras cassés, des voyages, des mariages, des bébés... alors une thèse de plus ou de moins, vous êtes toujours là, merci !

La thèse n'étant pas un long fleuve tranquille, je souhaite également remercier ceux qui sans vraiment connaître mes activités de recherche, ont aussi fait partie de mon aventure, ne serait-ce que humainement, alors merci Timothée, Pascal, Jean-Pierre et merci Elarick pour m'avoir offert votre amitié dans un contexte professionnel difficile, vous m'avez à votre façon permis de terminer « sereinement » ce projet de thèse...

Et parce que, des fois quand même, la distance est parfois difficile à vivre seule, je voudrais remercier ma très grande famille d'adoption pour tout ce qu'elle a su me procurer. Une petite zoreille dans un monde de Créoles... tant de choses à découvrir ! Mi remercie zot tout' Joël, Marie-Anne, Mélissa, Natacha, Athéan, Lili... Un spécial merci à toi, Sébastien, pour avoir sauvé mes données de thèse des abîmes profonds de mon ordinateur mort. Et plus que quiconque dans cette famille formidable, je remercie celui qui m'a permis de les connaître et dont les yeux brillent quand il parle de sa « coloc en thèse ». A ta façon tu as été là. Parfois avec fracas, parfois avec éclat mais toujours avec moi. Merci pour ton soutien, tes encouragements et ta foi en moi. Je n'en serais pas là sans toi, ma petite princesse Logan.



Merci au pec Arthur (et à sa chimie salvatrice), à la pépette Anna et au gnome Oscar, grâce à qui j'ai obtenu le meilleur rôle d'improvisatrice de ma vie : grande sœur. Sans vos petites bouilles au fond de ma mémoire, je n'aurais sûrement pas aussi bien réussi.


Pour finir, enfin, je voudrais remercier celle qui doit sûrement avoir la recette magique pour qu'énergie, positivisme, gentillesse et tendresse brillent autant en elle sans jamais se consumer, elle est la personne à laquelle j'aimerais ressembler, soutien indéfectible de tous mes projets, de mes peines et de mes bonheurs, ma maman, la plus chouette de toutes les mamans. Un tendre merci plein d'amour.

Merci à vous et en route pour de nouvelles aventures ! Le meilleur reste toujours à venir...

# GLOSSAIRE

---

Définitions proposées dans le sens utilisé dans le manuscrit.

Les définitions des mots suivis de ce symbole  sont données dans le glossaire.

- Absorption* : Propriété que présentent les solides et les liquides de retenir certaines substances (gaz ou liquides) dans la totalité de leur volume.
- Adsorption* : Adhésion des molécules d'une substance gazeuse ou liquide à une substance solide.
- Anthropique* : Sont qualifiés d'anthropiques tous les phénomènes, positifs ou négatifs, qui peuvent être la conséquence de la présence ou de l'action de l'être humain.
- Archée* : Ou archaebactéries (Archaea), microorganismes unicellulaires procaryotes, êtres vivants constitués d'une cellule unique qui ne comprend ni noyau ni organites, à l'instar des bactéries.
- Biote* : Ensemble des organismes vivants (flore, faune et champignons ainsi que les microorganismes tels que bactéries, levures, microchampignons...) présents dans un lieu, une région ou un habitat précis.
- Biotope* : « Type de lieu de vie » défini par des caractéristiques physiques et chimiques déterminées et relativement uniformes. Héberge un ensemble de formes de vie composant la biocénose : flore, faune (dont les microorganismes).
- Bloom* : Efflorescence algale, augmentation relativement rapide de la concentration d'une (ou de quelques) espèce(s) de phytoplancton dans un système aquatique. Peut se traduire par une coloration de l'eau (douce ou marine).
- Cambrien* : Ere géologique, qui s'étend de  $-541 \pm 1,0$  à  $-485,4 \pm 1,9$  millions d'années, c'est la première des six périodes du Paléozoïque.
- Caroténoïdes* : Carotènes et xanthophylles. Pigments plutôt orange-rouge

répandus chez de nombreux organismes vivants. Appartiennent à la famille chimique des terpénoïdes.

*Cristallisoir* : Table salante. Partie du salin où s'accomplit la cristallisation du sel.

*Cyanobactérie* : Embranchement de bactéries, autrefois appelées « algues bleu-vert », comporte l'unique classe des Cyanophyceae, aussi appelées Cyanophycées.

*Degrés Baumé* : Unité de mesure indirecte de concentration, *via* la densité, inventée par Antoine Baumé. On le note par °B, °Be ou °Bé.

*Dulçaquicoles* : Organisme qui vit et se reproduit exclusivement dans les eaux douces.

*Eaux-mères* : Eaux qui ont déjà précipité leur sel.

*Etier* : Petit canal acheminant les saumures.

*Evaporite* : Roches sédimentaires constituées de minéraux ayant précipité à la suite d'une augmentation de leurs concentrations dans une saumure.

*Fleur de sel* : Mince couche de cristaux blancs qui se forme et affleure la surface des marais salants, en général par l'action évaporatrice du vent. Se forme bien avant la récolte, lorsque la saumure vient à saturation dans le cristallisoir, c'est la première cristallisation très fine qui apparaît en surface surtout au bord de la table salante.

*Halite* : Espèce minérale composée de chlorure de sodium (NaCl) avec, parfois, des traces d'iode, brome, fluor, fer, oxygène et silicium.

*Haplontique* : Cycle de développement d'un organisme ne comportant qu'une phase haploïde i.e. un haplonte.

*Lagune (ou étang lagunaire)* : Etendue d'eau généralement peu profonde séparée de la mer par un cordon littoral.

*Lithosphère* : Enveloppe terrestre rigide de la surface. Elle comprend la croûte terrestre et une partie du manteau supérieur.

*Marais salants (ou salines)* : Etendues de terre voisine de la mer formant un ensemble de bassins de faible profondeur, dans lesquels est récolté le sel cristallisé, obtenu par évaporation de l'eau de mer, sous l'action combinée du soleil et du vent (s'ils sont aménagés).

<i>Mixotrophe</i>	Capacité d'une cellule à utiliser plusieurs sources de carbone pour son métabolisme, en fonction des conditions environnementales.
<i>Mulons (ou camelles) :</i>	Tas de sel constitué à la fin de la récolte de sel.
<i>Œillet :</i>	Compartiment où cristallisera le sel, généralement plus petit que la table salante ou le cristalliseur, terme plus utilisé en région méditerranéenne.
<i>Roche sédimentaire :</i>	Roche exogène (à la surface de l'écorce terrestre) formée par accumulation de sédiments déposés en couches.
<i>Saumure :</i>	Sel en dissolution, eau saturée de sel qu'on fait évaporer pour obtenir du sel cristallisé.
<i>Saunier (ou paludier) :</i>	Maître dans l'art de récolter le sel dans les cristalliseurs, cueille la fleur de sel selon des traditions séculaires.
<i>Sel :</i>	Résulte de la réaction d'un acide sur une base, notamment le chlorure de sodium (NaCl), le sel (sal, salis) se définit comme une substance cristallisée, friable, soluble, qui se trouve en abondance dans la nature.
<i>Sel gemme (ou halite) :</i>	Sel cristallisé qui se trouve en sous-sol.
<i>Sel ignigène :</i>	Sel obtenu par évaporation, sous l'action de la chaleur, d'une saumure extraite par pompage, et raffiné ensuite dans des salines spécialisées (salines ignigènes).
<i>Temps de rétention :</i>	Temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué. Il est noté $t_r$ .
<i>Temps de rétention réduit :</i>	Temps de rétention auquel est retiré le temps mort. Il est noté $t_r'$ et est égal à $t_r' = t_r - t_m$ .

# ABRÉVIATIONS

---

AA : Acide Aminé

ABA : Acide ABscissique

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AU : Unité Arbitraire

C\* : Chroma (saturation de la couleur)

CAR : CARboxen

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

CDC : Composés Dérivés de Caroténoïdes

CG : Chromatographie Gazeuse

CG-SM : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CIT : Courant Ionique Total

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

CoA : Coenzyme A

CW : CarboWax

DGGE : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)

DHA : DiHydroActinidiolide

DLUO : Date Limite d'Utilisation Optimale

DOM : Matière Organique Marine dissoute (dissolve marine organic matter)

DRO : Dérivés Réactifs de l'Oxygène

DVB : DiVinylBenzène

h\* : hue (placement sur le spectre, bleu, rouge, vert...)

HS : espace de tête (HeadSpace)

h $\nu$  : énergie d'un photon

IPP : IsoPentényl-Pyrophosphate

IRR : Indice de Rétention Relatif

L\* : Light (intensité de la couleur)

M : Mitochondrie

Maj : Mise A Jour

MEP : MéthylErythritol Phosphate

PCR : réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane

PQ : PlastoQuinone

p/v : poids / volume

RISA : analyse de l'espace intergénique de l'ADN ribosomique (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

SM : Spectromètre de Masse

SPME : microextraction sur phase solide (Solid Phase MicroExtraction)

TGGE : électrophorèse sur gel en gradient de température (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

$t_r$  : temps de rétention

$t_r'$  : temps de rétention réduit

UFC : Unité Formant Colonie

# SOMMAIRE

---

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>III</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>V</b>
<b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>PARTIE I - ETAT DE L'ART</b> .....	<b>24</b>
<b>CHAPITRE I - LE SEL</b> .....	<b>25</b>
<b>I.1. Définition légale</b> .....	<b>26</b>
<b>I.2. Structure cristalline</b> .....	<b>26</b>
<b>I.3. Principales caractéristiques physico-chimiques</b> .....	<b>27</b>
<b>I.4. Sources</b> .....	<b>29</b>
I.4.1. Le sel gemme .....	29
I.4.2. Le sel ignigène .....	29
I.4.3. Le sel de mer .....	29
I.4.4. Les autres sels.....	30
<b>I.5. Extraction</b> .....	<b>31</b>
I.5.1. Le sel gemme .....	31
I.5.2. Le sel ignigène .....	32
I.5.3. Le sel de mer .....	33
I.5.4. Les autres sels.....	35
<b>I.6. Usage et consommation</b> .....	<b>35</b>
I.6.1. Le sel gemme .....	36
I.6.2. Le sel ignigène .....	36
I.6.3. Le sel de mer .....	37
I.6.4. Les autres sels.....	37
<b>I.7. Production</b> .....	<b>38</b>
I.7.1. La production mondiale.....	39
I.7.2. Cas particulier de la France .....	40

<b>I.8. Cas particulier du sel alimentaire .....</b>	<b>42</b>
I.8.1. Définition .....	42
I.8.2. Facteurs essentiels de composition et de qualité .....	42
I.8.3. Utilisation comme support .....	43
I.8.4. Etiquetage réglementaire .....	44
<b>Résumé .....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE II - LES MICROORGANISMES DES MARAIS SALANTS.....</b>	<b>45</b>
<b>II.1. Présentation générale.....</b>	<b>46</b>
II.1.1. Microorganismes et matériel génétique .....	46
II.1.2. Ribosome, ADNr-16S et ARNr-16S .....	51
<b>II.2. Techniques d'analyses .....</b>	<b>54</b>
II.2.1. Extraction d'ADN / ARNr et amplification par PCR.....	54
II.2.2. Electrophorèse en gel dénaturant ou analyses DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) et séquençage.....	56
II.2.3. La cytométrie en flux (flux cytometry, FCM) et phylogénétique .....	57
<b>II.3. ADNr-16S : travaux antérieurs .....</b>	<b>60</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE III - LES COMPOSES VOLATILS .....</b>	<b>64</b>
<b>III.1. Présentation générale.....</b>	<b>65</b>
III.1.1. Les terpénoïdes .....	66
III.1.1.1. Présentation générale .....	66
III.1.1.2. Origine biosynthétique.....	68
III.1.1.3. Les grandes classes de terpènes volatils .....	74
III.1.2. Les phénylpropanoïdes / benzénoïdes .....	88
III.1.2.1. Présentation générale .....	88
III.1.2.2. Origine biosynthétique.....	88
III.1.3. Les dérivés d'acides gras .....	90
III.1.3.1. Présentation générale .....	90
III.1.3.2. Origine biosynthétique.....	90
III.1.4. Les dérivés d'acides aminés .....	91
III.1.4.1. Présentation générale .....	91
III.1.4.2. Origine biosynthétique.....	91
<b>III.2. Techniques d'extraction des composés volatils : cas particulier de la microextraction sur phase solide (SPME) .....</b>	<b>93</b>
III.2.1. Principe de la SPME.....	93
III.2.2. Description du système SPME .....	94
III.2.3. Revêtement des fibres.....	95
III.2.4. Procédure d'extraction .....	96
<b>III.3. Techniques d'analyses des composés volatils.....</b>	<b>98</b>
III.3.1. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) .....	98
III.3.2. Identification des composés volatils .....	101
<b>III.4. Composés volatils du sel : travaux antérieurs .....</b>	<b>104</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>109</b>



<b>PARTIE II - ANALYSES MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DES SAUMURES ET DES FLEURS DE SEL DE LA COTE ATLANTIQUE .....</b>	<b>110</b>
<b>CHAPITRE I - LES ECHANTILLONS .....</b>	<b>111</b>
<b>I.1. Localisation géographique des échantillons .....</b>	<b>112</b>
<b>I.2. Echantillonnage .....</b>	<b>112</b>
I.2.1. La saumure ou eau des marais.....	112
I.2.2. Le sel .....	113
I.2.3. Bilan de l'échantillonnage.....	114
<b>CHAPITRE II – ANALYSES MICROBIOLOGIQUES .....</b>	<b>119</b>
<b>II.1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>120</b>
II.1.1. Numération des microorganismes.....	120
II.1.2. Microalgues .....	121
II.1.3. Bactéries.....	122
II.1.4. Moisissures et champignons .....	123
II.1.5. Colorimétrie .....	123
II.1.6. Extraction d'ADN bactérien .....	124
II.1.7. Analyses DGGE.....	125
II.1.8. Analyses statistiques .....	126
II.1.9. Purification et séquençage des amplicons majeurs .....	127
<b>II.2. Résultats.....</b>	<b>127</b>
II.2.1. Numération des microorganismes.....	127
II.2.2. Microalgues .....	129
II.2.3. Bactéries.....	131
II.2.4. Moisissures et champignons .....	132
II.2.5. Colorimétrie .....	133
II.2.6. Extraction d'ADN bactérien .....	136
II.2.7. Analyses DGE.....	137
II.2.8. Analyses statistiques .....	138
II.2.9. Purification et séquençage des amplicons majeurs .....	139
<b>II.3. Discussion .....</b>	<b>140</b>
II.3.1. Comparaison par bassin .....	140
II.3.2. Comparaison par année d'échantillonnage .....	142
II.3.3. Comparaison par type d'échantillon .....	143
II.3.4. Origine possible des microorganismes et de la couleur des marais .....	143
<b>CHAPITRE III – ANALYSES CHIMIQUES .....</b>	<b>159</b>
<b>III.1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>160</b>
III.1.1. Extraction des composés volatils par SPME .....	160
III.1.2. Analyses des composés volatils par CG-SM .....	162
III.1.3. Analyses de données.....	163
<b>III.2. Résultats .....</b>	<b>166</b>
III.2.1. Optimisation des conditions d'extraction des composés volatils par SPME .....	166
III.2.2. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de l'Ile de Ré .....	172
III.2.3. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de Noirmoutier .....	177

III.2.3. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de Saint-Armel .....	180
III.2.3. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de Guérande.....	187
III.2.4. Analyses en ACP et CAH des saumures et des fleurs de sels de l’Ile de Ré, Noirmoutier, Saint-Armel et Guérande au cours des campagnes de collecte 2007, 2009 et 2010.....	191
<b>III.3. Discussion.....</b>	<b>198</b>
III.3.1. Analyse comparative par type d’échantillon (eau des marais / fleur de sel) de la composition chimique des espaces de tête .....	199
III.3.2. Analyse comparative par année et par saison de la composition chimique des espaces de tête ...	200
III.3.3. Analyse comparative par bassin de la composition chimique des espaces de tête des eaux des marais et des fleurs de sel .....	202
III.3.4. Cas particulier des norisoprénoïdes : origines possibles de leur présence dans les eaux des marais et dans le sel.....	209
<b>CHAPITRE IV – DISCUSSION GENERALE : CORRELATION DES DONNEES MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES .....</b>	<b>215</b>
<b>IV.1. Corrélations des données microbiologiques et chimiques.....</b>	<b>216</b>
IV.1.1 Variations des microorganismes : quelques éléments d’explications .....	216
IV.1.2. Variation des composés volatils : quelques éléments d’explication .....	220
<b>IV.2. Marqueurs géographiques .....</b>	<b>222</b>
IV.4.1. Marqueurs géographiques génétiques : l’ADNr-16S.....	222
IV.4.2. Marqueurs géographiques chimiques : les composés volatils .....	223
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>225</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES .....</b>	<b>228</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>233</b>
<b>PUBLICATIONS ET OUVRAGES LITTERAIRES COMPLETS (ORDRE ALPHABETIQUE) .....</b>	<b>233</b>
<b>SITES INTERNET (ORDRE ALPHABETIQUE DES PAGES D’ACCUEIL) .....</b>	<b>246</b>
<b>LOGICIELS (ORDRE ALPHABETIQUE DES AUTEURS).....</b>	<b>247</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>248</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>291</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>291</b>

# INTRODUCTION

---

Le sel de l'eau de mer ou de certaines roches minérales provient de la formation initiale des océans et de l'activité volcanique primitive de la Terre. Ainsi, suite à divers « remaniements » géologiques, notre planète se compose actuellement de 29% de terres et de 71% d'Océans. Or depuis plusieurs milliards d'années, la salinité de ces Océans est stable (35 g/L) grâce à un processus tectonique et chimique qui enlève autant de sel qu'il en arrive par les rivières (Pinet, 2013). Ainsi, le chlorure de sodium est l'un des minéraux les plus abondants sur la Terre. On estime actuellement les réserves à  $3,7 \times 10^{18}$  tonnes pour le sel gemme et à  $5 \times 10^{25}$  tonnes pour le sel dissous dans les océans et les mers (Pinet, 2013).

Consommé depuis toujours par toutes les espèces animales, le sel<sup>●</sup> est indispensable pour le bon fonctionnement de nos cellules. A ce niveau, il joue notamment un rôle :

- dans les transferts d'eau (sans lui, le corps ne pourrait pas retenir d'eau. A l'équilibre, le sérum sanguin contient ainsi 8 g/L de sel (Colas, 1994)),
- dans la contraction musculaire (transmission de l'influx nerveux) (Colas, 1994 ; Cuny, 2005),
- dans la digestion (en maintenant un pH voisin de 1,4 dans l'estomac (Colas, 1994)).

Présent naturellement dans les fruits et les légumes (environ 20% des apports journaliers (Tableau I ; Cuny, 2005), ajouté à la fabrication de nombreux aliments (fromage, charcuterie, pain qui représentent en moyenne 50% des apports) ou directement lors de la prise de repas (le sel ajouté correspond à peu près à 30% des apports quotidiens (Cuny, 2005) ), le sel a tendance à être surconsommé (entre 5 et 10 fois plus que les 7 g/jour recommandés) (Baribault, 2003).

**Tableau I.** Teneur en sel de quelques aliments classés par ordre croissant (Cuny, 2005).

<b>Aliments</b>	<b>Teneur en sel (g pour 100 g de produit)</b>
Pomme de terre	Traces
Sucre raffiné	0
Farine de blé	0,001
Orange	0,004
Beurre	0,005
Tomate	0,001
Sucre non-raffiné	0,024
Bœuf	0,045
Lait entier	0,05
Vin	0,07
Poisson	0,075
Veau	0,085
Œuf	0,13
Lait concentré	0,14
Margarine	0,38
Gruyère	0,42
Pain blanc	0,5
Saucisse	1
Jambon fumé	2,1

La surconsommation de sel, induirait des risques importants pour la santé. Lors du colloque international « Sel & Santé » de janvier 2002, le Professeur MacGregor cite entre autres, l'aggravation de l'insuffisance cardiaque, l'hypertrophie du cœur, les maladies du rein et l'augmentation de la pression artérielle (Direction générale de l'alimentation, 2013). Pour d'autres cependant, les preuves incontestables de sa nocivité n'ont pas encore été apportées. Quoiqu'il en soit, même si les chercheurs ne sont pas tous unanimes, il ne fait aucun doute que la consommation humaine en sel est largement supérieure aux besoins et que les risques de sa nocivité existent. C'est dans l'intention de limiter ces risques que l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a décidé d'agir (Baribault, 2003).

Ainsi, en mars 2001, un Groupe de Travail « Sel » associant les scientifiques, les administrations, les agences, les acteurs économiques et les associations de consommateurs a été mis en place (Hercberg, 2002).

En janvier 2002, les objectifs étaient fixés :

- Proposer des mesures à mettre en œuvre pour respecter une distribution statistique de consommation de sodium de 5 à 12 g/jour,
- Identifier les aliments vecteurs de l'essentiel de l'apport sodé alimentaire,

- Proposer des recommandations effectives d'abaissement de la teneur en sodium de certains aliments vecteurs,
- Effectuer des études de simulation de l'apport sodé de la population française,
- Réfléchir sur les moyens de limiter la consommation du sodium.

Après une analyse de la situation française, le Groupe de Travail a proposé un ensemble de recommandations afin de diminuer la consommation moyenne de sel au niveau de la population.

L'objectif, fixé à 5 ans, est une réduction de 20% de l'apport moyen de sel, soit une réduction d'environ 4% des apports sodés moyens par an.

Les recommandations envisagent :

- L'optimisation de la teneur en sel des produits, c'est-à-dire, la réduction de la teneur en sodium des aliments principaux vecteurs de sodium (et notamment ceux favorisant le risque d'excès) qui soit acceptables sur les plans gustatifs, technologiques et sécuritaires,
- L'éducation et l'information du consommateur pour le responsabiliser dans le contrôle et la gestion de ses apports iodés.

Face à cette situation, les acteurs de la filière saline, et notamment les petits producteurs manuels, doivent réadapter leurs produits afin de conserver une place sur le marché agroalimentaire. Depuis plusieurs années, des efforts sont ainsi faits pour diversifier les produits proposés aux consommateurs (produits hauts de gamme) et pour leur garantir des produits issus d'un véritable savoir-faire et d'un terroir.

Ainsi, afin d'aider les producteurs à mieux positionner leurs produits, ce travail avait pour objectif d'apporter une meilleure connaissance du sel de mer alimentaire et de son environnement. Axé sur quatre bassins de la côte Atlantique française (Ile de Ré, Noirmoutier, Guérande, Saint Armel), l'étude a porté sur les eaux des marais salants<sup>①</sup> et les produits salins selon deux approches :

1. **Une approche microbiologique :** on sait que pour un climat et une zone géographique déterminés, il existe un environnement propre, spécifique avec une faune et une flore précises et caractéristiques (biote<sup>②</sup>) qui évoluent au cours du temps. Ainsi, au fil des saisons, les paludiers (ou sauniers<sup>③</sup>) remarquent que leur marais subit des variations importantes au niveau de ces habitants tant macroscopiques (oiseaux

migrateurs) que microscopiques (variation de couleurs des eaux). De nombreuses études portant sur le lien entre un milieu et les microorganismes *via*, par exemple, ses traces ADN (notamment ADNr-16S) tendent à prouver que ce type de postulat est de plus en plus pris en considération dans les études de caractérisation. On peut citer, par exemple, les études de détermination d'origine de certains fromages (dans le cadre de démarche protection d'appellation d'origine contrôlée), tel que la recherche d'ADNr-16S chez le Minas Gérais (un fromage AOC du Brésil), qui permet de confirmer sa provenance (les espèces appartenant au genre *Streptococcus* devant ainsi prédominer) (Arcuri *et al.*, 2013).


Lors de la formation du cristal de sel dans les marais salants, des microorganismes ou des résidus de microorganismes peuvent se retrouver emprisonnés à l'intérieur ou accolés à ses parois. Ainsi, des traces d'ADN pourraient donc être présentes sur les cristaux. Or, si ces traces sont spécifiques à un bassin, elles pourraient permettre de relier un sel à son origine. Pour valider cette hypothèse, plusieurs échantillons de sels ont été récoltés directement dans les marais ou achetés dans le commerce et soumis à PCR, DGGE, séquençage et cytométrie de flux afin de définir les traces d'ADNr-16S bactérien présents sur les sels en comparaison avec une base de données préexistante.

2. **Une approche chimique :** on sait que la technique de caractérisation d'un produit alimentaire peut également passer par l'étude de ses caractéristiques organoleptiques. Ainsi, de nombreuses études ont été menées pour définir un produit, une origine, notamment *via* des études d'odeur ou de couleur. On peut par exemple citer le Porto dont le contenu en caroténoïdes<sup>⑥</sup> identifié permet de connaître son niveau de vieillissement. En effet, les caroténoïdes évoluent au cours du temps pour donner des norisoprénoïdes responsables des caractéristiques sensorielles de ce vin : fleuri, fruité, sucré... Plus le vin est vieux, plus la quantité de caroténoïdes diminue dans le Porto et plus la quantité de norisoprénoïdes augmentent. Le ratio  $\beta$ -carotène / lutéine combiné à sa teneur en  $\beta$ -ionone ou d'autres composés volatils odorants permet ainsi de déterminer l'âge du produit (Mendes-Pinto *et al.*, 2013).

Chaque marais, d'après les paludiers, semble avoir une couleur et une odeur particulière. Connaître les composés volatils présents dans les échantillons d'eaux et de sels issus du commerce ou directement des marais pourrait donc permettre de définir des spécificités chimiques pour chaque origine. Pour cela, une chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse permettra d'analyser les composés

extraits *via* une microextraction en espace de tête pour définir les composés volatils spécifiques à chaque bassin.

**Après un état de l'art sur le sel, les microorganismes halophiles et les composés volatils, il sera présenté les matériels et méthodes utilisés lors de cette étude consacrée d'une part, à l'analyse des traces d'ADNr-16S sur des sels et d'autre part, à l'analyse de l'empreinte olfactive des eaux des marais salants et des sels. Avant de conclure, les résultats seront alors présentés et analysés.**

Les définitions des mots suivis de ce symbole  sont données dans le glossaire.



# **PARTIE I - ETAT DE L'ART**

---



## CHAPITRE I - LE SEL

## I.1. Définition légale

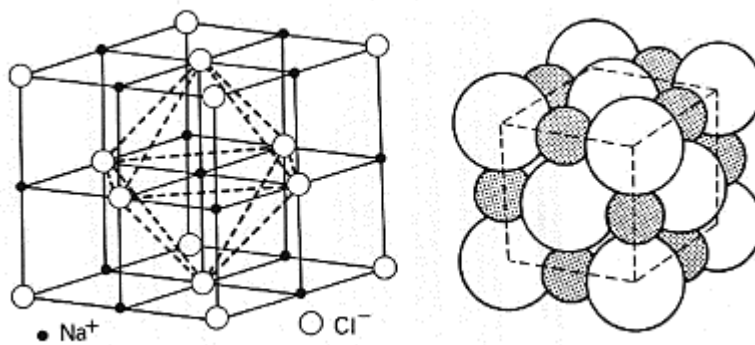
En chimie, un sel est un composé ionique constitué de cations et d'anions formant un produit neutre et sans charge nette. Ces ions peuvent être aussi bien minéraux (chlorure  $\text{Cl}^-$ ) qu'organiques (acétate  $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ ), monoatomiques (fluorure  $\text{F}^-$ ) et polyatomiques (sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$ ). En français, le nom d'un sel commence par celui de l'anion (par exemple chlorure de ou acétate de) suivi de celui du cation (par exemple sodium ou ammonium). Les sels sont souvent cités en fonction du seul nom du cation (par exemple sel de sodium ou sel d'ammonium) ou de celui de l'anion (par exemple chlorure ou acétate).

Le chlorure de sodium est donc un composé chimique de formule  $\text{NaCl}$  appelé plus communément sel de table ou de cuisine ou tout simplement sel dans le langage courant. Son utilisation ne se limite pourtant pas seulement à la préparation de plats, il est largement utilisé dans de nombreux domaines (déneigement, agriculture, textile...).

## I.2. Structure cristalline

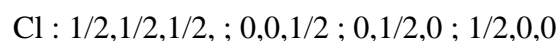
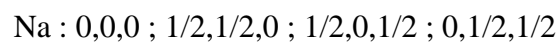
La structure du cristal d'halite<sup>●</sup> fut la première à être analysée aux rayons X par Bragg dès 1914 : chaque ion  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  se trouve à égale distance de six ions de l'autre type, constituant les sommets d'un octaèdre (Figure 1) dont l'ion considéré occupe le centre. L'unité du cristal de sel est un système cubique à faces centrées avec une distance  $2a$  ( $a$  : côté du cube) égale à 1,1278 nm. Les cristaux se présentent communément en cubes, rarement en octaèdres, mais plus souvent en assemblages plus ou moins ordonnés de cubes (trémies). Il existe des clivages parfaits parallèles aux faces du cube.

Ainsi, le chlorure de sodium cristallise dans le système cubique. Les ions  $\text{Cl}^-$ , 61% du poids du sel, et  $\text{Na}^+$ , 39% du poids (Colas, 1994), sont séparés par une distance égale à la moitié de la diagonale du corps du cube unitaire total (Figure 1) (Singh, 2011). Il y a 4 sous-unités Na-Cl par monocristal. C'est donc un cube de 5,63 Angströms de côté et sa densité est de 2,165.



*Figure 1. Structure cristalline du NaCl (site Internet CSF, maj 2013).*

La Figure 1 illustre une maille du cristal du chlorure de sodium (NaCl) coïncidant avec celle du réseau des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . L'ion  $\text{Na}^+$  figurant au centre est entouré de six ions  $\text{Cl}^-$ , placés aux sommets d'un octaèdre (site Internet CSF, maj 2013). Ainsi, la position des atomes est la suivante (Singh, 2011) :



Les positions des atomes de Na et de Cl peuvent cependant être interchangées sans qu'aucun changement dans la formule ou le cristal soit opéré. Le fait que le sodium et le chlorure puissent également avoir une forme ionique permet à la molécule et au cristal de se former sans que le système nécessite trop d'énergie. Cependant, il existe une différence notable entre la molécule de NaCl et son cristal : dans une molécule, un atome de Na est entièrement lié à un atome de Cl alors que dans le cristal, un atome de Na est lié équitablement aux 6 atomes de Cl présents aux alentours. Ainsi, la distance entre sodium et calcium est plus petite dans la molécule que dans le cristal (Singh, 2011).

Dans la nature, plusieurs cristaux dont la structure reproduit celle du NaCl, par exemple, le cristal d'oxyde de magnésium (MgO également appelé magnésie) ou encore le fluorure de potassium (KF) (Singh, 2011).

### **I.3. Principales caractéristiques physico-chimiques**

Le sel est un évaporite<sup>①</sup> qui se caractérise par plusieurs paramètres physico-chimiques (Tableau II).

**Tableau II.** Principales caractéristiques physico-chimiques du chlorure de sodium (Colas, 1994).

Nom minéralogique	Halite
Cristallisation	Cubique
Formule Chimique	NaCl
Indice de réfraction	1,544
Masse moléculaire	58,45
Densité du monocristal	2,165
Densité du liquide à 801°C	1,549
Dureté (indice de MOHS)	2 à 2,5
Chaleur spécifique	0,22 Kcal/Kg/°C
Solubilité dans l'eau froide (0°C)	357 g/1000 g d'eau
Solubilité dans l'eau chaude (100°C)	391 g/1000 g d'eau
Température d'ébullition de la saumure saturée*	108,8°C
Température de fusion*	801°C
Température d'ébullition du sel fondu*	1449°C
Chaleur latente de dissolution (à saturation)*	7,8 Kcal/Kg
Chaleur latente de fusion*	97 Kcal/Kg
Chaleur latente d'ébullition*	698 Kcal/Kg

\*à la pression atmosphérique

Les autres caractères les plus intéressants du sel sont :

- L'avidité pour l'eau : le sel attire naturellement l'eau (c'est un produit hygroscopique) (Colas, 1994).
- La solubilité : le sel est totalement insoluble dans l'acide chlorhydrique, faiblement dans l'alcool et l'ammoniac mais il est soluble dans la glycérine (93 g de sel par Kg). Sa solubilité dans l'eau est importante avec 26,3% en poids à 20°C, soit environ 360 g de sel par Kg d'eau (elle varie peu avec la température) (Colas, 1994).
- La conductivité : le sel fondu et le sel en solution aqueuse sont bons conducteurs. Le sel est un électrolyte. En effet, ce composé est soluble dans l'eau car en milieu aqueux, le cristal salin voit ses forces de cohésion diminuer (force d'attraction électrostatique divisée par 80). Ses ions sont donc plus facilement dissociables, surtout les éléments de surface. De plus, lorsqu'un ion  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  se détache, il est solvaté de molécules d'eau qui orientent vers lui leur pôle de signe opposé. C'est ce qu'on appelle le phénomène de solvation (ou hydratation). Dans ce cas, il empêche les cristaux de se reformer. La dissociation de ses ions constitutifs permet donc au courant de circuler lorsqu'il est en solution.

## I.4. Sources

Aujourd'hui, le sel provient principalement de 3 sources :

- Les gisements souterrains, le sel est alors appelé *sel gemme*,
- Les eaux de saumures issues du sol donnent quant à elles du *sel ignigène*,
- La mer ou l'océan, on dit alors qu'il s'agit de *sel marin ou de mer*.

Les différents types de sel cristallisés sont interchangeable dans la plupart des secteurs d'utilisation : l'origine du sel importe peu (Moinier, 1997).

### I.4.1. Le sel gemme

**Définition :** le sel gemme (ou halite) est un dépôt de minerai contenant une grosse concentration de sel comestible. C'est donc un sel fossile extrait de mines.

**Formation :** ces gisements de sel ont été constitués par l'évaporation des lacs durant la Préhistoire et se retrouvent aujourd'hui dans l'écorce rocheuse de la Terre, la lithosphère.

**Localisation :** les gisements de sel gemme sont très nombreux et répartis partout sur la planète. Certains sont exploités depuis longtemps (Hallstatt en Autriche, Cordoba en Espagne, Slanic Prahova en Roumanie par exemple) (site Internet CSF, maj 2013). Le sel gemme le plus connu reste cependant le sel de l'Himalaya ou sel rose.

### I.4.2. Le sel ignigène

**Définition :** sel obtenu par évaporation, sous l'action de la chaleur, d'une saumure extraite par pompage, et raffiné ensuite dans des salines spécialisées (salines ignigènes).

**Formation :** ce sel provient des eaux de saumures : eaux souterraines salées ou gisements de l'écorce terrestre inexploitable sous forme de mines auxquels de l'eau est injectée.

**Localisation :** sa production est souvent combinée avec celle du sel gemme. Les salines ignigènes se retrouvent un peu partout à travers le Monde.

### I.4.3. Le sel de mer

**Définition :** le sel obtenu par évaporation de l'eau de mer sous l'effet du soleil et du vent dans les marais salants.

**Formation :** les lagunes (ou salines) se sont formées au Cambrien suite à l'inondation de certains bassins préhistoriques riches en sel (évaporites).

**Localisation** : ils ne peuvent exister que dans certaines configurations géographiques. Ainsi, ils ne peuvent pas être présents là où les vagues ou le courant sont trop importants (l'érosion y est trop forte), en contrepartie, ils se rencontrent au niveau des estuaires, des lagons, des zones côtières protégées ou encore des environnements marins peu profonds. Ils représentent 0,3% de la surface mondiale soit environ 5% des surfaces humides sur la planète (Cuny, 2005 ; Zedler *et al.*, 2008).

**Environnement** : les marais salants sont des écosystèmes salins (dont la concentration en sel est supérieure à 35 g/L) avec des caractéristiques géomorphologiques (sédiments, texture du sol fine, topographie relativement plane), une faune et une flore spécifiques. La forte salinité de ce type de milieu implique en effet une sélection naturelle des espèces qu'il contient : la faune et la flore des marais salants varient en fonction de leur altitude, de leur microtopographie et de leur proximité avec des sources d'eau douce ou de terres. (Cuny, 2005 ; Zedler *et al.*, 2008)

Ainsi, les marais représentent de vastes surfaces naturelles non dégradées, que leur richesse biologique et la sécurité d'un habitat stable et peu perturbé transforment en véritables conservatoires d'oiseaux sédentaires et migrateurs. La faune des marais se compose ainsi, de nombreuses espèces d'invertébrés, de poissons, d'oiseaux et de mammifères mais de peu d'amphibiens ou de reptiles. En fonction des saisons, voire même des mois, les différentes espèces animales se succèdent selon le volume d'eau présent dans les marais.

La flore, quant à elle, est souvent restreinte à des petits buissons halophiles, les arbres ou autres espèces ne pouvant y développer leur système racinaire (instabilité du sol, pas de tolérance au sel). C'est d'ailleurs grâce à ces petits végétaux que les sédiments des marais peuvent être stabilisés et l'eau retenue.

#### **I.4.4. Les autres sels**

Il existe d'autres sources de sels issus de divers procédés, comme par exemple :

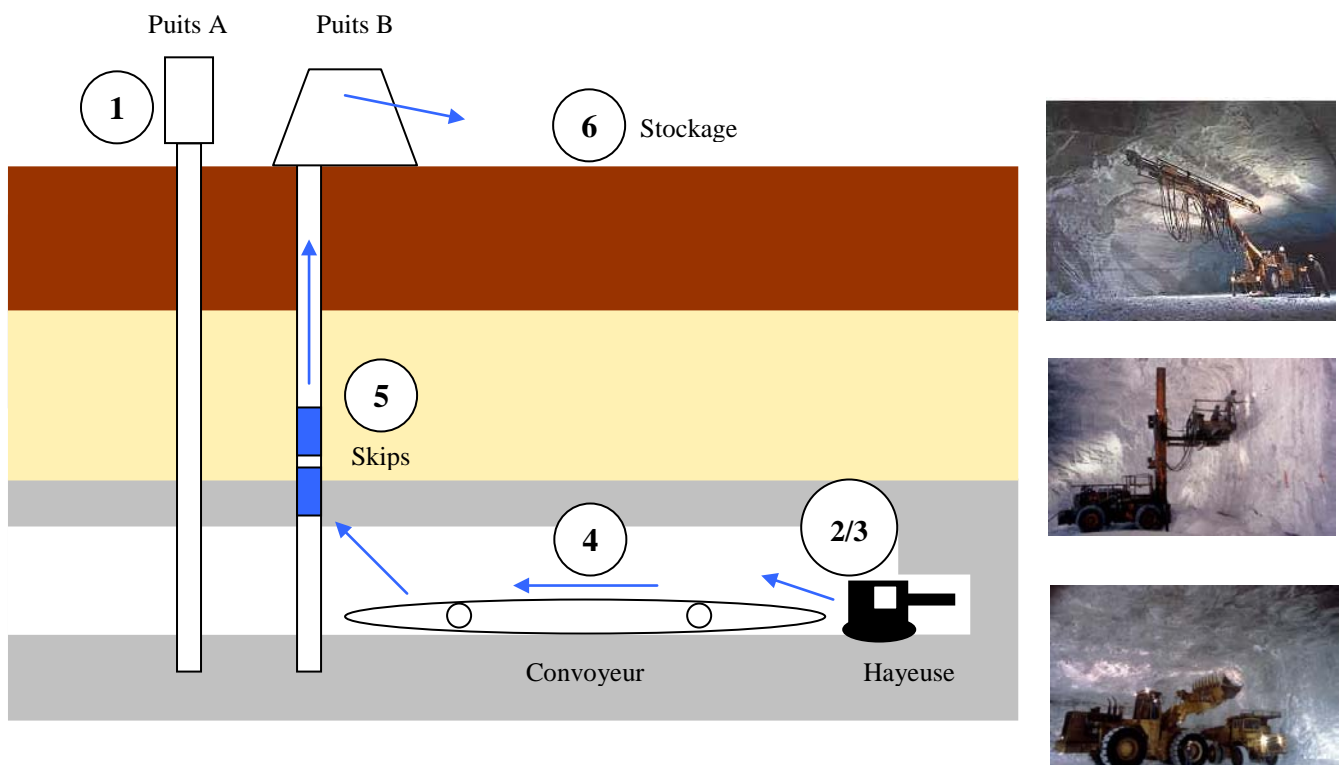
- le sel provenant des saumures extraites des gisements de sel gemme,
- les sels provenant de cendres de végétaux halophiles,
- le sel thermique (ou sel coproduit) obtenu lors du traitement de la sylvinite (minerai de potasse),
- la concentration des lessives de soude donne également du sel.

## I.5. Extraction

Le sel est actuellement produit partout dans le monde selon trois procédés : la méthode agricole pour le sel de mer, la technique minière pour le sel gemme et le process thermique pour le sel raffiné (aussi appelé sel « igné »).

### I.5.1. Le sel gemme

Les mines de sel gemme ne peuvent être exploitées que si elles contiennent au moins 90% de NaCl. Les dépôts sont extraits traditionnellement dans une mine ou par injection d'eau. L'eau injectée dissout le sel et la saumure produite peut être pompée à la surface où le sel est récolté (site Internet CSF, maj 2013). Ce type de sel est principalement utilisé par l'industrie chimique, son extraction se fait par exploitation des couches cristallines qui peuvent atteindre plusieurs mètres de hauteur (site Internet CSF, maj 2013) (Figure 2).



**Figure 2.** Schéma et photographies de l'extraction minière du sel gemme (site Internet CSF, maj 2013 ; site Internet Salt Institute, maj 2013).

**Etape 1 :** L'accès à la mine se fait par un puits vertical à partir duquel un réseau de galeries a été creusé, en laissant des piliers de sel carrés ou rectangulaires, qui assurent la stabilité des terrains.



**Etape 2 :** A l'aide d'une haveuse, sorte de tronçonneuse, une saignée horizontale, de 3 à 5 mètres de profondeur à la base et sur toute la largeur de la galerie, est réalisée.

**Etape 3 :** Des trous de 3 à 5 mètres de profondeur sont forés. Les blocs de sel sont extraits à l'aide d'explosifs. Lors de l'exploitation, environ 500 à 2000 tonnes de minerai sont abattues.

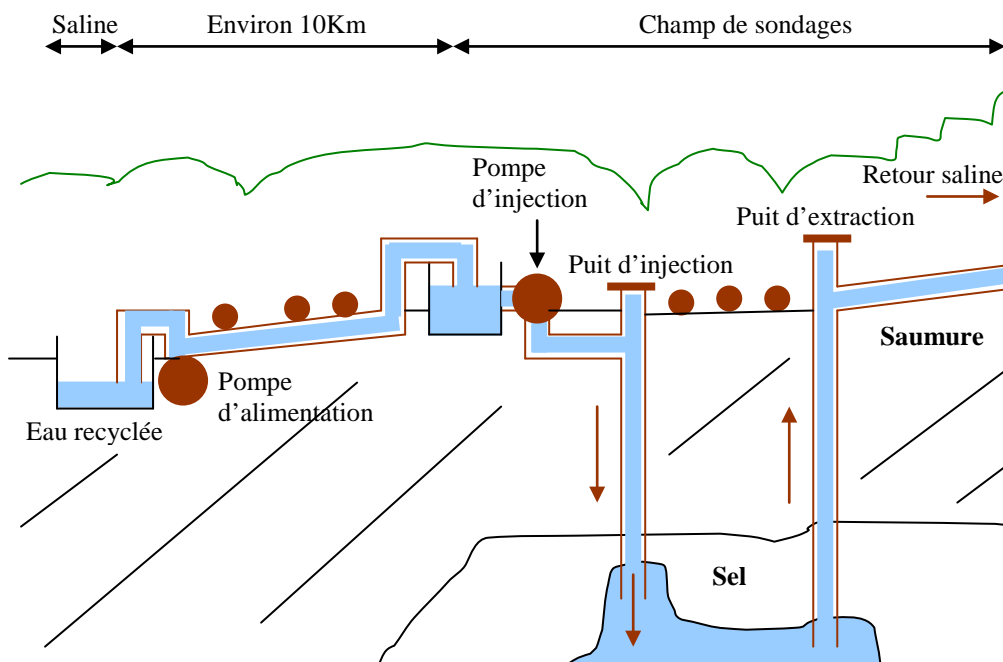
**Etape 4 :** Le sel est transporté jusqu'à une station de concassage, puis il voyage par des convoyeurs à bande jusqu'à la station de broyage-criblage.

**Etape 5 :** Il est alors acheminé en surface au moyen d'un système de deux skips (grandes bennes) pouvant charrier 20 tonnes chacun.

**Etape 6 :** Il est stocké en vrac ou conditionné.

### 1.5.2. Le sel ignigène

La production de sel est effectuée à partir de saumure. Autrefois, la saumure provenant de sources salées était cuite dans de grandes poêles placées sur un foyer, d'où le terme ignigène (du latin, *ignis*, feu). Aujourd'hui, l'évaporation de la saumure a lieu dans une saline en surface (Figure 3) (site Internet CSF, maj 2013).



**Figure 3.** Obtention de sel ignigène à partir de saumures souterraines (site Internet CSF, maj 2013).

**Etape 1 :** Le gisement est lessivé grâce à la circulation souterraine de l'eau douce injectée sous pression.

**Etape 2 :** La saumure, qui contient environ 300 g/L de chlorure de sodium, est ensuite dirigée vers une station d'épuration.

**Etape 3 :** La saumure est acheminée dans les évaporateurs de la saline où s'opère, sous l'effet de la chaleur, la cristallisation du sel. Le sel est ensuite essoré, puis séché (humidité abaissée de 3% à 0,1%). Il est à ce stade, très pur et très blanc.

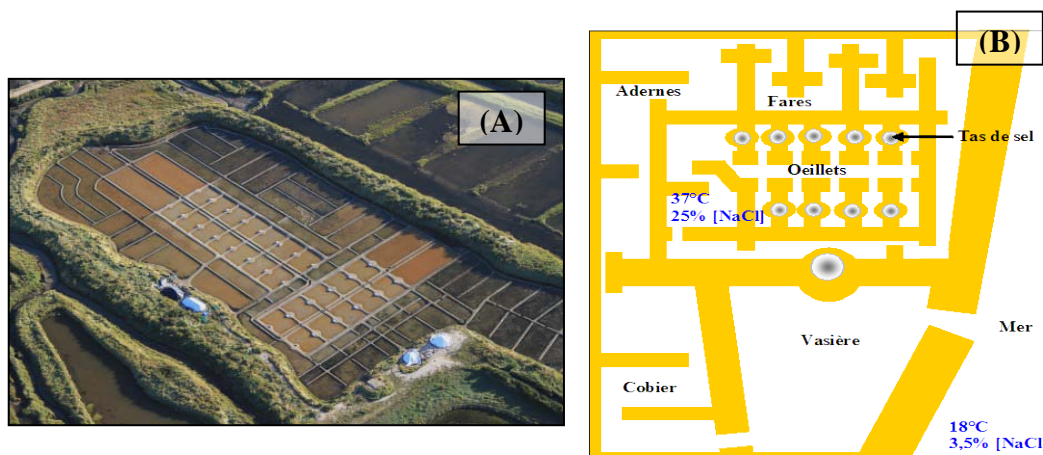
A partir du sel obtenu, l'application d'une forte pression provoque l'agglomération des cristaux de sel (procédé de compaction) et permet la fabrication des pastilles (ou berlingots) et des plaques, elles-mêmes broyées et criblées pour obtenir des grains de la taille voulue. De lourdes presses permettent aussi de fabriquer des blocs comprimés utilisés pour l'alimentation du bétail (site Internet CSF, maj 2013).

### I.5.3. Le sel de mer

#### ❖ *Le fonctionnement d'un marais salant*

Depuis la mer, l'eau circule en traversant des bassins aménagés dont l'épaisseur se réduit au fur et à mesure. L'eau arrive ainsi sous forme de saumure saturée au niveau des tables salantes sur lesquelles le sel cristallise et précipite (Cuny, 2005).

La configuration générale des salins utilise ainsi au mieux la topographie naturelle du littoral. Le marais est organisé en cinq parties distinctes (Figure 4).



**Figure 4.** Un marais salant (A) Lasné (Saint-Armel) et ses bassins colorés (B) Représentation schématique (site Internet CSF, maj 2013).

L'eau de mer parcourt un long chemin avant d'arriver, sous forme de saumure saturée, aux tables salantes ou cristallisoirs<sup>●</sup>. Elle traverse successivement des étangs aménagés, les partènements, circulant soit par simple gravité, soit au moyen de pompes. Ces étangs sont endigués par des vannes, également appelées portes martelières.

L'eau traverse ainsi :

- la Vasière : un grand réservoir d'eau de mer, alimenté par un canal principal,
- le Cobier : réservoir de moindre dimension qui sert à la préparation de l'eau avant de la faire entrer dans la saline,
- les Adernes : canaux agencés de manière à obliger l'eau, déjà concentrée, à suivre de nombreux méandres,
- les Fares : vestibules de la saline,
- la Saline : divisée en de nombreux compartiments réguliers, formée d'œilletts<sup>●</sup> peu profonds (tables salantes) où le sel se cristallise.

L'eau de mer va peu à peu se transformer en saumure dans les étangs naturels. Le saunier contrôle l'écoulement de l'eau de mer en la faisant passer d'un étang à l'autre, en ouvrant ou fermant les portes martelières. Cette circulation permet la décantation des matières organiques et des impuretés, puis la lente montée en salinité. En effet, l'eau de mer ne contenant pas que du NaCl, une évaporation directe de l'eau (contenant également du carbonate et du sulfate de sodium, du chlorure et du sulfate de magnésium ainsi que des impuretés organiques) aboutirait à un sel de qualité peu acceptable. La saumure ainsi affinée arrive enfin sur les tables salantes pour y cristalliser pendant l'été. Pendant la saison de production, le saunier doit donc vérifier au quotidien le taux de concentration en sel pour avoir un produit de qualité : le sel est récolté entre 25 et 30 degré *Baumé*<sup>●</sup> (au-delà, la précipitation accrue des sels magnésiens produit un sel amer).

#### ❖ *La production au fil des saisons*

La récolte du sel dans les salins est largement tributaire du climat : elle exige une période sèche favorable à l'évaporation naturelle. Dans les régions tempérées comme dans les régions tropicales, les saisons déterminent le cycle des eaux.

***Début du printemps, la mise en eau*** : à la fin de l'hiver ou au printemps, l'eau de mer ([NaCl] = 3,5 %) est amenée dans le marais salant soit par pompage soit par simple gravité.

C'est le début d'un lent parcours de plusieurs dizaines de kilomètres (Figure 4 page 34). Durant cette période, la plus grande partie de l'eau va s'évaporer.

***Le printemps et l'été, la cristallisation*** : les marais salants suivent une pente naturelle qui amène la saumure depuis les partènements jusqu'aux *œillets*. La concentration des saumures atteint 260 g/L (26 %). C'est une période de surveillance constante, il faut souvent « reclasser les eaux » : les précipitations n'atteignant pas toujours l'ensemble de la surface du salin, le saunier gère la vitesse de déplacement, évacue les eaux afin de mener la cristallisation à son terme. Les œillets représentent 1/10<sup>ème</sup> de la surface totale du marais.

***L'été, la récolte*** : avant la récolte, il est nécessaire de vidanger les eaux-mères<sup>●</sup> (afin d'éviter la précipitation du sulfate de magnésium). Le gâteau de sel qui s'est déposé au fond des œillets peut être récolté. La technique traditionnelle de levage est manuelle, le sel se récolte à la pelle et demande une main d'œuvre nombreuse. Le climat méditerranéen, avec ses étés bien marqués, permet une récolte annuelle alors que le climat océanique, plus humide et qui peut connaître de fortes précipitations, contraint le saunier à récolter le sel quotidiennement, par précaution, de juin à septembre pendant toute la période où le bilan d'évaporation est positif.

Dans un premier temps, le sel est rassemblé en gerbes puis, après égouttage, il est stocké et conditionné.

***L'automne et l'hiver, l'entretien des salins*** : l'hiver est favorable à la remise en état des sols et au relèvement des digues. Les tables salantes (œillets) sont d'abord lavées à l'eau douce puis, si cela est nécessaire, curées et égalisées.

#### **I.5.4. Les autres sels**

La majorité des autres sels sont des coproduits de productions industrielles résultant de processus thermique ou chimique plus ou moins complexes.

### **I.6. Usage et consommation**

La production de sel touche de nombreux secteurs (site Internet CSF, maj 2013) (Figure 5 page 38) :

- les industries chimiques (production de carbonate de sodium pour le verre ou de sulfate de sodium pour le papier kraft par exemple),

- le déneigement (la consommation de ce secteur varie énormément d'une année sur l'autre),
- les industries alimentaires (salaisons, plats cuisinés par exemple ou vente directe aux consommateurs),
- l'agriculture (engrais, nourriture animale),
- mais aussi les industries annexes (utilisé en tannerie comme agent hydratant des cuirs et des peaux, dans les industries textiles comme agent fixateur de teinture...).

### **I.6.1. Le sel gemme**

Les impuretés du sel gemme simplement concassé au sortir de la mine destinent principalement ce sel au déneigement et/ou au déglçage. Il est cependant également utilisé en agriculture et en industries diverses (en cosmétologie par exemple, il est parfois employé comme déodorant 100% naturel ou comme exfoliant lorsqu'il est broyé).

En saumure, il peut se rencontrer lors de cures thermales car les eaux enrichies en sel gemme sont utilisées notamment pour les troubles de la croissance. Elles sont alors appelées des eaux chlorurées.

Il peut aussi être consommé par l'Homme, il suffit de le passer au moulin pour une utilisation traditionnelle (à noter que contrairement au sel marin, il est dépourvu d'iode). Généralement, il est alors utilisé dans les applications sèches, dans lesquelles les grains de sel sont ajoutés à l'aliment en cours de transformation. L'utilisation la plus courante est la cuisson du pain et des gâteaux. Le sel gemme est également utilisé pour des applications spécifiques dans la transformation du poisson, ainsi que pour les mélanges d'épices.

### **I.6.2. Le sel ignigène**

Une fois la saumure remontée à la surface et évaporée en saline, le sel obtenu est ensuite essoré et séché. Il se présente alors sous forme de bloc compacté utilisé tel quel pour l'alimentation du bétail ou raffiné pour l'alimentation humaine. Sous cette forme, il peut également servir en agriculture, pour l'adoucissement des eaux, en industries chimiques (en raison de sa pureté), en tannerie et dans les industries agro-alimentaires.

### I.6.3. Le sel de mer

Le sel marin doit à ses origines géographiques variées d'être un sel non spécialisé et destiné à tous les usages.

### I.6.4. Les autres sels

Le sel en dissolution est utilisé en l'état pour la production de dichlore (alimentation des cellules à diaphragme) et la fabrication de carbonate de soude. Ces saumures sont, en outre, reprises pour empêcher la déformation des cavités de stockage aménagées dans certains sites d'où elles sont extraites.

Les sels issus des industries sont souvent recyclés en interne, par exemple les sels issus de la concentration des lessives de soude qui peuvent être directement recyclés pour produire du dichlore et de la soude.

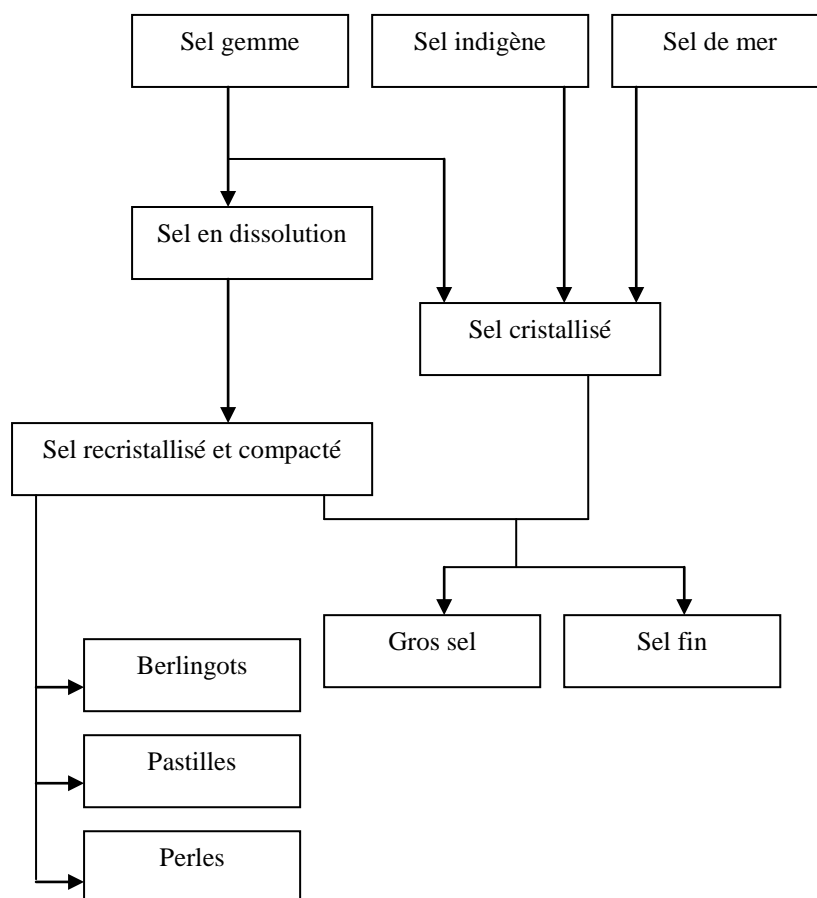


Figure 5. Obtention des différents sels et conditionnement (site Internet CSF, maj 2013).

La consommation de sel par secteur d'utilisation en milliers de tonnes de 2011 est donnée Tableau III.

**Tableau III.** Comparaison de la consommation de sel par secteur d'utilisation en milliers de tonnes en France et aux Etats-Unis (2011) (Salazar & McNutt, 2013 ; site Internet CSF, maj 2013).

Secteur d'utilisation	Consommation Française (2011)	Consommation des Etats-Unis (2011)
Industrie chimique	1 305	18 500
Déneigement	1 739	19 600
Industries diverses *	1 501	4 992
Consommation humaine	653	3 929
Traitement de l'eau *	-	311
Agriculture	903	1 710
Total	6 100	45 000

\* En France, le traitement de l'eau est compris dans les industries diverses.

Dans les pays industrialisés, l'industrie consomme environ 70% de la production de sel. Aux Etats-Unis, en 2011, en prenant en compte le sel de dissolution, la consommation de l'industrie chimique a été de 18,5 millions de tonnes dont 17,5 millions de tonnes pour la production de dichlore et de soude. En effet, la chimie du chlore est approvisionnée à près de 80% par le sel en dissolution (Salazar & McNutt, 2013).

La consommation du sel dans le secteur du déneigement varie énormément d'une année à l'autre. Aux Etats-Unis, la consommation de sel pour le déneigement était de 19,6 millions de t/an en 2005 alors qu'elle était 5% plus faible en 2006. En Europe après une consommation record de sel de déneigement entre 2008 et 2011 (1,9 millions épandu en 2010), l'hiver 2011-2012 a été caractérisé par un climat assez doux, entraînant une consommation de sel pour la protection des routes relativement faible (environ 750 000 tonnes). La dose de sel employée est de 5 à 15 g/m<sup>2</sup> (selon la norme XP P 98 181) soit environ de 0,5 à 2,8 Kg par mètre linéaire de chaussée par an en fonction des associations du sel (chlorure de sodium, chlorure de magnésium ou chlorure de calcium) ces combinaisons peuvent prétendre assurer une protection jusqu'à -20°C (Salazar & McNutt, 2013 ; site Internet ASSELVIA, maj 2012 ; site Internet CSF, maj 2013).

## I.7. Production

A travers le Monde, la production de sel reflète l'évolution de la population (sel alimentaire) et le développement industriel (sel de déneigement, chimie, alimentation animale...). La production mondiale de sel en 2012, toutes utilisations confondues, a été d'environ 280 millions de tonnes (site Internet Salt Institute, maj 2013). Ce volume est assez

important pour placer le sel au deuxième rang des minéraux non énergétiques après le fer (Colas, 1994).

### **I.7.1. La production mondiale**

Le sel est l'un des rares produits dont le Monde risque le moins de manquer au cours des millénaires à venir, sous ces deux formes : le sel gemme, dont il existe des réserves considérables et le sel marin, pratiquement inépuisable. La capacité de production installée est nettement supérieure aux besoins, en particulier dans les pays développés. L'essentiel de la production vient de l'exploitation du sel gemme, liquéfié ou solide.

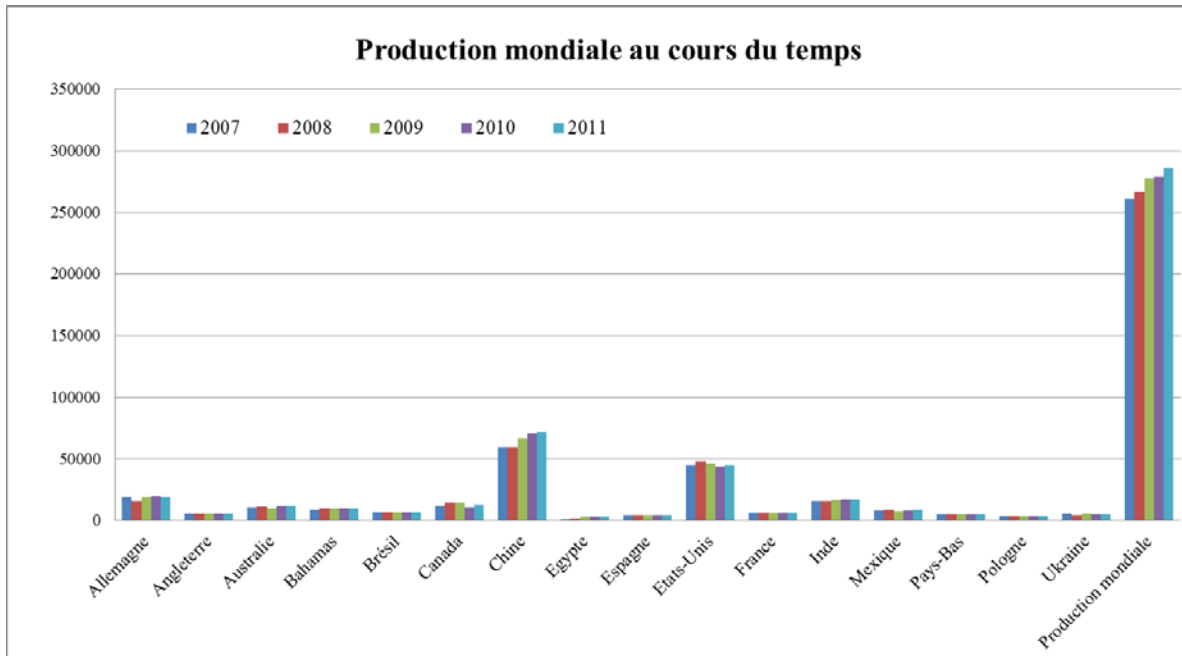
Dans les pays industriels qui se sont dotés d'une industrie chimique minérale, la production de sel en dissolution représente souvent plus de la moitié de la production totale. Ainsi, le sel a cessé d'être d'abord une denrée alimentaire. La consommation humaine de sel alimentaire représente moins de 6% de l'ensemble des utilisations, la consommation animale moins de 2,5%. Le sel défini comme apport de sodium et de chlore à l'organisme vivant et comme agent de sapidité et de conservation n'a plus qu'un rôle économique modeste, eu égard aux quantités mises sur le marché, mais reste biologiquement indispensable.

Traditionnellement, l'Europe et les Etats-Unis sont les plus grands producteurs de sel à travers le Monde. Cependant, depuis 2003, ils ont été dépassés par la Chine (site Internet Salt Institute, maj 2013). Ainsi, aujourd'hui, les Etats-Unis et la Chine dominent la production mondiale de sel (toutes utilisations confondues : alimentaire, chimique, déneigement...) en produisant chacun environ 50 millions de tonnes par an, soit environ 40% de la production mondiale à eux deux. L'Europe, quant à elle, assure en moyenne 27% de la production mondiale (site Internet Salt Institute, maj 2013). Les ressources en sel sont en général bien réparties et abondantes sauf au Japon (production 2011 : 1,3 million de t/an, consommation 2011 : 10 million de t/an) et en Scandinavie (pas de production, importation 2009 : 1,9 million de t/an). Les échanges mondiaux portent sur environ 15% de la production de sel cristallisé (site Internet CSF, maj 2013) (Figure 6).

La production de sel dans un pays varie d'une année sur l'autre en fonction des conditions climatiques (sel de mer) ou encore de la pureté et de la profondeur des puits (sel gemme).



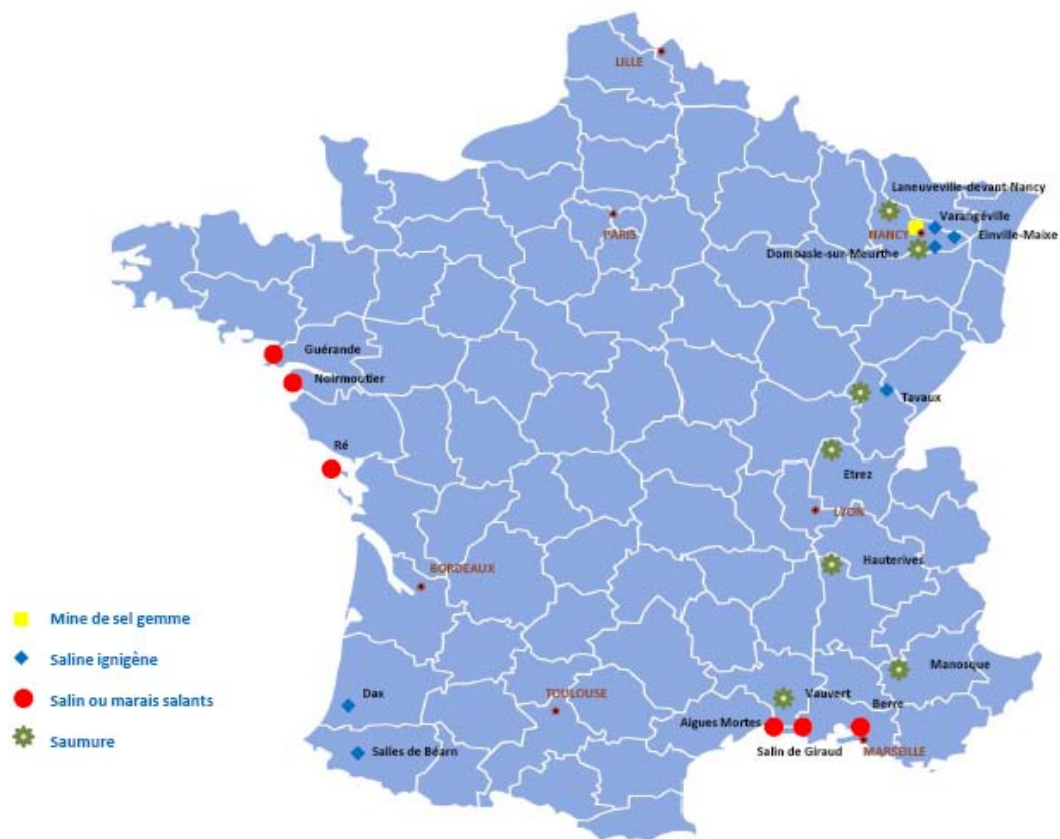
Les bassins de production sont également dépendants de conditions environnementales mais aussi logistiques : le transport et/ou la vente doivent être possibles au niveau des sites de production.



**Figure 6.** Evolution de la production mondiale de sel entre 2007 et 2011 en millions de tonnes (toutes origines confondues) (Salazar & McNutt, 2013).

### I.7.2. Cas particulier de la France

La production de sel en France employait en moyenne 1 000 salariés en 2010. Elle concerne principalement, le Midi, l’Ouest (côte Atlantique), la Lorraine, la Franche-Comté et le Sud-Ouest (Figure 7).



*Figure 7. Répartition de la production de sel en France (site Internet CSF, maj 2013).*

La France a produit  $6,1 \cdot 10^6$  Kt en 2011 ( $6,14 \cdot 10^6$  Kt en 2007) de sel sous toutes ses formes, soit un peu moins de 3% de la production mondiale. La production de la France représente 18% de celle de l'Union Européenne. Les principaux industriels du secteur sont Solvay, la Compagnie des Salins du Midi et des Salines de l'Est, les Mines de Potasse d'Alsace.

La production de sel en dissolution est en baisse et la récolte de sel marin est toujours fortement dépendante des conditions climatiques mais elle a légèrement augmentée ces dernières années (+ 11% entre 2008 et 2010) à la fois sur les sites du sud de la France et les salines de l'Atlantique. La production par les Mines de Potasse d'Alsace de sel thermique, dont près de 90% est utilisé pour le déneigement, a, quant à elle, connue une augmentation car la vente de sel cristallisé pour la viabilité hivernale ont connu une forte augmentation au niveau national (+45% entre 2009 et 2010). La production de sel gemme dans les mines et celle de sel ignigène augmentent également.

En 2010, la consommation apparente de sel en France est, avec 4 864 Kt en nette augmentation par rapport aux 2 605 Kt de 2008 soit 404 Kt pour l'alimentation et 4 460 Kt

pour le reste (déneigement, industries, agriculture... Tableau III page 39). Il est à noter que la part du sel alimentaire dans les ventes totales de sel en France a largement diminué ces dernières années (-18%), notamment à cause des recommandations du PNNS (Programme National Nutrition Santé édité en 2011).

Les importations de sel en France pour plus de 90% en provenance des pays de l'Europe connaissent une très forte augmentation. Elles sont stimulées par l'achat de sel de déneigement et représentent 1 591 Kt en 2010 contre 900,8 Kt en 2009. Ces importations proviennent essentiellement d'Espagne, du Benelux et de l'Allemagne. Les exportations de sel français sont en progression de 6,5% avec 288,5 Kt en 2010 contre 271 Kt en 2009. 90% de ces exportations ont pour destination des pays de l'Europe, le reste est pour la Suisse et les Etats-Unis.

Le site d'Aigues Mortes de la Compagnie des Salins du Midi et des Salines De L'est, qui appartient dorénavant au groupe américain Rohm & Haas Co, serait en difficulté malgré une production de 410 Kt/an (2005) ; une réorganisation serait en cours ; il est même question de fermeture (Mouron *et al.*, 1999 ; Salazar & McNutt, 2013 ; site Internet CSF, maj 2013).

## **I.8. Cas particulier du sel alimentaire**

### **I.8.1. Définition**

Le sel de qualité alimentaire est un produit cristallin se composant essentiellement de chlorure de sodium. Il peut provenir de la mer, de gisements souterrains de sel gemme ou encore de saumure naturelle.

Est concerné par cette définition :

- Le sel utilisé en tant qu'ingrédient alimentaire destiné aussi bien à la vente directe au consommateur qu'à l'industrie alimentaire,
- Le sel utilisé comme support d'additifs alimentaires et/ou d'éléments nutritifs.

### **I.8.2. Facteurs essentiels de composition et de qualité**

Le sel de qualité alimentaire doit répondre aux spécifications suivantes (Codex Alimentarius, 2006) :

- Chlorure de sodium : pas moins de 97% de l'extrait sec, additifs non compris,

- Produits secondaires naturels inorganiques dont les quantités peuvent varier en fonction de l'origine et de la méthode de production utilisée. Ils comprennent principalement des sulfates, des carbonates et des bromures de calcium, de potassium, de magnésium et de sodium ainsi que des chlorures de calcium, de potassium et de magnésium.

De plus, le sel de qualité alimentaire ne doit pas contenir de contaminants pouvant s'avérer toxiques et/ou pouvant nuire au consommateur. En particulier, les limites maximales suivantes ne doivent pas être dépassées :

- Cuivre : pas plus de 2 mg/Kg,
- Plomb : pas plus de 2 mg/Kg,
- Arsenic : pas plus de 0,5 mg/Kg,
- Cadmium : pas plus de 0,5 mg/Kg,
- Mercure : pas plus de 0,1 mg/Kg.

### I.8.3. Utilisation comme support

Le sel peut être utilisé comme support d'additif alimentaire ou d'élément nutritif pour des raisons technologiques (mélange de sel et de nitrite et/ou nitrate en salaison, par exemple) ou de santé publique (utilisé en mélange comme vecteur d'iode ou de fluor, pour prévenir aux déficiences en iode ou fluor, par exemple (Tableau IV) (Codex Alimentarius, 2006).

*Tableau IV. Réglementation relative au sel iodé et fluoré (Codex Alimentarius, 2006).*

	Sel alimentaire	Sel Iodé	Sel Fluoré
<b>Concentration</b>	[NaCl] = min. 970 g/Kg	[NaCl] = min. 970 g/Kg [Iode] = 15 – 20 mg/Kg	[NaCl] = min. 970 g/Kg [Fluor] = 250 mg/Kg
<b>Dénomination de vente</b>	Sel alimentaire Sel de table Sel de cuisine	Iodé Iodé et fluoré	Fluoré Iodé et fluoré
<b>Champ d'application</b>	Ménages Collectivités Industries alimentaires	Ménages Collectivités	Ménages Cantines scolaires
<b>Conditions</b>	Exclusivement de première intention (cuisine)		Ne pas consommer si l'eau de boisson contient F > 0,5 mg/L
<b>Allégations autorisées en France</b>		L'iodation du sel participe au bon fonctionnement de l'organisme. L'UNICEF recommande l'iodation du sel.	Le sel fluoré favorise la prévention de la carie dentaire.

#### I.8.4. Etiquetage réglementaire

Le nom du produit déclaré sur l'étiquette doit être « sel ».

En fonction de sa composition, cette désignation devra s'accompagner de la mention « alimentaire », « de cuisine » ou « de table » (Codex Alimentarius, 2006).

Quand le sel est utilisé comme support d'un ou de plusieurs éléments nutritifs et vendu comme tel pour des raisons de santé publique, le produit sera désigné de manière appropriée sur l'étiquette en utilisant par exemple les expressions « sel fluoré », « sel iodé », « sel enrichi avec du fer » (Tableau IV) (Codex Alimentarius, 2006).

L'origine du sel ou la méthode de production pourra être indiquée à condition de ne pas tromper le consommateur ou de l'induire en erreur.

Pour garantir des conditions d'hygiène alimentaires jusqu'au consommateur, la méthode de production, le conditionnement, le stockage et le transport du sel de qualité alimentaire doivent être tels que tout risque de contamination soit exclu (Codex Alimentarius, 2006).

#### Résumé

Le sel, un cristal cubique à faces centrées, peut avoir une origine terrestre ou maritime. Il est exploité par l'Homme depuis l'Antiquité car il est nécessaire à ses besoins physiologiques, aux pratiques culinaires, à la conservation des aliments et dans de nombreuses industries.

La commercialisation du sel alimentaire est réglementée afin de garantir un produit sain et conforme aux attentes du consommateur. Sa consommation conseillée est de 1 à 2 grammes de sel par jour soit 400 à 800 milligrammes de sodium par jour, pour des raisons de sécurité sanitaire, ce taux ne devrait pas excéder 4 grammes par jour (Direction générale de l'alimentation, 2013).



## CHAPITRE II - LES MICROORGANISMES DES MARAIS SALANTS

## II.1. Présentation générale

### II.1.1. Microorganismes et matériel génétique

Chaque être vivant possède un matériel génétique qui lui est propre et qui détermine l'ensemble de ses caractéristiques : son appartenance à un groupe phylogénétique, son métabolisme et tout ce qui lui permet de vivre est directement inscrit dans ses gènes. Aussi, même quand il meurt, l'organisme laisse des « traces » génétiques dans l'environnement où il s'est développé. L'environnement influence donc le type de microorganismes présents mais ce sont les traces de ces microorganismes qui seront finalement les marqueurs caractéristiques de cet environnement.

Aujourd'hui, la caractérisation d'un organisme est possible grâce à l'utilisation de techniques moléculaires modernes basées sur le matériel génétique des organismes vivants (ou ayant laissé une trace de vie) dans un écosystème, même si ce dernier n'est pas majoritaire dans l'échantillon étudié (moisissures ou bactéries du fromage, microorganismes des salines, du sel...).

Ce type de technique est particulièrement recherché en alimentaire pour assurer la traçabilité de certains produits notamment ceux dont la mise en avant résulte d'un argument marketing fondé sur l'origine géographique du produit. La traçabilité est donc au cœur du processus de sécurité, de qualité et de typicité du produit.

Ainsi, la détermination de l'origine géographique fait partie intégrante du processus de traçabilité et peut être menée à bien grâce à la détermination de la population bactérienne (densité et diversité), surtout pour les produits frais ou n'ayant pas subi de traitement thermique (la chaleur tuant les microorganismes). La caractérisation de la flore microbienne se fait alors par l'utilisation de marqueurs spécifiques qui se fixent uniquement à une séquence précise du génome visé (= sélectivité). Le complexe marqueur / génome cible est ensuite multiplié pour être détecté plus facilement grâce à la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR – technique de polymérisation en chaîne grâce à la polymérase, une enzyme de synthèse génomique) (Arcuri *et al.*, 2013).

L'utilisation de la PCR a déjà permis de déterminer l'origine géographique de poissons tels que le *Pangasius* du Vietnam dont le génome des bactéries associées varie en fonction des zones d'élevage ou le Tilapia du Cameroun qui peut être pêché dans trois lacs ou encore de fruits ou de fromages tels que le Minas Brésilien produit dans quatre zones

distinctes du pays (selon différentes méthodes de production) (Tatsadjieu *et al.*, 2010 ; Arcuri *et al.*, 2013).

Ainsi, avec l'augmentation de la précision des méthodes de caractérisation *via* des techniques d'analyse de l'ADN, l'extension de leur utilisation pour des matrices plus petites et comportant des traces plus faibles de résidus organiques (organismes vivants ou morts) ont pu récemment faire leur apparition.

Les eaux ayant des concentrations en sel proche de la saturation sont souvent peuplées par un microbiote dense (bactéries, levures mais aussi, bien entendu, microalgues). Il existe trois types de microorganismes halophiles autrement dit capables de survivre en milieu hyper salin : les archées<sup>●</sup>, les bactéries et les eucaryotes. Un organisme est considéré comme halophile, lorsqu'il est capable de se développer dans des milieux dont la concentration est supérieure à 100 g.L<sup>-1</sup> en sel et les techniques qu'il utilise pour résister aux fortes pressions osmotiques imposées par le milieu permettent de les classer facilement dans un dendrogramme (Oren, 2002b).

- Les **archées** halophiles rouges de la famille des Halobactéries sont les archéobactéries majoritaires dans les environnements hypersalins. Divisée en 15 genres et 44 espèces, la famille des Halobactéries contient des individus variés (coques, triangles, bacilles, spores) qui peuvent être regroupés facilement notamment grâce à l'étude de leur ADNr-16S (Oren, 2002b,c).
- Chez les **bactéries**, les microorganismes halophiles appartiennent à plusieurs familles aux caractéristiques variées : cellules aérobies ou anaérobies, colorées ou incolores... A titre d'exemples, les espèces *Salinibacter ruber* ou *Halorhodospira spp.* qui se retrouvent dans les marais salants, tout comme les cyanobactéries<sup>●</sup>. L'*Halorhodospira* est une alcalophile capable de photosynthèse anoxygénique, elle peut même vivre dans des environnements où la teneur en sel est de 300 g.L<sup>-1</sup>. Sur la base d'études ADN (ADNr-16S) un classement phylogénétique est également possible pour ce domaine du vivant (Oren, 2002b).
- Au niveau des **eucaryotes** (les algues), c'est la classe des Chlorophycées *stricto sensu*, qui est la plus représentée au sein des salines. Autrefois unique classe des algues vertes, elle a désormais un sens beaucoup plus restreint (le développement des techniques de classification permettant plus de précision). Cette classe regroupe ainsi environ 350 genres et 2 500 espèces (Melkonian, 1990). Les cellules flagellées de ce



groupe sont nues ou pourvues de thèque (enveloppe minéralisée) ainsi que de 2 ou 4 flagelles égaux et lisses, ou d'une sorte de couronne de flagelles chez les Oedogoniales. Le cycle de vie de ces cellules est souvent monogénétique haplontique<sup>Ⓢ</sup> (reproduction sexuée) et elles vivent principalement dans les eaux douces (dulçaquicoles<sup>Ⓢ</sup>). Cependant, certains spécimens comme *Dunaliella acidophila* se développent en milieu acide (pH voisin de 1), d'autres comme *Dunaliella salina* se retrouvent dans les marais salants. Certaines cellules eucaryotes sont en revanche terrestres et se retrouvent essentiellement dans les sols humides (les eucaryotes sont d'ailleurs les plus abondantes en nombre de genres et en nombre total de cellules dans ce type de milieu) (De Reviere, 2002).

Depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, l'algue verte unicellulaire *Dunaliella* a été étudiée comme un organisme d'intérêt producteur de pigments orange, violet ou rose et ce notamment grâce à l'observation des marais salants lors des fameux blooms<sup>Ⓢ</sup>. Deux espèces halotolérantes : *Dunaliella salina* et *Dunaliella viridis*, ont été particulièrement étudiées pour leurs mécanismes de régulation osmotique, leur production de caroténoïdes et leur photosynthèse en conditions extrêmes. La croissance de *Dunaliella* dépend de plusieurs facteurs extérieurs (Ben-Amotz *et al.*, 2009) :

#### ❖ La lumière

En fonction des espèces, les algues sont plus ou moins sensibles à l'énergie lumineuse. Par exemple, *D. salina* peut croître pour un ensoleillement entre 50 et 800  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sa croissance stagne pour 1500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  et ne se développe plus au-delà. En effet, l'exposition au soleil stimule les réactions photochimiques au sein des cellules (radiations UV, radiations photosynthétiques...), mais si les radiations sont trop importantes, elles ne permettent plus l'activation des mécanismes cellulaires. Il en va de même pour des longueurs d'onde non appropriées.

#### ❖ La température

La température optimale de développement cellulaire est propre à chaque espèce ; Elle peut varier de -35°C à +40°C. L'optimum de croissance pour *D. salina*, par exemple, est une gamme de températures comprises entre +20 et +40°C. En effet, plus la teneur en sel du milieu augmente, plus les algues sont capables de résister à des températures élevées. Chez

certaines espèces telles que *D. viridis*, la division cellulaire est directement corrélée à la température extérieure, à la teneur en sel et au taux d'azote présent dans le milieu.

#### ❖ *Le pH*

Il doit être au moins de 6 pour toutes les espèces de *Dunaliella* (sauf pour *D. acidophila*). La croissance des cellules étant inversement proportionnelle au pH : plus il est acide, moins les algues pourront se développer. Pour les microorganismes halophiles, le pH est optimum entre 7,2 et 9,1. Dans le cas particulier de *D. salina* des gammes de pH assez larges allant de 5,5 à 10,0 permettent son développement. La tolérance à l'acidité est liée à la résistance des cellules c'est à dire à leur capacité à utiliser le carbone inorganique dissout et l'hydrogénocarbonate ( $\text{HCO}_3$ ) comme sources de carbone durant la photosynthèse. Dans les marais salants, le pH est d'environ 9,0, la teneur en sel est importante et les températures fortes. La solubilité du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) est donc faible, la seule forme de carbone inorganique disponible est donc le  $\text{HCO}_3$ . *D. salina* qui vit dans ce type de milieu s'est donc adaptée pour pouvoir croître avec peu de  $\text{CO}_2$  faible en accumulant du carbone inorganique (dont les concentrations peuvent être jusqu'à 20 fois celle du milieu).

#### ❖ *La salinité*

La teneur moyenne en sel ( $\text{NaCl}$ ) pour la croissance optimale des *Dunaliella* est comprise entre 20 g/L et 40 g/L. A noter que la salinité agit directement sur la production de caroténoïdes (caroténogénèse), plus elle augmente, plus la quantité de pigments cellulaires diminue. Le maximum de production de caroténoïdes est atteint pour  $[\text{NaCl}] = 120$  g/L. Des études récentes ont de plus prouvé que chez les espèces halotolérantes l'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique, qui transforme le  $\text{CO}_2$  en  $\text{H}_2\text{CO}_3$  et vice versa, est plus importante que chez les autres espèces.

#### ❖ *Le phosphate*

La teneur en phosphate nécessaire pour la croissance des espèces halophiles est d'environ 110 à 114  $\mu\text{M}$  (les autres espèces nécessitent de plus fortes concentrations pour se développer). En effet, l'absence de membrane cellulaire rigide pour les espèces halophiles implique un mécanisme d'assimilation du phosphate complexe, souvent lié directement à la teneur en phosphate du milieu, même si certaines enzymes telles que la dihydroxyacétone

phosphate réductase permettent de réguler la pression osmotique induite par le phosphate et donc la résistance aux milieux hypersalins.

#### ❖ *L'azote*

Les espèces du genre *Dunaliella* utilisent diverses sources azotées telles que le nitrate de potassium, le nitrate de sodium, le nitrate d'ammonium, l'acétate d'ammonium, le chlorure d'ammonium ou encore l'histidine. Les sources utilisées sont fonction des espèces, sachant que la majorité du temps, leur assimilation est fonction de l'intensité lumineuse. Le manque d'azote induit un stress important au niveau des cellules, réduisant considérablement la synthèse de pigments comme les caroténoïdes. Ainsi, lorsque *D. salina* manque de source azotée, elle produit 2,5 fois moins de pigments que dans un milieu riche en azote. De même, selon les sources d'azote, les cellules grandiront plus ou moins vite (photosynthèse stimulée ou non). Par exemple, *D. salina* a une photosynthèse plus active lorsque dans son milieu, il y a de l'ammoniac ( $\text{NH}_4$ ) disponible, *a contrario*, elle se développera plus lentement si c'est du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) (-20%).

#### ❖ *Les métaux*

Les algues semblent assez bien tolérer la présence de métaux. *D. salina* peut se développer en présence de 5,94  $\mu\text{M}$  de cuivre et 4,55  $\mu\text{M}$  de cadmium par exemple. Ainsi, dans les marais salants, elles permettent un "traitement" des eaux pour une obtention de cristaux de meilleure qualité.

L'application de techniques biologiques moléculaires et notamment l'approche *via* des séquences d'ARN-ribosomal, ont fortement contribué à une meilleure compréhension de l'organisation de la communauté des microorganismes halophiles dans les écosystèmes hypersalés (Oren, 2002a).

Les marais salants sont caractérisés par deux paramètres :

- leur niveau d'eau, qui détermine leur teneur en sel : entre 20 et 36% (notion d'espace),
- la saisonnalité, qui définit quant à elle l'état du marais : glacé, trop plein, vide... (notion de temps).

Le dynamisme des marais, soumis aux facteurs « temps » et « espace » est également visible lors de l'étude des communautés de microorganismes présents en leur sein (Boujelben *et al.*, 2012) :

- Lorsque la teneur en sel est supérieure à 20%, la nature des microorganismes présents dans les marais est variable et des espèces très spécifiques d'archées et de bactéries peuvent être mises en avant. Petit à petit, les espèces se raréfient, entre 20% et 24%, les bactéries halophiles prédominent. De plus, lorsque la teneur en sel devient supérieure à 24%, l'espèce dominante change, les archées deviennent plus nombreuses que les bactéries.
- au cours des saisons, les bassins aux très fortes teneurs en sel ne subissent que peu de modifications dans leur teneur en sel alors que pour les bassins dont la concentration est comprise entre 20% et 23,8%, une succession nette « d'espèces » peut être mise en évidence. Les variations de température que subit l'environnement et plus précisément les eaux salines sont l'un des facteurs essentiels de cette variation.

Une empreinte génétique, ou profil génétique, est le résultat d'une analyse génétique, rendant possible l'identification d'un organisme à partir d'une petite quantité de ses tissus biologiques (comme par exemple chez les humains, le bulbe de cheveux, le sang, la salive, le sperme).

L'empreinte génétique repose ainsi sur le fait que bien que deux organismes parents aient une large majorité de leur patrimoine génétique identique, un certain ensemble de séquences dans leur ADN reste spécifique à chaque individu (en raison du polymorphisme). Ce sont ces séquences spécifiques d'un individu que l'analyse d'empreinte génétique permet de comparer. Si un échantillon de cellules présente la même empreinte génétique qu'un individu, ces cellules proviennent très certainement de cet individu, ou de son éventuel jumeau monozygote.

### **II.1.2. Ribosome, ADNr-16S et ARNr-16S**

Chaque cellule, qu'elle soit un organisme à elle toute seule, c'est-à-dire procaryote (comme les bactéries ou les archées) ou le composant d'un plus grand édifice (organismes macroscopiques eucaryotes), est composée de différents organites (noyau, vacuole...) qui lui permettent de vivre et de se reproduire.

Parmi eux, le ribosome, un complexe ribonucléoprotéique, dont la fonction est de traduire le code génétique, propre à chaque individu, en protéines, par l'intermédiaire des ARN messagers (ARNm).

#### ❖ *Structure du ribosome*

Le ribosome est un complexe composé d'ARN et de protéines ribosomiques, associés à une membrane (au niveau du réticulum endoplasmique granuleux des eucaryotes) ou libre dans le cytoplasme (chez les procaryotes). Commun à toutes les cellules (procaryotes et eucaryotes), le ribosome (et surtout sa composition) varie en fonction des organismes, même s'il est toujours composé de deux sous-unités distinctes.

Les procaryotes (bactéries, archées) possèdent un ribosome de 70S (S correspondant à l'unité de sédimentation de Sverdberg) composé des sous-unités 50S et 30S. Trois ARN ribosomiques sont impliqués dans sa structure (23S, 16S et 5S) ainsi que 55 protéines.

Le ribosome des eucaryotes est appelé 80S, divisé en deux sous-unités 60S et 40S. Quatre ARN (28S, 18S, 5,8S et 5S) constituent sa structure avec plus de 80 protéines.

#### ❖ *Fonction du ribosome*

Le ribosome traduit des triplets de nucléotides (un codon) portés par les ARNm en acides aminés. Ceci est possible grâce à l'intervention de molécules interprètes, les ARN de transfert (ARNt). Elles portent deux informations essentielles : un anticodon qui reconnaît le codon de l'ARNm, et un acide aminé correspondant. Ainsi, chaque codon est traduit par l'un des vingt acides aminés existants, et l'enchaînement des codons donne naissance à un enchaînement d'acides aminés, c'est-à-dire une protéine.

Le gène ADN<sub>r</sub>-16S codant pour l'ARN<sub>r</sub>-16S (ARN ribosomique 16S) est l'un des gènes les mieux conservés parmi les organismes procaryotes (eubactéries et archées). C'est donc une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier les bactéries entre elles.

En effet, l'ADN<sub>r</sub>-16S :

- comporte des séquences internes très conservées qui permettent de sélectionner des amorces universelles pour l'amplification de l'ADN<sub>r</sub>-16S de la majorité des bactéries existantes,

- comporte des séquences internes variables, qui, une fois analysées, permettent de distinguer les espèces de bactéries entre elles et de les classer en fonction de leur phylogénie,
- est d'une taille suffisamment courte (~1500 paires de bases) pour être analysé rapidement.

Les ribosomes ainsi formés de deux sous-unités comportant chacune des protéines ribosomales assemblées sur une matrice d'acides ribonucléiques (ARNr-16S ou -23S chez les procaryotes) à partir des séquences contenues dans l'ADNr, se sont donc imposés comme référence de taxonomie moléculaire car ils réunissent l'ensemble des qualités requises :

- Ils sont un élément clé de synthèse protéique, fonction très conservée car indispensable à la vie de la cellule. Le choix des ARN ribosomiques (environ 10 000 copies par cellule chez *Escherichia coli*) permet de réaliser directement des hybridations *in situ* à l'aide de sondes spécifiques fluorescentes.
- Ils ont une structure particulière faite d'une succession de domaines dont les vitesses d'évolution sont très variables, de relativement élevée à presque nulle, chacun de ces domaines ayant son importance pour l'identification moléculaire des micro-organismes. Certaines parties de l'ARNr sont identiques chez toutes les bactéries et donc utilisables comme sites de complémentarité pour des amorces universelles de séquences ou d'amplification. La comparaison des domaines conservés permet de retracer les liens de parenté qui unissent des bactéries éloignées, tandis que les domaines à vitesse d'évolution plus rapide permettent l'étude des relations phylogénétiques d'espèces plus proches. D'autres parties de séquences sont propres à un groupe et permettent ainsi l'identification de séquences dites signatures caractéristiques d'ordre taxonomique (espèce, genre, famille ou royaume).

A l'origine le choix de la molécule ARNr 16S ou 23S pour des études phylogéniques, avait été déterminé pour des raisons techniques. La taille plus importante et la présence de structures secondaires particulièrement marquées dans l'ARNr 23S ont longtemps rendu son clonage et son séquençage difficiles. Pour ces raisons, l'ARNr 16S a été choisi comme index phylogénique et en particulier pour la phylogénie des procaryotes. Ceci a permis la construction de la plus grande banque de données actuelle avec un rythme d'accroissement

supérieur à celui de toute autre molécule. C'est donc le gène "classique" pour ce genre de travail et pour les souches Bactériennes, on dispose maintenant de plus de 100 000 séquences.

## II.2. Techniques d'analyses

### II.2.1. Extraction d'ADN / ARNr et amplification par PCR

La Polymerase Chain Reaction connue sous les initiales PCR (ou Amplification en Chaîne par Polymérase, ACP) et conçue par Kary Mullis en 1985, est une réaction *in vitro* qui permet d'obtenir une quantité abondante d'ADN (ou d'ARN) spécifique à partir d'un échantillon peu abondant.

Elle permet de passer d'un échantillon de l'ordre du picogramme à du matériel utilisable de l'ordre du microgramme sans avoir recours au clonage. La PCR est capable d'amplifier un fragment d'ADN noyé dans 500 000 à 1,5 millions de cellules.

L'eau des marais salants filtrée (pores de 0,22  $\mu\text{m}$ ) permet l'obtention d'une biomasse de microorganismes halophiles d'où l'ADN (ou l'ARNr) peut être directement extrait *via* une technique d'extraction classique :

- 1/ digestion de la membrane cellulaire,
- 2/ précipitation des nucléotides grâce à un mélange d'acétate de sodium et d'isopropanol,
- 3/ isolement du précipité par centrifugation.

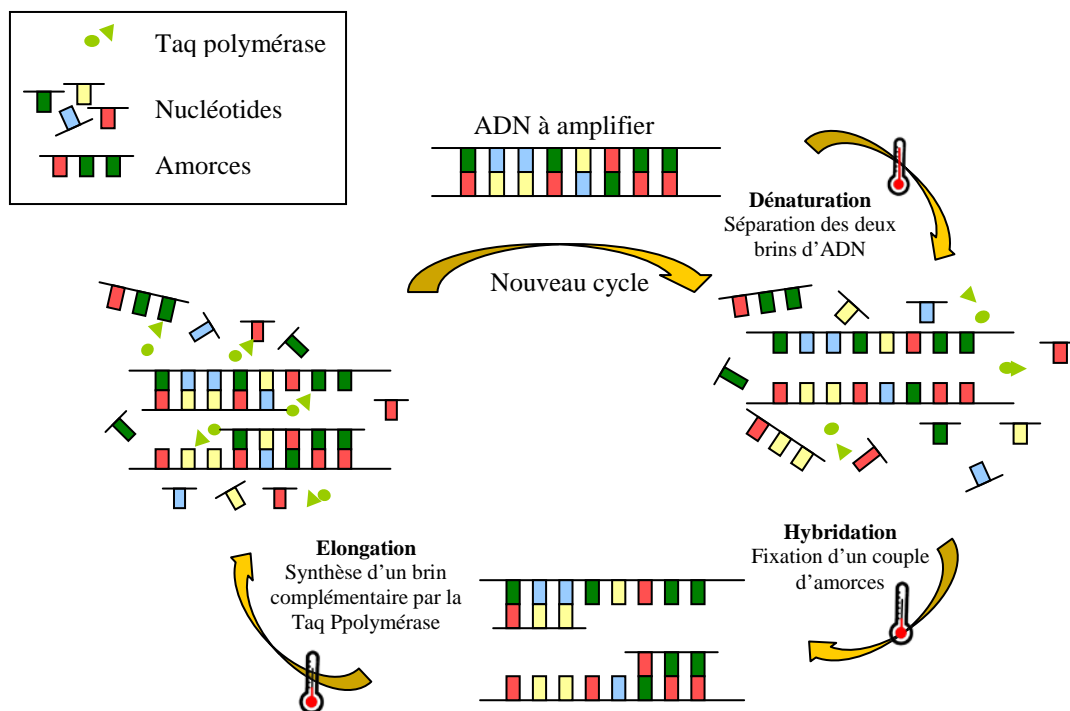
L'ADN génomique ou l'ARN ribosomal ainsi obtenu peut être conservé plusieurs mois à  $-80^{\circ}\text{C}$  sans dénaturation.

Le génome ARNr 16S des bactéries et des archées est amplifié grâce à la PCR (Figure 8) en utilisant un mélange (Boujelben *et al.*, 2012) :

- d'ADN dans lequel se trouve les séquences à amplifier,
- d'amorces spécifiques à chaque ARNr 16S, des « primers » qui se présentent sous la forme de courte chaîne d'ADN (20 à 30 oligonucléotides) complémentaire aux extrémités du fragment de l'ARNr 16S de chaque espèce à amplifier, soit deux primers différents par espèce. Ces deux amorces ont leur extrémité 3-prime (3') dirigée l'une vers l'autre encadrant ainsi la séquence à amplifier. Elles sont indispensables à l'accrochage de la polymérase.

- de solution tampon, contenant notamment du chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ), dont le rôle est de maintenir le pH du milieu constant pour permettre à la réaction d'avoir lieu. En effet la polymérase ne peut pas agir si la teneur en sel est trop élevée,
- de *Taq* polymérase, une enzyme qui ne travaille qu'à partir d'une double hélice et qui ajoute des désoxynucléotides à l'extrémité 3-prime ( $3'$ ) en croissance.
- de désoxynucléotides ou dNTP, pour l'élongation du brin d'ADN complémentaire synthétisé à partir des primers fixés sur l'ARNr.

La PCR amplifie une courte séquence d'ADN de deux ou trois kilobases nommée séquence cible en créant des amplicons. Ceux-ci seront présents à des millions d'exemplaires dans l'échantillon final rendant le reste du génome négligeable.



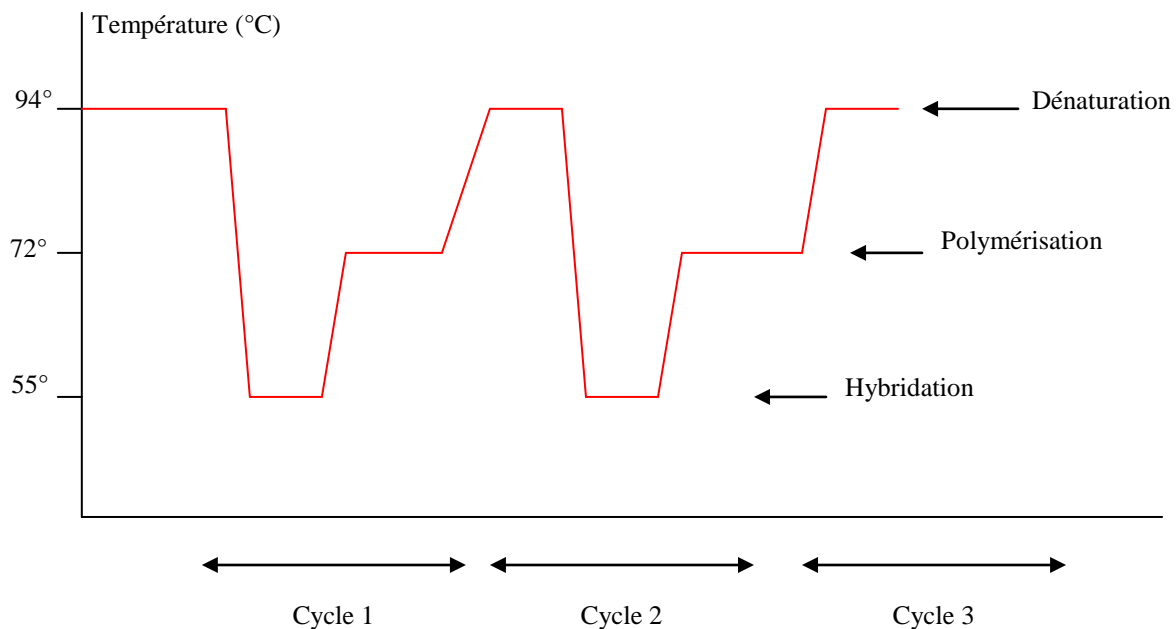
**Figure 8.** Réaction cyclique d'amplification par PCR.

Les amplicons sont obtenus par synthèses successives constituées de trois étapes de quelques minutes se produisant à des températures différentes :

- 1/ Dénaturation de l'ADN bicaténaire aux alentours de  $95^{\circ}C$ .
- 2/ Hybridation des amorces aux brins monocaténaire à  $50-60^{\circ}C$ .
- 3/ Polymérisation grâce à la *Taq* polymérase aux alentours de  $72^{\circ}C$ .



Ces trois étapes sont produites 30 à 40 fois sans interruption dans un thermocycleur d'où l'importance de la résistance à la chaleur de la *Taq* Polymérase. En effet, le principe consiste à réutiliser le produit de chaque cycle comme matrice pour les cycles suivants. La séquence cible est donc doublée à chaque cycle donnant un taux d'amplification théorique de  $2^n$ ,  $n$  étant le nombre de cycles. Cela permet d'obtenir une courbe exponentielle à l'image d'une courbe de prolifération bactérienne (Figure 9). En pratique, on n'obtiendra pas ce genre de graphique mais on assistera à un phénomène de plateau. En effet, le taux d'amplification diminue en raison de la concentration accrue des produits de la PCR qui s'hybrident naturellement entre eux ainsi qu'à l'épuisement des réactifs tel que les enzymes, les désoxynucléotides libres et les amorces.



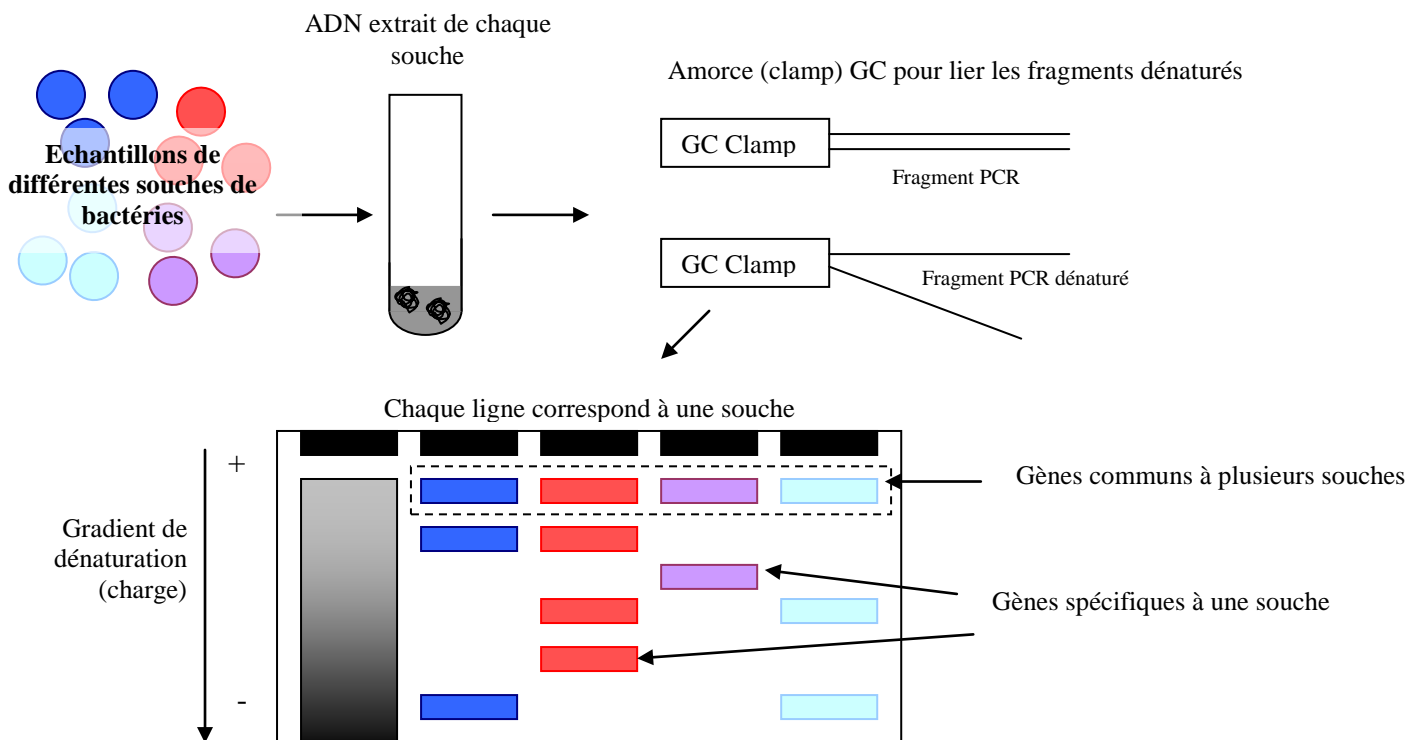
**Figure 9.** Les trois étapes clé de la PCR : Dénaturation, hybridation, polymérisation

Une fois les cycles de PCR terminés, les produits de cette polymérisation en chaîne sont prêts à être analysés.

### II.2.2. Electrophorèse en gel dénaturant ou analyses DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) et séquençage

Les amplicons sont chargés au niveau d'un gel dénaturant dont la concentration en polyacrylamide augmente (de 6% à 45-65% pour les archées et de 6% à 40-60% pour les bactéries). Dans des conditions maîtrisées de température (60°C) et de pH (tampon), les amplicons migrent à travers le gel en fonction de leur longueur (plus ils sont grands, moins ils

iront loin) pendant 16 à 18 heures. La séparation des fragments amplifiés apparaît sous forme de bandes sous la lumière UV (Figure 10).



**Figure 10.** Migration des amplicons sur gel dénaturant pour isolement des fragments et identification (DGGE).

L'identification et le séquençage des fragments se fait grâce à l'isolement des bandes dont le contenu est remis en suspension (le morceau de gel est laissé une nuit dans de l'eau distillée milliQ stérile). Les produits sont ensuite purifiés, séquencés et analysés grâce à la comparaison avec des bases de séquences connues, permettant ainsi de déterminer à quelle espèce biologique appartient l'ARNr amplifié, prouvant ainsi la présence de cet organisme (ou des traces de cet organisme) dans l'échantillon initial (Boujelben *et al.*, 2012).

### II.2.3. La cytométrie en flux (flux cytometry, FCM) et phylogénétique

La cytométrie en flux permet l'analyse de nombreux constituants cellulaires (acides nucléiques, lipides, protéines), d'organites isolés (noyaux, mitochondries, plastes, chromosomes) ou de certaines fonctions cellulaires (viabilité, activités enzymatiques, gènes rapporteurs, pH, potentiels, activités ioniques). Typiquement l'analyse se fait à plusieurs milliers d'objets par seconde.

Le cytomètre en flux comprend trois parties (Figure 11) :

- 1/ Un réseau fluide constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon.
- 2/ Un banc optique avec une ou plusieurs sources lumineuses et ses détecteurs du type photodiode (pour la diffusion de la lumière) et des photomultiplicateurs et filtres optiques qui permettent de quantifier les diverses fluorescences émises par chaque objet.
- 3/ Un microprocesseur qui convertit les signaux électriques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques.

Certains appareils, comprennent un dispositif de tri. En polarisant brièvement le jet, on obtient des gouttelettes chargées (+ ou -) qui seront déviées, avec leurs contenus, dans un champ électromagnétique. Les analyses se feront à plusieurs milliers d'objets par seconde.

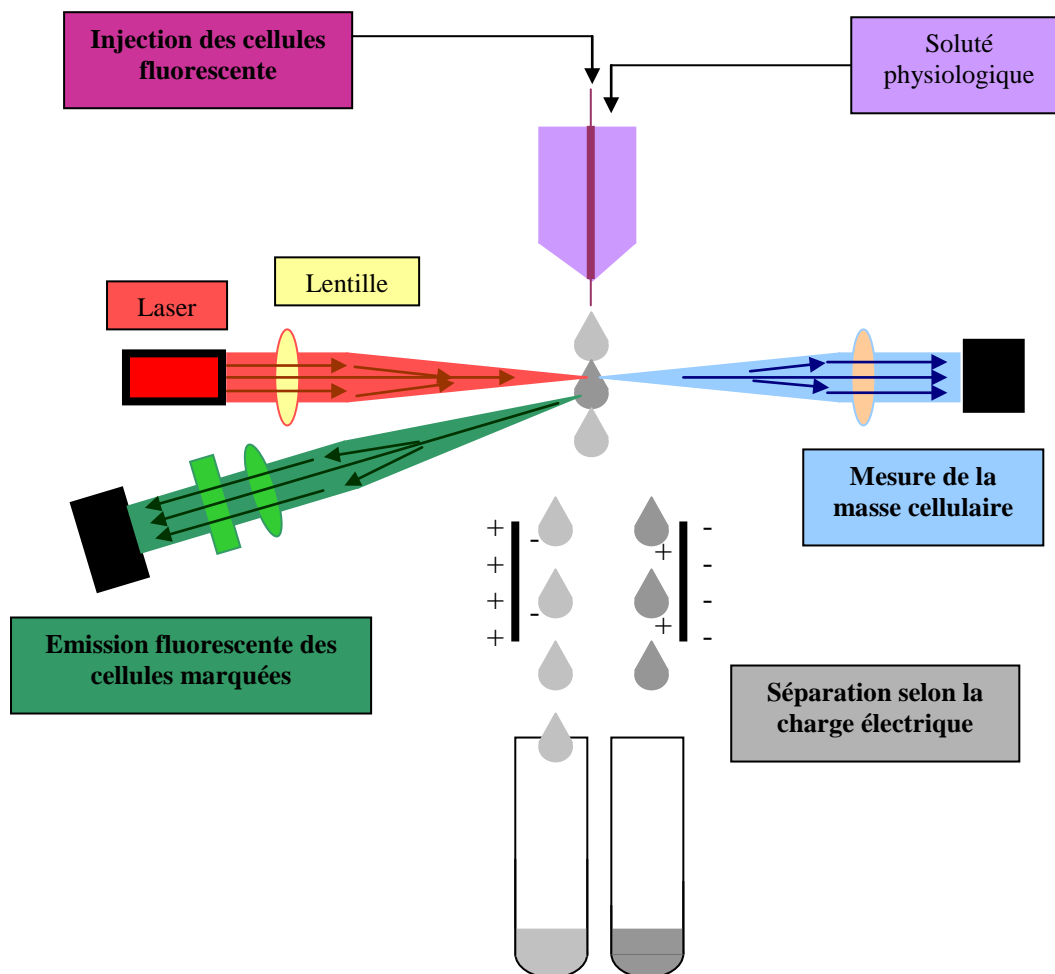
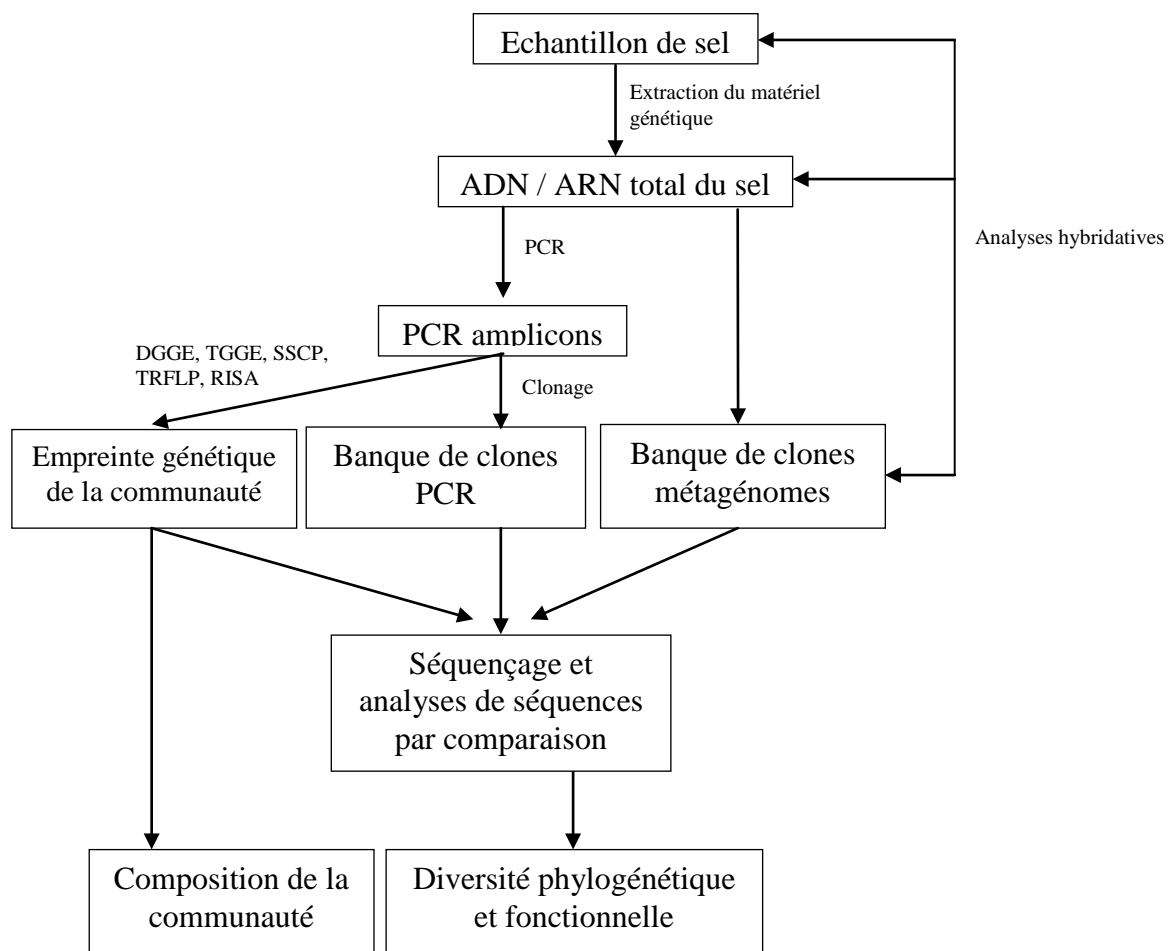


Figure 11. Schéma général du fonctionnement de la cytométrie en flux.

Il est possible de combiner la FCM avec la phylogénie (ou l'étude des relations de parenté entre différents êtres vivants permettant de comprendre l'évolution des organismes vivants). Dans le cas d'échantillons d'eau saline (bassin à 20% et 39% de sel), l'étude phylogénétique de l'ARNr 16S (échantillon *versus* banque de données) et la FCM permettent la caractérisation et la classification de la population procaryotique. Ainsi, il a été mis en évidence que les mêmes archées sont présentes quelle que soit la concentration en sel du milieu alors que les espèces bactériennes sont plus spécifiques pour une concentration donnée. 16S-DNA (Trigui *et al.*, 2011).



**Figure 12.** Synthèse des méthodes moléculaires pour l'analyse des communautés microbiennes d'un échantillon (Hernandez *et al.*, 2008).

*PCR* : polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase) ; *DGGE* : denaturant gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) ; *TGGE* : temperature gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel en température dénaturante) ; *SSCP* : single strand conformation polymorphism (polymorphisme de conformation des simples brins) ; *T-RFLP* : terminal restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de longueur de fragments de restriction) ; *RISA* : ribosomal intergenic spacer analysis (analyse de l'espace intergénique ribosomal).

### II.3. ADNr-16S : travaux antérieurs

L'analyse d'ADN permet non seulement une identification mais aussi une classification des souches étudiées. C'est pourquoi son utilisation s'étend à plusieurs domaines, concernant aussi bien la caractérisation que le contrôle des échantillons analysés.

La flore microbienne des marais salants a été mise en évidence à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle et depuis, ont été identifiés dans tous les milieux hypersalins de la planète (côtes, marais salants, lacs salés...) des microorganismes halophiles extrêmes. Grâce à l'évolution actuelle des nouvelles technologies l'identification de microorganismes jusqu'à présent inconnus est aujourd'hui possible. C'est notamment le cas des bactéries halophiles extrêmes retrouvées dans un marais salant chinois, *Halorubrum* et *Alkalibacillus*, identifiées grâce à la comparaison de leur ADNr-16S à des bases de données (Wen *et al.*, 2009).

#### ❖ Variations inter-sites : prélèvements sur sites géographiquement éloignés

Les microorganismes des marais salants sont exposés à des conditions environnementales extrêmes, notamment au cœur des marais salants : forte salinité, fort taux d'ensoleillement (donc forte radiation) et même parfois, forte pression ou faible pH. Cet environnement particulier est composé d'une faune microbienne bien spécifique : des archées comme *Haloquadratum walsbyi*, des bactéries halophiles extrêmes (5% à 30% de la population totale) tel que *Salinibacter ruber* ou des algues au métabolisme adapté telles que les espèces du genre *Dunaliella* (premier représentant des eucaryotes dans les marais salants). Il est à noter que ces milieux hypersalins sont également caractérisés par la présence de nombreuses particules virales charriées par les systèmes planctoniques.

Parce qu'il existe un lien environnemental important entre bactéries et archées et qu'elles présentent des caractéristiques similaires, il est possible de penser que les bactéries ont subi un transfert de gène latéral à partir des archées leur permettant de résister aux conditions extrêmes.

Grâce à l'analyse des ADNr-16S présents dans différents marais salants, il a été mis en évidence l'existence de *Salinibacter ruber* (ou de bactéries très similaires) dans plusieurs marais salants du monde : Espagne (Alicante et Tarragone), Baléares (Ibiza, Majorque), îles Canaries, Turquie ou encore Israël, Afrique, Pérou (marais des Andes), Mexique, Amérique du Nord ou Australie. Cette analyse a, en outre, également permis de mettre en évidence un patrimoine génétique propre à chaque région du Monde. Ainsi, la migration sur gel dénaturant

permet de mettre en évidence des gènes communs aux souches isolés mais également des gènes spécifiques à chaque origine géographique. Il y a donc une variété métabolique au sein d'une même espèce (J. Anton *et al.*, 2008).

*Haloquadratum walsbyi* est, quant à elle, une archée très fréquente et assez abondante dans les marais salants. L'étude d'ADNr-16S issu de cette souche indique qu'il existe des divergences en fonction des sites de récoltes des échantillons même si entre 86 et 98% de leur génome est similaire, les variations mineures mises en évidence permettent une classification taxonomique précise des bactéries (7 phylogroupes et 4 clones identifiés), chaque taxon étant lié à une zone géographique spécifique (Oh *et al.*, 2010 ; Dyll-Smith *et al.*, 2011 ; Saponetti *et al.*, 2011 ; Fu *et al.*, 2012).

#### ❖ Variations intra-site : prélèvements en différents points d'un même site

Au sein d'un même marais, la comparaison entre la microfaune des cristalliseurs ([NaCl] = 390 g/L,  $28,7 \times 10^7$  cellules/mL) et celle des corbiers, premiers bassins à l'entrée des marais ([NaCl] = 200 g/L,  $8,12 \times 10^7$  cellules/mL) a également permis de mettre en évidence l'évolution de la faune en fonction de la teneur en sel du milieu.

Alors que les archées se développent quelles que soient les teneurs en sel du milieu, les bactéries du genre *Salinibacter* et *Sphingobacteria* sont présentes principalement dans les bassins possédant de fortes concentrations en sel et les bactéries du genre *Phyllobacterium* sont majoritaires pour les bassins à faibles concentrations.

De même, les acides nucléiques à poids moléculaire élevé ne se retrouvent que dans les bactéries des cristalliseurs alors que les acides nucléiques à faibles poids moléculaires sont présents uniquement dans les bactéries des corbiers. Les archées quant à elles possèdent à la fois des acides nucléiques lourds et légers quelle que soit la teneur en sel du bassin. Cependant le ratio entre les deux types d'acides nucléiques change en fonction de l'environnement.

Ainsi, la taille, la structure interne et la physico-chimie des microorganismes analysés varient ainsi en fonction des bassins étudiés et de leur concentration en sel (Trigui *et al.*, 2011).

Les études sur différents points d'échantillonnage d'un même marais permettent de confirmer qu'il existe une variation du type de microorganismes présent en fonction de paramètres physico-chimiques du site, notamment lorsque la concentration en sel de

l'environnement varie. Ainsi, les flavobactéries qui semblent dépendantes de la concentration en potassium, calcium et sulfates, ne sont pas adaptées aux fortes teneurs en sel contrairement aux sphingobactéries. De même, la concentration dans les marais des bactéroïdes augmente avec la concentration en sel de l'eau. Les archées quant à elles sont présentes dans tous les bassins mais l'halobactérie, *Haloquadratum walsbyi*, semble particulièrement caractériser les cristalliseurs (Baati *et al.*, 2008).

Des études menées sur l'ADNr-18S de populations microbiennes issues de différents points de la mer du Sud en Chine, confirment l'existence d'une fluctuation des échantillons au sein d'un même lieu géographique. En effet, en fonction de la latitude de prélèvement, les échantillons présentent des résultats variés permettant une classification des microalgues présentes dans la mer de Chine (6 échantillons collectés dans différentes zones, plus de 600 séquences d'ADNr-18S identifiés) : à de hautes latitudes, les Prasinophyceae dominent alors que ce sont les Trebouxiophyceae plus nombreuses aux faibles latitudes. La température de l'eau et sa salinité pourraient être à l'origine de ces fluctuations (Li *et al.*, 2008).

#### ❖ Variations intra-échantillon : prélèvements sur un lieu unique

La précision des résultats issus de l'analyse de l'ADNr permet même la mise en avant de variations au sein d'un même échantillon. L'identification de molécules et la classification de différentes souches de *Dunaliella* a par exemple été possible grâce aux études portant sur la taille de l'ADNr-18S extrait de ces microalgues ainsi que le nombre et la position des introns mis en évidence dans leurs gènes. Trois structures d'ADNr-18S ont ainsi été identifiées : un gène ayant une taille d'environ 1770 paires de bases (pb) sans intron, un gène ayant une taille d'environ 2170 pb avec un intron à son extrémité 5' et un gène d'environ 2570 pb ayant deux introns (1 en 3' et 1 en 5'). D'autres altérations et combinaisons pouvant également être identifiées au cours des PCR réalisées. Cette étude permet de montrer qu'à l'intérieur d'un même genre, tel que *Dunaliella*, il existe une base commune (la taille de l'ADNr-18S, caractéristique de *Dunaliella salina*) mais que la structure et la position de l'intron sont très différentes. Il y a donc un réarrangement génétique possible dans le genre *Dunaliella* et ce, dans une même eau saline (Hejazi *et al.*, 2010).

### ❖ *ADNr et alimentation : la garantie d'un produit authentique*

Les techniques d'analyse d'ADNr-16S sont également de plus en plus utilisées dans le cadre d'identification lors de contrôles alimentaires. En effet ils sont garants de la composition microbiologique d'un produit, assurant ainsi au consommateur une maîtrise de la qualité, de la sécurité et de l'authenticité du produit qu'il achète.

Par exemple, la détermination d'espèces responsables de typicité géographique (label Appellation d'Origine Contrôlée...) de poissons, fromages ou de fruits peut être basée sur ce genre de technologie. C'est le cas notamment lorsqu'est vérifiée la provenance d'un *Pangasius*, un poisson du Viêt-Nam, de la Mozzarella de bufflonne, un fromage d'Italie ou encore du Minas, un fromage du Brésil, car les bactéries de leur environnement sont propres à la zone de production et au produit lui-même (analyses réalisées sur les matières premières ou le produit fini). De même, il est possible de savoir si un physalis vient de Colombie, d'Egypte, d'Uganda ou de Madagascar en étudiant la population de levures présente sur le fruit (Arcuri *et al.*, 2013 ; El Sheikha *et al.*, 2012).

## Résumé

Chaque organisme est adapté à son environnement : sa croissance et sa prolifération dépendra de ses affinités avec son milieu et de ses adaptations physiologiques face aux particularités de ce milieu. Chaque microorganisme est ainsi défini par un pool de gènes qui lui sont propres et qui permettent de le caractériser.

Un organisme halophile (du grec *halos*, sel et *philein*, aimer) est un organisme qui s'accommode ou a besoin de fortes concentrations en sel dans son milieu pour vivre. Les microorganismes halophiles sont des extrémophiles appartenant aux domaines des archées ou des bactéries, mais des plantes sauvages des régions maritimes (les halophytes) et un grand nombre d'algues sont également halophiles.

Il existe aujourd'hui de nombreuses techniques moléculaires permettant de travailler sur les microorganismes : extraction d'ADN, purification, séquençage, classification... sont autant de méthodes permettant de caractériser un microorganisme : classification, origine, phylogénie...





## CHAPITRE III - LES COMPOSÉS VOLATILS

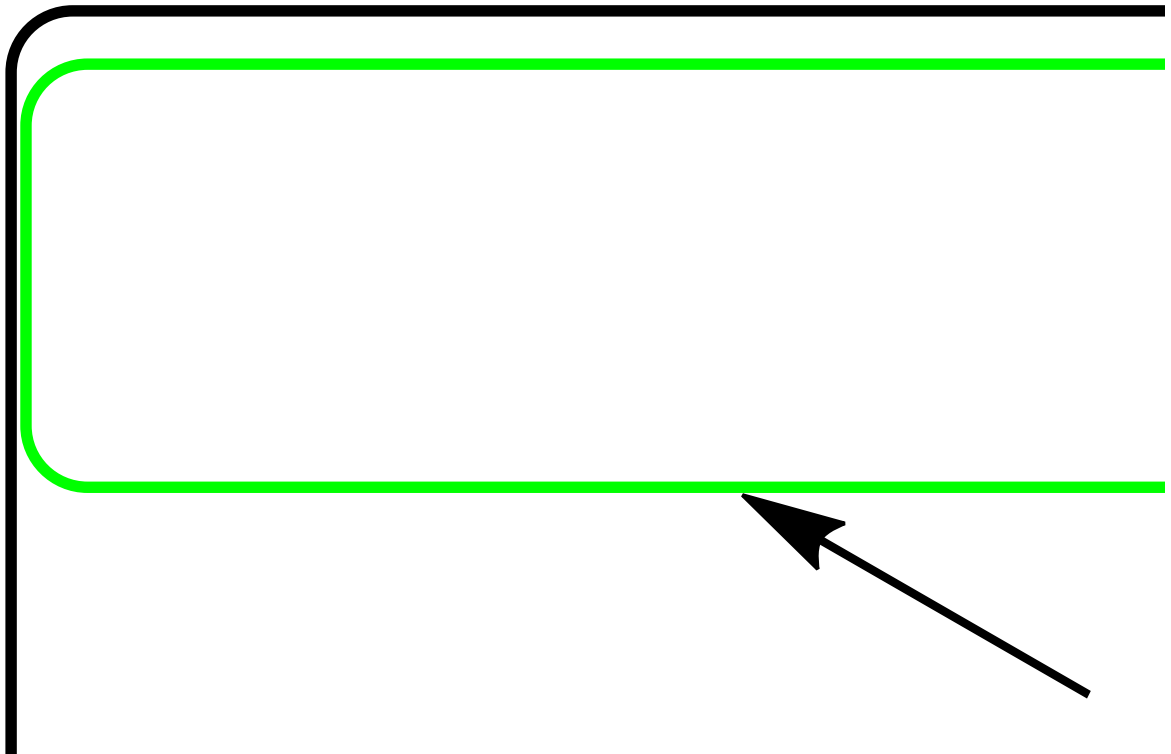
### III.1. Présentation générale

Les composés organiques volatils sont des composés à forte pression de vapeur, c'est-à-dire qu'ils sont spontanément à l'état gazeux sous des conditions de pression atmosphérique et de température ambiante. Ils peuvent être d'origine anthropique<sup>●</sup> (provenant du raffinage, de l'évaporation de solvants organiques, imbrûlés, etc.) ou naturelle (émissions par les plantes ou certaines fermentations). Selon les cas, ils sont plus ou moins lentement biodégradables par les bactéries et champignons, voire par les plantes, ou dégradables par les UV ou par l'ozone. Certains sont considérés comme toxiques et nocifs pour la santé (comme le benzène ou le formaldéhyde) alors que d'autres sont recherchés pour leurs qualités médicinales ou odorantes (comme la  $\beta$ -ionone ou la  $\beta$ -damascénone, deux dérivés des caroténoïdes aux notes olfactives puissantes et détectables à de très faibles concentrations) (Britton, 2008 ; Waché, 2001 ; Winterhalter & Rouseff, 2001a). Les composés volatils d'origine naturelle sont des composés carbonés souvent lipophiles de 6 à 20 atomes de carbone et dont le poids moléculaire est inférieur à 300 Daltons (Negre-Zakharov *et al.*, 2009). Il s'agit principalement de composés à chaînes courtes (alcools, aldéhydes, cétones, esters, lactones), de composés aromatiques, et de terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes plus rarement et dérivés des caroténoïdes). Ils peuvent être regroupés en quatre classes selon leur origine métabolique :

- les terpènes,
- les phénylpropanoïdes / benzénoïdes,
- les dérivés d'acides gras,
- les dérivés d'acides aminés.

Chez les végétaux et les algues, ces composés volatils sont biosynthétisés par des cellules spécialisées dans deux compartiments subcellulaires différents : le cytosol et les plastes (Figure 13). Ils peuvent être stockés dans des structures anatomiques très diverses : idioblastes, cavités de stockage, glandes coniques, sous-cuticulaires, trichomes glandulaires, laticifères, poches et canaux de résines. Plusieurs catégories de tissus producteurs et sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce voire dans un même organe. Les composés volatils peuvent facilement traverser les membranes cellulaires et être relâchés dans l'atmosphère ou dans le sol. La diversité et la quantité de ces composés formés et relâchés varient selon les espèces et sous l'influence de facteurs biotiques (pollinisateurs, prédateurs, symbiotes...) et abiotiques (température, UV...). La très grande majorité d'entre eux sont considérés comme étant des métabolites secondaires, composés non-requis pour la

croissance et le développement cellulaire, mais présumés avoir une fonction écologique associée aux interactions des plantes avec d'autres organismes vivants dans le contexte de la reproduction, de la défense ou de la symbiose (Dudareva *et al.*, 2006, Gershenzon & Durdareva, 2007).



**Figure 13.** Résumé des processus cellulaires impliqués dans la biosynthèse des composés volatils (Negre-Zakharov *et al.*, 2009).

AADC : Amino acide décarboxylase ; CCD : Caroténoïde clivage dioxygénase ; DAHP : 3-Déoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate ; DMAPP : Diméthylallyl diphosphate ; FPP : Farnésyl diphosphate ; FPPS : FPP synthase ; GGPP : Géranylgeranyl diphosphate ; GGPPS : GGPP synthase ; GPP : Géranyl diphosphate ; GPPS : GPP synthase ; HPL : Hydroperoxyde lyase ; IPP : Isopentényl diphosphate ; JMT : Acide jasmonique carboxyl méthyl transférase ; LOX : Lipoxygénase ; L-Phe : L-Phénylalanine ; MEP : 2-C-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate ; MVA : Mévalonate ; PAAS : Phénylacétaldéhyde synthase ; PAL : Phénylalanine ammonia lyase ; TPS : Terpene synthase.

### III.1.1. Les terpénoïdes

#### III.1.1.1. Présentation générale

Le terme de « terpènes » provient de la turpentine (*Balsamum terebinthinae*) et se réfère aux résines visqueuses et agréablement odorantes qui coulent de l'écorce de certains

arbres notamment ceux de la famille des pinacées. Les terpènes représentent la plus ancienne famille de produits naturels et la plus diverse structurellement, stéréochimiquement et fonctionnellement avec plus de 55 000 molécules identifiées à ce jour dans toutes les formes de vie (Christianson, 2008). Des centaines de nouvelles structures sont reportées chaque année. Leurs structures varient d'une simple chaîne linéaire hydrocarbonée jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés (Connoly & Hill, 1991). Alors que certains terpénoïdes exercent des fonctions métaboliques primaires essentielles pour la croissance et la reproduction chez de nombreux organismes, la majorité fonctionne comme des métabolites secondaires et contribue à l'adaptation des espèces à leur niche écologique (Harborne, 1991).

Cycliques ou à chaînes ouvertes, les terpènes sont formés par l'association d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées de l'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) (Figure 14).

**Figure 14.** Unité isoprénique en  $C_5$  et Isoprène ou 2-méthyl-1,3-butadiène

Leur formule brute est donc  $(C_5H_x)_n$  dans laquelle  $x$  est une variable fonction du degré d'insaturation de la molécule et  $n$ , une variable de 1 à 8 (à l'exception des polyterpènes comme le caoutchouc, où il peut atteindre plus de 100).

Les terpènes se rangent selon le nombre d'unités isopréniques condensées en suivant les lois énoncées par Ruzicka et Wallach (Breitmaier, 2006). Le Tableau V regroupe ces différentes classes de terpènes (pouvant également être appelés isoterpènes) : hémiterpènes ( $C_5$ ), monoterpènes ( $C_{10}$ ), sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), diterpènes ( $C_{20}$ ), sesterterpènes ( $C_{25}$ ), triterpènes ( $C_{30}$ ), tétraterpènes ( $C_{40}$ ) et polyterpènes (Breitmaier, 2006).

**Tableau V.** Les différentes classes de terpènes.

Classe	Nombre d'unités isopréniques	Nombre de carbones	Squelette de base des structures acycliques
Hémiterpènes	1	$C_5$	2-méthylbutane
Monoterpènes	2	$C_{10}$	2,6-diméthyl-octane
Sesquiterpènes	3	$C_{15}$	2,6,10-triméthyl-dodécane
Diterpènes	4	$C_{20}$	2,6,10,14-tétraméthyl-hexadécane
Sesterterpènes	5	$C_{25}$	2,6,10,14,18-pentaméthyl-eicosane
Triterpènes	6	$C_{30}$	2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-tétracosane
Tétraterpènes	8	$C_{40}$	$\Psi, \Psi$ -carotène
Polyterpènes	$n$	$(C_5)_n$	<i>trans</i> -polyisoprène

La partie isopropyle du 2-méthylbutane-1,3-diène est couramment définie comme la « tête » du terpène alors que le résidu éthyle est considéré comme la « queue ». Les mono-, les sesqui-, di- et sesterterpènes sont ainsi constitués, le plus souvent, d'un enchaînement d'unités « tête à queue ». Les tri- et tétraterpènes contiennent une liaison « queue à queue » en leur centre (E. Breitmaier, 2006) (Figure 15).

- Exemple de monoterpène : le myrcène

- Exemple de triterpène : le squalène

- Exemple de tétraterpène : le  $\beta$ -carotène

*Figure 15. Série terpénique - Enchaînement des unités isopréniques « tête-queue » et « queue-queue »*

### **III.1.1.2. Origine biosynthétique**

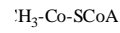
Beaucoup de recherches durant les deux dernières décennies se sont concentrées sur la biosynthèse de terpénoïdes (Negre-Zakharov *et al.*, 2009). Les voies de base de la biosynthèse des terpénoïdes végétaux ont été élucidées dans plusieurs systèmes biologiques et sont toutes attachées à la formation de seulement deux précurseurs isomères à 5 carbones, véritables

« blocs de construction » que sont l'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). Deux voies distinctes sont actuellement connues chez les organismes vivants pour la biosynthèse de l'IPP et du DMAPP : la voie classique du mévalonate (MVA) et la voie indépendante plus récemment découverte du 2-C-méthyl-D-érythriol phosphate (MEP). Les archaées, certaines eubactéries, les levures, les champignons, certains protozoaires et animaux utilisent la voie du mévalonate. Beaucoup de bactéries et des algues vertes produisent, quant à elles, l'IPP uniquement par la voie du déoxyxylulose phosphate. L'utilisation des deux voies a été établie chez les Streptomycètes, certaines algues, des diatomées marines et les plantes supérieures (Lichtenthaler, 1999).

#### ❖ *La voie du mévalonate*

Les travaux de B.W. Agranoff, en 1960, ont mis en évidence la voie du MVA (Figure 16). Depuis, sa biochimie a été étudiée exhaustivement chez les plantes (Lichtenthaler, 1999 ; Gershenzon & Croteau, 1993). Cette voie débute par la condensation de deux molécules d'acétyl-coenzyme A (Ac-CoA) en acétoacétyl-coenzyme A par l'acétoacétyl-coenzyme A thiolase (AACT). Ensuite, un supplément d'Ac-CoA est ajouté pour former le (S)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) *via* une action de condensation catalysée par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A synthétase (HMG-CoA Synthétase). La réduction de HMG-CoA en MVA est réalisée par la HMG-CoA réductase. Les dernières étapes de la synthèse de l'IPP, qui est ensuite isomérisé en DMAPP, nécessitent une série de phosphorylations du MVA par les actions consécutives de la mévalonate kinase (MK), la mévalonate-5-phosphate kinase (PCM) puis une décarboxylation par la mévalonate-5-diphosphate décarboxylase (Goto *et al.*, 2010).

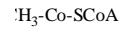
**acétyl-Coenzyme A (Ac-CoA)**



acétoacétyl CoA thiolase



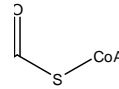
**acétoacétyl-Coenzyme A**



3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthétase



**acide (3S)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA (HMG-CoA)**



3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA réductase



HMG CoA réductase



**acide 3-phosphomévalonique (MVA)**



mévalonate kinase



**phosphate de mévalonate**

mévalonate 5-phosphate kinase

**diphosphate de mévalonate**

mévalonate 5-diphosphate décarboxylase

**diméthylallyl diphosphate (DMAPP)**



**pyrophosphate d'isopentényle (IPP)**

*Figure 16. Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP) à partir de l'acétyl-CoA.*

### ❖ *La voie du MEP*

Avant 1993, la voie du MVA était la seule origine biosynthétique connue des terpénoïdes. Identifiée en 1993, chez certains organismes, une voie alternative qui ne découle pas de l'acétyl-CoA a été totalement décrite en 2002 (Rohdich *et al.*, 2002). Il s'agit de la voie du MEP (Figure 17), aussi connue sous le nom de voie des 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (DXP/MEP). Elle débute par une réaction de condensation de type transcétolase des deux précurseurs, le pyruvate et le glycéraldéhyde-3-phosphate, catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (Dxs) conduisant à la synthèse du 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP). Puis se forme, suite à des réactions d'isomérisation et de réduction effectuées par l'enzyme 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase (IspC), l'intermédiaire clé de cette réaction, le 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP). Après plusieurs modifications mineures : adjonction et suppression d'un groupe cytidyl, cyclisation, le MEP est transformé en 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate. Ce dernier subi alors une série de réactions enzymatiques (synthèses et réductions) qui permettent alors la production d'IPP (Lichtenthaler, 1999). L'IPP est finalement isomérisé en DMAPP par l'IPP isomérase (Ipi), une enzyme présente chez tous les organismes vivants (Goto *et al.*, 2010 ; Obiol-Pardo *et al.*, 2011).



**glycéraldéhyde-3-phosphate**

**pyruvate**

**1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate  
(DXP)**

**2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate  
(MEP)**

**4-diphosphocytidyl-2C-méthyl-D-érythritol**

**4-diphosphocytidyl-2C-méthyl-D-érythritol 2-phosphate**

**2C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate**

**1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butényl-4-diphosphate**

**diméthylallyl diphosphate (DMAPP)**

**pyrophosphate d'isopentényle (IPP)**

*Figure 17. Voie de MEP (Goto et al., 2010).*

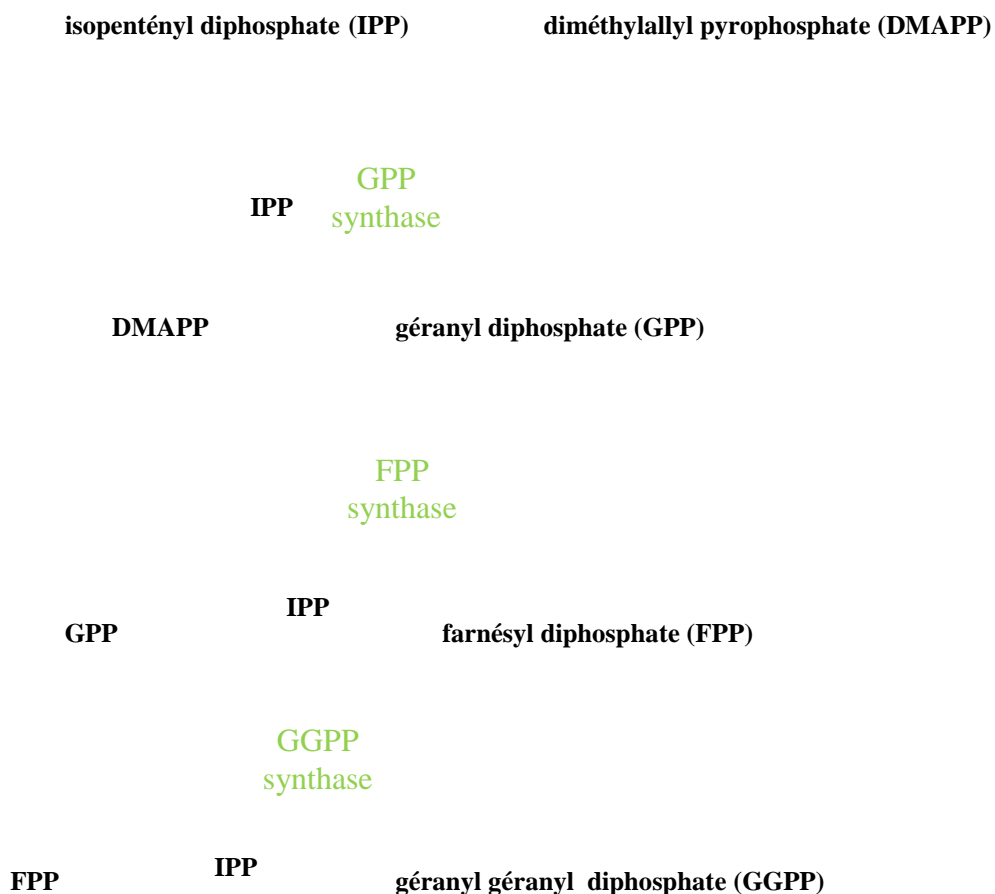
*Dxs : 1-désoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase ; IspC : 1-désoxy-d-xylulose-5-phosphate-réductoisomérase ; IspD : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-d-érythritol synthase ; IspE : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-d-érythritol kinase ; IspF : 2C-méthyl-d-érythritol-2,4-cyclophosphate synthase ; IspG : 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butényl-4-diphosphate synthase ; IspH : 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butényl-4-diphosphate réductase ; Ipi : isopentényl pyrophosphate isomérase.*

### ❖ *Utilisation de la voie du MVA et de la voie du MEP*

Les organismes utilisent une seule ou les deux voies pour synthétiser leur propre IPP. Chez les animaux, les champignons et les archées, seule la voie du MVA est utilisée (Lichtenthaler, 1999). Inversement, seule la voie du MEP existe chez les bactéries, les eubactéries, les algues vertes, les cyanobactéries, les diatomées et le *Plasmodium falciparum*. Chez les plantes supérieures, les deux voies sont actives et sont à l'origine de groupes de terpènes différents. Pour permettre une régulation différentielle de ces deux voies, elles sont actives dans des compartiments différents de leurs cellules. La voie du MVA est active au niveau du cytoplasme alors que celle du MEP, l'est au niveau du chloroplaste. Un transporteur permet un échange de l'IPP entre ces deux compartiments mais il n'est pas suffisamment actif pour rendre inutile l'une de ces deux voies (Lichtenthaler, 1999 ; Rohmer, 1999).

### ❖ *La formation des prényls diphosphates, GPP, FPP et GGPP*

La première étape de diversification des squelettes carbonés des terpènes consiste en la condensation « tête-queue » (attachement du carbone fixant le groupement pyrophosphate d'un des substrats avec le carbone opposé à celui fixant le groupement pyrophosphate de l'autre substrat) de quantités variables d'IPP et de DMAPP pour produire les prényl diphosphates (Prényl-PP) suivants : le géranyl diphosphate (GPP), le farnésyl diphosphate (FPP) et le géranyl géranyl diphosphate (GGPP). Ces réactions de condensation sont catalysées par des prényltransférases (PT) ayant comme substrat des prényl-PP à courte chaîne, la GPP synthase, la FPP synthase et la GGPP synthase. La GPP synthase catalyse la réaction de condensation de l'IPP avec le DMAPP pour former le GPP, précurseur diphosphate C10 des monoterpènes. La FPP synthase ajoute deux molécules d'IPP au DMAPP pour former le FPP, précurseur diphosphate C15 des sesquiterpènes et des triterpènes. Enfin, la GGPP synthase condense trois molécules d'IPP au DMAPP pour former le précurseur diphosphate C20 des diterpènes et tétraterpènes (Figure 18) (Bohlmann *et al.*, 1998 ; Ramos-Valdivia *et al.*, 1997).



*Figure 18. Elongation de la chaîne isoprénique.*

### III.1.1.3. Les grandes classes de terpènes volatils

Seuls les terpènes de faible poids moléculaire, c'est-à-dire, les monoterpènes, les sesquiterpènes et plus rarement les diterpènes (respectivement 10, 15 et 20 atomes de carbone) sont volatils et susceptibles d'être odorants. Parmi les dérivés terpéniques volatils, figurent également les norisoprénoïdes, issus de la dégradation des caroténoïdes. Monoterpènes, sesquiterpènes et norisoprénoïdes seront ci-après tour à tour décrits.

### ❖ *Les monoterpènes (Breitmaier, 2006)*

Environ 1 500 monoterpènes sont actuellement identifiés. La majorité d'entre eux sont une succession « tête à queue » d'unité du 2,6-diméthyl-octane (Bouwmeester *et al.*, 1998). A ce jour, on dénombre six squelettes monoterpéniques (Figure 19). En règle générale, les monoterpènes sont regroupés en trois catégories :

- les monoterpènes linéaires,
- les monoterpènes monocycliques,
- les monoterpènes bicycliques.

**2,6-diméthyl-octane**

***p*-menthane**

**thujane**

**carane**

**pinane**

**bornane**

*Figure 19. Principaux squelettes monoterpéniques.*

#### ➤ *Monoterpènes linéaires ou acycliques*

Dans la famille des monoterpènes acycliques, se retrouvent de nombreux composés responsables des odeurs de certaines plantes aromatiques tels que le myrcène issu de l'huile essentielle des feuilles de basilic, *Ocimum basilicum* ou de la bactérie *Pseudomonas sp.*; l'acétate de linallyle, issu de la lavande ; encore le citronellal, présent dans l'huile essentielle de citronnelle par exemple (Figure 20).

Marqueurs odorants de l'espèce végétale qu'ils caractérisent, ils sont souvent impliqués dans la répulsion des prédateurs (insectes) environnants.

myrcène

citronellal

Figure 20. Exemples de monoterpènes acycliques.

### ➤ *Monoterpènes monocycliques*

Chez les monoterpènes monocycliques, il existe différentes formes de squelettes (Figure 21) :

- **Le squelette de type cyclopropane ou cyclobutane** : principalement impliqués dans l'attraction sexuelle des plantes et des insectes (phéromones) comme par exemple la junionone de *Juniperus communis* (Cupressaceae) et de certaines algues vertes ou encore le fragranol des racines de l'*Artemisia fragrans* (Asteraceae).
- **Le squelette de type cyclopentane** : la majorité de ces monoterpènes sont des iridoïdes ou des séco-iridoïdes (environ 200 composés). La phéromone insecticide et antibactérienne, le (+)-iridomyrmécine de la fourmi d'Argentine (*Iridomyrmex humilis*) ou encore le (4aS,7S,7aR)-(+)-népétalactone des herbes à chat (*Nepeta cataria*, Labiatae) en sont des exemples.
- **Le squelette de type cyclohexane** : le limonène est l'un des monoterpènes cyclohexanes les plus connus. C'est un monoterpène insaturé responsable de l'odeur de nombreux agrumes. D'autres, comme le (-)-menthol sont impliqués dans le parfum de menthe poivrée de la Labiatae, *Mentha piperita*.
- **Le squelette de type cymène ou menthane benzoïde** : responsables d'odeur fortes des végétaux tel que le thymol extrait de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*, Labiatae) ou le *p*-cymène de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum sp.*, Lauraceae).

junionone

fragranol

(+)-iridomyrmécine

(4aS,7S,7aR)-(+)-népétalactone

limonène

(-)-menthol

thymol

*p*-cymène

*Figure 21. Exemples de monoterpènes monocycliques.*

➤ **Monoterpènes bicycliques**

Les monoterpènes bicycliques appartiennent à quatre grandes familles (Figure 22) :

- **Les thujanes** comme par exemple le thuyène du citron ou le (+)-3-thujanone extrait de l'huile essentielle des jeunes pousses de thuja (*Thuja occidentalis*, Cupressaceae).

- **Les caranes** tels que le (+)-3-carène provenant du pin *Pinus contorta* Dougl. (Pinaceae) ou l'un de ses dérivés, l'acide (+)-chaminique du *Chamaecyparis nootkatensis* (Cupressaceae).
- **Les pinanes**,  $\alpha$ - et  $\beta$ -pinènes constituants de la résine de pin ou encore les bornanes comme le bornéol et le camphre, issus notamment de la Sauge officinale (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae).

thuyène

(+)-3-thujanone

(+)-3-carène

acide (+)-chaminique

$\alpha$ -pinène

$\beta$ -pinène

bornéol

camphre

*Figure 22. Exemples de monoterpènes bicycliques.*

❖ *Les sesquiterpènes (Breitmaier, 2006)*

10 000 sesquiterpènes sont à ce jour connus. Il existe une très grande variété de squelettes sesquiterpéniques. La Figure 23 reprend neuf des squelettes les plus répandus dans le règne végétal (notamment chez les algues marron ou rouge).

**farnésane**

**bisabolane**

**germacrane**

**humulane**

**caryophyllane**

**cadinane**

**eudesmane**

**gaïane**

**himachalane**

*Figure 23. Principaux squelettes sesquiterpéniques.*



De façon générale, les sesquiterpènes peuvent être classés en cinq groupes :

➤ **Sesquiterpènes linéaires**

Ils ont pour squelette celui du farnésane (Figure 23). A titre d'exemples peuvent être cités, l'isomère (*E,E*)- $\alpha$ -farnésène qui contribue aux odeurs de fruits telles que la pomme et la poire ; le (*E*)-nérolidol, utilisé en phytothérapie lorsqu'il est contenu dans l'huile essentielle du Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*, Myrtaceae) ; ou encore le caparrapidiol, résultant de l'hydratation du (*E*)-nérolidol produits par les champignons du genre *Fusarium* (Figure 24).

(*E,E*)- $\alpha$ -farnésène

(*E*)-nérolidol

caparrapidiol

Figure 24. Exemples de sesquiterpènes linéaires.

➤ **Sesquiterpènes monocycliques**

Parmi les squelettes monocycliques sesquiterpéniques, les quatre les plus communs sont :

- **Le squelette de type bisabolane** (Figure 23) : plus de 100 bisabolanes dérivés de plantes sont connus à ce jour. Ils sont formés à partir de la cyclisation en C-1 et C-6 de farnésanes comme par exemple le (-)-zingibérène (Figure 25) issu du rhizome de *Zingiber officinalis* (Zingiberaceae) ou encore comme certains dérivés issus de l'algue rouge *Laurencia tristicha*.
- **Le squelette de type germacrane** (Figure 23) : obtenus lors de la cyclisation en C-1 et C-10 de farnésanes, ils sont plus de 300 identifiés. Ils peuvent être issus d'agrumes comme le germacrène B (Figure 25) isolé de l'écorce de l'agrumes *Citrus junos* (Rutaceae).
- **Le squelette de type élémène** (Figure 23) : environ 50 élémanes sont connus à ce jour y compris le  $\beta$ -élémonone (Figure 25) composant de la myrrhe.
- **Le squelette de type humulane** (Figure 23) : issu de la cyclisation en C-1 et C-11 des sesquiterpènes linéaires. Une trentaine de composés a déjà été

identifiée, comme par exemple les époxyhumuladiènes, dérivés des humulènes (Figure 25), entrant dans la composition principale des huiles essentielles de trèfles (*Caryophylli flos*, Caryophyllaceae) et de gingembre (*Zingiber zerumbeticum*, Zingiberaceae) par exemple.

**(-)-zingibérène**

**germacrène B**

**$\beta$ -éléménone**

**2,3-époxy-6,9-humuladiène**

**6,7-époxy-2,9-humuladiène**

**9,10-époxy-2,6-humuladiène**

*Figure 25. Exemples de sesquiterpènes monocycliques.*

#### ➤ *Sesquiterpènes bicycliques*

Les sesquiterpènes bicycliques retrouvés dans le genévrier cade (*Juniperus oxycedrus*, Cupressaceae) peuvent être cités comme exemples de cette famille. Il s'agit de cinq sesquiterpènes bicycliques isomères dérivés du cadinane (4-isopropyl-1,6-diméthyl-décahydronaphtalène) et communément appelés  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - et  $\varepsilon$ -cadinène (Figure 26). Ils entrent dans la composition de l'huile essentielle obtenue à partir du bois de ce végétal.

$\alpha$ -cadinène

$\beta$ -cadinène

$\gamma$ -cadinène

$\delta$ -cadinène

$\varepsilon$ -cadinène

*Figure 26. Exemples de sesquiterpènes bicycliques.*

➤ *Sesquiterpènes tricycliques*

Les santalènes, les santalols (alcools correspondants des santalènes) ou les ylangènes sont des composés odorants de cette classe (Figure 27) (Parker *et al.*, 2007).

- **Les santalènes et santalols**, aux notes boisées particulièrement tenaces, constituent les composés majoritaires de l'huile essentielle du santal blanc (*Santalum album*, Santalaceae).
- **Les ylangènes** retrouvés notamment dans l'huile essentielle d'Ylang-Ylang sont caractérisés par une odeur poivrée.

$\alpha$ -santalène

$\beta$ -santalène

(+)-(Z)- $\alpha$ -santalol

$\alpha$ -ylangène

$\beta$ -ylangène

*Figure 27. Exemples de sesquiterpènes tricycliques.*

#### ➤ *Sesquiterpènes polycycliques*

En plus des sesquiterpènes mono-, bi- ou tricycliques, il existe des composés polycycliques dont les voies métaboliques et les rôles sont très variables en fonction de leur origine. A titre d'exemples, citons, la santonine et l'atémisinine, lactones utilisées en médecine ou encore l'acide abscisique, hormone végétale qui joue un rôle primordial dans le développement, ce composé stimulant notamment la chute des feuilles (Figure 28).

santonine

atémisinine

acide abscisique

*Figure 28. Exemples de sesquiterpènes polycycliques.*

#### ❖ *Les Composés Dérivés des Caroténoïdes (CDC)*

*The carotenoids are the most interesting class of compounds with which I have worked, and they have given me a great deal of pleasure. Paul Karrer (Prix Nobel de Chimie - 1937).*

Les caroténoïdes constituent une famille de terpènes à 40 atomes de carbones. Ils sont connus grâce à certains pigments faisant partie de cette famille, notamment un pigment photosynthétique majeur, le  $\beta$ -carotène, mais également des pigments aux propriétés anti-oxydantes comme le lycopène de la tomate (Figure 29).

**$\beta$ -carotène**

**lycopène**

*Figure 29. Exemples de pigments de caroténoïdes.*

Les caroténoïdes représentent en fait l'une des plus grandes et des plus diversifiées classes de pigments naturels (environ 600 composés identifiés en 2001 (Winterhalter & Rouseff, 2001b), plus de 750 en 2014). Même s'ils jouent un rôle dans la photosynthèse, la photoprotection et la nutrition des végétaux, ils sont surtout connus et étudiés pour leur rôle de précurseurs dans la fabrication de pigments. Ils présentent ainsi un double intérêt pour l'organisme qui le produit :

- sous forme de pigment, ils peuvent jouer un rôle tant au niveau de l'absorption de lumière qu'au niveau de la communication (attraction d'insectes *via* leur couleur orange),
- alors que lorsqu'ils sont dégradés, ils entreront en jeu dans la communication intra ou interspécifique de l'organisme.

Leurs fragments ou composés dérivés des caroténoïdes (CDC ou norisoprénoïdes) jouent également un rôle important dans la physiologie des organismes.

Les CDC, issus de l'oxydation des chaînes polyènes riches en électrons des caroténoïdes, constituent des composés volatils odorants dont il a été démontré par Peter Winterhalter (Allemagne) et Russel L. Rouseff (Etats-Unis) l'appartenance au groupe des sémiochimiques (molécules naturelles produites par des organismes vivants et intervenant comme moyen de communication intra ou interspécifique). La majorité des CDC, possèdent

ainsi, en commun une partie du squelette des caroténoïdes desquels ils sont issus et peuvent donc facilement être reliés au « caroténoïde initial ». Les CDC peuvent se retrouver partout chez les végétaux ou les produits issus des végétaux : dans les feuilles de tabac ou de thé, dans les huiles essentielles de fruits, d'épices ou encore comme additifs, dans le vin, le café, le miel... En effet, la formation de dérivés peut se dérouler durant le stockage, le traitement ou la transformation de matériel végétal et ces produits contribuent à l'obtention de l'arôme ou de la flaveur désirée, par exemple lors de la production commerciale de thé, vin ou tabac (Britton, 2008).

➤ *Les différentes voies de formation des CDC*

Alors que les voies de synthèse des caroténoïdes sont maîtrisées, celles des CDC restent encore peu connues. Les travaux réalisés jusqu'à ce jour ont montré que l'obtention de CDC directement à partir de caroténoïdes pouvait se faire selon deux voies : l'une chimique et l'autre enzymatique (Figure 30).

- La voie chimique inclue la photo-oxygénation initiée par la lumière, la présence d'oxygène et une hausse de la température.
- La voie enzymatique est, quant à elle, catalysée grâce à la dioxygénase. Trois étapes sont requises pour générer un CDC par biodégradation :
  - 1/ le clivage initial par la dioxygénase,
  - 2/ l'obtention d'intermédiaires polaires (précurseurs), résultant des transformations enzymatiques ultérieures à l'action de la dioxygénase,
  - 3/ la catalyse acide qui permet la conversion de précurseurs non-volatils en composés aromatiques libres.

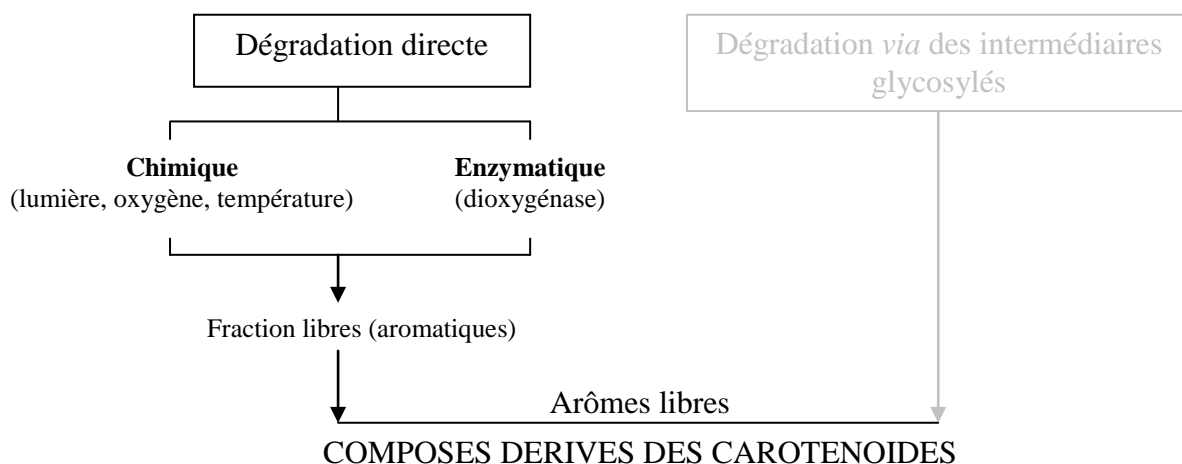


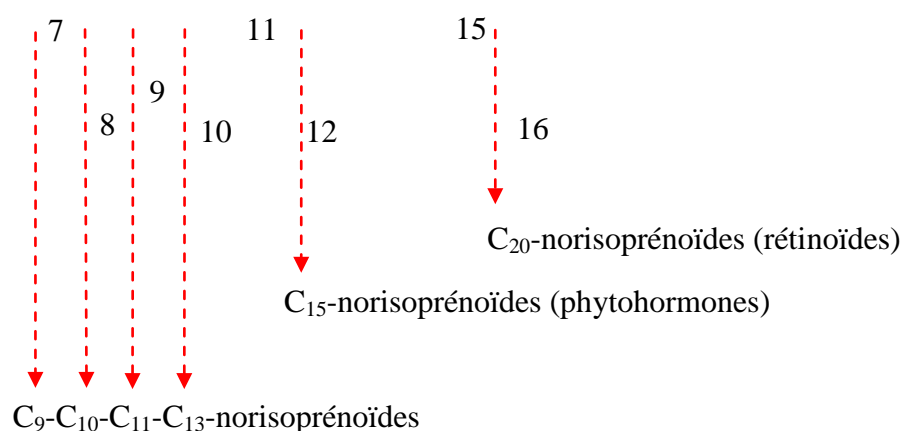
Figure 30. Les différentes voies de dégradation des caroténoïdes (Mendes-Pinto, 2009).

Le détail de ses étapes est encore méconnu à ce jour. Seul dans de rares cas, le système de dégradation a été caractérisé (en partie), comme par exemple chez la cyanobactérie *Mycrocystis* sp. (Winterhalter & Rouseff, 2001b).

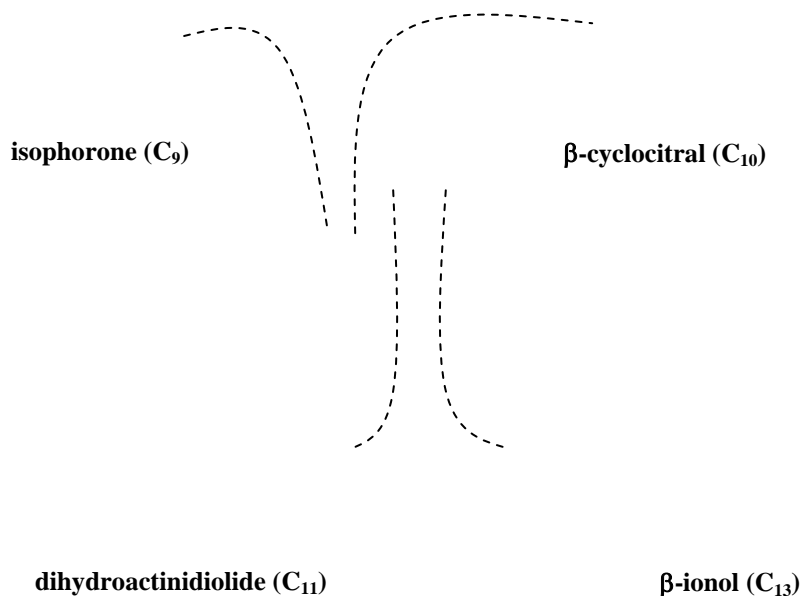
➤ **Diversité des composés dérivés des caroténoïdes**

A l'issue du processus de dégradation, en fonction du clivage oxydatif observé (spécifique ou non en fonction des enzymes entrant en jeu : caroténases ou oxydases (Fleischmann *et al.*, 2001) (Figure 31), plusieurs grandes classes de CDC en fonction de leur taille sont obtenues (Figures 31 et 32) :

- 1/ **Les C<sub>20</sub>-norisoprénoïdes** ou rétinoïdes dont le squelette est constitué de 20 atomes de carbone. Ils sont obtenus par clivage central de la molécule de caroténoïdes.
- 2/ **Les C<sub>15</sub>-norisoprénoïdes** ou phytohormones dont le squelette est constitué de 15 atomes de carbone. Ils sont formés par clivage de la double liaison C(11,12).
- 3/ **Les C<sub>9</sub> à C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes**, CDC à 9, 10, 11 ou 13 atomes de carbones et issus du clivage des liaisons C(6,7), C(7,8), C(8,9) et C(9,10) respectivement.



**Figure 31.** Principales coupures de caroténoïdes conduisant à la formation de norisoprénoïdes.



**Figure 32.** Exemple de coupures des caroténoïdes conduisant à la formation de norisoprénoïdes.

Concernant les C<sub>9</sub> à C<sub>13</sub> norisoprénoïdes, il s'agit de composés volatils formés dans la cellule dont la concentration est fonction de la teneur initiale en caroténoïdes. La concentration en caroténoïdes influence en effet l'action des enzymes. Les norisoprénoïdes C<sub>9</sub> à C<sub>13</sub> peuvent être précurseurs d'arômes et se divisent alors en trois classes (Knapp *et al.*, 2001) :

- La plus large, composée des molécules contenant des ponts glycosidiques, obtenus notamment durant la maturation du fruit ou la fermentation. Cette classe comprend, entre autres, la β-damascénone et la vitispirane (Figure 33).
- Les polyols cycliques qui après perte d'eau sont transformés en précurseurs volatils telles que la théaspirane (Figure 33).
- Les esters de glucose comme par exemple la marmelo lactone du coing (Figure 33).



**$\beta$ -damascénone**

**vitispirane**

**théaspirane**

**marmelo lactone**

*Figure 33. Exemples de norisoprénoïdes C<sub>9</sub>-C<sub>13</sub>.*

### III.1.2. Les phénylpropanoïdes / benzénoïdes

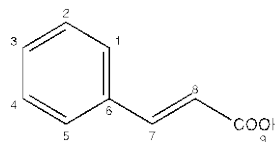
#### III.1.2.1. Présentation générale

Les benzénoïdes et les phénylpropanoïdes sont des composés aromatiques qui contribuent aux odeurs de plusieurs plantes et jouent un rôle important dans la communication ou le mécanisme de défense des végétaux (Dudareva *et al.*, 2006 ; Schwab *et al.*, 2008), ils peuvent notamment être obtenus grâce à une symbiose entre bactéries, champignons et plantes.

#### III.1.2.2. Origine biosynthétique

Ils constituent la seconde classe de composés volatils la plus abondante et dérivent tous du même précurseur, la L-phénylalanine (L-Phe) (Figure 34). Cette dernière peut subir (Dudareva *et al.*, 2006) :

- L'action d'enzymes telles que l'acide aminé décarboxylase (AADC) ou la phénylacétaldéhyde synthase (PAAS) qui permettent la formation directe de phénylpropanoïdes.
- L'action de la L-phénylalanine aminolyase (PAL) qui permet la formation de l'acide *trans*-cinnamique (Figure 34) précurseur d'un grand nombre de benzénoïdes et de phénylpropanoïdes.



**L-phénylalanine**

**acide-*trans*-cinnamique**

*Figure 34. Les précurseurs des phénylpropanoïdes et des benzénoïdes.*

Les phénylpropanoïdes volatils sont réduits au niveau du carbone 9 (en aldéhyde, alcool ou alcane/alcène) et/ou présentent un groupement *O*-alkyle à la place de la fonction OH du noyau benzénique ou de la fonction carboxyle de la chaîne linéaire. Parmi cette classe de composés, les plus connus sont le phényléthanol, le phénylacétaldéhyde ou encore l'eugénol (Figure 35).

**phényléthanol**

**phénylacétaldéhyde**

**eugénol**

*Figure 35. Principaux phénylpropanoïdes.*

Les benzénoïdes sont des dérivés des phénylpropanoïdes obtenus par perte de deux atomes de carbone au niveau de la chaîne latérale. Peuvent être cités par exemple, le benzaldéhyde, le benzoate de méthyle et l'acétate de benzyle (Figure 36).

**benzaldéhyde**

**benzoate de méthyle**

**acétate de benzyle**

*Figure 36. Exemples de benzénoïdes.*

### III.1.3. Les dérivés d'acides gras

#### III.1.3.1. Présentation générale

Les dérivés d'acides gras ou composés aliphatiques comme le (3Z)-hex-3-én-1-ol, l'hexanal, le nonanal et le méthyl-jasmonate constituent un autre groupe important de composés volatils, notamment chez les plantes (Dudareva *et al.*, 2006) (Schwab *et al.*, 2008). Ce sont, par exemple, les composés aliphatiques volatils à six carbones à l'origine des odeurs vertes et fraîches.

#### III.1.3.2. Origine biosynthétique

Les dérivés d'acides gras sont produits par dégradation d'acides gras polyinsaturés en C18 (acide linoléique et acide linolénique) par la voie de la lipoxygénase. Les étapes importantes sont la peroxydation des acides linoléique et linolénique par la lipoxygénase (LOX), qui conduit à la formation de deux précurseurs : l'acide (9S)-hydroperoxy-linoléique et l'acide (13S)-hydroperoxy-linolénique. La lyse de ces hydroperoxydes catalysée par l'hydroperoxyde lyase (HPL), conduit à la formation d'aldéhydes à neuf carbones (C<sub>9</sub>), comme par exemple le (2E,6Z)-nona-2,6-diéanal et à six carbones (C<sub>6</sub>), comme par exemple le (3Z)-hex-3-éanal (Figure 37). Ces aldéhydes peuvent subir des conversions spontanées en leurs isomères par un réarrangement ou l'action d'une alkyle isomérase ou peuvent être réduits en alcools par une alcool déshydrogénase (ADH) comme par exemple le (3Z,6Z)-nona-3,6-dié-1-ol et le (3Z)-hex-3-én-1-ol.

**Figure 37.** Formation de dérivés d'acides gras.

*Encadré bleu* : Voie de l'allène oxyde synthase (AOS) conduisant au jasmonate de méthyle ; *Encadré vert* : Voie de l'hydroperoxyde lyase (HPL) conduisant aux composés volatils en C<sub>6</sub> et C<sub>9</sub>. AAT : Alcool acyltransférase ; ADH : Alcool déshydrogénase ; AI : Alcène isomérase ; JMT : Acide jasmonique carboxyle méthyltransférase.

### **III.1.4. Les dérivés d'acides aminés**

#### **III.1.4.1. Présentation générale**

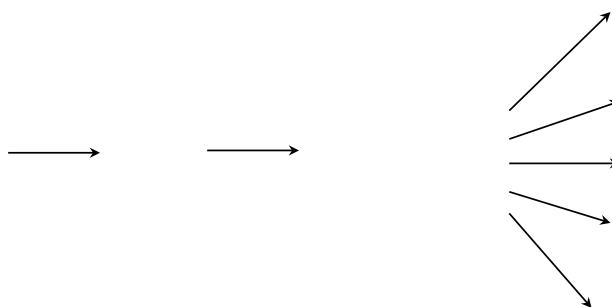
Les dérivés d'acides aminés regroupent de nombreux composés volatils incluant des aldéhydes, des alcools, des esters, des acides et des composés azotés et soufrés. Ces composés proviennent d'acides aminés tels que l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine ou la méthionine.

#### **III.1.4.2. Origine biosynthétique**

Les acides aminés issus de la dé-amination d'acides  $\alpha$ -cétoniques, forment des aldéhydes, des acides, des alcools et des esters tels que le méthylbutanol, l'acétate de 2-méthylbutyle et l'acétate de méthylpropyle après décarboxylation, réduction, oxydation et estérification. (Dudareva *et al.*, 2006 ; Schwab *et al.*, 2008) (Figure 38).

*Figure 38. Formation de dérivés d'acides aminés.*

La méthionine et la cystéine ont été détectées comme précurseurs de composés soufrés tels que le méthanethiol, le diméthyldisulfure et les thioesters responsables des odeurs d'ail, d'oignon ou de pomme de terre bouillie (Bialecki & Smadja, 2014) (Figure 39).



*Figure 39. Formation de dérivés soufrés d'acides aminés.*

## **III.2. Techniques d'extraction des composés volatils : cas particulier de la microextraction sur phase solide (SPME)**

L'extraction est une technique qui permet d'isoler des composés d'intérêt d'une matrice qui les contient. Le choix de la technique est donc important et repose sur la nature de l'échantillon et du type de composés à extraire.

Plusieurs champs d'études, comme l'analyse de polluants atmosphériques, de composés volatils floraux, d'arômes alimentaires, nécessitent des méthodes permettant l'échantillonnage de composés volatils et leur concentration avant analyse. Ces investigations utilisent particulièrement les techniques d'« headspace » (HS) ou « espace de tête » reposant sur la volatilité de l'analyte recherché dans une matrice complexe non chromatographiable. Ces techniques peuvent être regroupées selon leur aspect statique (sans circulation d'air) ou dynamique (avec circulation d'air). Parmi les techniques statiques, se trouve la microextraction sur phase solide (SPME) ; parmi les méthodes dynamiques, peuvent être cités le « Close-Loop Stripping », le « Pull- » et « Push Pull-systems ».

Pour toutes ces méthodes de collecte des composés volatils, la chambre de collecte doit être dépourvue de matériaux pouvant retenir les composés volatils ou causer des relargages de composés pouvant contaminer l'espace de tête. Les matériaux les plus appropriés sont le verre et le Téflon alors que le caoutchouc, le plastique, les colles, les adhésifs et le bois sont à proscrire. Seule l'extraction par SPME sera développée ci-après, car il s'agit de la méthode utilisée au cours de ce travail de recherche, celle-ci présentant de nombreux avantages. Les méthodes d'extraction par headspace dynamique sont quant à elles décrites en Annexe 3.

### **III.2.1. Principe de la SPME**

Il s'agit d'une technique d'extraction sans solvant applicable à des molécules organiques plus ou moins volatiles, à partir d'échantillons qui peuvent-être aqueux, solides, gazeux ou même à l'état de traces. Cette technique qui ne nécessite pas l'usage de solvants, présente l'avantage d'être peu coûteuse et simple d'utilisation. Elle permet en outre, la collecte de composés volatils aux seuils limites de détection de l'ordre de la partie par billion par volume (ppbv).

Introduite au début des années 1990 par les canadiens Pawlliszyn et Arthus et commercialisée en 1993 par la société Supelco, la microextraction sur phase solide (SPME) a

su trouver de très nombreuses applications dans des domaines variés : environnement, pharmacie, toxicologie, chimie légale ou encore agroalimentaire.

Le principe de base de la méthode repose sur la technique d'ab(ad)sorption<sup>●</sup> - désorption utilisant une fibre de silice fondue, revêtue de différents types d'ab(ad)sorbants inertes (Stashenko & Martinez, 2012 ; Pawlinsyn, 1999). Ces ab(ad)sorbants peuvent varier de polarité et d'épaisseur. Ils sont sélectionnés selon les différents types d'applications désirés. Après concentration des molécules sur la phase polymérique pendant la phase d'extraction, ces molécules sont transférées dans l'injecteur d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse (CG) ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour être désorbées, c'est la phase de désorption des molécules.

### III.2.2. Description du système SPME

Le système SPME est composé :

- d'une fibre de 1 à 2 cm enduite d'une phase polymérique dont l'épaisseur varie entre 7 et 100  $\mu\text{m}$ ,
- d'un piston en acier inoxydable sur lequel est attachée la fibre.

Ce système est protégé par une partie métallique amovible qui permet la protection de la fibre lorsqu'elle est inutilisée. Pour des raisons pratiques, l'ensemble est fixé sur un porte fibre, le système complet formant ainsi une seringue SPME (Figure 40).

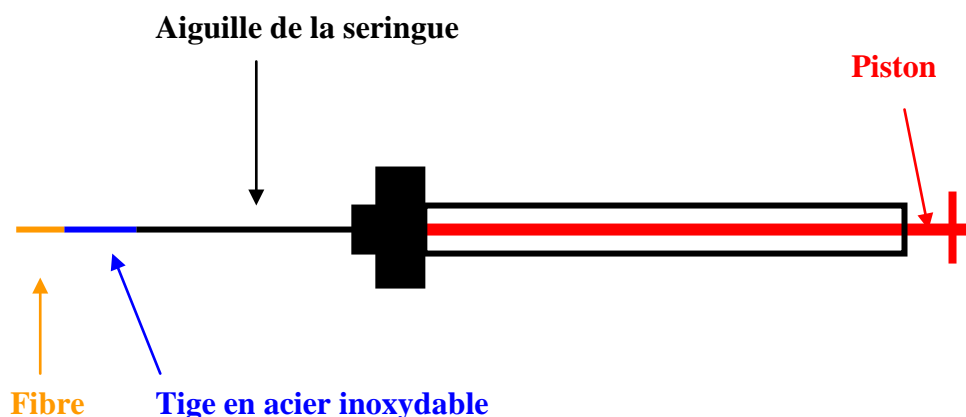


Figure 40. Porte fibre et fibre SPME.

### III.2.3. Revêtement des fibres

Le type de fibre utilisée dépend des résultats attendus et de la méthode utilisée pour les obtenir. Pour un échantillon donné, afin d'avoir le panel le plus large possible en un minimum de temps, la fibre retenue doit présenter trois caractéristiques (Shirey, 1999) :

- peu ou pas de sélectivité,
- une rapidité d'extraction,
- une grande sensibilité.

Le choix du revêtement de la fibre en silice est essentiel pour un bon couple extraction/analyse. Il existe à ce jour plusieurs revêtements ayant différentes propriétés. Ils sont classés en deux groupes (Shirey, 1999) :

#### ➤ *Les phases liquides*

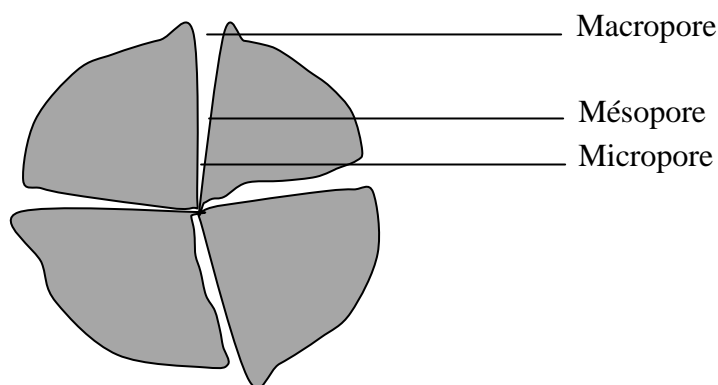
Les phases polymériques liquides recouvrant la fibre sont généralement classées en fonction de leur polarité et de leur épaisseur. La phase apolaire la plus utilisée est le polydiméthylsiloxane (PDMS). Plus son épaisseur est importante plus elle va capter de composés mais plus le temps d'extraction va être allongé. Parmi les phases polymériques liquides polaires, se trouvent le polyacrylate (PA) et le Carbowax (CW). A température ambiante, le polyacrylate est solide ce qui lui confère une très bonne résistance à la température et aux solvants. Cependant, la migration des composés vers la fibre et hors de la fibre est ralentie par sa présence et une forte température est nécessaire pour leur désorption. Le Carbowax (également utilisé comme colonne dans la chromatographie en phase gazeuse) a quant à lui tendance à gonfler ou se dissoudre dans l'eau. Il ne résiste pas très bien à la chaleur (>220°C), il est donc souvent couplé à d'autres matériaux d'enrobage tel que le divinylbenzène (DVB).

#### ➤ *Les mélanges poreux de particules*

Les pores ont la capacité d'adsorber les analytes et de les retenir physiquement grâce à leur conformation. Les fibres recouvertes de matériaux poreux sont généralement plus adaptées à l'analyse de microtraces de composés (ppm). Par exemple, la surface de contact du divinylbenzène (DVB), qui présente des mésopores eux-mêmes recouverts de macro et de micropores, est approximativement de 750 m<sup>2</sup>/g. Ces mésopores sont ainsi idéaux pour piéger les analytes en C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>. Le DVB étant solide, il est nécessaire de le combiner à une phase liquide afin de le fixer sur la fibre. Son association avec le CW en particulier permet d'augmenter la polarité de la fibre et sa capacité à capter des composés. Ainsi, la combinaison



DVB, CW et PDMS permet d'améliorer grandement la rétention de petits analytes et de composés polaires d'une fibre uniquement constituée de PDMS. Le revêtement devient néanmoins plus fragile. Parmi les revêtements adsorbant, le Carboxen 1006 présente plusieurs caractéristiques notables, notamment lorsqu'il est mélangé au PDMS car il permet la création d'une phase bipolaire pour les petits analytes. En effet, le Carboxen présente une série de pores synthétiques au design particulier (et maîtrisé), réseau de méso, macro et micropores, qui lui permet d'être adapté à l'adsorption de nombreux composés de différentes tailles (sans pour autant retenir les composés tels que l'oxygène ou l'azote qui sont souvent des contaminants en SPME-HS). De plus, la désorption des composés lors de l'analyse est facile mais longue en raison de la forme de son réseau de pores (Figure 41).

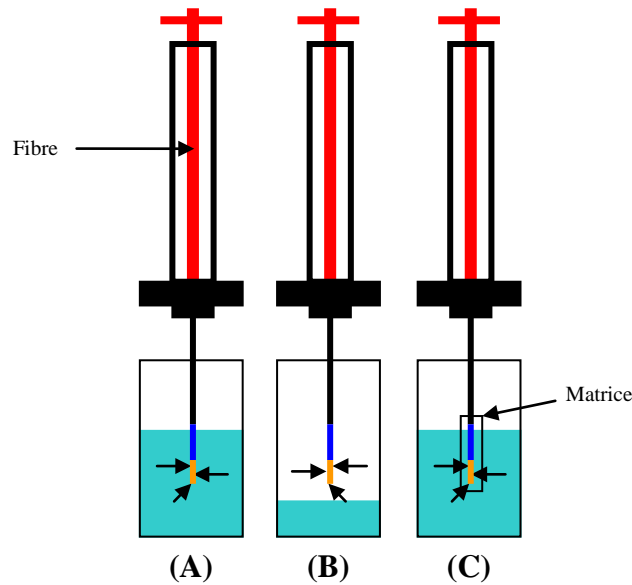


*Figure 41. Vue schématique de la structure d'un pore de Carboxen 1006 (Shirey, 1999).*

La forme spécifique de ce réseau de pores présente quand même le désavantage d'augmenter l'hystérésis (peu d'évolution du système extrait même si l'échantillon change d'état au cours du temps) car des molécules ( $> C_{12}$ ) peuvent s'accumuler dans les mésopores et « bloquer » une partie de la désorption lors de l'analyse. Pour réduire ce phénomène, les analyses de fibre avec Carboxen sont réalisées à température élevées (310-320°C).

#### **III.2.4. Procédure d'extraction**

L'échantillon est placé dans un flacon hermétiquement clos. La seringue transperce alors le septum du flacon. La fibre est alors placée en position rétractée. Ce dispositif permet à la fibre et à l'échantillon d'être en environnement clos réduit pour une optimisation des échanges. Une fois la seringue à l'intérieur du flacon, le piston est abaissé et la fibre est mise en contact avec l'échantillon, soit trempée directement dans le liquide (si aqueux), soit en espace de tête (Figure 42).



**Figure 42.** Microextraction (A) en phase liquide ; (B) en espace de tête ; (C) protégée d'une membrane.

Après un temps prédéterminé d'ab(ad)sorption, la fibre est rentrée dans le porte fibre et retirée du flacon. La sélectivité de la fibre, dépend de plusieurs facteurs, à peaufiner selon la matrice utilisée et les composés à extraire :

- de la force ionique de l'échantillon,
- du temps d'exposition et de la température de la matrice,
- de l'agitation,
- de la nature de la fibre SPME.

Les composés à analyser sont ainsi extraits et concentrés sur la surface polymérique d'une fibre de silice (Figure 42) selon trois possibilités :

- **Extraction directe** : contact direct entre la fibre et l'échantillon, par immersion dans une matrice liquide. Les analytes sont transportés directement de la matrice échantillon à la phase d'extraction. Pour réaliser une extraction plus rapide, c'est-à-dire, atteindre plus facilement le point d'équilibre, une agitation est nécessaire (Figure 42 (A)).
- **Extraction en espace de tête (HS-SPME)** : pour des matrices liquides, solides ou gazeuses qui émettent des composés volatils. Les analytes sont extraits de la phase gazeuse équilibrée issue de l'échantillon. Ce mode d'extraction permet de protéger la fibre contre les effets néfastes susceptibles d'être provoqués par

les substances non-volatiles de haut poids moléculaire présentes dans la matrice de l'échantillon. En général, le temps d'équilibre est atteint plus rapidement avec cette technique (Figure 42 (B)).

- **Extraction protégée d'une membrane** : la fibre est également directement plongée dans l'échantillon mais une membrane protectrice semi-perméable est utilisée autour de la fibre. Celle-ci empêche certains composés susceptibles de dégrader la fibre, de venir au contact de cette dernière (Figure 42 (C)).

En SPME, le type d'échantillon est donc important (solide ou liquide) mais le choix, le développement et l'optimisation de la méthode sont également essentiels. Cependant, la microextraction reste une technique dite "d'équilibre" qui ne permet pas toujours de doser quantitativement les composés volatils présents dans un échantillon. Les analytes de l'échantillon ne sont pas complètement extraits de la matrice, quand la seringue est placée dans le flacon, c'est un équilibre qui s'effectue (Figure 42) (Pawlisyn, 1999) :

- (A) et (C) entre la fibre et la matrice liquide,
- (B) entre l'espace de tête et la matrice, puis entre l'espace de tête et la fibre.

La fibre est ensuite désorbée thermiquement dans un appareil d'analyse (CG ou CLHP avec utilisation de solvants). La fibre est ensuite à nouveau protégée dans le porte-fibre (Stashenko & Martinez, 2012).

### III.3. Techniques d'analyses des composés volatils

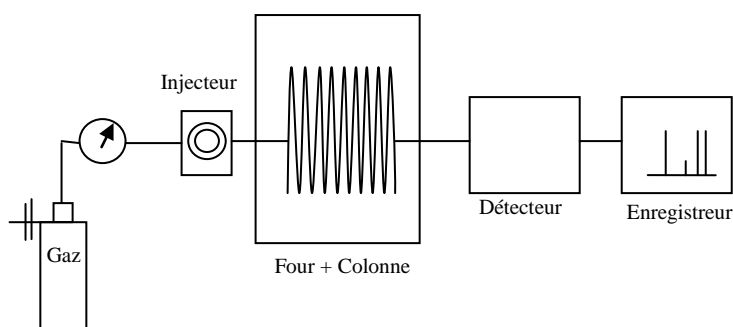
#### III.3.1. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer des mélanges gazeux complexes par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire appropriée. Ce concept de chromatographie en phase gazeuse a été introduit par Archer Martin et Richard Synge en 1941 (prix Nobel de chimie en 1952 pour leurs travaux sur la chromatographie de partage liquide-liquide).

Quatre modules « composent » le chromatographe en phase gazeuse (Figure 43) :

- L'injecteur : module d'introduction de l'échantillon,
- La colonne placée dans un four : module de séparation du mélange,
- Le détecteur : module de détection des composés élués,

- L'enregistreur : module d'analyse des données.



**Figure 43.** Les différents modules de la chromatographie gazeuse

La qualité des analyses dépend de la combinaison de ces quatre modules. Par exemple, l'injection doit permettre le transfert qualitatif de l'échantillon vers la colonne sans altération chimique ou déperdition de composés. Cette entrée des composés doit se faire sans adjonction de composés parasites et sans bruit de fond. L'optimum de séparation est possible lorsque l'ensemble des paramètres de l'appareillage sont stables et pertinents : température, vitesse de la phase mobile, pression, colonne (polarité, longueur, épaisseur...). La détection de la réponse (le signal) dépend, quant à elle, des propriétés physiques liées à l'élution de l'échantillon par la colonne (liaison ionique, température, fluorescence...), c'est-à-dire de la détection de la quantité de molécules analysées et de leur interaction avec la colonne. La relation directe entre l'intensité de détection et la quantité de composés à analyser est la base de la chromatographie (Dewulf & Van Langenhove, 2002 ; Stashenko & Martinez, 2012).

- *Injecteur.* La plupart du temps, les échantillons sont soit injectés comme des extraits à base de solvants, dans l'injecteur chauffé en mode *split* (avec division de flux) ou en mode *splitless* (sans fuite c'est-à-dire sans division de flux) soit désorbé à partir de fibre SPME en les plaçant directement dans un tube thermique de désorption chauffé entre 200°C et 300°C. La chambre d'injection a pour fonction de porter l'échantillon à l'état vapeur et de l'amener en tête de colonne grâce au gaz vecteur. Ce gaz vecteur, constitue la phase dite mobile. Il est choisi inerte vis-à-vis des composés du mélange et de la phase stationnaire (He, N<sub>2</sub> pour les plus utilisés) (Stashenko & Martinez, 2012).
- *Colonne.* Les composés injectés sont séparés lors de leur passage dans la colonne chromatographique en fonction de leur distribution entre la phase mobile et la phase stationnaire. La colonne se présente sous la forme d'un tube enroulé sur lui-même. Il

est constitué de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'une fine pellicule nommée phase stationnaire. La paroi externe est enveloppée d'un revêtement en polyimide qui donne souplesse et robustesse à la colonne. Ainsi, la phase stationnaire peut être soit apolaire, soit mi-polaire, soit polaire. Par conséquent, selon sa polarité, les constituants du mélange à analyser seront séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire et de leur volatilité si cette dernière est apolaire (Stashenko & Martinez, 2012). En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par trois paramètres géométriques : sa longueur (entre 5 et 100 m), son diamètre interne (entre 0,1 et 0,75 mm) et l'épaisseur de sa phase stationnaire (entre 0,2 et 5  $\mu\text{m}$ ). La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice. Cette colonne capillaire est placée dans une enceinte thermostatée, pouvant aller de la température ambiante à 400°C. Cette température est maintenue constante pour une plus grande efficacité de la séparation des constituants de l'échantillon. Chacun des paramètres de la colonne exerce une influence déterminante sur la qualité de la séparation : le temps de rétention<sup>®</sup> ( $t_r$ ) des composés dans la colonne dépend des dimensions de la colonne, de la polarité de la phase stationnaire, de la température du four, du flux du gaz vecteur. L'objectif étant de choisir la colonne la mieux adaptée à l'échantillon à analyser pour pouvoir obtenir des pics chromatographiques les plus fins possibles (grande efficacité), les mieux séparés possible (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum (Pawliszyn, 2000).

➤ *Détecteur.* Après la phase de séparation (communément, la CG), la phase de détection (quelques fois combinée à une identification) permet de faciliter l'analyse qualitative. Les détecteurs placés en sortie du chromatographe décèlent la présence des composés au fur et à mesure de leur arrivée. Plusieurs types de détecteurs peuvent être couplés à la CG, afin d'analyser ces composés extraits (Rafson, 1998 ; Stashenko & Martinez, 2012), le choix entre les différents détecteurs est fait en fonction de leur sensibilité et de leur spécificité, les plus connus et utilisés sont :

- le détecteur à ionisation de flamme - FID (flame-ionisation detection) : il s'agit d'un détecteur couramment utilisé pour la mesure des composés volatils. Lorsqu'un composé organique est brûlé, il produit des ions responsables du passage d'un courant ionique. Le courant produit est proportionnel à la quantité

d'échantillon brûlé. Ce type de détecteur apporte uniquement des informations sur les temps de rétention.

- le spectromètre de masse, un détecteur de seconde génération, lui, permet une élucidation de structures. C'est le détecteur le plus utilisé dans les analyses de composés volatils (Rafson, 1998). Les composés sortant de la colonne sont ionisés et fragmentés. Les molécules résultantes chargées positivement ainsi que les fragments de molécules sont sélectionnés en entrant dans le filtre du quadrupôle selon le ratio masse sur charge ( $m/z$ ). Les chromatogrammes en ions totaux sont obtenus pour chaque composé, et donnent à la fois des informations sur le temps de rétention du composé et son spectre de masse (profil de fragmentation ionique caractéristique).

➤ *Enregistreur*. Les variations enregistrées sont transformées par le détecteur, en signaux électriques qui sont amplifiés et transcrits sous forme graphique par l'enregistreur.

Il ne sera développé par la suite que la technique de la CG-SM, méthode utilisée dans l'analyse des composés volatils de la présente étude. En effet, l'association de la sensibilité de la CG avec les capacités de détection de la SM permet la formation d'un système d'analyse puissant et complet. Les résultats obtenus ont ainsi une nature tridimensionnelle grâce aux indices de rétention, les aires chromatographiques et le spectre de masse, ces informations peuvent être déterminées pour chaque composé, même ceux d'un mélange complexe (Stashenko & Martinez, 2012).

### III.3.2. Identification des composés volatils

L'identification des composés dans un système CG-SM est ainsi basée à la fois sur la comparaison des spectres de masse avec ceux de bases de données et sur le calcul des indices de rétention relatifs.

- **Le spectre de masse** est un graphique ou une table à double entrée produit par un spectromètre de masse. Il présente le courant d'ion mesuré en fonction du rapport masse (dalton) sur charge ( $m/z$ ). Le graphique peut se présenter sous la forme de deux tracés différents :
  - Le premier qualifié de vrai spectre de masse ou spectre continu, est le reflet fidèle du courant ionique que reçoit le détecteur en fonction du

rapport  $m/z$  et se présente sous la forme d'un ensemble de pics plus ou moins larges.

- Le second, ou spectre barres, est obtenu après traitement informatique du vrai spectre de masse, chaque pic étant présenté sous la forme d'un trait vertical. Le pic le plus intense du spectre, correspondant au type d'ion le plus abondant, est appelé le pic de base et son intensité est chiffrée à 100%. L'intensité des autres pics s'exprime en % de celle du pic de base (Menet, 2011).

Une première identification est ainsi possible par comparaison du SM obtenu après analyse avec les SM de banques de données informatisées (Wiley, NIST) ou d'ouvrages (Adams, 2004 ; Joulain & König, 1998). Mais pour identifier les composés ayant les mêmes spectres de masse, il devient indispensable d'avoir recours à des données complémentaires. Ainsi, il est possible :

- 1/ Si l'on dispose de standards, de les injecter dans les mêmes conditions que l'échantillon étudié afin de comparer leur temps de rétention à ceux des composés de l'échantillon.
  - 2/ D'associer les spectres de masse aux indices de rétention relatifs (IRR). Cette technique est la plus souvent utilisée et permet l'identification précise du composé (Gross & Caprioli, 2003).
- **Les indices de rétention relatifs (IRR)** ont deux objectifs principaux :
    - Caractériser tous les composés par une grandeur générale autre que le temps de rétention car celui-ci dépend des conditions opératoires (programmation de température du four, nature et débit du gaz vecteur, longueur de la colonne...).
    - Suivre l'évolution dans le temps de la colonne.

Les IRR sont fondés sur la relation linéaire constatée entre le logarithme du temps de rétention réduit<sup>Ⓢ</sup> et le nombre d'atomes de carbone du soluté, dans la famille de produits homologues, par exemple celle des hydrocarbures saturés aliphatiques (*n*-alcanes). Le mélange à étudier est injecté dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour la table d'alcanes. Ainsi, le nouveau chromatogramme permet d'accéder à l'IRR qui correspond au produit

par 100 du nombre apparent d'atomes de carbone de l'alcane théorique ayant le même temps de rétention réduit.

$$\text{Log } t_r' = an + b$$

$t_r'$  : temps de rétention réduit  
n : nombre d'atomes de carbones

Deux calculs permettent d'obtenir directement l'IRR à partir des  $t_r'$  de deux alcanes ( $C_n$  et  $C_{n+1}$ ) qui encadrent le composé inconnu X.

$$t_r'_{C_n} < t_r'(X) < t_r'_{C_{n+1}}$$

$t_r'$  : temps de rétention réduit  
n : nombre d'atomes de carbones

Les indices de rétention se calculent de deux manières différentes suivant le fonctionnement en température du chromatographe :

✓ Pour une analyse effectuée en isotherme

$$\text{IRR}(X) = 100n + 100 \frac{\log(t_r'(X)) - \log(t_r'(C_n))}{\log(t_r'(C_{n+1})) - \log(t_r'(C_n))}$$

IRR : indice de rétention du composé X à identifier  
 $t_r'$  : temps de rétention réduit  
n : nombre d'atomes de carbones

✓ Pour une analyse effectuée en programmation de température

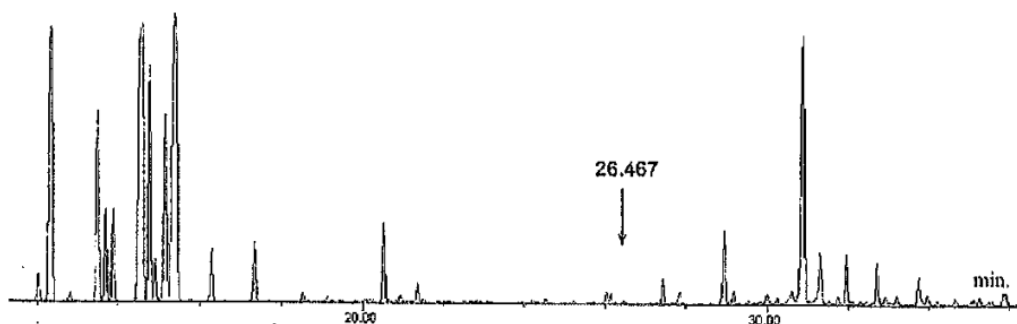
$$\text{IRR}(X) = 100n + 100 \frac{t_r'(X) - t_r'(C_n)}{t_r'(C_{n+1}) - t_r'(C_n)}$$

IRR : indice de rétention du composé X à identifier  
 $t_r'$  : temps de rétention réduit  
n : nombre d'atomes de carbones

A chaque composé on attribue ainsi un IRR qui lui est propre pour une phase stationnaire donnée. Ces indices pourront être comparés à ceux de banques de données en ligne (NIST) ou ceux donnés dans la littérature (Adams, 2004 ; Joulain & König, 1998).

- **Corrélation masse - indice de rétention relatif.** Lorsque l'on combine l'IRR avec le spectre de masse, la qualité des données augmente proportionnellement et fournit un excellent guide pour les identités possibles de composants. Par exemple, sur le chromatogramme ci-après (Figure 44) obtenu après analyse CG-SM de l'huile essentielle de *Schinus terebinthifolius* Raddhi, on cherche à trouver le composé lié au pic obtenu à 26,467 minutes.





**Figure 44.** Chromatogramme de l'huile essentielle de *Schinus terebinthifolius* (Gauvin, 2006).

Pour ce pic à 26,467 minutes, la banque de données informatisée propose :

- L' $\alpha$ -cubébène, avec une qualité de corrélation de 99% ;
- L' $\alpha$ -copaène, avec une qualité de corrélation de 90%.

Le calcul de l'IRR<sub>SPB-5</sub> du composé à 26,467 minutes grâce aux formules précédemment citées est de 1357. Dans la littérature, pour une phase stationnaire similaire (DB-5), les valeurs des IRR proposées sont :

- IRR<sub>DB-5</sub> ( $\alpha$ -cubébène) = 1351
- IRR<sub>DB-5</sub> ( $\alpha$ -copaène) = 1377

Par comparaison des valeurs des IRR<sub>SPB-5</sub> et IRR<sub>DB-5</sub>, il est alors possible de conclure sur l'identification du composé sortant à 26,467 minutes : la valeur la plus proche de 1357 est 1351, donc le composé élué à 26,467 minutes correspond à l' $\alpha$ -cubébène.

### III.4. Composés volatils du sel : travaux antérieurs

Reconnus et protégés depuis plusieurs années pour leur richesse écologique, les marais salants tels que ceux de Lasné (Morbihan, Bretagne), qui rentrent dans le programme Natura 2000<sup>1</sup>, ou encore ceux de Guérande ou de l'Ile de Ré, qui bénéficient de soutien actif de leur Région en tant que véritables réserves naturelles, sont des zones environnementalement riches ayant une faune et une flore très spécifiques. En effet, ce milieu hypersalin ne permet le développement que d'un certain type d'organismes, les organismes halophiles. L'écosystème d'un marais n'est donc propre qu'à lui-même (à sa région, à ses conditions climatiques...) et,

<sup>1</sup> Le réseau Natura 2000 est un ensemble de sites naturels européens, terrestres et marins, identifiés pour la rareté ou la fragilité des espèces sauvages, animales ou végétales, et de leurs habitats. Natura 2000 concilie préservation de la nature et préoccupations socio-économiques. En France, le réseau Natura 2000 comprenait 1753 sites en 2014 (site Internet Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, maj 2013).

l'ensemble des organismes ou des matières qui s'y rencontrent, est directement relié à ce lieu (site Internet Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, maj 2013).

En 2000 et 2001, des travaux sur les pigments des bassins de cristallisation des marais salants ont permis de connaître plus précisément la composition de leur microbiote. Les analyses pigmentaires permettent, ainsi, de dire que les eaux des marais se composent d'au moins trois types de microorganismes :

- **Des microalgues vertes unicellulaires**, du genre *Dunaliella sp.* (Oren & Rodriguez-Valera, 2001),
- **Des bactéries rouges procaryotes halophiles** du genre *Salinibacter* (Anton *et al.*, 2000 ; Oren & Rodriguez-Valera, 2001),
- **Des archées halophiles rouges**, tel que *Haloquadratum walsbyi* (Oren & Rodriguez-Valera, 2001).

En 2008 et plus récemment en 2012, il a même été prouvé que ces trois microorganismes sont complémentaires car, bien qu'ils possèdent tous des adaptations métaboliques propres à leur genre afin de lutter contre la teneur en sel élevée du milieu (fermentation, dénitrification, réduction des sulfates, méthanogénèse, phototrophie oxy- et anoxygénique, hétérotrophie aérobie...), ils ont mis en place un véritable système collaboratif pour survivre aux conditions extrêmes que leur impose le taux de salinité élevée des marais salants. Les procaryotes utilisent, par exemple, les déchets glycosés des microalgues pour équilibrer leur pression osmotique (Bardavid *et al.*, 2008 ; Oh *et al.*, 2012). En effet, une très forte teneur en sel limite les microorganismes aux voies de dissociation simples car elles consomment et nécessitent moins d'énergie pour rétablir l'osmose... la variété des métabolismes diminuant, les microorganismes présents sont donc obligés de coexister pour pouvoir subsister (Litchfield & Gillevet, 2008 ; Oren, 2002a).

La couleur rouge-orangée des marais salants (Figure 4 page 34), assez typique de certaines saisons (printemps, été), n'est donc pas seulement due à la présence d'un seul producteur de caroténoïdes (*Dunaliella sp.*, comme cela était supposé il y a une vingtaine d'années) mais bien à l'association de plusieurs genres :

- des microalgues et des archées : la couleur rouge-orange de *Dunaliella salina* ou d'*Haloquadratum walsbyi* est due à la présence en leur sein de caroténoïdes et notamment de  $\beta$ -carotène (Oren & Rodriguez-Valera, 2001),
- des bactéries : 5 à 7,5 % des pigments procaryotiques mis en évidence dans les bassins de cristallisation, sont des caroténoïdes ou des dérivés de caroténoïdes dont

certains peuvent être attribués avec précision à *Salinibacter ruber* par exemple (Anton *et al.*, 2000 ; Oren & Rodriguez-Valera, 2001).

Depuis les années 2000, il est donc reconnu que la diversité des microorganismes halophiles présents dans les marais est donc fortement caractéristique du milieu lui-même. Les pigments de *Salinibacter sp.* identifiés dans des marais Espagnols (Santa Pola et Majorque), ne se retrouvent pas, par exemple, dans un marais Israélien (Eilat) ou Américain (Newark) (Oren & Rodriguez-Valera, 2001). De même, certaines souches communes à plusieurs marais géographiquement séparés, présentent des différences au niveau de leur génome ce qui leur permet une adaptation propre aux conditions environnementales de leur milieu. C'est notamment le cas d'*Haloquadratum walsbyi*, dont la souche présente des différences au niveau de son ADN-16S selon qu'elle est issue de marais Espagnols ou Australiens (Oh *et al.*, 2012 ; Oren & Rodriguez-Valera, 2001).

La diversité des halophiles est d'ailleurs si liée à l'environnement que la distribution de ces microorganismes varie même en fonction des saisons et des bassins (plus ou moins profonds par exemple). La teneur en sel peut en effet fluctuer entre 20% et 36% en fonction des bassins et entre 20% et 23,5% pour un même bassin au cours de l'année. Se succèdent alors au cours du temps différentes espèces au sein d'un même marais (Boujelben *et al.*, 2012).

Le sel qui se développe dans les marais salants est directement en contact avec les microorganismes qui peuplent les salines. La récolte du cristal de sel se faisant juste après sa formation (cas de la fleur de sel<sup>®</sup>) ou juste après qu'il ait coulé (cas du gros sel ou du sel de table courant), il est donc possible que des halophiles entiers, des « fragments » voire des composés qui en sont issus, se retrouvent sur ou dans les cristaux que le paludier récolte par tonnes chaque année (Norton & Grant, 1988).

Il pourrait donc exister un lien étroit entre le site de production du sel et le sel lui-même. Ainsi en 2009, alors que leur but était de démontrer le lien qui existait entre la qualité du sel et son environnement, Isabel Silva et son équipe ont mis en évidence la présence de nombreux composés volatils issus des cristaux des marais. Après le développement d'une méthode d'extraction (HS-SPME) et d'analyse, le couple CG-SM a permis de détecter et d'identifier un grand nombre de composés issus de la matrice salée. 40 composés volatils appartenant à différentes familles chimiques (hydrocarbures, alcools, aldéhydes, cétones, esters, phénols, terpénoïdes et norisoprénoïdes) ont été mis en évidence. Ils proviennent de microalgues, de bactéries ou encore de la pollution environnante. Peuvent notamment être

cités comme exemples, le 6-méthyl-heptan-2-one, le trisulfure de diméthyle, l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -ionone ou encore l'isobutylphtalate (Silva *et al.*, 2009).

En 2009 et 2010, la même équipe de chercheurs travaillant sur des échantillons issus de récoltes successives pour un même marais a démontré qu'il existait bel et bien :

- D'une part, un lien entre les composés volatils extraits du sel (157 identifiés sur 4 sites de productions différents : 3 portugais, 1 français et 1 au Cap Vert) et leur site de production. En effet, certains composés sont particuliers à l'un ou l'autre des bassins étudiés, comme par exemple l' $\alpha$ -humulène qui ne se retrouve que dans le sel du Cap Vert ou encore l'octan-3-one présent dans le sel français (Guérande). Plusieurs composés volatils en revanche peuvent être communs à tous comme l'hydroxytoluène butylé (BHT) qui semblerait être un contaminant anthropique ou le 6-méthyl-5-hepten-2-one, d'origine bactérienne ou alguale (Silva *et al.*, 2009).
- Et d'autre part, une dégradation rapide et importante des composés des marais présents sur le sel, au cours du temps, lorsque le produit est récolté et stocké dans les conditions normales de conservation du sel de mer par un consommateur (Silva *et al.*, 2010a,b).

Les composés volatils issus des marais et mis en évidence *via* l'étude du sel sont donc soit des composés issus de microorganismes présents lors de la formation du cristal (microalgues, bactéries, archées...) soit des polluants liés à l'environnement des marais ou à celui du stockage du produit. L'élargissement de la comparaison de bassins a permis de confirmer qu'il existait un lien étroit entre le sel, ses composés volatils et son origine géographique. En effet, les conditions climatiques (soleil, vent) et les marais eux-mêmes (profondeur des bassins, teneur en sel) jouent un rôle sur la faune et la flore et donc sur les composés qu'ils génèrent (Silva *et al.*, 2010a).

Ainsi, grâce aux techniques de HS-SPME et CG-SM, la comparaison de produits venant du Portugal (trois bassins) et de France (un bassin : Guérande), et notamment leur teneur en  $\beta$ -ionone, a permis de mettre en évidence des différences importantes : les sels des marais du Portugal sont pauvres en  $\beta$ -ionone (288 ng/Kg) alors que le sel issu du marais français en contient une grande quantité (669 ng/Kg) (Silva *et al.*, 2010b ; Drake S.L. & Drake M.A., 2011). Cette différence de teneur peut cependant s'expliquer par les conditions de production des sels : s'ils sont laissés trop longtemps au soleil pour séchage et

blanchiment, la  $\beta$ -ionone présente peut être dégradée ou évaporée (effet du rayonnement lumineux, de la température...). Les conditions climatiques (ensoleillement) du Portugal étant plus « intenses » qu'en France au moment de la récolte du sel, les produits portugais ont donc moins de chance de « contenir » ce composé.

En 2011, toujours grâce à la SPME et à la CG-SM, de nombreux polluants spécifiques de zones géographiques ont, également, été mis en évidence et ce notamment dans une étude sur différents sels issus de la côte espagnole méditerranéenne (Serrano *et al.*, 2011). Ces contaminants ont été identifiés comme issus de l'activité humaine et transportés par la mer, les rivières ou les flux d'eau (lors d'arrosage par exemple) puis fréquemment déposés sur les zones côtières telles que les marais salants, les estuaires de rivières ou les deltas.

La connaissance de l'origine et de la quantité de ces polluants est donc importante, tant pour le marais que pour la traçabilité du sel ou pour la sécurité du consommateur. Basée sur l'extraction de composés tels que des insecticides, des contaminants organiques ou inorganiques, l'isolement et l'analyse des polluants contenus dans le sel a été réalisé grâce à une extraction liquide-liquide (sel en solution aqueuse ou directement eau des marais – méthanol / acétate d'éthyle), suivi d'un analyse par CLHP ou CG-SM.

Il a alors été mis en évidence que si le bassin est une zone protégée, il contient très peu de polluants (seulement 2 phénols identifiés) même si son sel en contient d'avantage (12 composés identifiés tels que le butylphtalate et l'éthylphtalate, pouvant être issus notamment de l'environnement du sel tel que les bâches de stockage, les packaging en plastique ou plus généralement, des rejets de pollution urbaine ou maritime). Sur les quatre bassins de la côte méditerranéenne espagnole étudiés, certains composés polluants sont similaires alors que d'autres sont propres à une zone, en fonction de l'activité humaine alentour (Serrano *et al.*, 2011).

## Résumé

Les composés volatils d'origine naturelle, sont des composés carbonés souvent lipophiles de 6 à 20 atomes de carbone et dont le poids moléculaire est inférieur à 300 Daltons. Il s'agit principalement de composés à chaînes courtes (alcools, aldéhydes, cétones, esters, lactones), de composés aromatiques et de terpènes tels que les mono- et les sesquiterpènes mais aussi les composés issus de la dégradation par oxydation des caroténoïdes (CDC ou norisoprénoïdes).

Classés comme métabolites secondaires, les composés volatils biosynthétisés par des organismes vivants (plantes, bactéries, microalgues, champignons...) sont bien souvent émis en réponse à des pressions non seulement abiotiques (température, luminosité, pluie, sécheresse, radiations ultra-violette, oxydants) mais aussi biotiques (prédateurs, pollinisateurs...). Dans ce dernier cas, les composés volatils servant de moyen de communication intra et interspécifiques sont nommés sémiochimiques.

Pour extraire et analyser les composés volatils, l'une des méthodes les plus couramment employée est une combinaison des techniques SPME et CG-SM. Cette méthode a été mise en pratique de façon efficiente dans un grand nombre de travaux dont l'objectif était la caractérisation du bouquet odorant de produits alimentaires, dont le sel de mer (Silva *et al.*, 2009 ; Drake S.L. & Drake M.A., 2011). Depuis les années 2000, il a ainsi été mis en évidence que le type de composés détectés dans des produits salins (eaux ou sels) est lié à la localisation de l'environnement dont il est issu. L'ensemble des composés volatils pouvant ainsi être, en partie, responsables de l'odeur du sel détectable lors de la récolte (odeur de violette de la fleur de sel ultra-fraîche). L'évolution de l'échantillon au cours du temps (dégradation voire disparition des composés volatils) fait qu'il ne subsiste souvent plus d'odeur détectable par le nez humain lors de la commercialisation du produit. Pourtant grâce aux techniques modernes de plus en plus précises, il est possible de relier un échantillon de sel de commerce à son marais permettant ainsi de réduire la fraude quant à la provenance des produits commercialisés (Silva *et al.*, 2009, 2010a, 2010b ; Serrano *et al.*, 2011).

**PARTIE II - ANALYSES**  
**MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DES**  
**SAUMURES ET DES FLEURS DE SEL DE LA**  
**CÔTE ATLANTIQUE**

---



## CHAPITRE I - LES ÉCHANTILLONS



## I.1. Localisation géographique des échantillons

En collaboration avec les paludiers locaux de grands bassins de production de la côte Atlantique, ont pu être étudiés des échantillons (eaux et sels) issus de quatre marais salants des villes de Saint-Armel, de Guérande, de l’Ile de Noirmoutier et de l’Ile de Ré (Figure 45).



Figure 45. Localisation des échantillons analysés (site Google map, maj 2014).

## I.2. Echantillonnage

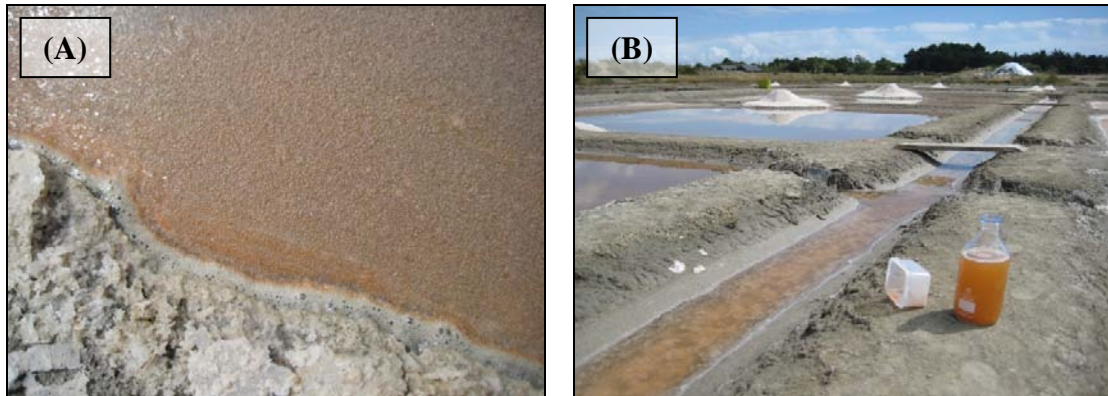
### I.2.1. La saumure ou eau des marais

#### ❖ Mode de prélèvement

➤ **L'eau** a été prélevée à la surface du marais au niveau des cristallisoirs (bassin de formation du sel) afin de récolter également les microorganismes présents (Figure 46). Pour chaque prélèvement, 2 L d'eau (minimum) ont été récupérés et aliquotés en flacons de verre étiquetés indiquant le site et la date de prélèvement ainsi que le code de l'échantillon. Pour chaque échantillon, une fiche de prélèvement a été rédigée (Annexe 4).

Afin d'obtenir les saumures les plus représentatives possibles, elles ont été prélevées :

- au cours d'une même année à différentes saisons (hiver, été),
- sur plusieurs années pour une même saison (étés 2007, 2009 et 2010),
- dans différents marais salants (Ile de Ré, Noirmoutier, Guérande, Saint-Armel).



**Figure 46.** (A) Bloom d'algue à Saint-Armel ; (B) Echantillonnage de l'eau des marais.

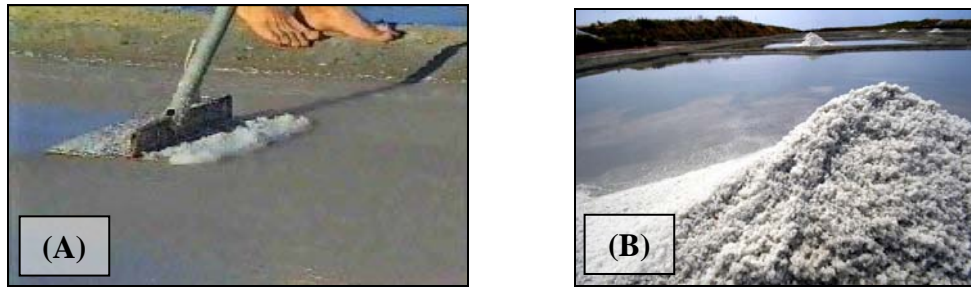
#### ❖ *Conservation des échantillons*

L'ensemble des eaux a été conservé au réfrigérateur à +8°C pendant la durée de l'étude. 12 h avant analyse, les échantillons ont été remis à température ambiante.

### **I.2.2. Le sel**

#### ❖ *Mode de prélèvement*

➤ **Les sels « bruts »** sont directement issus de marais salants et n'ont subi aucun traitement de séchage ou de blanchiment (couramment utilisés par les sauniers avant commercialisation). Ils ont été directement récoltés soit par effleurage de la surface des marais (écrémage, Figure 47(A)) soit dans les mulons<sup>Ⓢ</sup> juste après récolte par le saunier (tas de sel formé sur les œillets, Figure 47(B)). Les sels ont été stockés dans des flacons en verre étiquetés indiquant le site et la date de prélèvement, ainsi que le code de l'échantillon). Comme pour les saumures, pour chaque échantillon de sel, une fiche de prélèvement a été rédigée (Annexe 4).



**Figure 47.** Récolte des échantillons de sel (A) par écrémage ; (B) au niveau des tas des œillets.

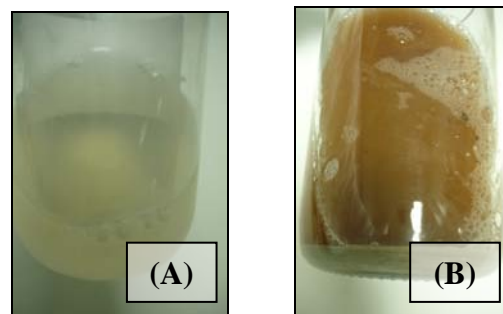
➤ **Les sels de commerce** ont été achetés en point de vente. Ils ont donc subi l'ensemble des traitements relatifs à leur commercialisation (séchage au soleil, stockage, blanchiment par flux d'air chaud pour certains, transport...). Les sels ont été stockés dans leur emballage de commercialisation.

#### ❖ *Conservation des échantillons*

Les sels ont été conservés au réfrigérateur à +8°C pendant la durée de l'étude. 12 h avant analyse, les échantillons ont été remis à température ambiante.

### I.2.3. Bilan de l'échantillonnage

➤ **Les saumures** présentent des couleurs visuellement différentes (Figure 48) en fonction des zones géographiques d'où elles proviennent.



**Figure 48.** Différence de couleur d'eau des marais. (A) Ile de Ré été 2009 lot 1 ; (B) Saint-Armel été 2009 lot 1.

➤ **Les sels** directement prélevés dans les marais présentent une légère coloration rose-orangâtre alors que les sels de commerce sont tous identiques, quelle que soit leur origine. Ils sont généralement plus secs et plus blancs que le sel brut pour un même marais. Gros sel, fleur de sel et sel fin ont également des différences de couleur notables (Figure 49).



*Figure 49. Gros sel, fleur de sel et sel fin*

L'ensemble des échantillons de saumures et de sels utilisés dans cette étude est récapitulé dans le Tableau VI pages ci-après. Après réception, tous les échantillons ont été aliquotés dans des flacons en verre opaque afin de réduire au maximum tout transfert entre le contenant et son contenu et toute dégradation du contenu par la lumière.

**Tableau VI. Récapitulatif des échantillons à disposition (eaux, sels).**

Origine	Echantillon	Appellation, allégations...	Type d'emballage	Volume (mL ou g)	DLUO*, n°lot, zone de récolte	Année de récolte	Fournisseur	Quantité	Description
<b>Ile de Ré</b>	Eau été 2009 lot 1		Bouteille plastique	250	Prise des barres Loix	06-juil-09	Esprit du sel de Ré	2	Rosée avec dépôt
	Eau été 2009 lot 2		Bouteille plastique	250	Prise des barres Loix	24-juil-09	Esprit du sel de Ré	2	Rosée avec dépôt
	Eau été 2009 lot 3		Bouteille plastique	250	Prise des barres Loix	18-août-09	Esprit du sel de Ré	2	Rosée avec dépôt
	Eau été 2009 lot 4		Bouteille plastique	250	Prise des barres Loix	21-août-09	Esprit du sel de Ré	2	Jaunâtre avec dépôt
	Eau été 2009 lot 5		Bouteille plastique	250	Prise des barres Loix	28-août-09	Esprit du sel de Ré	2	Jaunâtre avec dépôt
	Eau hiver 2010 lot 1, lot 2 et lot 3		Bouteille plastique	1 000	Prise des barres Loix	déc-2010	Esprit du sel de Ré	3	Translucide
	Fleur de sel lot 1 (marais)		Sac plastique	500	Ré	01-juil-09	Esprit du sel de Ré	2	Humide, cristaux cubiques, blanche légèrement rosée
	Fleur de sel lot 2 (commerciale)	Esprit du sel, fleur de sel du marais salant	Flacon plastique	200	01/03/2012 (lot 074 14:20)	Achat 2010	Esprit du sel de Ré (commerce)	1	Humide, cristaux fins, blancs
<b>Noirmoutier</b>	Eau été 2009 lot 1		Bouteille verre	750	La Lipoire	23-août-09	Producteur Noirmoutier	1	Jaunâtre avec dépôt
	Eau été 2009 lot 2		Bouteille plastique (transféré dans une bouteille en verre)	750	Champ d'or	23-août-09	Producteur Noirmoutier	1	Jaunâtre avec dépôt
	Fleur de sel lot 1 (marais)		Sac plastique	450	La Lipoire	23-août-09	Producteur Noirmoutier	2	Humide, cristaux cubiques, blancs légèrement jaunâtres
	Fleur de sel lot 2 (marais)		Sac plastique	500	Champ d'or	23-août-09	Producteur Noirmoutier	1	Humide, cristaux fins, blancs

\*DLUO : Date limite d'utilisation optimale

**Tableau VI. Suite - Récapitulatif des échantillons à disposition (eaux, sels et autres).**

Origine	Code échantillon	Appellation, allégations...	Type d'emballage	Volume (mL ou g)	DLUO*, n°lot, zone de récolte	Année de récolte	Fournisseur	Quantité	Description
<b>Saint-Armel</b>	Eau été 2007		Flacon verre	200	Saline de Lasné	juil-07	Saint-Armel	1	Blanchâtre avec filament dedans, odeur de violette marquée
	Eau été 2009 lot 1		Flacon verre	1000	Saline de Lasné	juil-09	Olivier Chenelle	1	Très rose-orangé avec dépôt au fond sel + argile
	Eau été 2009 lot 2		Flacon verre	1000	Saline de Lasné	juil-09	Olivier Chenelle	1	Rouge avec dépôt au fond sel + argile
	Eau été 2009 lot 3		Flacon verre	1000	Saline de Lasné	juil-09	Olivier Chenelle	1	Très rose-orangé avec dépôt au fond sel + argile
	Eau été 2010		Flacon verre	700	Saline de Lasné	juil-10	Olivier Chenelle	1	Très orangé avec dépôt au fond sel + argile
	Fleur de sel lot 1 (marais)		Boite plastique	850	Saline de Lasné	juil-09	Olivier Chenelle	1	Humide, gros cristaux cubiques grisâtres avec morceaux d'argile
	Fleur de sel lot 2 (commerciale)	Fleur de sel salines de Saint-Armel, production artisanale, sel de mer du Golfe du Morbihan	Sac plastique	250	Saline de Lasné	2007	Olivier Chenelle	1	Humide, cristaux fins, blancs

\*DLUO : Date limite d'utilisation optimale

**Tableau VI. Suite - Récapitulatif des échantillons à disposition (eaux, sels et autres).**

Origine	Code échantillon	Appellation, allégations...	Type d'emballage	Volume (mL ou g)	DLUO*, n°lot, zone de récolte	Année de récolte	Fournisseur	Quantité	Description	
Guérande	Eau été 2009 Lotie 18		Flacon verre	750	Lotie 18	juil-09	Aproselà (Bourgneuf)	1	Jaunâtre avec dépôt	
	Eau été 2009 Lotie 24		Flacon verre	750	Lotie 24	juil-09il	Aproselà (Bourgneuf)	1	Jaunâtre avec dépôt	
	Eau été 2009 Le Mès lot 1		Flacon verre	600	Le Mès	23-août-09	Aproselà (Michel Coquard)	1	Rosée avec dépôt	
	Eau La Coyée		Flacon verre	550	La Coyée	28-août-09	Aproselà (Sophie Bonnet-Questiau)	1	Blanchâtre avec dépôt	
	Eau automne 2009 Département bras mort		Flacon verre	500	Département bras mort	01-sept-09	Pascal Donini	1	Saumure blanchâtre avec dépôt	
	Eau automne 2009 Joetryer		Flacon verre	500	Joetryer œillet 12	01-sept-09	Pascal Donini	1	Rosée avec dépôt	
	Eau automne 2009 Boulanger		Flacon verre	600	Boulangier œillet 12	01-sept-09	Pascal Donini	1	Rosée avec dépôt	
	Eau été 2010 Lot 1		Flacon verre	700	Guérande	juil-10	Pascal Donini	1	Orange-marron avec dépôt	
	Eau été 2010 Lot 2		Flacon verre	700	Guérande	juil-10	Pascal Donini	1	Marron foncée avec gros dépôt	
	Eau été 2010 Le Mès lot 2		Flacon verre	700	Bassin du Mès 1	juil-10	Guérande	1	Orange avec dépôt	
	Eau été 2010 Le Mès lot 3		Flacon verre	700	Bassin du Mès 2	juil-10	Guérande	1	Orange avec dépôt	
	Fleur de sel lot 1 (marais)			Sac plastique	320	Le Mès	23-août-09	Aproselà (Michel Coquard)	1	Très humide, cristaux cubiques légèrement jaunes
	Fleur de sel lot 2 (commerciale)	Fleur de sel de Guérande sans additif Reflets de France		Boite carton	125	631113371 DLUO 31/12/10	Achat 2007	Guérande (commerce)	1	Humide, cristaux fins, blancs

\*DLUO : Date limite d'utilisation optimale



## CHAPITRE II – ANALYSES MICROBIOLOGIQUES



## II.1. Matériels et méthodes

### II.1.1. Numération des microorganismes

Pour l'ensemble des eaux un état-frais et une coloration de Gram ont été réalisés afin de valider la présence de microorganismes (et notamment de microorganismes vivants, s'ils sont mobiles) au sein des échantillons.

#### ❖ *Etat frais*

L'examen à l'état frais s'est fait à partir des échantillons des eaux :

- mélange de l'échantillon (homogénéiser),
- prélèvement d'une goutte de l'échantillon à l'aide d'une pipette Pasteur,
- dépôt de la goutte sur lame.
- protection de la goutte par une lamelle (la goutte ne doit pas déborder de la lamelle).

L'observation s'est faite au microscope optique (Olympus CX41RF), grossissement x400.

*NB* : s'il y a un trop grand nombre de cellules qui empêche la bonne observation, l'échantillon peut être dilué dans de l'eau distillée salée (concentration identique à l'eau étudiée).

#### ❖ *Coloration de Gram*

La coloration de Gram s'est faite en deux étapes : réalisation d'un frottis puis coloration.

Le frottis a été réalisé à partir d'une goutte d'échantillon déposée sur une lame à laquelle a été ajoutée, à l'aide d'une cœse, une colonie. La goutte a ensuite été séchée à la flamme d'un bec Bunsen puis rincée à l'alcool et à l'eau distillée. La lame a alors été séchée avec du papier absorbant (délicatement pour ne pas décoller le frottis).

La coloration s'est faite par trempage successif dans différents bains de colorants :

- coloration au violet de gentiane (30 secondes à 1 minute de contact puis rinçage à l'eau distillée),

- mordantage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) (30 secondes à 1 minute de contact puis rinçage à l'eau distillée),
- décoloration (rapide) à l'alcool 90°C (goutte à goutte sur la lame inclinée jusqu'à décoloration puis rinçage à l'eau distillée).
- recoloration à la fuchsine (30 secondes à 1 minute de contact puis lavage à l'eau distillée),
- séchage de la lame près de la flamme du bec Bunsen.

L'observation s'est faite au microscope optique (Olympus CX41RF), grossissement  $\times 1000$  en immersion dans une goutte d'huile.

### II.1.2. Microalgues

Une cellule de Thomas ( $0,1 \text{ mm}^3$  ; 1 grand carré ;  $0,00 \text{ m}^3$  ; Preciss France CE) a été utilisée pour déterminer le nombre de microalgues présentes dans les échantillons de saumure (3 comptages par échantillon). Grâce à cette méthode, les cellules ont pu être comptées une à une.

Une goutte de  $0,01 \text{ mL}$  d'échantillon a été versée au centre de la cellule puis recouverte d'une lamelle. L'échantillon a été observé à l'aide d'un microscope optique au grossissement  $\times 400$  (Olympus CX41 RF). Les microalgues ont été dénombrées sur 5 grands carrés et leur concentration a été calculée grâce à la formule suivante :

$$[\text{concentration (microorg./mL)}] = (n \times 16) \times 10$$

n = nombre de microalgues  
trouvé dans un grand carré

Une collaboration avec l'ARVAM (Agence pour la Recherche et la Valorisation Marines, spécialisée, notamment, dans l'étude et la culture d'algues) a permis la mise en culture des microalgues pour leur identification. Les microalgues ont été cultivées en « milieu f/2 » (sur la base du « f medium » décrit par Guillard et Ryther en 1962) :

- $950 \text{ mL}$  d'eau de mer filtrée,
- $1 \text{ mL}$  de  $\text{NaNO}_3$  ( $75 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- $1 \text{ mL}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- $1 \text{ mL}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ( $30 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- $1 \text{ mL}$  de mélange de métaux (voir composition ci-après),
- $0,5 \text{ mL}$  de solution vitaminée (voir composition ci-après),

- Ajuster à 1 L avec de l'eau de filtrée si nécessaire et autoclaver.

« f/2 mélange de métaux »

- 950 mL d'eau distillée,
- 3,15 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,
- 4,36 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- 1 mL de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $180 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- 1 mL de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $22 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- 1 mL de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- 1 mL de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $6,3 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- Ajuster à 1 L avec de l'eau distillée si nécessaire.

« f/2 solution vitaminée »

- 950 mL d'eau distillée,
- 200 g de Thiamine · HCl (vitamine B),
- 1 mL de Biotine (vitamine H) ( $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- 1 mL de Cyanocobalamine (vitamine B<sub>12</sub>) ( $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$ ),
- Ajuster à 1 L avec de l'eau distillée si nécessaire.

### II.1.3. Bactéries

Les bactéries ont été cultivées sur un milieu PCA hyper-salin artificiel (Plate Count Agar de Merck enrichi en sel). Le milieu a été préparé avec :

- 22,5 g de poudre de PCA (mélange de 5 g/L de péptone de caséine, 2,5 g/L d'extrait de levure, 1 g/L de glucose D(+), 14 g/L d'agar-agar),
- 1 L d'eau chaude déminéralisée,
- différentes quantités de NaCl afin d'obtenir les teneurs en sel suivantes : 0% (témoin), 3,5% (concentration en sel de l'eau de mer) et 33% (concentration dans les cristallisoirs des marais salants),

Après équilibrage du pH à  $7,0 \pm 0,2$  à 25°C, ce milieu a été autoclavé 15 minutes à 121°C.

2 types de cultures ont été menés :

- en masse : 1 mL d'échantillon / boîte de Pétri mélangé au milieu,
- en surface : 0,1 mL / boîte étalé à la surface du milieu.

Les boîtes ont été mises à incuber à 34°C (température moyenne dans les marais salants lors de la production de sel) avec éclairage de 12h (15 W dans un incubateur Sanyo MIR-253) pendant 10 jours.

Chaque échantillon a été dilué en cascade jusqu'à la dilution  $1 \times 10^{-5}$  afin de permettre un comptage efficace. Les données obtenues sont le résultat d'un triple ensemencement (3 répétitions par dilution).

#### **II.1.4. Moisissures et champignons**

Les moisissures et les champignons ont été cultivés sur un milieu malt-agar hypersalin artificiel (Merck enrichi en sel). Le milieu a été préparé avec :

- 48 g de poudre de malt + agar (mélange de 30 g/L d'extrait de malt, 3 g/L de peptone de graines de soja, 15 g/L d'agar-agar),
- 1 L d'eau chaude déminéralisée,
- 35 g de NaCl (concentration dans les cristallisoirs des marais salants),

Après équilibrage du pH à 5,6 +/- 0,2 à 25°C, ce milieu a été autoclavé 10 minutes à 121°C.

2 types de cultures ont été menés :

- en masse : 1 mL d'échantillon / boîte de Pétri mélangé au milieu,
- en surface : 0,1 mL / boîte étalé à la surface du milieu.

Les boîtes ont été mises à incuber à 34°C (température moyenne dans les marais salants lors de la production de sel) avec éclairage de 12h (15 W dans un incubateur Sanyo MIR-253) pendant 10 jours.

Chaque échantillon a été dilué en cascade jusqu'à la dilution  $1 \times 10^{-5}$  afin de permettre un comptage efficace. Les données obtenues sont le résultat d'un triple ensemencement (3 répétitions par dilution).

#### **II.1.5. Colorimétrie**

La couleur a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre CM-3500d (Konica-Minolta, Roissy, France) associé au logiciel SpectraMagic NX (Konica Minolta). Pour reproduire une lumière du jour standard, les paramètres suivants ont été sélectionnés : lumière (D 65) et géométrie (d/8, diffusion de la lumière incidente, angle 10°). Les données ont été reportées dans les systèmes colorimétriques  $L^*a^*b^*$  et  $L^*C^*h^*$ .

Toutes les saumures ont été analysés au cours d'une seule séance à raison de 5 mesures par échantillons (5 g / échantillon).

### II.1.6. Extraction d'ADN bactérien

L'ADN total a été extrait des échantillons grâce à un kit de purification (Ademtech, France), selon le protocole du fournisseur (Dufossé *et al.*, 2013).

Pour chaque échantillon, 2,5 g de sel a été dissous dans des tubes Falcons de 50 mL avec 10 mL d'eau distillée et mis à incuber 15 min sous agitation. Les tubes ont ensuite été centrifugés 5 min à 500 g pour éliminer les impuretés. 2 mL du surnageant mis en tube Eppendorf et centrifugés 10 min à 20 000 g. Le surnageant ainsi obtenu a été éliminé et le culot resuspendu dans 200 µL d'eau et 4 mL d'ARNase. 400 µL de tampon (amorces) ont été ajoutés et incubés 10 min à température ambiante. Ensuite, 400 µL d'éthanol absolu et 35 µL de gouttes de silicone ont été ajoutés à la solution, les tubes ont alors été agités et mis à incuber 5 minutes à température ambiante. Les 3 cycles de séparation magnétique associés à des lavages et au tampon (fournis par le fournisseur) ont été faits dans un rack de tube magnétique spécialisé. Les gouttes ont été séchées 5 minutes à température ambiante. Ensuite, elles ont été remises en solution dans 100 µL d'eau et transférées dans un Eppendorf propre.

Le tube a alors été chauffé à 50°C pendant 5 minutes, rapidement mélangé à l'aide d'un vortex et soumis à séparation magnétique. Le surnageant, contenant l'ADN, a été récupéré dans un nouveau Eppendorf propre et pour subir une dernière séparation magnétique.

La quantité d'ADN obtenue a été estimée en purifiant les échantillons par migration sur gel (0,8% d'agarose) et lecture sous spectrophotomètre (BioSpec-Nano, Shimadzu). Les gels ont été photographiés sous UV (Gel Smart 7.3 system, Clara Vision, Les Ulis, France).

Le Tableau VII suivant présente les codes utilisés pendant l'analyse des sels.

**Tableau VII.** Correspondance échantillons / codes.

<b>Origine</b>	<b>Type de sel</b>	<b>Année de récolte</b>	<b>Code</b>
Ile de Ré	Fleur de sel marais - lot 1	2009	FRE1
Ile de Ré	Fleur de sel marais - lot 2	2009	FRE2
Noirmoutier	Fleur de sel marais Lipoire	2009	FNOIR1
Noirmoutier	Fleur de sel marais Champ d'Or	2009	FNOIR2
Saint-Armel	Fleur de sel commerce	2007	FSTA1
Saint-Armel	Fleur de sel marais	2009	FSTA2
Guérande	Gros sel brut	2009	GSGUE1
Guérande	Fleur de sel brute	2009	FGUE1

### II.1.7. Analyses DGGE

La région V3 variable de l'ADNr-16S de la flore bactérienne des marais salants a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces JCM2 dérivée de l'amorce gc338f, 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGG CAGCA) et 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTTGG) (Sigma, France) (Sheffield *et al.*, 1989). Une répétition de 40 paires de base GC (Sigma, France) au niveau du 5' du JCM2 a permis d'assurer que les fragments d'ADN obtenus soient double brin et que la région étudiée soit dans une partie relativement répétitive.

Chaque mélange (50 µL) contenait ainsi :

- moins de 25 ng d'ADN, [0,2 µM] de chaque amorce,
- tous les désoxyribonucléotides triphosphate nécessaires pour la PCR (dNTP) à [200 µM],
- 10 x 5 µL du milieu tampon,
- 0,5 U de Taq polymérase (Qiagen).

L'amplification a alors pu suivre le cycle suivant :

- dénaturation initiale : 94°C pendant 2 min
- 30 cycles de dénaturation : 94°C pendant 30 sec
- hybridation : 55°C pendant 30 sec
- polymérisation (extension) : 72°C pendant 1 min
- extension finale : 72°C pendant 10 min

Les produits de la PCR ont été analysés *via* une électrophorèse classique en gel d'agarose de 2% (w/v) : milieu tampon (Tris-HCL à [40 mM], pH 7.4, acétate de sodium à [20 mM], Na<sub>2</sub>-EDTA à [1.0 mM]), coloré au rouge 1,5x (VWR) et TAE. Les gels ont été photographiés et les bandes d'ADN mises en évidence déterminées grâce à la comparaison avec un ADN standard (100 paires de base, Promega).

Les produits de la PCR ont également été analysés *via* un gradient sur gel dénaturant (DGGE) (système de détection Bio-Rad Dcode TM des mutations universelles, Bio-Rad, Etats-Unis) (Muyzer *et al.*, 1993 ; Leesing, 2005).

Les échantillons contenant des valeurs assez proches d'amplicons ont été placés en gel de polyacrylamide à 8% (w/v) (acrylamide/N,N-méthylène bisacrylamide, 37,5/1, Proméga,

France) en milieu tampon 1 x TAE (Tris-HCL à [40 mM], pH 7.4, acétate de sodium à [20 mM], Na<sub>2</sub>-EDTA à [1.0 mM]).

Les électrophorèses ont été réalisées à 60°C en utilisant un gradient dénaturant entre 30-60% (100% 7Murea et 40% v/v formamide, Promega, France). La migration s'est faite pendant 10 min à 20 volts puis 12 heures à 80 Volts. A la fin de l'électrophorèse, les gels ont été colorés en rouge (30 minutes de coloration) puis photographiés pour observation.

### II.1.8. Analyses statistiques

Les images individuelles issues du gel ont été alignées et le logiciel ImageQuant TL (Amersham Biosciences, Etats-Unis) a permis la détection, la quantification et l'enregistrement de la position de chaque bande d'ADN. Les profils de bandes obtenus en DGGE pouvant alors être considérés comme une image de la population bactérienne présente dans le milieu. Une bande unique et discrète étant quant à elle, considérée comme le témoin d'une séquence unique correspondant à une population bactérienne dite discrète. Ces informations ont été confirmées par Kowalchuk *et al.* (1997), qui ont démontré qu'une migration identique de bande renseigne sur l'appartenance à une même espèce (Ferris *et al.*, 1996 ; Van Hannen *et al.*, 1999).

Les marqueurs DGGE ont été manuellement identifiés en mettant en évidence l'absence ou la présence de bandes co-migratoires (leur intensité donnant des indications de quantité).

Les similarités communautaires, ont été quantifiées en utilisant le coefficient de similarité (SD) :

$$SD = 2Nc / (Na + Nb)$$

Na = nombre de bandes détectées dans l'échantillon A  
Nb = nombre de bandes détectées dans l'échantillon B  
Nc = nombre de bandes communes aux 2 échantillons

L'indice de similarité est exprimé sur une échelle allant de 0 (totalement différent) à 100 (identiques) (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Les différences significatives des communautés bactériennes issues des marais salants ont été déterminées avec une analyse factorielle en utilisant les deux premiers facteurs les plus représentatifs de la variation dans la base constituée.

Une analyse référentielle (par groupe) a été réalisée en utilisant la base de données des coefficients de similarité précédemment calculés. La méthode de reconstruction par moyenne groupée a été utilisée (logiciel Primer V.6, Angleterre) et les résultats présentés sous forme de dendrogrammes.

### **II.1.9. Purification et séquençage des amplicons majeurs**

Les bandes ont été coupées dans le gel et les amplicons purifiés grâce au kit de purification PCR (système de purification, Promega, France) selon la méthode d'amplification précédemment citée avec amorces mais sans séquence GC.

Les produits PCR ont à nouveau été purifiés (GATC Biotech compagny, Allemagne) pour être séquencés. Les séquences d'ADNr-16S obtenues ont été comparées avec celles des banques internationales NCBI (banque national pour l'information biotechnologique) du programme BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) (Dufossé *et al.*, 2013).

## **II.2. Résultats**

### **II.2.1. Numération des microorganismes**

Les états-frais ont permis de mettre en évidence la mobilité des cellules présentes dans les échantillons et d'avoir une première idée de leur morphologie, de leur mode de regroupement.

La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les classer. Elle donne une information rapide sur le type et sur la forme des cellules. Les Gram positives (couleur violette après traitement) sont ainsi des bactéries dotées d'une simple paroi avec une quantité de peptidoglycane importante alors que les bactéries dites Gram négatives (coloration rose), possèdent une paroi avec moins de peptidoglycane mais sont, quant à elles, pourvues d'une membrane externe supplémentaire.

Onze microorganismes différents ont, ainsi, pu être observés dans les échantillons d'eau des marais, sur les géloses ensemencées, plusieurs types de colonies sont visibles (formes et couleurs variées). La majorité sont orange (Tableaux VIII et IX ci-après, Annexe 5. Description des colonies ensemencées observées à l'œil nu).



**Tableau VIII.** Résultats des observations au microscope des états frais et des colorations de Gram (observation au microscope grossissement x40 et x1000).

Origine	Etat frais	Coloration de Gram
Ile de Ré	Cellules rondes, vertes mobiles, mouvement très rapide	Bacilles et coques, cellules roses ou incolores, G- Coques violettes, G+
Noirmoutier	Petites colonies immobiles, cellules vertes mobiles, cellules en chaînettes allongées ou regroupées (pas de flagelle visible) Cellules rondes, vertes mobiles, mouvement très rapide	Bacilles et coques roses, G-, coques en chaînettes ou en amas roses foncées, G+ Coques violettes, G+
Saint-Armel	Cellules fixes et cellules vertes, cellules rondes et cellules allongées Petites cellules rondes mobiles Très petites cellules allongées Cellules allongées et cellules rondes Cellules rondes, vertes, fixes Cellules vertes mobiles	Bacilles roses, G- Coques incolores, G- Bacilles et coques violettes, G+ Bacilles violets, G+ Long bâtonnets en chaînettes, G+ Coques violettes, G+
Guérande	Cellules rondes, vertes mobiles, mouvement très rapide	Bacilles roses, G- Coques violettes, G+
Témoin	NV	NV

Bacille : forme allongée ; Coque : forme ronde ; G+/G- : Gram positif / Gram négatif ; NV : non visible

**Tableau IX.** Nombre de microorganismes mis en évidence pour les eaux des marais.

Origine	Bactéries			Levures et Moisissures		Microalgues
	PCA 0%	PCA 3,5%	PCA 25%	Malt 0%	Malt 3,5%	Cellule de Thomas
	Concentration nb de cellules/ml			Concentration nb de cellules/ml		Concentration nb de cellules/ml
Ile de Ré été 2009 lot 1	271	5	0	125	0	160
Ile de Ré été 2009 lot 2	2638	101	0	0	267	0
Ile de Ré été 2009 lot 3	6	840	0	0	0	64
Ile de Ré été 2009 lot 4	255	2584	808	0	167	160
Ile de Ré été 2009 lot 5	1678	1854	0	0	0	64
Ile de Ré hiver 2010 lot 1	6725	20213	0	13333	11750	80
Ile de Ré hiver 2010 lot 2	6830	20147	0	12574	11803	100
Ile de Ré hiver 2010 lot 3	6541	20212	0	13600	10796	106
Noirmoutier été 2009 lot 1	10	936	0	10	833	224
Noirmoutier été 2009 lot 2	18	2771	0	0	835	180
Saint-Armel été 2007	207	1060	10	10	51	256
Saint-Armel été 2009 lot 1	440	3833	0	0	67	5152
Saint-Armel été 2009 lot 2	268	1084	0	0	10	320
Saint-Armel été 2009 lot 3	566	247	0	0	0	576
Saint-Armel été 2010	676	4027	0	0	62	523

0 : aucune colonie visible ; nc : colonies trop nombreuses, non comptables

PCA 0% : Ensemencement sur milieu plate count agar ayant une concentration en sel de 0%

Malt 0% : Ensemencement sur milieu malt-agar ayant une concentration en sel de 0%

**Tableau IX. Suite - Nombre de microorganismes mis en évidence pour les eaux des marais.**

Origine	Bactéries			Levures et Moisissures		Microalgues
	PCA 0%	PCA 3,5%	PCA 25%	Malt 0%	Malt 3,5%	Cellule de Thomas
	Concentration nb de cellules/ml			Concentration nb de cellules/ml		Concentration nb de cellules/ml
Guérande été 2009 Lotie 18	500	814958	502	nc	683833	301
Guérande été 2009 Lotie 24	35	213049	0	nc	234353	235
Guérande été 2009 Le Mès	97	341200	0	nc	63173	175
Guérande été 2009 La Coyée	200	240820	0	nc	267208	256
Guérande automne 2009 Département bras mort	121	227035	0	nc	251830	200
Guérande automne 2009 Joestryer œillet 12	217	273190	0	nc	359480	279
Guérande automne 2009 Boulanger œillet 12	70	204978	0	15000	576590	458
Guérande été 2010 lot 1	nc	705000	0	23100	nc	853
Guérande été 2010 lot 2	nc	1650000	110	nc	2460000	759
Guérande Le Mès été 2010 lot 2	300	270000	0	nc	1676667	679
Guérande Le Mès été 2010 lot 3	360	nc	20	nc	230000	586
Témoin	0	0	0	0	0	0

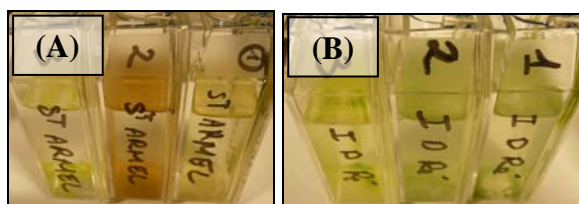
0 : aucune colonie visible ; nc : colonies trop nombreuses, non comptables

PCA 0% : Ensemencement sur milieu plate count agar ayant une concentration en sel de 0%

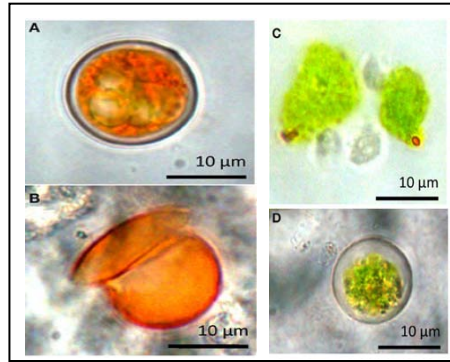
Malt 0% : Ensemencement sur milieu malt-agar ayant une concentration en sel de 0%

## II.2.2. Microalgues

L'identification du genre de microalgue majoritairement présent dans les eaux des marais (*Dunaliella spp.*) a pu être possible grâce aux observations au microscope des eaux des marais faites en partenariat avec l'ARVAM. Le développement de ces microorganismes et différents stades du cycle (Figures 50 à 52) ont pu être observés au microscope, confirmant les observations transmises par les sauniers (variation de couleur dans les marais selon les périodes, selon les blooms) et les données de la littérature à leur sujet (Ben-Amotz *et al.*, 2009 ; Jaenicke, 1998 ; Ranishree *et al.*, 2010).



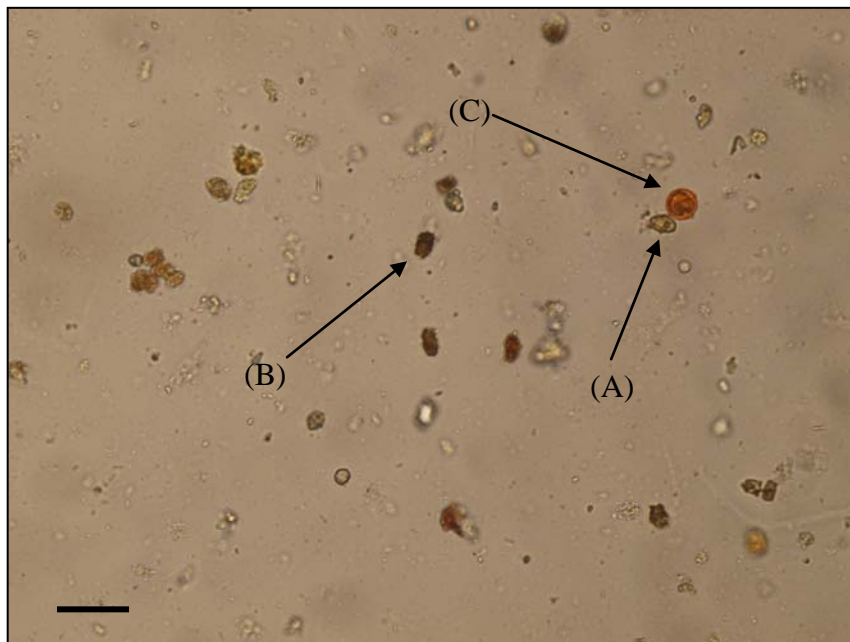
**Figure 50.** Etude des échantillons d'eau par l'ARVAM, différence de couleur après remise en culture (« f/2 Medium », Guillard & Ryther 1962). (A) Eaux des marais de Saint-Armel ; (B) Eaux des marais de l'Ile de Ré.



**Figure 51.** Différentes formes de *Dunaliella* spp. lorsqu'elles sont exposées à de fortes salinités et/ou températures.

(A) Aplanospores ; (B) Membrane vide ; (C, D) cellules après remise en culture dans des milieux teneur en sel (3,5%) et températures moyennes (24°C) (Heidelberg *et al.*, 2013).

Dans les saumures récoltées, différentes formes de microalgues ont ainsi pu être observées (Figure 52) : aplanospore orange (pleine ou vide), spores vertes, microalgue verte biflagellée, forme orange mobile (Ben-Amotz *et al.*, 2009 ; Jaenicke, 1998).



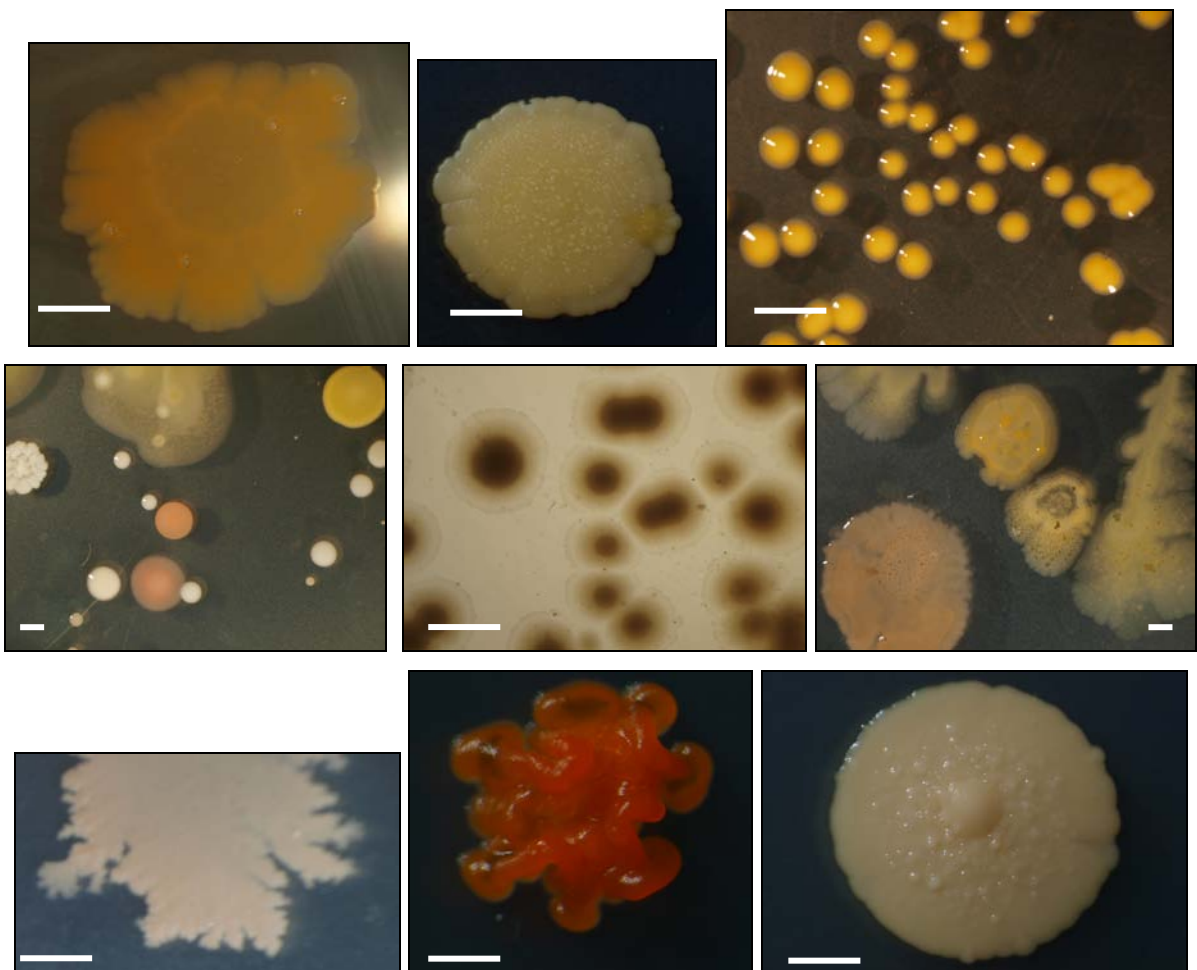
**Figure 52.** Microalgues *Dunaliella* présentes dans l'eau des marais de St-Armel (œillet)

(A) forme végétative, verte flagellée ; (B) forme végétative mobile orange ; (C) cellule orange non mobile (aplanospore ou zygote) (A. Ben-Amotz *et al.*, 2009). Observation au microscope optique (Olympus CX41RF), grossissement x400, le repère représente 26 µm.

### II.2.3. Bactéries

Lors de la mise en culture des eaux des marais en boîte de Pétri pour des milieux à différentes teneurs en sel sous illumination constante à 34°C, le plus grand nombre de bactéries a été détecté pour les milieux à 3,5% de sel. Les bactéries initialement présentes dans les saumures sont donc des bactéries pouvant se développer pour des concentrations en sel proche de sel de l'eau de mer. Les bactéries se développent également sur le milieu sans sel mais présentent alors des formes de résistance (spores) face au stress hypo-salique qu'elles semblent subir. Aucune bactérie ne semble se développer pour des teneurs en sel importantes (Tableau IX page 130).

Quelle que soit la concentration du milieu ou l'origine de la saumure, les colonies observées sont similaires : orange diffuse ou jaune circulaire ou blanche circulaire (Figure 53).



**Figure 53.** Exemples de colonies de bactéries non-identifiées observées sur PCA 3,5% sel (ensemencées en surface avec 0,1 mL d'eau de Guérande, St-Armel ou Noirmoutier). Observations au stéréomicroscope (Olympus SZX2-ILLK), grossissement x 2,5, le trait représente 4 mm.

## II.2.4. Moisissures et champignons

L'étude des levures et des moisissures s'est faite en éclairage constant sur milieu spécifique (malt agar, 3,5% sel - la teneur des marais) et à 34°C. Plus le milieu est coloré (foncé), plus la présence de moisissure ou de champignon peut être constatée (Tableau IX page 130), les colonies avaient toutes une forme similaire, de par les conditions qui leur étaient imposées (Figure 54).



**Figure 54.** Exemples de colonies de levures ou de moisissures non-identifiées observées sur Malt 3,5% sel (ensemencées en surface avec 0,1 mL d'eau de Guérande, St-Armel ou Noirmoutier). Observations au stéréomicroscope (Olympus SZX2-ILLK), grossissement x 2,5, le trait représente 4 mm.

Ainsi un nombre important et variable de microorganismes a été mis en évidence en fonction des milieux et de leur origine (Figure 55) :

- Les microalgues sont détectées dans tous les bassins en quantités variables, ce sont les échantillons de Guérande et de Saint-Armel qui présentent les concentrations les plus importantes.
- Les bactéries présentent de fortes concentrations dans tous les échantillons quelque soit leur type ou leur année de récolte.
- Les levures et moisissures sont présentes en grande quantité pour le bassin de Guérande mais peuvent être totalement absentes dans certains échantillons de l'île de Ré ou de Saint-Armel.

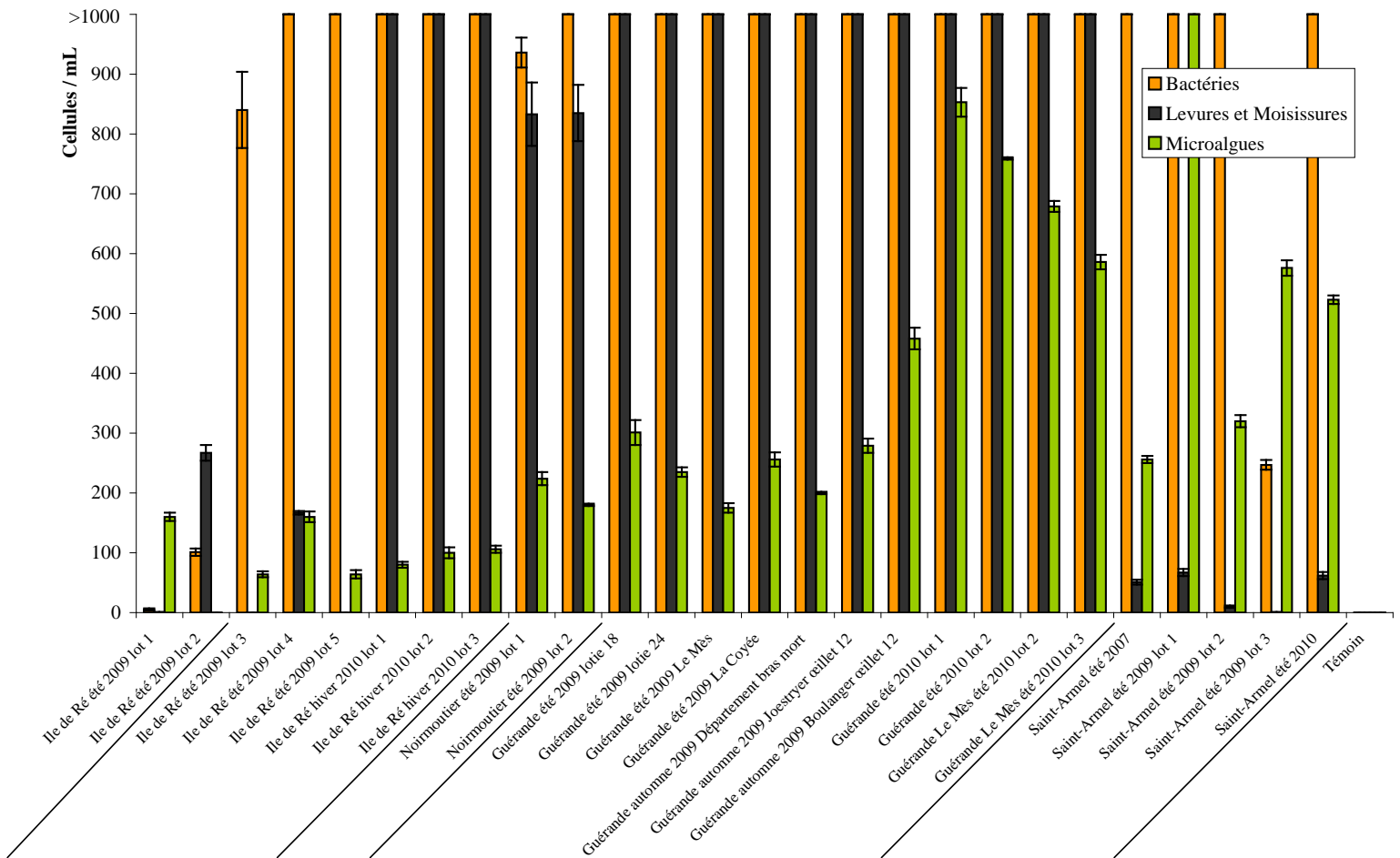
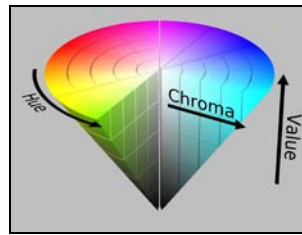


Figure 55. Concentration estimée des microorganismes en fonction de leur zone géographique.

## II.2.5. Colorimétrie

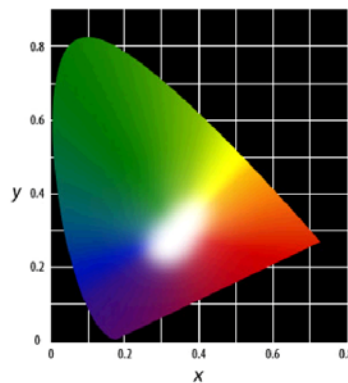
La perception des couleurs par l'œil humain est limitée à des longueurs d'onde comprises entre 380 et 770 nm. Il existe un système de mesure simple et international de la couleur qui permet de s'affranchir de tous les autres paramètres pouvant influencer sa perception, tels que le « brillant » ou la texture. La couleur est en effet le résultat de la perception du stimulus visuel perçu après interaction avec / sur un objet. La lumière peut ainsi être reflétée, absorbée, transmise ou réfractée par un objet éclairé. Par exemple, si toute l'énergie lumineuse est reflétée, l'objet apparaîtra blanc alors que si elle est absorbée totalement, l'objet semblera noir. Dans le système L\*h\*C\*, le terme « luminosité » (L ou « value » en anglais) d'un produit fera ainsi référence au rapport lumière absorbée / lumière reflétée. Le terme « hue » (h) définit quant à lui l'orientation colorimétrique du système (objet qui tend vers le rouge, le bleu, le jaune ou le vert). Cette perception de la couleur dépend de l'absorption de l'énergie du spectre lumineux à différentes longueurs d'onde. Ainsi, lorsque les plus petites longueurs d'onde (entre 400 et 500 nm) sont reflétées, l'objet semble bleu alors

que lorsque ce sont les longueurs les plus longues qui sont reflétées (600-700 nm) l'objet est rouge. Le terme "chroma" (C) définit la saturation des objets, c'est à dire leur réflexion, combien ils sont différents du gris. Il permet par exemple de décrire en quoi un rouge brique est différent d'un rouge tomate pour un L et un h identiques. Pour résumer, L permet de définir la clarté de l'objet, h permet de définir vers quelle couleur il tend et C la vivacité de sa teinte. Ces 3 paramètres peuvent s'organiser dans un système trichromique cyclique (Figure 56).



**Figure 56.** La perception visuelle de la couleur peut être représentée selon un système simple de 3 variables : la luminosité (value,  $L^*$ ), la couleur (hue,  $h^*$ ) et l'intensité (chroma,  $C^*$ ).

Outre les mesures  $L^* h^* C^*$ , un autre système de mesure permet de déterminer la couleur d'un produit : le système CIE (tristimulus) basé sur des coordonnées chromatiques X, Y et Z d'une couleur c'est-à-dire sa "composition" en rouge, vert et violet (Figure 57).



**Figure 57.** Diagramme chromatique, système CIE.

Dans le cadre des mesures tristimuli effectuées sur les différentes eaux prélevées pour l'étude, il a pu être mis en évidence qu'il n'existe pas vraiment de couleur spécifique à une région. Les eaux des marais se situent toutes dans les orange très clairs (Figure 58 ; Tableau X) bien qu'il existe des différences de couleurs entre elles (Figure 59).

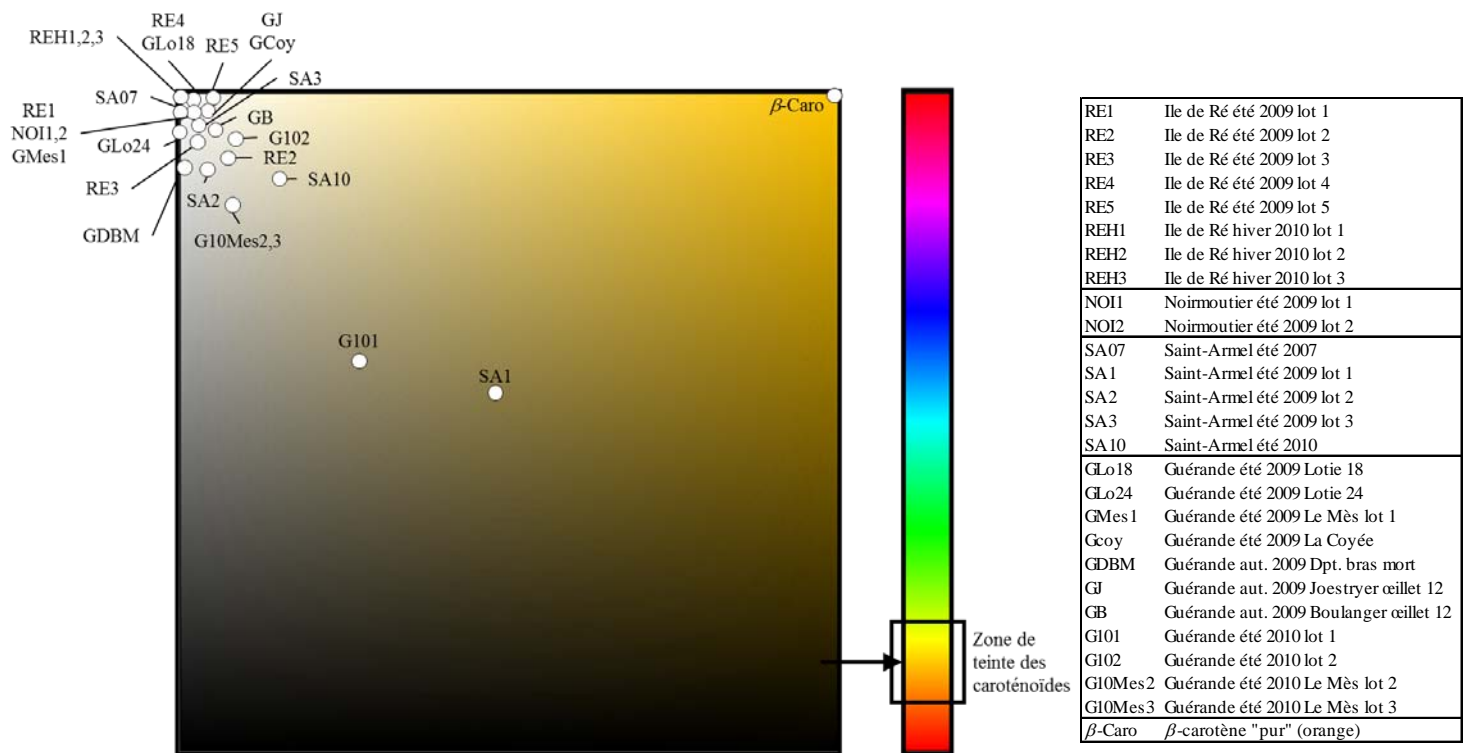


Figure 58. Répartition des échantillons en fonction de leur couleur et de leur origine.

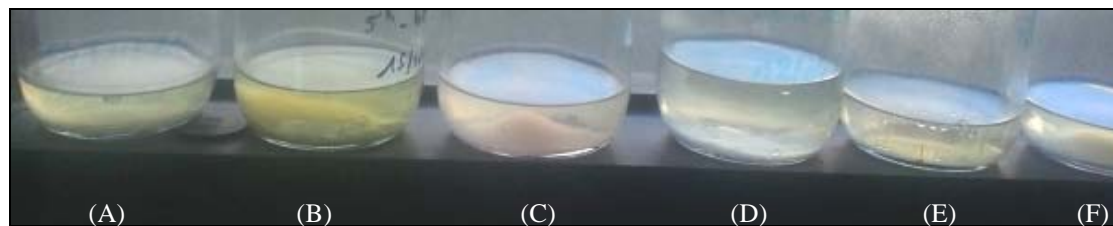



















Figure 59. Exemples de différence de couleurs entre les eaux des marais. (A) Guérande été 2010 Le Mès lot 2 ; (B) Saint-Armel hiver 2010 ; (C) Saint-Armel été 2009 lot 2 ; (D) Ile de Ré été 2009 lot 2 ; (E) Ile de Ré hiver 2010 ; (F) Saint-Armel été 2009 lot 3.

Tableau X. Résultats colorimétriques (eaux des marais).

Origine	a*	b*	L*	C*	h*	R	G	B	Rendu
Ile de Ré été 2009 lot 1	-0,21	4,41	97,98	4,42	92,68	251,61	248,97	240,63	
Ile de Ré été 2009 lot 2	0,47	8,55	91,46	8,57	86,88	238,55	229,59	214,23	
Ile de Ré été 2009 lot 3	0,23	6,65	92,95	6,66	87,98	240,85	234,11	222,04	
Ile de Ré été 2009 lot 4	-0,19	3,36	98,69	3,36	93,26	253,8	251,08	244,7	
Ile de Ré été 2009 lot 5	-0,55	5,28	98,17	5,31	96	253,21	249,66	239,49	
Ile de Ré hiver 2010 lot 1	-0,14	0,52	99,7	0,54	104,56	254,31	254,19	251,1	
Ile de Ré hiver 2010 lot 2	-0,1	0,58	99,83	0,59	99,5	254,83	254,53	253,36	
Ile de Ré hiver 2010 lot 3	-0,1	0,62	99,88	0,62	99,03	255	254,68	253,43	
Noirmoutier été 2009 lot 1	-0,02	3,78	95,82	3,78	88	246,22	242,68	235,67	
Noirmoutier été 2009 lot 2	-0,26	4,05	97,03	4,06	75,5	249,46	246,29	238,6	



**Tableau X. Suite - Résultats colorimétriques (eaux des marais).**

Saint-Armel été 2007	0,09	1,91	97,82	1,92	87,22	250,59	248,5	245	
Saint-Armel été 2009 lot 1	3,48	24,96	41,99	25,2	82,06	117,77	95,94	57,89	
Saint-Armel été 2009 lot 2	-0,32	9,21	94,2	9,21	91,97	245,4	237,84	220,65	
Saint-Armel été 2009 lot 3	0,43	10,67	92,38	10,67	87,67	242,75	232,08	212,77	
Saint-Armel été 2010	1,35	19,89	82,48	19,94	86,11	220,41	203,11	168,17	
Guérande été 2009 Lotie 18	-0,37	3,45	98,36	3,47	96,05	252,56	250,23	243,57	
Guérande été 2009 Lotie 24	0,11	6,37	94,68	6,37	89,04	245,36	239,14	227,46	
Guérande été 2009 Le Mès	-0,23	4,06	97,55	4,07	93,3	251,03	247,77	240,07	
Guérande été 2009 La Coyée	-0,58	6,09	97,12	6,12	95,42	250,79	246,6	234,92	
Guérande aut. 2009 Dpt. bras mort	-0,1	2,66	93,34	2,66	92,21	237,98	235,71	230,74	
Guérande aut. 2009 Joestryer œillet 12	-0,78	7,63	97,27	7,67	95,8	252,1	247,04	232,37	
Guérande aut. 2009 Boulanger œillet 12	0,02	8,9	93,18	8,9	89,85	242,89	234,74	218,38	
Guérande été 2010 lot 1	1,64	14,62	53,67	14,76	83,58	140,81	126,44	103,27	
Guérande été 2010 lot 2	-0,09	12,34	91,47	12,34	90,44	240,37	229,7	207,02	
Guérande été 2010 Le Mès lot 2	1,26	13,47	81,35	13,53	84,68	214,89	200,41	177,11	
Guérande été 2010 Le Mès lot 3	1,23	13,66	81,72	13,72	84,85	216,01	201,45	177,76	
Témoin (blanc)	0,005	-0,01	100	0,012	296,813	255	255	255	

aut. : automne ; Dpt. : Département

## II.2.6. Extraction d'ADN bactérien

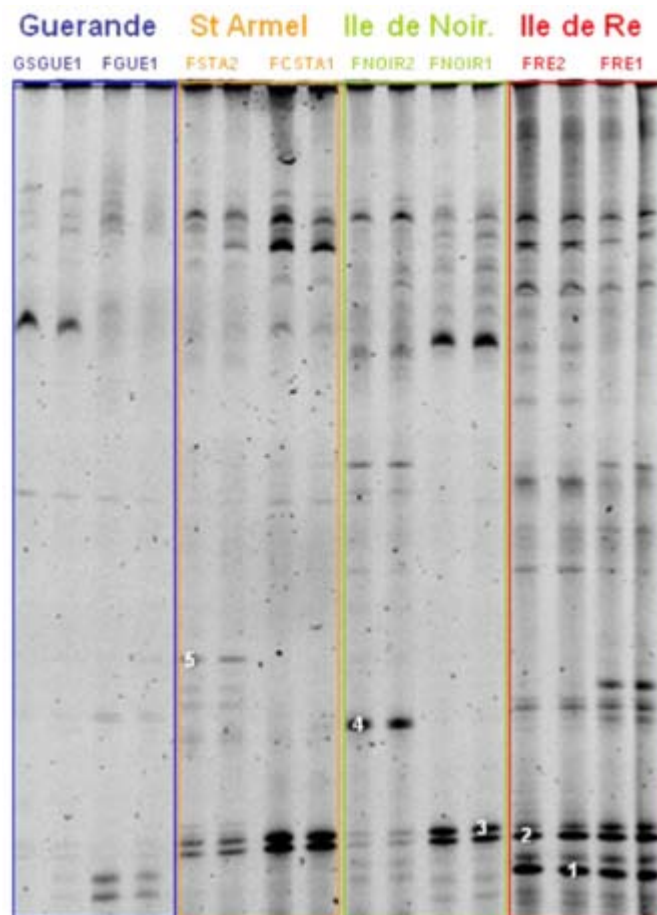
La technique d'extraction d'ADN utilisée pour récupérer l'ADN total a permis de mettre en évidence des concentrations d'ADN entre 0,3 et 2  $\mu\text{g} / \text{g}$  de sel étudié (évalué par électrophorèse en gel d'agarose et analyses *via* le logiciel Biospec). La quantité extraite n'est pas reliée au type de sel, à son jour de collecte ou son origine.

La PCR a été faite selon des protocoles standards d'amplification d'ADN et des amorces universelles. Il a pu être mis en évidence une amplification significative des ADNr-16S, de plus aucun ADN fongique ou de levure (ADNr-26S et -28S) n'a été détecté lors de l'amplification. Ce constat permet de supposer que les bactéries sont plus importantes, en nombre, que les levures et les champignons dans la microflore des marais salants étudiés, comme cela a pu être mis en évidence au cours d'étude sur les milieux fortement concentrés en sel (Dufossé *et al.*, 2013). Les bactéries contenues dans les échantillons, ont d'ailleurs été isolées à partir du sel et ont permis une identification d'espèce grâce à l'utilisation de gel DGGE.

### II.2.7. Analyses DGGE

L'ADNr-16S amplifié a été séparé sur gel (DGGE). Les résultats qui montrent des variations notables entre les échantillons ont ainsi été mis en évidence 10 à 20 bandes discrètes à intensités variables et des bandes co-migratoires permettant une analyse statistique des échantillons (Figure 60).

N.B. Les résultats obtenus sont reproductibles sur plusieurs analyses identiques, les observations de bandes étant donc bien dues uniquement à l'échantillon lui-même.



**Figure 60.** Bandes d'ADNr-16S mises en évidence après PCR-DGGE pour 4 sels de mer d'origines géographiques différentes.

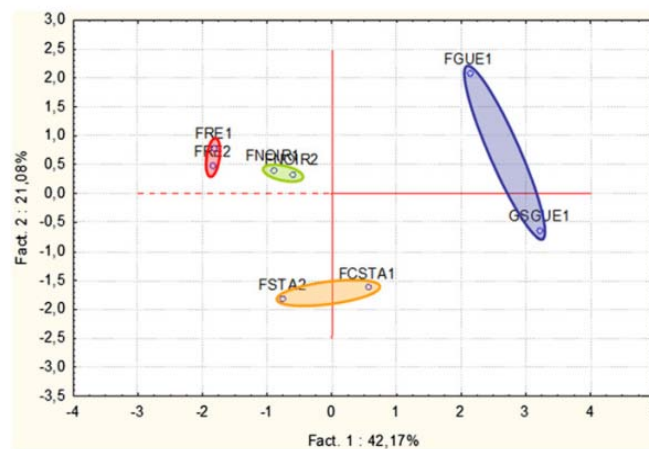
GSGUE1 : Gros Sel de Guérande 2009 ; FGUE1 : Fleur de Sel de Guérande 2009 ; FSTA2 : Fleur de Sel de St-Armel échantillon 2009 ; FSTA1 : Fleur de Sel de St-Armel échantillon 2007 ; FNOIR 2 : Fleur de sel de Noirmoutier, Champ d'Or 2009 ; FNOIR 1 : Fleur de sel de Noirmoutier, Lipoire 2009 ; FRE2 : Fleur de Sel de l'Ile de Ré lot 2 2009 ; FRE1 : Fleur de sel de l'Ile de Ré lot 1 2009.

## II.2.8. Analyses statistiques

C'est la comparaison entre les différentes bandes obtenues lors de la migration sur gel qui permet la construction d'un dendrogramme (Le Nguyen *et al.*, 2008 ; Léopold *et al.*, 2010).

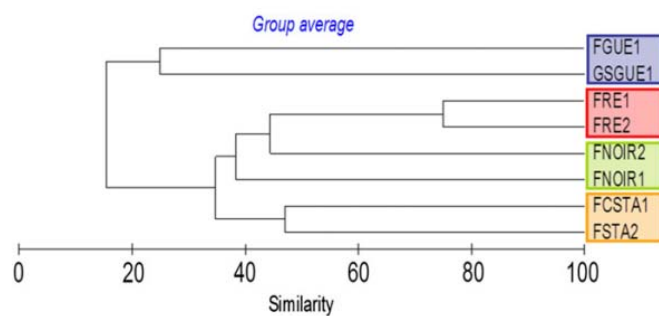
Une analyse factorielle (ACP) a été utilisée pour décrire plus de 63% de la variation au sein des échantillons analysés (1 point = 3 répétitions). Ainsi, une légère variation semble exister au sein d'un même bassin géographique mais la variation entre les différentes origines est encore plus importante (Figure 61). Les échantillons de Guérande et de Saint-Armel sont ceux représentant la plus grande disparité.

Les groupes ont été réalisés en fonction de leur indice de similarité. Il apparaît ainsi que les sels peuvent être groupés selon leur origine de production (Figures 61 et 62). Les échantillons de l'Ile de Ré présentent les plus grandes similarités (75%) et Guérande les plus faibles (25%). Ces résultats sont cependant répétitifs car même en utilisant des variantes du modèle d'approche proposé, les regroupements restent les mêmes.



**Figure 61.** Analyse factorielle des correspondances pour les bandes d'ADNr-16S obtenues après DGGE à partir de sels de 4 différentes zones géographiques.

GSGUE1 : Gros Sel de Guérande 2009 ; FGUE1 : Fleur de Sel de Guérande 2009 ; FSTA2 : Fleur de Sel de St-Armel échantillon 2009 ; FSTA1 : Fleur de Sel de St-Armel échantillon 2007 ; FNOIR 2 : Fleur de sel de Noirmoutier, Champ d'Or 2009 ; FNOIR 1 : Fleur de sel de Noirmoutier, Lipoire 2009 ; FRE2 : Fleur de Sel de l'Ile de Ré lot 2 2009 ; FRE1 : Fleur de sel de l'Ile de Ré lot 1 2009.



**Figure 62.** Dendrogramme basé sur l'analyse de l'ADNr-16S sur DGGE des sels de différentes origines.

GSGUE1 : Gros Sel de Guérande 2009 ; FGUE1 : Fleur de Sel de Guérande 2009 ; FSTA2 : Fleur de Sel de St-Armel échantillon 2009 ; FSTA1 : Fleur de Sel de St-Armel échantillon 2007 ; FNOIR 2 : Fleur de sel de Noirmoutier, Champ d'Or 2009 ; FNOIR 1 : Fleur de sel de Noirmoutier, Lipoire 2009 ; FRE2 : Fleur de Sel de l'Ile de Ré lot 2 2009 ; FRE1 : Fleur de sel de l'Ile de Ré lot 1 2009.

Bien que déjà précise, cette représentation phylogénétique est basée uniquement sur l'analyse d'ADN bactérien (PCR faite à partir d'amorces bactériennes). Or, les bactéries ne sont pas l'espèce prédominante dans les marais. Un travail sur les archées permettra dans l'avenir d'affiner cette classification et l'ensemble des résultats liés aux études ADN.

### II.2.9. Purification et séquençage des amplicons majeurs

Les bandes d'ADN 16S, séquencées en totalité, ont été choisies en fonction de leur intensité (donc de leur abondance) et de leur spécificité (c'est-à-dire, semblant être le "marqueur" d'une zone géographique). 5 bandes ont ainsi été isolées à partir des profils DGGE obtenus (Figure 60 page 139), purifiées, amplifiées par PCR et séquencées.

Les séquences obtenues ont été comparées à la base de données génomique (Blast) pour déterminer les espèces bactériennes auxquelles elles pourraient appartenir. Ainsi, les 5 séquences obtenues semblent être issues de bactéries halophiles ou halotolérantes vivant soit dans les marais salants soit dans un domaine marin ou océanique.

Les bandes 2 et 3 « communes » aux différents échantillons (Figure 60 page 139) présentent des similitudes de séquence avec le génome de *Gracilomonas tropica* (93% de correspondance entre les séquences isolées et le génome de la bactérie, souche CL-CB462, numéro d'accèsion EF988655) et celui de *Balneola vulgaris* (84% de corrélation avec les bandes 2 et 3 séquencées, souche 13IX/A01/164, numéro d'accèsion AY576749). Ces 2 espèces se retrouvent dans la littérature comme respectivement caractéristiques de la zone tropicale de l'Océan Pacifique (Choi, 2009) et le nord-ouest de la mer Méditerranée (Urios *et al.*, 2006).

La bande 1, spécifique des eaux de l'île de Ré semble, quant à elle, correspondre avec *Pseudomonas halophila* (corrélation supérieure à 99%, souche DSM 305, numéro d'accèsion AB021383). Cette bande est uniquement présente chez les échantillons FRE1 et FRE2 (Figure 60 page 139) pourrait donc être un marqueur intéressant pour les échantillons de cette zone de production. Dans la littérature, *Pseudomonas halophila* est notamment caractéristique du Grand Lac Salé des Etats-Unis (Sorokin & Tindall, 2006).

La Bande 4, très spécifique de l'un des échantillons de Noirmoutier (FNOIR2) est très fortement corrélée au génome de *Persicobacter diffluens* (84% d'identification, souche NBCR 15940, numéro d'accèsion AB260929), préalablement isolée de fruits de mer (Muramatsu *et al.*, 2010).

Enfin, la bande 5 provenant de l'échantillon de Saint-Armel (FSTA2) correspond spécifiquement à *Halanaerobium saccharolyticum* (plus de 99% de similitude, souche DSM 6643, numéro d'accèsion X89070). *H. saccharolyticum* est décrit comme une espèce halophile fermentative (Rainey, 1995) et peut donc se développer sans oxygène (ou pour des taux très faibles). Il est à noter que cet ADN<sub>r</sub>-16S est totalement absent de l'échantillon FSTA1 récolté 2 années auparavant.

### II.3. Discussion

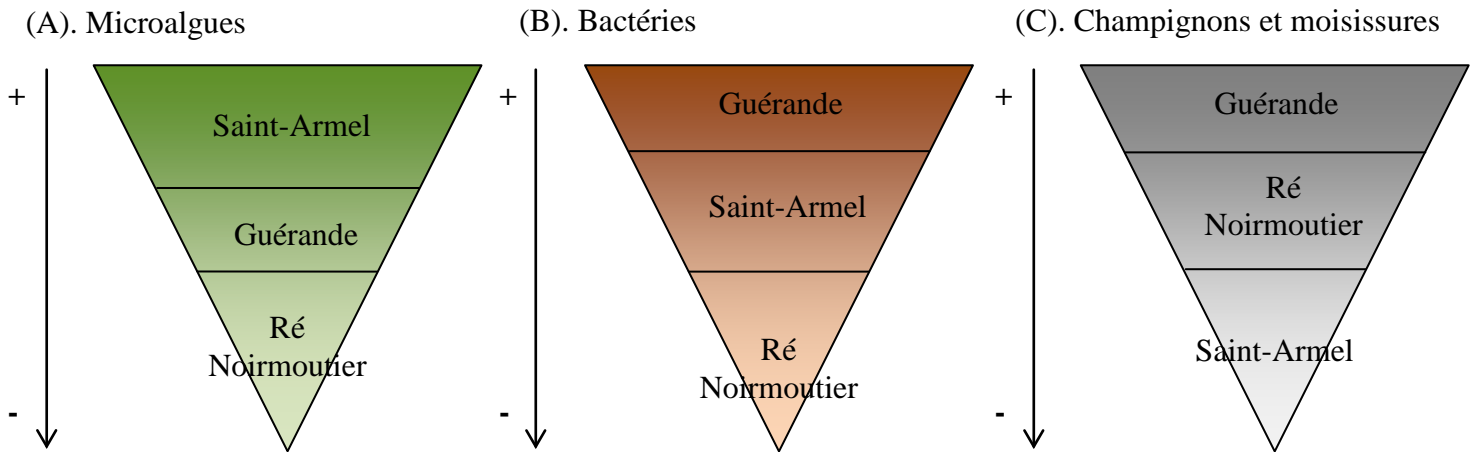
La présence de cellules mobiles dans les échantillons (état frais) et le développement important sur boîte de Pétri permet de valider la présence de microorganismes **vivants** dans l'ensemble des échantillons d'eaux étudiés (**bactéries, champignons, moisissures**). La mise en culture en milieu spécifique « f/2 » a, de même, permis de mettre en évidence la présence de **microalgues** vertes et/ou orange vivant dans les saumures analysées.

La présence de bacille et de coque et les couleurs variées des colonies sur boîte de Pétri, soulignent, qui plus est, la viabilité et la diversité des cellules en milieux hypersalin (Tableau IX page 130).

#### II.3.1. Comparaison par bassin

Bien que toutes les eaux étudiées contiennent des microorganismes, leur teneur et leur composition sont différentes pour chaque œillet de chaque bassin (Figure 63). La plus grande variabilité au sein d'une même origine est observée pour Guérande et l'île de Ré. Cette variation peut s'expliquer par une quantité d'échantillons importante de ces deux bassins (11

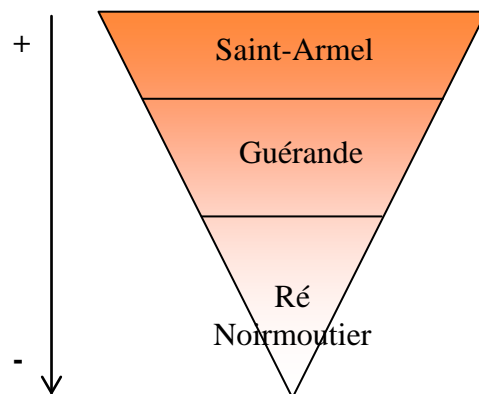
pour Guérande et 8 pour l’Ile de Ré) qui accroît la variabilité de composition : plus d’œilletés étudiés par bassin = plus de type de contenu différent. L’ACP des échantillons d’ADNr-16S étudiés à partir des sels souligne également cette légère variation au sein d’un même bassin géographique même si la variabilité entre les différentes origines est encore plus importante.



**Figure 63.** Teneur en microorganismes des différentes eaux. (A) Concentration en microalgues ; (B) concentration en bactéries ; (C) Concentration en champignons et moisissures.

La composition de chaque eau est différente selon les marais et leur localisation, en effet, selon les conditions climatiques imposées par l’environnement, se développera préférentiellement, l’un ou l’autre type de microorganismes. La composition en ADNr-16S isolés à partir des sels sera donc également différente et représentative du milieu duquel il est issu.

La couleur des différents bassins est également variable d’un site à l’autre (Figure 64) : elle varie du marron-orange pour Saint-Armel au translucide pour Noirmoutier.



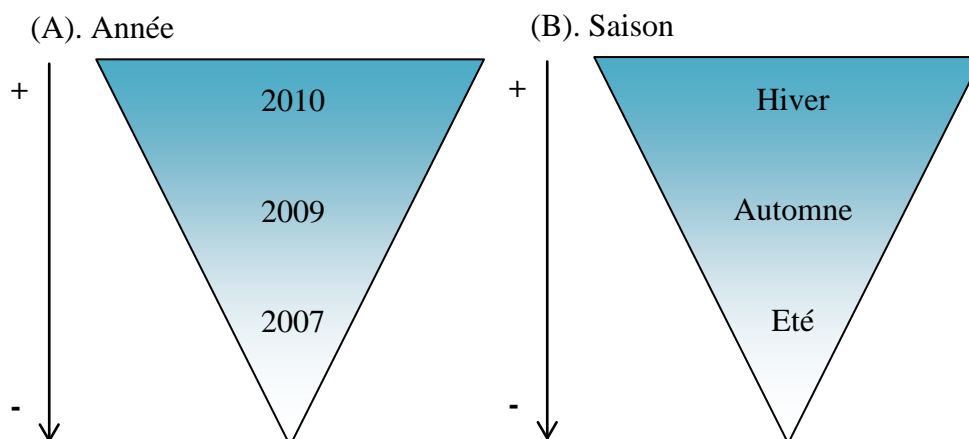
**Figure 64.** Variation de la couleur des eaux en fonction des bassins.

Au regard du classement de la couleur des eaux des bassins et de celui des microalgues et des colonies (bactéries), il semblerait qu'il existe un lien entre la couleur des eaux et celles des microorganismes, notamment les microalgues et les bactéries. Cette couleur orange de la majorité des colonies présentes sur les boîtes de Pétri ou de certaines microalgues et donc des eaux, peut s'expliquer par la présence de **caroténoïdes dans les organismes** étudiés (Raja *et al.*, 2007).

### II.3.2. Comparaison par année d'échantillonnage

Plus l'échantillon d'eau est récent, plus il contient de microorganismes (Figure 65(A)). En effet, après récolte les échantillons ont été stockés au frais sans aucun apport d'eau ultérieur. Un non-renouvellement de l'eau au cours du temps prive les microorganismes de tout apport extérieur de nutriments : ils ne peuvent pas continuer leur cycle de développement et meurent petit à petit.

L'eau d'hiver est la plus riche en microorganismes (Figure 65 (B)) car c'est à cette saison que les marais sont inondés pour être protégés du froid et des gelées qui pourraient faire craquer l'argile du fond des marais, les rendant inutilisables pour l'année suivante. Ainsi, la concentration en NaCl des marais inondés est la même que celle de l'Atlantique, c'est-à-dire, d'environ 35 g/L. Or c'est à cette concentration que les microorganismes se développent de façon optimale. Les microorganismes sont les plus nombreux en hiver mais aussi les moins colorés car la présence de pigments orange est souvent caractéristique d'un mécanisme de résistance mis en place par les bactéries ou les microalgues pour survivre dans des milieux hypersalins (250 g/L), ce qui n'est pas le cas en hiver.



**Figure 65.** Evolution des microorganismes des eaux au cours du temps. (A) En fonction des années (Saint-Armel) ; (B) En fonction des saisons (Ile de Ré et Guérande).

Au niveau de l'ADNr-16S isolés à partir des sels : Saint-Armel possède la plus grande disparité au niveau de ses résultats car les sels étudiés ne datent pas de la même année (2007 et 2009). Les échantillons de 2007 présentent des bandes plus importantes que ceux de 2009, en effet, la production de sel a été assez pauvre en 2009 à cause des conditions météorologiques défavorables, la quantité de microorganismes sur les cristaux étant donc être moindre cette année là (sel « lavé » par la pluie). Cette observation permet également de confirmer la survie des microorganismes dans les inclusions des cristaux : ils meurent dans les saumures mais peuvent survivre dans le sel car le minéral leur apporte un substrat de croissance (Price & Sowers, 2004).

### II.3.3. Comparaison par type d'échantillon

Les analyses de numération et de coloration ont été conduites sur les eaux et celles de l'ADNr-16S sur les sels. Les résultats observés d'une part et d'autre confirment que la diversité des microorganismes présents dans les différents types d'échantillons (forme et couleur des colonies ou des microalgues différentes) mais aussi le lien entre eux (couleur orange). La présence d'ADNr-16S de *Balneola vulgaris* (Guérande), de *Pseudomonas halophila* (Ile de Ré), de *Persicobacter diffluens* (Noirmoutier) et de *Halanaerobium saccharolyticum* (Saint-Armel) par exemple, indique que les microorganismes des marais sont capables de se développer et de survivre plusieurs années au sein des cristaux de sels, car ces microorganismes sont caractéristiques de bassins marins (Choi, 2009 ; Urios *et al.*, 2006 ; Sorokin & Tindall, 2006 ; Muramatsu *et al.*, 2010). La disparité de la quantité d'ADNr-16S mise en évidence dans certains bassins peut être expliquée par la variation au sein des échantillons fournis :

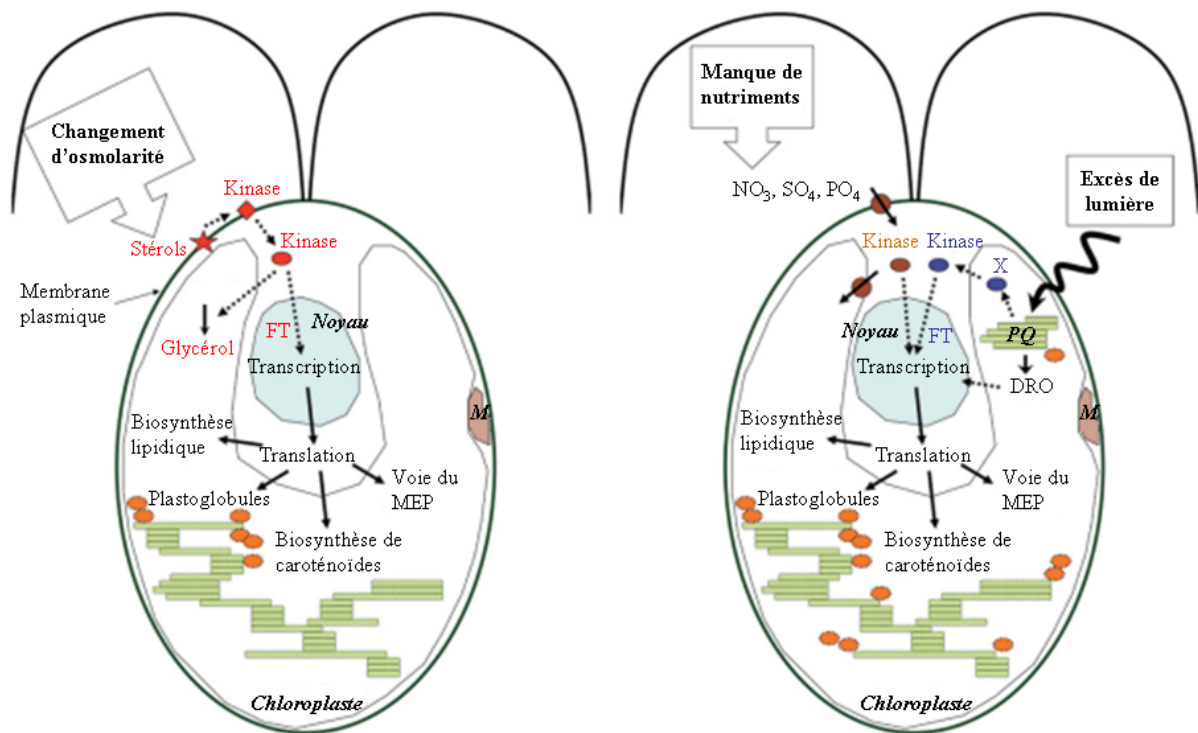
- deux années de récolte pour Saint-Armel,
- des natures de sels différents pour Guérande (gros sel vs fleur de sel : la différence de conformation et/ou de taille de cristal aura un impact sur le volume d'eau résiduelle dans le cristal donc sur la quantité de microorganismes présents).

### II.3.4. Origine possible des microorganismes et de la couleur des marais

*D. salina* est une algue unicellulaire verte qui peut survivre dans des milieux hypersalins et sous une forte luminescence, certaines souches sont, en effet, capables de se développer dans des milieux dont la teneur en sel se situe entre 0,6 et 35% et sous un soleil



ardent (Raja *et al.*, 2007). *Dunaliella salina* est une des seules algues eucaryotes qui peut accumuler une quantité importante de caroténoïdes dans les interthylakoïdes de ses chloroplastes (dans des gouttes lipophiles) lorsque les conditions et la forme de la cellule (flagellée, aplanospore...) s'y prêtent (Collins *et al.*, 2011) (Figure 66) (Lamers *et al.*, 2008 ; Raja *et al.*, 2007 ; Ye *et al.*, 2008).



**Figure 66.** Réponses métaboliques de *Dunaliella salina* au stress abiotique de son milieu (sel, manque de nutriment, fort ensoleillement) (Ramos *et al.*, 2011).

MEP : méthylérythritol phosphate ; PQ : plastoquinone ; DRO : dérivés réactifs de l'oxygène.

Sur la base des diagrammes d'A.A. Ramos *et al.* (Ramos *et al.*, 2011), le noyau est en bleu et les mitochondries en marron. A gauche, un changement d'osmolarité (augmentation de la teneur en sel du milieu) entrainerait une réponse rapide de la cellule afin qu'elle puisse équilibrer au plus vite sa pression osmotique interne. A droite, lorsqu'un manque de nutriment ou un trop plein de soleil (énergie lumineuse) est détecté par les récepteurs sensoriels de la cellule, cela activerait une voie de transduction secondaire dans la membrane plasmique et au niveau de l'appareil photosynthétique, ce qui permettrait l'expression de nouveaux gènes au niveau du noyau et du cytoplasme. Les gènes alors produits (notamment des enzymes) seraient importés dans le chloroplaste pour augmenter la quantité d'isoprénoïdes et de lipides présents. La production de caroténoïdes permettrait quant à elle la fixation de globules

lipidiques au niveau du stroma (autour de la membrane thylakoïdienne). Il est évident que la kinase, les facteurs de transcription (FT), les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et le changement dans le potentiel red-ox de la cellule (par exemple la sur-réduction de plastoquinone (PQ) sous l'effet de la forte lumière) associés à des facteurs encore inconnus (X) jouent un rôle non négligeable dans la régulation du métabolisme de l'algue lors d'un stress extérieur (Ramos *et al.*, 2011). Certaines études tendent même à montrer que le  $\beta$ -carotène contenu dans les chloroplastes est le précurseur, chez certaines algues comme *Haematococcus pluvialis*, d'astaxanthine, un xanthophylle dont la synthèse se déroule hors du chloroplaste (Collins *et al.*, 2011 ; Martin *et al.*, 2008).

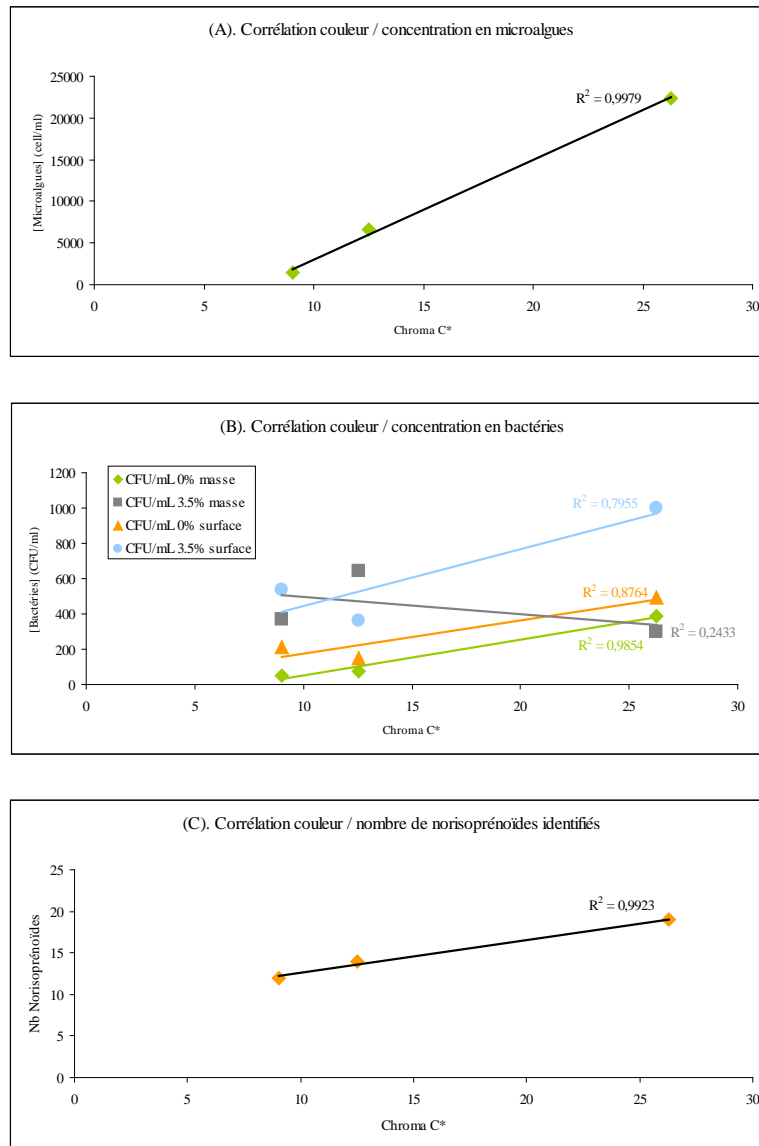
La présence de  $\beta$ -carotène dans *Dunaliella salina* a été mise en évidence et confirmée notamment par les travaux de R. Raja *et al.* (2007), démontrant ainsi que la microalgue peut accumuler une quantité importante de ce caroténoïde qui peut d'ailleurs représenter jusqu'à 10% de sa biomasse lorsque toutes les conditions environnementales sont réunies (Lamers *et al.*, 2008 ; Ye *et al.*, 2008).

Ainsi, dans le cas des saumures étudiées, celles apparaissant comme les plus colorées sont celles contenant la plus forte concentration en microalgues (Tableau XI ci-après) (Lamers *et al.*, 2008 ; Ye *et al.*, 2008 ; Raja *et al.*, 2007). En effet, comme en attestent les différents graphiques présentés ci-après Figure 67, il existe une corrélation forte entre la couleur de la saumure, ses microorganismes et son odeur. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que la majorité des algues (et donc des microalgues) contient des pigments photosynthétiques, outre la chlorophylle, pour capter l'énergie lumineuse. Le  $\beta$ -carotène est ainsi présent chez plus de 90% des algues, la fucoxanthine est quant à elle présente chez les diatomées, les dinoflagellés et les algues brunes. Avec les phycobiliprotéines, les caroténoïdes jouent le rôle de pigments « accessoires » dans la photosynthèse : la chlorophylle n'absorbant que pour des longueurs d'onde comprises entre 470 et 630 nm, les pigments accessoires permettent une absorption plus large du spectre lumineux (entre 450 et 640 nm) (Prescott *et al.*, 2003), de façon plus générale, les caroténoïdes assurent la protection de l'appareil photosynthétique en « défendant » les microorganismes de la lumière solaire et de la température (destruction réduite, quantité de chlorophylle protégée voir corrélée avec celle des caroténoïdes en présence) (Prescott *et al.*, 2003 ; Exton *et al.*, 2013).

**Tableau XI.** Synthèse des résultats du dénombrement de microorganismes, de l'étude de couleur et du nombre de norisoprénoïdes mis en avant pour les eaux de Saint-Armel échantillons 2009.

<b>Echantillons 2009</b>	<b>Lot 1</b>	<b>Lot 2</b>	<b>Lot 3</b>
C*	26,28	9,03	12,53
Cellules /mL	22400	1451	6613
Nb norisoprénoïdes	19	12	14
CFU/mL 0% masse	387	50	77
CFU/mL 3.5% masse	300	367	643
CFU/mL 0% surface	493	213	153
CFU/mL 3.5% surface	1000	540	360
CFU/mL levure/champ. masse	100	43	14
CFU/mL levure/champ. surface	67	3	0

CFU : unité formant colonie ; champ. : champignons ; C\* : chroma (indicateur de couleur) ; 0% masse : échantillon mélangé à la gélose de culture ayant une concentration en sel de 0% ; 0% surface : échantillon déposé sur le milieu de culture ayant une concentration en sel de 0%.



**Figure 67.** Corrélations entre la couleur (valeur de C\*) de la saumure des marais de Saint-Armel et d'autres paramètres. (A) la concentration en microalgues (nombre de cellules / mL); (B) le nombre de microorganismes (CFU/mL); (C) le nombre de norisoprénoides détectés.

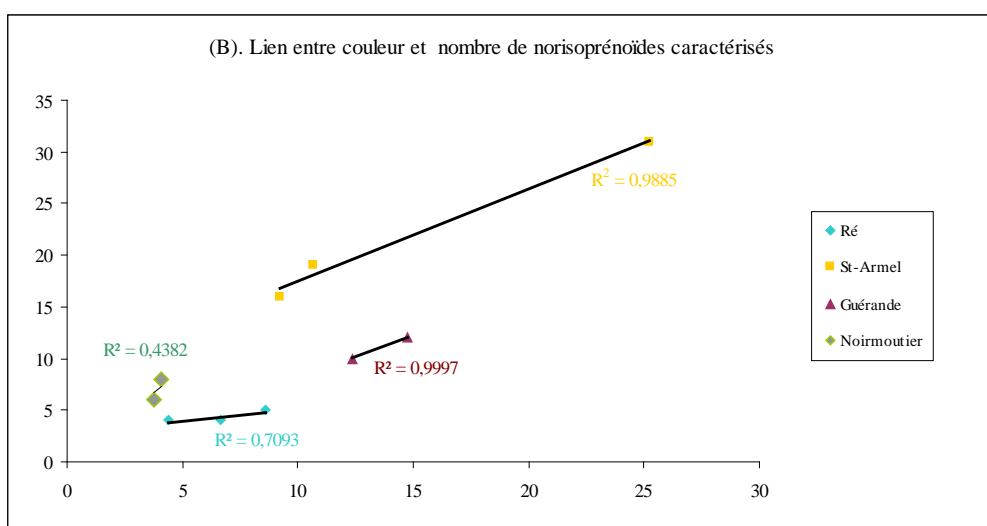
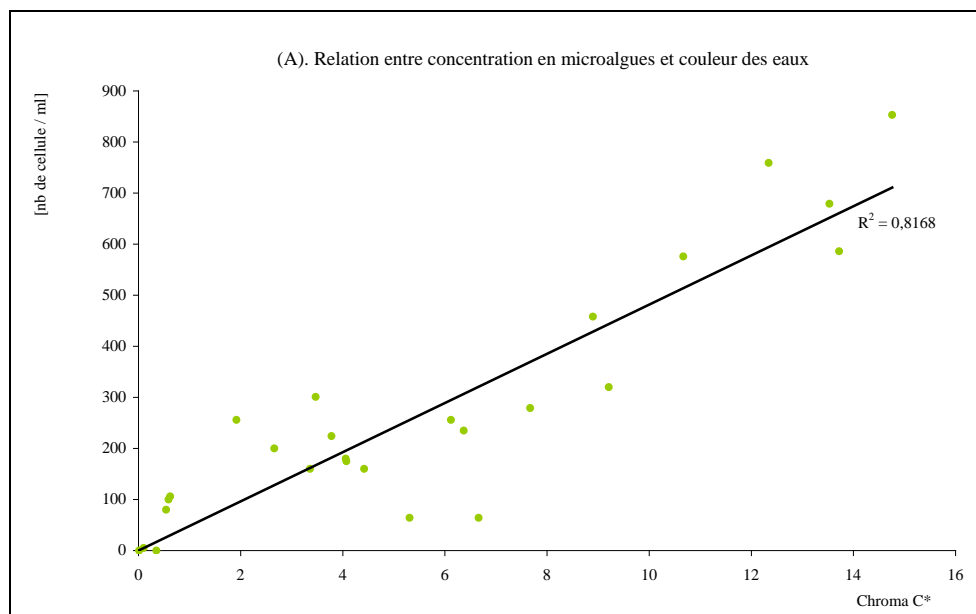
CFU : unité formant colonie ; PCA : plate count agar, milieu de culture ; 0% masse : échantillon mélangé à la gélose de culture ayant une concentration en sel de 0% ; 0% surface : échantillon déposé sur le milieu de culture ayant une concentration en sel de 0%.

D'après les graphiques de la Figure 68 page 149, la couleur, définie par le chroma C\* est positivement corrélée à la concentration de microalgues, dont *D. salina*, présentes dans l'eau du milieu. La contribution des microalgues semble donc non négligeable au regard de l'aspect final de l'eau (orange-rougâtre comme ces microalgues en milieu salin).

Pour les autres microorganismes, 3 milieux sur 4 confirment la relation positive entre couleur et microflore. Lorsque la couleur s'intensifie, le nombre de bactéries viables

dénombrable augmente pour les milieux à faible teneur en sel ou pour l'ensemencement de surface à forte teneur en sel (3,5%). Seul le milieuensemencé en masse avec une teneur en sel de 3,5% ne démontre pas de façon claire le lien entre microorganismes et couleur. Le manque d'oxygène des bactéries (ensemencement en masse) combiné au stress d'un milieu hypersalin peut nuire au développement bactérien, expliquant la courbe observée (Donadio *et al.*, 2011).

Le lien entre couleur et teneur en microalgues se vérifie d'ailleurs pour l'ensemble des eaux (Figure 68(A)) tout comme le lien entre couleur et nombre de norisoprénoïdes (Figure 68(B)). En effet, la mise en évidence de cellules vivantes au sein des échantillons, prouve que la couleur observée est due, entre autres, à la présence de microorganismes, notamment des bactéries et des algues halophiles dont la caractéristique notable est la production de norisoprénoïdes. De plus, il a été démontré que ces microorganismes halophiles sont capables de rester plusieurs années à l'intérieur des inclusions du cristal de sel (Norton & Grant, 1988), la couleur du dit-cristal dépendra donc des impuretés du minéral : plus il y a d'impuretés, plus le sel sera coloré (car il aura « absorbé » d'avantage le milieu environnant) (Drake S.L. & Drake M.A., 2011).



**Figure 68.** Corrélation entre la couleur des eaux pour l'ensemble des bassins étudiés et (A) la présence en microalgues (tous bassins confondus) ; (B) la teneur en norisoprénoïdes.

Les marais salants peuvent donc stimuler la production de caroténoïdes chez *Dunaliella salina* par l'environnement qu'ils lui imposent : fort taux d'ensoleillement, température et forte salinité. Après la mort et la dégradation de la microalgue, les molécules présentes dans son organisme pourront donc tout naturellement se retrouver dans la saumure (Miller & Moran, 1997).

Plus généralement, algues et microalgues sont effectivement connues pour leur diversité et leur richesse chimique (sesquiterpènes). Les molécules qu'elles contiennent jouent en effet un rôle important dans de nombreux processus biologiques tels que la reproduction, la communication, la lutte antibactérienne et se retrouvent fréquemment dans le milieu après

mort et dégradation de l'algue (Flament & Ohloff, 1984). Ainsi, les odeurs des eaux ont été analysées au cours d'études antérieures et un panel de norisoprénoïdes a été mis en évidence comme responsable du bouquet olfactif constaté (Flament & Ohloff, 1984) :

- des composés cycliques comme par exemple le  $\beta$ -cyclo-citral, la  $\beta$ -ionone, le (6C)-6-[( $\beta$ )-2-butényldiène]-1,5,5-triméthylcyclo-hexène, le 1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène, le dihydroactinidiolide, le 5,6-époxy- $\beta$ -ionone et le 2,6,6-triméthyl-2-cyclohexène-1,4-dione présents chez *Synechococcus*, *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* et *Cyanidium caldarium*.
- des composés acycliques comme le 6-méthyl-5-heptèn-2-one, le méthyl géranate et le géranylacétone présents chez *Cyanidium caldarium* et *Synechococcus* entre autres.

Dans les marais salants, c'est notamment l'association de microalgues et de bactéries qui permet la bioproduction de norisoprénoïdes à partir des carotènes. En effet, les isoprènes sont des composés volatils facilement dégradables une fois libérés dans l'environnement. Métabolisés dans des conditions extrêmes par les algues et microalgues, ils sont petit à petit « distillés » dans le milieu (déchet de production ou mort cellulaire), ce qui permet le maintien d'une population bactérienne aux alentours. En effet, les isoprénoïdes libres en milieu hypersalin représentent une source de carbone intéressante pour les microorganismes des salines (Alvarez *et al.*, 2009). La production massive de glycérol, par exemple, par *Dunaliella* (afin de réguler sa pression osmotique) assure une source importante de carbone pour le développement de bactéries telles que *Salinibacter* ou *Haloquadratum walsbyi* (lorsque la microalgue se dégrade) (Jaenicke, 1998 ; Bardavid *et al.*, 2008).

Comme le démontrent en effet les résultats de mise en culture bactérienne, bien que limités par les conditions de l'étude (3 concentrations en sel seulement, éclairage constant, température constante), il existe un système bactérien au niveau de l'eau de mer, qu'une trop forte concentration en sel détruit (Donadio *et al.*, 2011). Ainsi les produits issus des cellules mortes seraient concentrés dans le labyrinthe des marais salants pour être dégradés principalement au niveau des œillets sous l'influence des conditions environnementales (soleil, vent, microalgues). D'après la littérature, il existe, de plus, des populations bactériennes capables de résister aux teneurs en sel très élevées. Ces bactéries halophiles extrêmes, pas forcément mises en évidence avec les conditions d'expérimentations retenues, peuvent résister à la forte salinité du milieu :

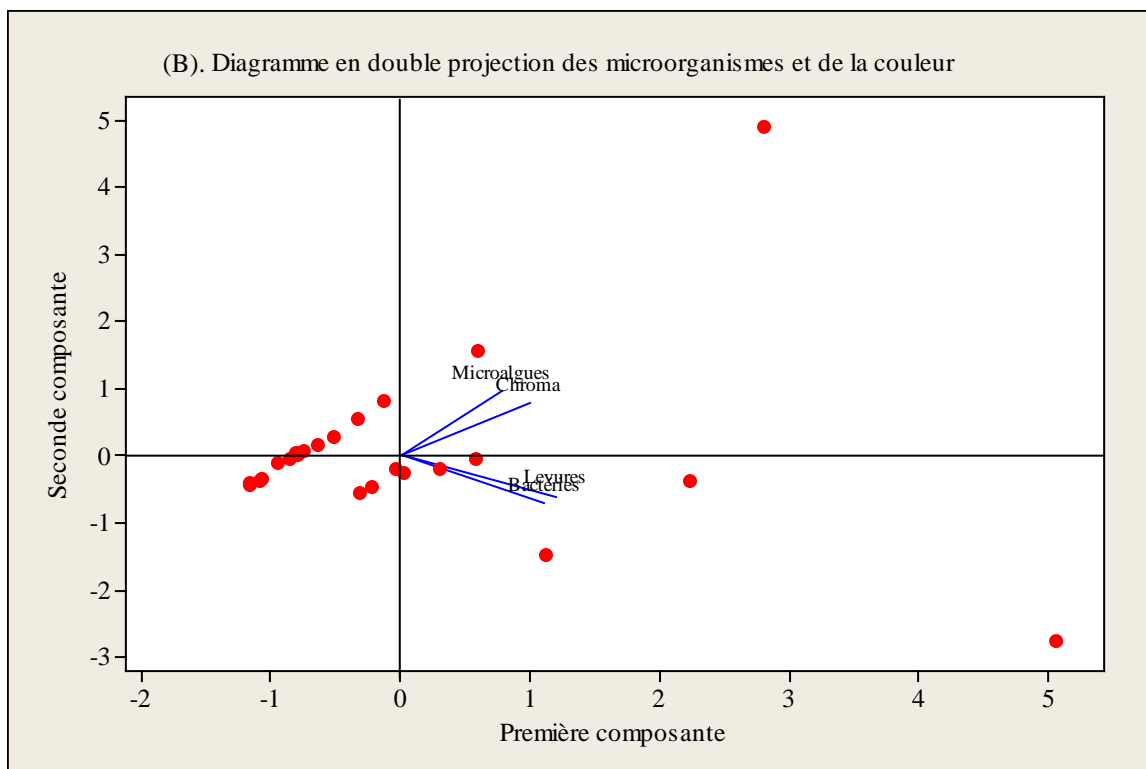
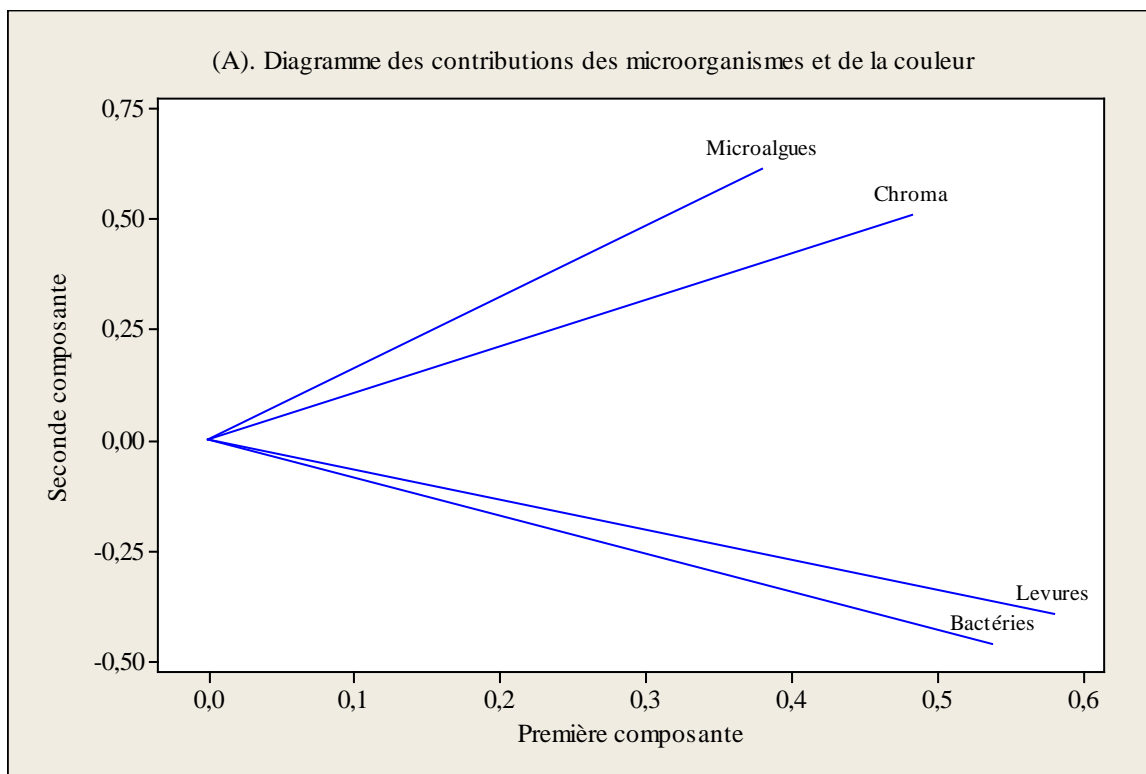
- soit grâce à un cytoplasme capable d'accumuler de fortes concentrations en sel pour maintenir une pression osmotique équilibrée avec leur milieu (archées), ce mécanisme d'osmorégulation nécessitant des adaptations enzymatiques importantes car elles doivent fonctionner dans un milieu intracellulaire riche en sel (Margesin & Schinner, 2001),
- soit grâce à des systèmes plus complexes et assez variés qui permettent une accumulation de divers solutés organiques dans leur cytoplasme afin d'équilibrer la différence de pression avec le milieu extérieur (eubactéries halophiles ou halotolérantes) (voir cas de l'halobactérie ci-après). Dans ce cas-là, la concentration interne des cellules en sel reste donc assez faible (Margesin & Schinner, 2001).

Les marais salants se caractérisant par une succession de bassins dans lesquels la concentration en sel augmente au fur et à mesure, les cristalliseurs finaux ont ainsi une teneur en sel d'environ 250 g/L. Les formes de résistance des bactéries (telles que les spores) peuvent permettre aux cellules de se déplacer, *via* les canaux, de l'extérieur des marais jusqu'à un lieu propice à leur croissance, les dits-cristalliseurs, où elles pourront se développer activement (cycle de croissance). Les bactéries halophiles ou les archaebactéries font donc partie intégrante de l'écosystème des marais et de son microbiome. Afin de pouvoir caractériser les communautés bactériennes en présence, des études ARN ou ADNr-16S ont d'ailleurs été conduites (Margesin & Schinner, 2001) confirmant la présence de microorganismes spécifiques à une origine géographique mais ayant tout un trait commun : celui d'une dépendance absolue envers une concentration élevée en NaCl. La majorité de ces procaryotes demandant une concentration d'au moins 1,5M NaCl (environ 80 g/L *p/v*) pour survivre avec un optimum de croissance pour des concentrations salines avoisinant les 3 à 4 M NaCl (170 à 230 g/L). Ces cellules pourront même croître à des concentrations salines approchant la saturation (environ 360 g/L). Ainsi des espèces comme *Halobacterium* sont tellement dépendantes de la présence de sel que lorsque sa teneur descend en dessous de 1,5 M, ces bactéries se désintègrent tout simplement (leur paroi ne supportant pas le « manque » de pression). Ces espèces sont donc ultra spécifiques des marais salants ou des lacs salés tels que la Mer Morte entre Israël et la Jordanie et le Grand Lac Salé de l'Utah (Prescott *et al.*, 2003 ; Pelmont, 1993). L'archée extrémophile, *Halobacterium salinarium* (*H. salinarium*), est une des bactéries les plus étudiées dans la littérature car son organisme s'est parfaitement adapté aux conditions environnementales très rudes des marais grâce à un système particulier



qui lui permet, même en l'absence de chlorophylle, de tout de même capter l'énergie lumineuse grâce aux pigments rouges (caroténoïdes) de sa membrane. En effet, comme la majorité des microorganismes des marais, l'*H. salinarium* utilise un caroténoïde (ou dérivé de caroténoïdes) afin de se protéger contre le trop fort ensoleillement. Dans ce cas précis, la bactérie synthétise une protéine de la membrane cellulaire, appelée la bactériorhodopsine (dérivé d'un caroténoïde, le rétinal) lorsque la teneur en oxygène du milieu est trop faible (cas des marais lors des mois de formation et de récolte du sel, l'O<sub>2</sub> n'étant pas très soluble dans les solutions fortement concentrées en sel, 200 g/L seulement au maximum). L'ATP est alors produit selon un mode unique de photosynthèse sans participation de bactériochlorophylle, ni chlorophylle. Cependant, cette condition ne permet pas une croissance exponentielle des colonies qui ont tout de même besoin d'oxygène pour croître normalement (Prescott *et al.*, 2003 ; Pelmont, 1993).

Ainsi lorsque toutes les données sur les microorganismes dénombrés dans les marais et la couleur des eaux sont compilées en une analyse en composantes principales (ACP) (données en Annexe 6), il est nettement mis en évidence que le facteur déterminant la couleur d'un marais est la concentration de microalgues présente dans ce dernier (Figure 69).



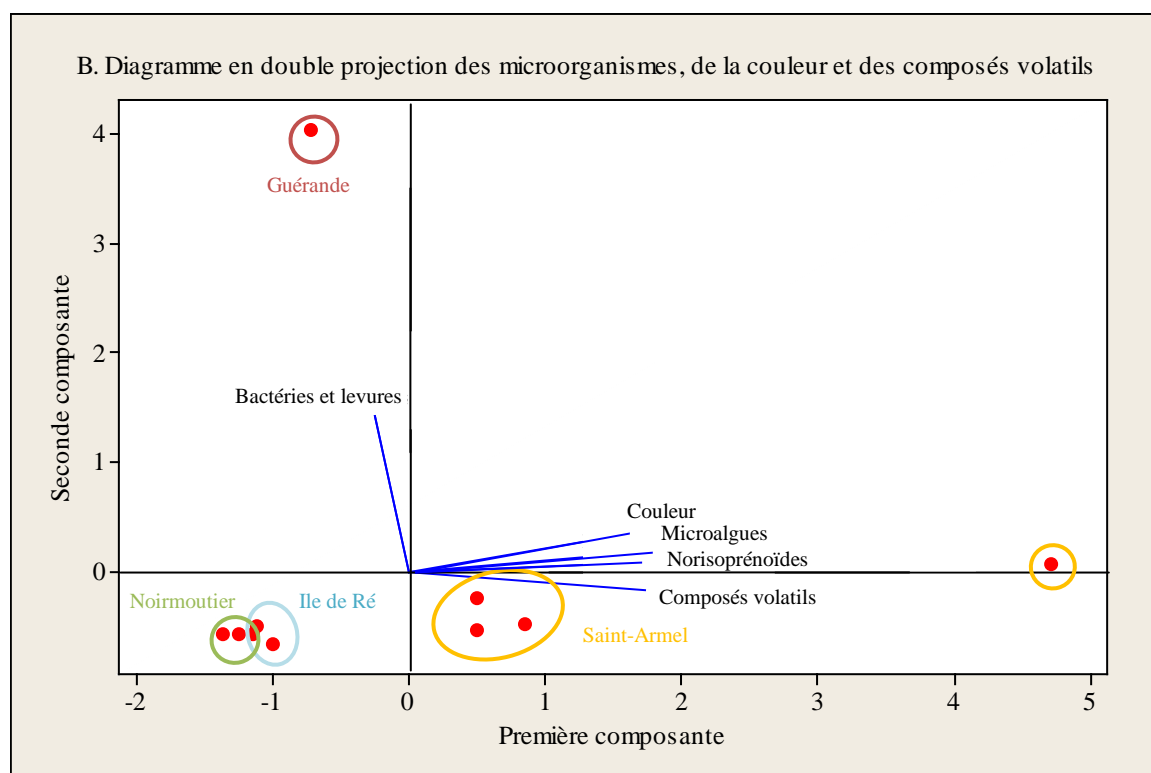
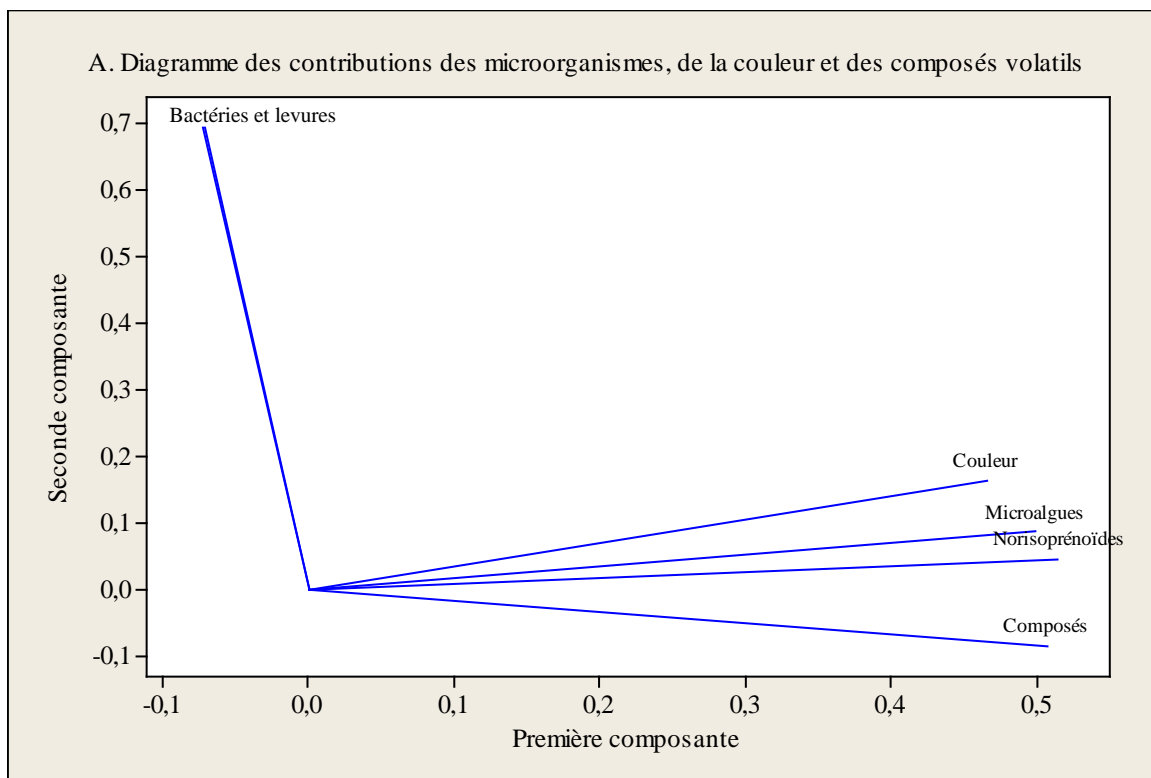
**Figure 69.** Résultats de l'ACP entre microorganismes et couleur. (A) Représentation des variables ; (B) Représentation des individus et des variables.

Le diagramme (A) permet de mettre en évidence 2 faits :

- plus il y a de microorganismes, plus la couleur sera importante et vice versa (première composante),
- une séparation nette entre couleur et microalgues d'un côté (corrélation positive) et bactéries et levures de l'autre (corrélation négative) (deuxième composante). Il s'agit donc d'un axe d'opposition entre les 2 groupes et plus précisément entre leurs 2 extrêmes : microalgues et bactéries, soulignant ainsi l'importance de leur relation dans les caractéristiques des eaux des marais.

Sur le diagramme (B), la première composante résume le profil général de l'eau des marais : plus la représentation graphique de l'eau se localise dans le carré supérieur droit, plus elle sera colorée et contiendra une forte concentration en microorganismes. La deuxième composante permet de mettre en évidence l'hétérogénéité de l'échantillon, plus les eaux auront une couleur et des concentrations en microorganismes disparates, plus leur représentation sur le graphique sera éloignée du 0. Cela permet ainsi de mettre en évidence, que la majorité des eaux possède un taux en microorganismes et une couleur similaire (points assez proches de l'axe horizontal) et que les résultats pour les différents critères d'une même eau sont assez homogènes (car tous les points sont tous proches du 0 de la composante numéro 2).

Couleur et teneur en microorganismes sont donc liés (positivement ou négativement) et c'est le pool total et complexe des différentes composantes d'un marais qui en fait sa spécificité, son caractère unique... Ainsi, bien que les eaux semblent globalement avoir des couleurs assez proches (à quelques exceptions près), leur composition en microorganismes semble suffisamment différente pour que leur teneur en composés volatils varie et donc que leur « odeur » leur soit propre (Figure 70, données en Annexe 6).



**Figure 70.** Résultats de l'ACP entre microorganismes, couleur et composés volatils. (A) Représentation des variables ; (B) Représentation des individus et des variables.

La Figure 70 (A) et (B) met, par exemple, en évidence le lien qui existe entre les différents facteurs de l'étude lorsque sont compilées ensemble les données des couleurs, des composés volatils et des microorganismes dans une nouvelle ACP :

- Le diagramme (A) permet de mettre en évidence le lien entre microalgues, couleur, composés volatils d'une part et entre bactéries et levures / moisissures d'autre part,
- Le diagramme (B) permet de mettre en évidence la répartition des bassins en fonction de leurs caractéristiques (odeur et couleur notamment), soulignant les similarités par origine géographique (Noirmoutier étant le plus homogène et Saint-Armel le plus varié, ce qui reste compréhensible à la vue du nombre d'échantillons disponibles pour chacune de ces 2 origines : seulement 2 pour Noirmoutier contre 4 pour St-Armel).

De plus, le travail présenté auparavant, sur les traces de génomes au niveau du sel (ADNr-16S) a permis de mettre en évidence le lien entre microorganismes halophiles, milieu et produit. En effet, en règle générale, il semble que les échantillons provenant d'une même zone géographique aient les mêmes profils de migration ADN, la même « signature écologique », même si au sein d'une même région, les résultats peuvent varier d'une saison à l'autre ou d'une année à l'autre, comme c'est le cas pour St-Armel entre 2007 et 2009 (la « vieillesse » du sel de 2007 et la dégradation du matériel génomique ou les réelles variations d'environnement pouvant être à l'origine de cet écart). Ces premières études sur l'ADNr-16S des sels permettent d'ébaucher le lien qui existe entre environnement, microorganisme et produit (sel). Ces travaux sur l'ADNr-16S ont ainsi permis de définir des premiers marqueurs biologiques pouvant être utilisés comme signature des sels dans un processus de traçabilité. Cependant, une étude plus longue (échantillonnage tous les ans à la même période ou tous les 6 mois pour travailler sur toutes les saisons) permettrait de mieux compléter ces premières conclusions. En effet, les sels pourraient même être catégorisés en fonction de leur « type » :

- le gros sel, récolté une fois qu'il a coulé, n'a que très peu d'odeur car la majorité des composés ont été « lavés » lors de « maturation » au fond du marais,
- la fleur de sel, récoltée par écrémage dès formation du cristal est quant à elle directement en contact avec la surface du marais, ses microorganismes et leurs molécules, elle est donc beaucoup plus « chargée » en molécules odorantes,
- enfin, le sel du commerce traité par blanchiment et séchage ne présente aucune odeur ou seulement quelques traces caractéristiques car les traitements thermiques (et/ou chimiques) subi lui font perdre toute son authenticité (dégradation des molécules, microorganismes des inclusions très affaiblis, voire détruits) (Price & Sowers, 2004).

Mais aussi en fonction de leur année de production :

- de fortes pluies lors de la récolte des sels perturbera le marais (dilution des eaux, diminution de la formation des cristaux...) et le sel sera appauvri en composés odorants ou traces ADNr-16S,
- une période chaude et venteuse accentuera au contraire le bouquet olfactif du produit (condensation dans les bassins de production où la quantité d'eau est très faible),
- enfin, hors des périodes de récoltes (eaux hivernales), les sels ne sont pas présents et les marais sont inondés, les microorganismes halophiles se trouvent alors majoritairement sous leur forme de résistance et ne produisent aucun composé volatil d'intérêt (pas de dérivé de caroténoïdes).

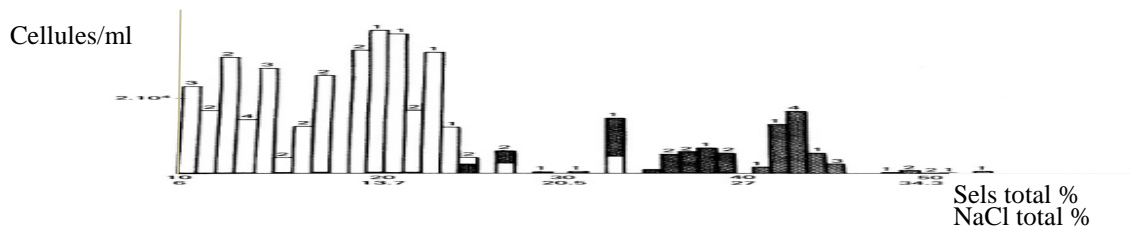
Ces résultats pourraient même pour finir, être comparés par la suite aux espèces de microorganismes obtenues lors de la mise en culture des saumures.

D'ailleurs outre les microalgues et les bactéries, la présence de champignon(s) et/ou de levure(s), et ce particulièrement dans les eaux les plus colorées (et les plus odorantes) semble démontrer qu'il existe, encore une fois, une corrélation entre les microorganismes et leur milieu. Des travaux précédents confirment, de plus, que les champignons peuvent jouer un rôle non négligeable dans les voies de dégradation des caroténoïdes (Rodriguez-Bustamante *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Bustamante *et al.*, 2007 ; Zorn *et al.*, 2003a,b).

En effet, il est prouvé que certains champignons peuvent également être responsables de la dégradation de caroténoïdes, comme c'est le cas par exemple lors de mycorrhize (symbiose plante / champignon). Plus de 50 espèces de champignons et de levures sont ainsi reconnues pour être capable de synthétiser des caroténoïdes ou de biotransformer des mono-, sesqui-, tri- ou tétraterpène en composés aromatiques. *Ganoderma applanatum*, *Hypomyces odoratus*, *Kuehneromyces mutabilis* ou encore *Trametes suaveolens* sont ainsi capables de cliver du  $\beta,\beta$ -carotène pour obtenir, par exemple du DHA en seulement 12h. *Ischioderma benzoidium*, *Marasmius scorodoni* et *Trametes versicolor* produisent quant à eux des composés aromatiques odorants tels que  $\beta$ -ionone,  $\beta$ -cyclocitral, DHA et 2-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexanone (Zorn *et al.*, 2003a).

Il existe donc un lien entre microorganismes halophiles et milieu. Plus le milieu est concentré en sel, plus le type de cellules présent est spécifique et caractéristique du milieu en question. Dans ces milieux hypersalins, les microorganismes doivent trouver un moyen de

réguler leur pression osmotique afin de pouvoir vivre et cela passe notamment *via* la production de pigments (Figure 71) (Mortain-Bertrand *et al.*, 1994 ; Riyahi *et al.*, 2007 ; Oren, 2002b,c ; Ben-Amotz *et al.*, 2009).



**Figure 71.** Colonies non-pigmentées (barres blanches) et pigmentées (barres noires) en fonction de la teneur en sel du milieu (marais salants de l'Alicante, Espagne).

Les valeurs en dessous des barres indiquent la concentration des bassins en sel, les valeurs du dessus, indiquent le nombre de bassin étudiés pour chaque concentration (Rodriguez-Valera *et al.*, 1981).

C'est dans ces conditions environnementales, au niveau des bassins les plus concentrés, que le sel de mer se forme. Ainsi l'ensemble de composés volatils mis en évidence au niveau du sel et des saumures dont il est issu, est donc bel et bien le résultat de la combinaison des produits et des interactions du microbiote (Bardavid *et al.*, 2008 ; Sanchez-Contreras *et al.*, 2000).



## CHAPITRE III – ANALYSES CHIMIQUES

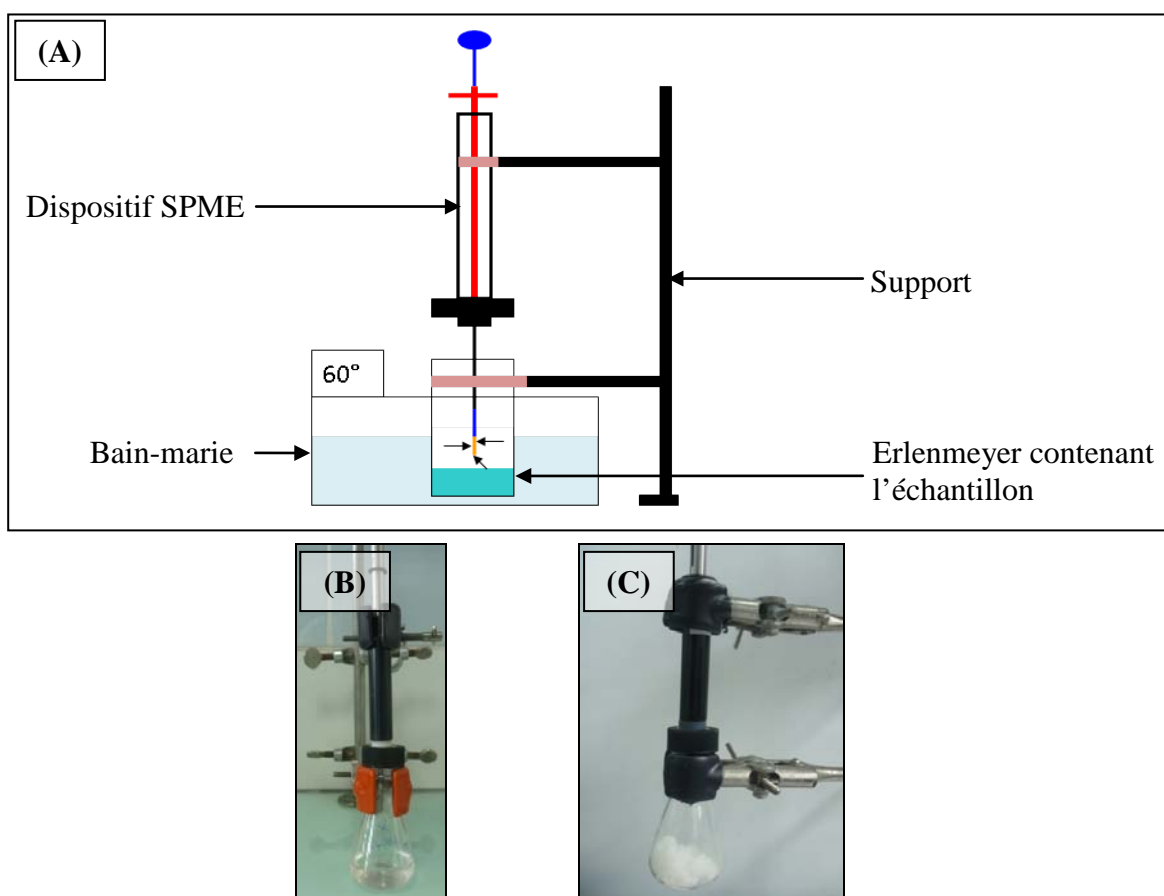


## III.1. Matériels et méthodes

### III.1.1. Extraction des composés volatils par SPME

Quelle que soit la nature de l'échantillon (eau des marais ou fleur de sel), les composés volatils ont été analysés par micro-extraction sur phase solide (SPME). L'échantillon est placé dans une enceinte en verre munie d'un bouchon percé, afin de laisser passer l'aiguille du dispositif SPME (Figure 72). La fibre est alors poussée hors de l'aiguille soit directement dans l'échantillon liquide, soit dans l'espace de tête après 5 minutes de saturation de l'espace de tête, puis laissée ainsi plusieurs heures. Au bout de ce temps de pause, la fibre est rétractée dans l'aiguille, retirée du dispositif puis désorbée dans l'injecteur du chromatographe placé à 250°C.

L'emploi de fibres neuves a nécessité au préalable un conditionnement propre à chaque fibre et défini par le fabricant (Supelco, Bellefonte, PA, Etats-Unis).



**Figure 72.** (A) Dispositifs expérimentaux pour l'extraction par SPME des composés volatils émis par les saumures (B) et les fleurs de sel (C).

Afin de déterminer les meilleurs paramètres d'extraction de composés volatils, plusieurs essais préliminaires ont été réalisés sur les mêmes échantillons de Saint-Armel (eau et sel). L'ensemble des paramètres testés sont donnés Tableau XII.

**Tableau XII.** Paramètres testés pour optimiser l'extraction de composés volatils issus des eaux ou du sel de marais par SPME.

Type de fibre	Type d'extraction	Durée d'extraction	Température	Qté d'échantillon	Agitation	Verrerie
PDMS (1 cm, 75 µm)	Immersion	3 h	22°C	5 g / 5 mL	Oui	Flacon hermétique
CW/CVB (1 cm, 65 µm)	Espace de tête	4 h	40°C	10 g / 10 mL	Non	Erlenmeyer visé
DVB/CAR/PDMS (2 cm, 50-30 µm)		5 h	50°C	15 g / 15 mL		
		12 h	60°C	20 g / 20 mL		
		24 h	80°C			

CAR : carboxen ; CW : carbowax ; DVB : divinylbenzène ; PDMS : polydiméthylsiloxane ; Qté : quantité

Afin de déterminer les meilleures conditions d'extraction, les paramètres ont été affinés selon l'ordre suivant :

- 1/ Type de fibre
- 2/ Type d'extraction
- 3/ Durée d'extraction
- 4/ Température
- 5/ Quantité d'échantillon
- 6/ Agitation
- 7/ Verrerie

Tous les paramètres sont d'abord fixés au maximum (temps le plus long, température la plus haute...), pour avoir le plus de composés extraits, puis ils sont diminués au fur et à mesure pour gagner en rapidité et en précision (éviter les pertes ou les dénaturations de composés par exemple).

La « qualité » des extractions est ensuite déterminée grâce au chromatogramme qui résulte du passage de la fibre en CG-SM. Les chromatogrammes comportant le plus de pics d'intérêts permettent de sélectionner à chaque étape, le paramètre optimal.

### III.1.2. Analyses des composés volatils par CG-SM

Les analyses par CG-SM des composés volatils ont été réalisées au moyen d'un chromatographe Hewlett Packland 6890N, couplé à un spectromètre de masse HP 5973N et équipé d'une colonne capillaire apolaire SPB-5. Les conditions d'analyse des composés volatils extraits par SPME, sont présentées dans le Tableau XIII.

*Tableau XIII. Conditions d'analyse par CG-SM.*

<b>Chromatographe : Agilent Technologies HP 6890N</b>	
Colonne	
Phase stationnaire	SPB-5
Longueur	60 m
Diamètre interne	0,32 mm
Épaisseur de film	0,25 µm
Injecteur	
Mode	<i>splitless</i> (pendant 4 min)
Température	250°C
Four	
Température initiale	60°C
Température finale	230°C (maintenue 40min)
Pas de programmation	4°C/min
Gaz vecteur	
Gaz	Hélium
Débit de la colonne	0,7 mL/min
<b>Spectromètre de masse : Agilent Technologies HP 5973N</b>	
Vide	37 mtorr
Source	Ionisation électronique
Courant d'ionisation	70°C
Température de la source	230°C
Mode de détection	Scan
Gamme de masse	30 à 550 uma
Délai de solvant	0 minute

Parallèlement à ces analyses par CG-SM, les indices de rétention relatifs (IRR) propres à chacun des composés ont été calculés à partir d'une table de *n*-alcane de C<sub>8</sub> à C<sub>22</sub>.

L'identification des composés a ensuite été réalisée par comparaison :

- 1/ Des spectres de masse expérimentaux avec ceux de la littérature (Adams, 2004), de banques de données informatisées NIST 02 et Wiley7n, et de standards injectés dans les mêmes conditions.
- 2/ Des IRR calculés avec ceux de la littérature (Adams, 2004), d'une banque de données en ligne (NIST 02) et de standards injectés dans les mêmes conditions.

Pour chaque échantillon (eaux et sels) trois fibres (trois répétitions) ont été utilisées simultanément dans les mêmes conditions, afin de vérifier la reproductibilité des résultats. Dans le cas de trop grandes différences entre les chromatogrammes obtenus, les mesures ont été renouvelées.

### III.1.3. Analyses de données

Deux méthodes d'analyses de données ont été utilisées : l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) afin d'étudier d'une part, l'influence du terroir (Ile de Ré, Noirmoutier, Saint-Armel et Guérande) et de l'année de collecte (2007, 2009, 2010) et d'autre part, l'influence du type d'échantillons (Saumure ou Fleur de sel).

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode descriptive qui permet d'extraire les composantes principales en donnant le maximum d'informations. Elle décrit et classe les échantillons étudiés dans des espaces de dimensions plus réduites afin d'observer l'homogénéité ou l'hétérogénéité des individus et d'en connaître qualitativement la cause.

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) est une méthode de classification automatique afin de répartir les individus étudiés en un certain nombre de classes.

Les analyses ont été menées à l'aide du logiciel d'analyses multivariées de données, SIMCA-P+ version 12.0.1 (Société Umétries) :

- 25 individus dont 8 en provenance de l'Ile de Ré, 4 de Noirmoutier, 6 de Saint-Armel et 7 de Guérande (Tableau XIV).
- 63 variables correspondant aux composés chimiques dont le pourcentage est supérieur à 0,1% : 6 alcanes, 3 alcools, 4 aldéhydes, 7 cétones, 4 composés aromatiques, 2 lactones, 8 monoterpènes oxygénés, 1 sesquiterpène hydrocarboné, 2 divers, 1 benzofurane et 25 norisoprénoïdes dont 7 en C<sub>9</sub>, 4 en C<sub>10</sub>, 3 en C<sub>11</sub> et 11 en C<sub>13</sub> (Tableau XV).

Le jeu de données était constitué des aires des pics sur les chromatogrammes issus des analyses CG-SM (données centrées et réduites).

**Tableau XIV.** Correspondance échantillons / codes échantillons.

<b>Origines</b>	<b>Echantillons</b>	<b>Codes échantillon</b>
<b>Ile de Ré</b>		
	Saumure été 2009 lot 1	RE1SE09
	Saumure été 2009 lot 2	RE2SE09
	Saumure été 2009 lot 3	RE3SE09
	Saumure hiver 2010 lot 1	RE1SH10
	Saumure hiver 2010 lot 2	RE2SH10
	Saumure hiver 2010 lot 3	RE3SH10
	Fleur de sel des marais été 2009	REMFE09
	Fleur de sel de commerce été 2010	RECFE10
<b>Noirmoutier</b>		
	Saumure été 2009 lot 1	NO1SE09
	Saumure été 2009 lot 2	NO2SE09
	Fleur de sel des marais été 2009 lot 1	NO1MFE09
	Fleur de sel des marais été 2009 lot 2	NO2MFE09
<b>Saint-Armel</b>		
	Saumure été 2009 lot 1	SA1SE09
	Saumure été 2009 lot 2	SA2SE09
	Saumure été 2009 lot 3	SA3SE09
	Saumure été 2010 lot 1	SA1SE10
	Fleur de sel des marais été 2009	SAMFE09
	Fleur de sel de commerce été 2007	SACFE07
<b>Guérande</b>		
	Saumure été 2007 lot 1	GU1SE07
	Saumure été 2009 lot Le Més	GU1SME09
	Saumure été 2009 lot La Coyée 1	GU1SCE09
	Saumure été 2010 lot La Coyée 2	GU2SME10
	Saumure été 2010 lot La Coyée 3	GU3SME10
	Fleur de sel de commerce été 2007	GUCFE07
	Fleur de sel du marais Le Més été 2009	GUMFE09

**Tableau XV.** Correspondance composés volatils / code composé.

<b>Composés volatils identifiés dans les échantillons</b>	<b>Codes composé</b>
<b>Hydrocarbures</b>	
heptadéca-6,9-diène	Alca2
heptadéc-8-ène (isomère Z/E n.i.)	Alca3
heptadéc-3-ène (isomère Z/E n.i.)	Alca4
heptadécane	Alca5
heptadéca-6,9-diène (isomère Z/E n.i.) <sup>(1)</sup>	Alca6
octadécane	Alca7
<b>Alcools</b>	
octan-1-ol	Alco5
2,3-diméthylcyclohexan-1-ol	Alco6
2,6-diméthylcyclohexan-1-ol	Alco8
<b>Aldéhydes</b>	
octanal	Alde1
nonanal	Alde2
décanal	Alde3

dodécanal	Alde5
-----------	-------

<sup>(t)</sup> : tentative d'identification

**Tableau XV. Suite - Correspondance composés volatils / code composé.**

<b>Composés volatils identifiés dans les échantillons</b>	<b>Codes composé</b>
<b>Cétones</b>	
6-méthylheptan-2-one	Ceto1
6-méthyl-5-heptén-2-one	Ceto2
2,4,4-triméthylcyclopentan-1-one <sup>(t)</sup>	Ceto3
3,4,5-triméthylcyclopent-2-én-1-one	Ceto4
2-méthoxy-6-méthyl-4 <i>H</i> -pyran-4-one <sup>(t)</sup>	Ceto5
3,3-diméthyl-octan-2,7-dione	Ceto6
dodécan-3-one	Ceto7
<b>Esters et lactones</b>	
dihydro-5-pentyl-2(3 <i>H</i> )-furanone	Est1
dihydro-5-heptyl-2(3 <i>H</i> )-furanone	Est2
<b>Composés aromatiques</b>	
alcool phényléthylque	Cparo1
2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phénol	Cparo2
2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-(1-oxopropyl)-phénol	Cparo3
1-méthyl-dodécylbenzène	Cparo4
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	
tétrahydro-2-isobutyl-4-méthylpyrane	Mto1
tétrahydro-4-méthyl-2-(2-méthyl-propén-1-yl)-(2 <i>H</i> )-pyrane	Mto2
5-méthyl-2-(1-méthyléthyl)-cyclohexan-1-one	Mto3
4-méthyl-1-(1-méthyléthyl)-cyclohex-3-én-1-ol	Mto5
$\alpha,\alpha,4$ -triméthylcyclohex-3-ène-1-méthanol	Mto6
1-méthyl-4-(1-méthyléthylidène)-cyclohexanol	Mto7
2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène-1-méthanol	Mto8
1-formyl-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène	Mto9
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>	
(1 <i>S</i> -exo)-2-méthyl-3-méthylène-2-(4-méthyl-3-pentényl)-bicyclo(2.2.1)heptane	Sth1
<b>Norisoprénoides</b>	
<b>C<sub>9</sub></b>	
2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one	ApoC91
2,3,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one <sup>(t)</sup>	ApoC93
3,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one	ApoC94
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one	ApoC95
2,6,6-triméthylcyclohexan-1-one	ApoC96
2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione	ApoC97
2,2,6-triméthylcyclohexane-1,4-dione	ApoC98
<b>C<sub>10</sub></b>	
3,3,5,5-tétraméthylcyclohexan-1-one <sup>(t)</sup>	ApoC101
1-(1,4-diméthyl-cyclohex-3-én-1-yl)-éthan-1-one	ApoC102
car-2-én-4-one	ApoC103
2,6,6-triméthyl-1-cyclohex-1-ène-1-carboxaldéhyde <sup>(t)</sup>	ApoC104
<b>C<sub>11</sub></b>	
2-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-1-acétaldéhyde	ApoC111
1-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-éthan-1-ol <sup>(t)</sup>	ApoC112
5,6,7,7 <i>a</i> -tétrahydro-4,4,7 <i>a</i> -triméthyl-2(4 <i>H</i> )-benzofuran-1-one	ApoC113

<sup>(t)</sup> : tentative d'identification

Tableau XV. Suite - Correspondance composés volatils / code composé.

Composés volatils identifiés dans les échantillons	Codes composé
<b>Norisoprénoides</b>	
<b>C<sub>13</sub></b>	
2,6,6,10-tétraméthyl-1-oxaspiro[4,5]déc-9-ène	ApoC131
4-(2-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexyl)-but-3-én-2-one <sup>(t)</sup>	ApoC132
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-ol	ApoC133
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-butan-2-one	ApoC134
(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one	ApoC135
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-butan-2-ol	ApoC136
3-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-2-yl)-oxiran-2-yl-éthan-1-one <sup>(t)</sup>	ApoC137
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol	ApoC138
1-(1,2,2-triméthylcyclopent-1-yl)-pentane-1,4-dione	ApoC139
5,6-7,8-diépoxy-mégastigman-2-one (dérivé du $\beta$ -ionol) <sup>(t)</sup>	ApoC1310
<i>trans</i> -1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,5,5-triméthyl-naphtalén-2-ol	ApoC1311
<b>Divers</b>	
2-méthyl-5-isopropénylfurane	Div1
<i>trans</i> -octahydro-5,5,8a-triméthyl-2H-1-benzopyrane	Div2
<b>Benzofurane</b>	
4,5,6,7-tétrahydro-7,7-diméthyl-1(3H)-isobenzofuran-1-one <sup>(t)</sup>	Benzof1

<sup>(t)</sup> : tentative d'identification

## III.2. Résultats

### III.2.1. Optimisation des conditions d'extraction des composés volatils par SPME

Les conditions d'utilisation ont été définies grâce au chromatogramme qui résulte du passage de la fibre en CG-SM après extraction des composés de l'eau des marais de Saint-Armel. Les paramètres en rouge dans les tableaux XVI à XXII ci-après correspondent aux paramètres sélectionnés pour l'étude : ils permettent d'obtenir les chromatogrammes avec le plus de pics d'intérêts.

#### ❖ Type de fibre

La microextraction (SPME) est une des seules techniques d'extraction qui utilise des fibres (notamment de silice longues de 1 à 2 cm pour l'étude ici-conduite) revêtue d'une phase polymérique d'épaisseur variable (Li & Weber, 1999) (Mani, 1999). Afin d'optimiser l'extraction des composés volatils de sel, plusieurs types de fibres ont été testés, autrement dit, différents types de phases polymériques (choisies en fonction de la littérature). L'objectif étant d'avoir l'extrait le plus représentatif de l'espace de tête (peu de sélectivité, meilleure représentativité des composés présents dans l'échantillon) (Shirey, 1999).

**Tableau XVI.** Conditions testées pour définir le type de fibre utilisé.

Type de fibre	PDMS (1 cm, 75 µm)	CW/DVB (1 cm, 65 µm)	DVB/CAR/PDMS (2 cm, 50-30 µm)
Type d'extraction	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête
Temps	24 h	24 h	24 h
Température	80°C	80°C	80°C
Quantité d'échantillon	20 mL	20 mL	20 mL
Eau des marais	20 g	20 g	20 g
Fleur de sel			
Agitation	Oui	Oui	Oui
Verrerie	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique

CAR : carboxen ; CW : carbowax ; DVB : divinylbenzène ; PDMS : polydiméthylsiloxane ; Qté : quantité

La fibre à trois polymères, divinylbenzène / carboxen / polydiméthylsiloxane reconnue pour sa forte sensibilité (Bicchi *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2007), a extrait le plus grand nombre de composés des matrices étudiées. Aucun composé n'a été observé lors des extractions réalisées avec les fibres PDMS et CW / DVB (même pour des températures d'extraction inférieures).

#### ❖ Type d'extraction

Deux types d'extraction ont été testés :

- en espace de tête, la fibre n'est pas en contact avec l'échantillon,
- en immersion, la fibre est directement « plongée » dans l'échantillon (voir schéma Figure 42 page 99).

Cette analyse comparative n'a été menée qu'avec les eaux des marais car la technique d'extraction en immersion n'est pas applicable aux matrices solides (sels).

**Tableau XVII.** Conditions testées pour définir le type d'extraction utilisée.

Type d'extraction	Espace de tête	Directe
Type de fibre	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
Durée	24 h	24 h
Température	80°C	80°C
Quantité de saumure	20 mL	20 mL
Agitation	Oui	Oui
Verrerie	Flacon hermétique	Flacon hermétique

Le mode d'extraction en espace de tête a permis d'extraire le plus grand nombre de composés. Notons par ailleurs que ce mode d'extraction permet une meilleure durabilité de la



fibres. L'extraction en immersion peut, en effet, dégrader plus rapidement la fibre si la solution dans laquelle, elle est trempée n'est pas homogène (impuretés).

#### ❖ *Durée de l'extraction*

La durée d'extraction influence fortement le profil olfactif de l'échantillon :

- un temps d'exposition trop long et les composés extraits pourraient ne plus être ceux réellement présents dans l'échantillon (dégradation des composés, surtout si l'échantillon est chauffé).
- un temps d'extraction trop court et l'ensemble des composés risque de ne pas être représenté lors des analyses.

**Tableau XVIII.** Conditions testées pour définir la durée de l'extraction.

Durée	3 h	4 h	5 h	12 h	24 h
Type de fibre	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
Type d'extraction	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête
Température	80°C	80°C	80°C	80°C	80°C
Quantité d'échantillon					
Eau des marais	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Fleur de sel	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Agitation	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Verrerie	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique

Un temps de contact échantillon par fibre de 5h a permis une extraction maximale.

#### ❖ *Température d'extraction*

Chauffer l'échantillon permet d'augmenter la vitesse d'extraction des composés. Cependant, si l'échantillon est trop chauffé (ou trop longtemps), les composés extraits peuvent être des dérivés (composés dégradés) des composés réellement présents dans la matrice initiale : plus la température est élevée, plus l'évaporation des composés est importante mais plus les composés risquent d'être dénaturés.

**Tableau XIX.** Conditions testées pour définir la température d'extraction.

Température	22°C	40°C	50°C	60°C	80°C
Type de fibre	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
Type d'extraction	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête
Durée	5 h	5 h	5 h	5 h	5 h
Quantité d'échantillon					
Eau des marais	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Sel	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g

<b>Agitation</b>	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Verrerie</b>	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique

60°C est apparu comme étant la température optimale pour extraire le maximum de composés en évitant une trop forte dégradation des composés de l'échantillon.

#### ❖ *Quantité d'échantillon*

La quantité d'échantillon limitée, demande de réduire au maximum les doses utilisées par extraction afin de pouvoir répéter plusieurs fois chaque analyse.

*Tableau XX. Conditions testées pour définir la quantité d'échantillon à utiliser pour chaque extraction.*

<b>Quantité d'échantillon</b>	<b>5 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>15 mL</b>	<b>20 mL</b>
Eau des marais				
Sel	<b>5 g</b>	<b>10 g</b>	<b>15 g</b>	<b>20 g</b>
<b>Type de fibre</b>	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
<b>Type d'extraction</b>	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête	Espace de tête
<b>Durée</b>	5 h	5 h	5 h	5 h
<b>Température</b>	60°C	60°C	60°C	60°C
<b>Agitation</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Verrerie</b>	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique	Flacon hermétique

10 g de sel ou 10 mL de saumure (eau des marais) sont suffisants pour obtenir des chromatogrammes exploitables.

#### ❖ *Agitation*

L'agitation permet un brassage entre l'air et l'échantillon constant. Lors de l'échantillonnage, en espace de tête cela peut être intéressant pour réduire le temps d'extraction.

*Tableau XXI. Conditions testées pour connaître la nécessité de l'agitation.*

<b>Agitation</b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
<b>Type de fibre</b>	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
<b>Type d'extraction</b>	Espace de tête	Espace de tête
<b>Durée</b>	5h	5h
<b>Température</b>	60°C	60°C
<b>Quantité d'échantillon</b>		
Eau des marais	10 mL	10 mL
Sel	10 g	10 g
<b>Verrerie</b>	Flacon hermétique	Flacon hermétique

Les chromatogrammes sans agitation sont similaires à ceux obtenus avec agitation. Il ne semble donc pas nécessaire, dans le cas de cette étude, de maintenir l'agitation de l'échantillon. De plus, avec une matrice sel, il est à noter que l'agitation n'est pas constante (les cristaux peuvent bloquer l'agitateur), et constitue donc un paramètre difficile à maîtriser.

#### ❖ *Type de verrerie*

L'utilisation d'un flacon sellé hermétiquement assure une meilleure étanchéité au montage. L'utilisation d'un erlenmeyer à col vissé avec un bouchon percé permet de réduire les coûts de la manipulation (l'opercule du flacon est à usage unique contrairement au bouchon vissé).

*Tableau XXII. Conditions testées pour définir le type de verrerie à utiliser.*

<b>Type de verrerie</b>	<b>Flacon hermétique</b>	<b>Erlenmeyer col vissé</b>
<b>Type de fibre</b>	DVB/CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
<b>Type d'extraction</b>	Espace de tête	Espace de tête
<b>Durée</b>	5 h	5 h
<b>Température</b>	60°C	60°C
<b>Quantité d'échantillon</b>		
Eau des marais	10 mL	10 mL
Sel	10 g	10 g
<b>Agitation</b>	Non	Non

Bien qu'un flacon hermétique semble plus étanche surtout lors d'une extraction en espace de tête, l'utilisation d'un erlenmeyer avec un bouchon perforé s'avère suffisant. L'équilibre se fait aussi rapidement dans l'une que dans l'autre verrerie. De plus, l'emploi d'un erlenmeyer est préférable car le flacon hermétique demande une perforation de sa membrane à l'aide du porte-fibre, ce qui peut à long terme détériorer le matériel et la fibre qu'il contient.

❖ *Conditions optimales pour l'extraction de composés par SPME (matrice sels et saumures)*

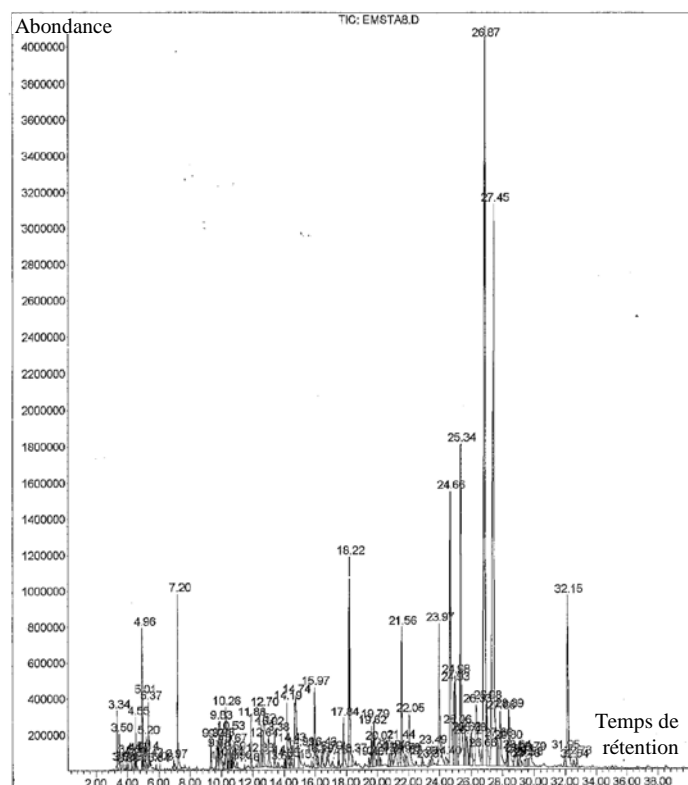
Le tableau XXIII synthétise les paramètres optimaux qui ont été utilisés pour cette étude.

**Tableau XXIII.** *Conditions optimales pour l'extraction de composés volatils par SPME à partir de matrice sels ou saumures.*

<b>Type de fibre</b>	DVB/CAR/PDMS
<b>Type d'extraction</b>	Espace de tête
<b>Durée</b>	5 h
<b>Température</b>	60°C
<b>Quantité d'échantillon</b>	
Eau des marais	10 mL
Sel	10 g
<b>Agitation</b>	Non
<b>Verrerie</b>	Erlenmeyer col vissé

❖ *SPME et CG-SM*

La Figure 73 représente un chromatogramme type avec les principaux temps de rétention des composés détectés grâce à l'extraction en SPME couplée à l'analyse en CG-SM (eau de Saint-Armel).



**Figure 73.** Microextraction sur phase solide en espace de tête et analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HS-SPME / CG-SM) de la saumure de Saint-Armel (lot 1).

Détection et identification des composés majeurs sur colonne apolaire SPB-5 :  $t_r$  26,87 min : 4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol (ou  $\beta$ -ionol) ;  $t_r$  27,45 min : 5,5,8a-triméthyl-octa-hydro-2H-chromén-2-one. AU : unité arbitraire.

La HS-SPME couplée à la CG-SM est une méthode qualitative, les valeurs obtenues représentent l'intensité de la réponse à l'analyse mais pas la quantité de la molécule présente dans l'échantillon. Ainsi, certains composés présentant peu d'affinité pour la fibre polymérique utilisée, peuvent, en effet, être faiblement détectés (pics de faible intensité) bien que présents en quantité non négligeable dans l'échantillon.

Les composés identifiés dans les espaces de tête des échantillons de sels et de saumures étudiés, sont listés dans les Tableaux XXIV à XXVII ci-après et leurs structures représentées dans l'Annexe 7.

### III.2.2. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de l'Ile de Ré

Pour l'Ile de Ré, ont été analysés :

- 3 saumures échantillonnées durant l'été 2009 (lots 1, 2 et 3, 2009),
- 3 saumures échantillonnées durant l'hiver 2010 (lots 1, 2 et 3, 2010),

- 1 fleur de sel brute récoltée dans le marais et conditionnée en 2009 (lot 1, 2009),
- 1 fleur de sel brute récoltée dans le marais et conditionnée en 2010 (lot 2, 2010).

Les résultats sont exposés Tableau XXIV.

Tableau XXIV. Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de l'Ile de Ré.

Composés			IRR		Saumure été			Saumure hiver			Fleur de sel brute	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 2 2009	% lot 3 2009	% lot 1 2010	% lot 2 2010	% lot 3 2010	% lot 1 2009	% lot 2 2010
<b>Hydrocarbures</b>												
octadécane		C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	1797	1800	ND	ND	ND	ND	ND	ND	traces	ND
<b>Aldéhydes</b>												
nonanal		C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1100	1089	2,1	ND	3,0	ND	ND	ND	ND	ND
décanal		C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	1201	1202	3,3	ND	6,4	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Cétones</b>												
3,4,5-triméthylcyclopent-2-én-1-one		C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O	1052	1063	3,6	2,8	7,4	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Monoterpènes oxygénés</b>												
4-méthyl-1-(1-méthyléthyl)-cyclohex-3-én-1-ol	terpinén-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1180	1180	5,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α,α,4-triméthylcyclohex-3-ène-1-méthanol	α-terpinéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1193	1189	4,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-méthyl-2-(1-méthyléthyl)-cyclohexan-1-one	p-menthan-3-one	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1155	1166	ND	ND	2,7	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>												
(1S-exo)-2-méthyl-3-méthylène-2-(4-méthyl-3-pentényl)-bicyclo(2.2.1)heptane	β-santalène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1481	1460	1,9	2,3	4,2	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Composés aromatiques</b>												
2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phénol	2,4-DTBP	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	1517	1513	ND	ND	ND	ND	ND	ND	traces	ND
2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-(1-oxopropyl)-phénol		C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1640	1635	10,7	ND	2,2	ND	ND	ND	14,3	ND

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne NIST).

Tableau XXIV. Suite - Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de l'île de Ré.

Composés			IRR		Saumure été			Saumure hiver			Fleur de sel brute	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 2 2009	% lot 3 2009	% lot 1 2010	% lot 2 2010	% lot 3 2010	% lot 1 2009	% lot 2 2010
<b>Composés aromatiques</b>												
diéthyl-phthalate		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	1864	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	traces	traces
1,2-benzènedicarboxylate de butyle et de 2-éthylhexyle		C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	1872	-	ND	ND	ND	ND	traces	ND	traces	traces
<b>Norisoprénoïdes</b>												
<b>C<sub>9</sub></b>												
2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	1038	1036	ND	3,2	1,9	ND	ND	ND	9,9	ND
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one	isophorone	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1123	1121	7,9	5,0	11,3	ND	ND	ND	ND	ND
2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1,4-dione	4-cétoisophorone	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1147	1142	10,6	49,7	26,3	ND	ND	ND	ND	ND
2,2,6-triméthylcyclohexane-1,4-dione		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1165	1168	ND	5,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>C<sub>10</sub></b>												
car-2-én-4-one		C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1223	1215	1,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>C<sub>11</sub></b>												
5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4H)-benzofuran-1-one	dihydroactinidiolide (DHA)	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	1546	1548	ND	4,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>C<sub>13</sub></b>												
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol	β-ionol	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1496	1489	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9,7	ND
<b>Divers</b>												
2-méthyl-5-isopropénylfurane		C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	932	943	traces	ND	1,6	ND	ND	ND	ND	ND
Nombre total de composés identifiés					11	7	10	0	traces	traces	2	traces
Pourcentage total identifié					50,4	73,1	67,0	0	traces	traces	19,6	traces

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne NIST).



Un total de 21 composés volatils (dont 8 CDC) a donc pu être identifié pour les eaux et sels de l’Ile de Ré.

#### ❖ *Eaux des marais ou saumures*

La majorité des composés volatils a été mise en évidence dans l’eau d’été 2009. On relèvera en particulier la présence commune de quatre composés dans les espaces de tête des trois lots de saumures de l’été 2009 : une cétone, un sesquiterpène hydrocarboné et deux C<sub>9</sub>-norisoprénoïdes (Figure 74).

**3,4,5-triméthylcyclopent-2-én-1-one**  
(cétone)

**β-santalène**  
(sesquiterpène hydrocarboné)

**3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one** ou isophorone  
(C<sub>9</sub>-norisoprénoïde)

**2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione**  
(C<sub>9</sub>-norisoprénoïde)

**Figure 74.** Composés volatils caractéristiques des eaux des marais de l’Ile de Ré (été 2009).

Il est à noter par ailleurs, qu’aucun composé volatil (ou seulement quelques traces) n’a été détecté dans les espaces de tête de la saumure de l’hiver 2010.

#### ❖ *Fleur de sel*

Les résultats obtenus pour la fleur de sel de l’Ile de Ré sont peu homogènes. Paradoxalement, c’est dans la fleur de sel la plus ancienne (lot 1, 2009) que l’on relève la présence forte de certains composés volatils : un composé aromatique et deux norisoprénoïdes (Figure 75).

**2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-(1-oxopropyl)-phénol**  
(composé aromatique)

**2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one**  
(C<sub>9</sub>-norisoprénoïde)

**4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol**  
(C<sub>13</sub>-norisoprénoïde)

*Figure 75. Composés volatils caractéristiques de la fleur de sel des marais de l'Ile de Ré (été 2009).*

### III.2.3. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de Noirmoutier

Pour Noirmoutier, ont été analysés :

- 2 saumures échantillonnées durant l'été 2009 (lots 1 et 2, 2009),
- 2 fleurs de sel achetées en 2009 (lots 1 et 2, 2009).

Les résultats sont exposés Tableau XXV.

Tableau XXV. Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Noirmoutier.

Composés			IRR		Saumure		Fleur de sel	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 2 2009	% lot 1 2009	% lot 2 2009
<b>Aldéhydes</b>								
nonanal		C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1100	1089	ND	9,6	ND	ND
dodécanal		C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O	1409	1409	ND	3,7	ND	ND
<b>Cétones</b>								
6-méthylheptan-2-one		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	953	955	ND	traces	ND	ND
<b>Composés aromatiques</b>								
1,2-benzènedicarboxylate de butyle et de 2-éthylhexyle		C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	1872	-	ND	ND	ND	traces
1-méthylDodécylbenzène		C <sub>19</sub> H <sub>32</sub>	1914	1894	ND	ND	traces	6,0
<b>Lactones</b>								
dihydro-5-heptyl-2(3H)-furanone	γ-undécalactone	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1579	1573	ND	25,9	ND	ND
<b>Norisoprénoides</b>								
<b>C<sub>9</sub></b>								
2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	1038	1036	5,1	3,0	ND	ND
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one	isophorone	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1123	1121	4,3	traces	ND	ND
2,3,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one <sup>(1)</sup>		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1084	-	10,4	ND	ND	ND
2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione	4-cétoisophorone	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1147	1142	8,3	35,6	ND	ND
<b>C<sub>11</sub></b>								
5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4H)-benzofuran-1-one	dihydroactinidiolide (DHA)	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	1546	1548	3,7	6,9	ND	ND
<b>C<sub>13</sub></b>								
(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one	(E)-α-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	1434	1430	12,1	ND	ND	ND
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol	β-ionol	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1496	1489	50,0	4,4	traces	ND
Nombre total de composés identifiés					7	9	traces	1
Pourcentage total identifié					93,9	89,1	traces	6

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne NIST).

Un total de 13 composés volatils a été mis en évidence pour les échantillons de Noirmoutier (dont 7 CDC, très présents notamment pour les eaux).

#### ❖ *Eaux des marais ou saumures*

Les composés volatils identifiés dans le cas des échantillons de Noirmoutier, ont été principalement détectés dans les espaces de tête des eaux des marais. On relèvera en particulier dans les deux lots étudiés la présence commune de cinq norisoprénoïdes (Figure 76).

**2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one**  
(*C<sub>9</sub>-norisoprénoïde*)

**3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one** ou  
**isophorone**  
(*C<sub>9</sub>-norisoprénoïde*)

**2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4 dione**  
(*C<sub>9</sub>-norisoprénoïde*)

**5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4H)-benzofuran-1-one** ou  
**dihydroactinidiolide**  
(*C<sub>11</sub>-norisoprénoïde*)

**4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol** ou  
**β-ionol**  
(*C<sub>13</sub>-norisoprénoïde*)

**Figure 76.** Composés volatils caractéristiques des eaux de Noirmoutier (été 2009).

#### ❖ *Fleur de sel*

Les espaces de tête se sont révélés en revanche très pauvres en composés volatils. On pourra retenir la présence d'un composé aromatique, le 1-méthyl dodécylbenzène (Figure 77).

**1-méthyl dodécylbenzène**  
(*composé aromatique*)

**Figure 77.** Composé volatil caractéristique de la fleur de sel commerciale de Noirmoutier (achat 2009).

### III.2.3. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de Saint-Armel

Pour Saint-Armel, ont été analysés :

- 3 saumures échantillonnées durant l'été 2009 (lots 1, 2 et 3, 2009),
- 1 saumure échantillonnée durant l'été 2010 (lot 1, 2010),
- 1 fleurs de sel achetée en 2007 (lot « commerciale », 2007),
- 1 fleur de sel prélevée dans le marais juste après récolte en 2009 (lot « marais », 2009).

Les résultats sont exposés Tableau XXVI.

Tableau XXVI. Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Saint-Armel.

Composés			IRR		Saumure				Fleur de sel	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 2 2009	% lot 3 2009	% lot1 2010	Marais 2009	Commerciale 2007
<b>Hydrocarbures</b>										
4,5-diéthyl octa-3,5-diène <sup>(1)</sup>		C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	1355	-	traces	traces	traces	ND	0,7	ND
heptadéca-6,9-diène (isomère Z/E n.i.)		C <sub>17</sub> H <sub>32</sub>	1671	1668	0,4	ND	0,5	ND	ND	ND
heptadéc-8-ène (isomère Z/E n.i.)		C <sub>17</sub> H <sub>34</sub>	1678	1677	5,4	traces	14,3	20,1	13,1	4,4
heptadéc-3-ène (isomère Z/E n.i.)		C <sub>17</sub> H <sub>34</sub>	1681	1692	ND	3,5	1,6	ND	ND	ND
heptadécane		C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	1694	1700	traces	ND	traces	0,9	1,3	8,7
octadécane		C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	1797	1800	traces	traces	traces	ND	traces	1,4
<b>Alcools</b>										
6-méthylheptan-2-ol		C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	965	960	traces	ND	ND	ND	ND	ND
heptan-1-ol		C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	971	967	traces	ND	ND	ND	ND	ND
oct-1-én-3-ol		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	982	979	traces	ND	ND	ND	ND	ND
6-méthylhept-5-én-2-ol		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	996	992	traces	traces	traces	ND	ND	ND
octan-1-ol		C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	1073	1068	1,1	ND	ND	ND	ND	ND
2,3-diméthylcyclohexan-1-ol		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	1116	1112	0,5	0,6	0,3	ND	1,5	traces
nonan-1-ol		C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	1175	1169	traces	ND	ND	traces	ND	ND
<b>Aldéhydes</b>										
octanal		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	1004	999	traces	ND	ND	ND	ND	ND
undécanal		C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	1307	1307	ND	ND	ND	traces	ND	ND
<b>Cétones</b>										
6-méthylheptan-2-one		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	953	955	0,5	0,5	0,6	ND	ND	ND
6-méthyl-5-heptén-2-one		C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	987	986	1,1	0,4	1,1	0,6	ND	ND
2,4,4-triméthylcyclopentan-1-one <sup>(1)</sup>		C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	1002	-	0,2	traces	0,3	ND	ND	ND
3,3-diméthyl octane-2,7-dione		C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	1282	1290	0,5	0,5	0,9	0,6	0,4	ND
dodécan-3-one		C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O	1397	1391	ND	ND	ND	ND	traces	1,0

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne NIST).

Tableau XXVI. Suite - Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Saint-Armel.

Composés			IRR		Saumure				Fleur de sel	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 2 2009	% lot 3 2009	% lot1 2010	Marais 2009	Commerciale 2007
<b>Esters et lactones</b>										
1,2-benzènedicarboxylate de butyle et de 2-éthylhexyle		C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	1872	-	ND	ND	ND	ND	traces	traces
dihydro-5-pentyl-2(3 <i>H</i> )-furanone	γ-nonalactone	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1369	1361	0,3	ND	ND	traces	ND	ND
<b>Monoterpènes oxygénés</b>										
tétrahydro-2-isobutyl-4-méthylpyrane	<i>cis</i> -dihydro-oxyde de rose	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	1073	1043	ND	ND	0,4	ND	ND	ND
tétrahydro-4-méthyl-2-(2-méthylpropén-1-yl)-(2 <i>H</i> )-pyrane	<i>cis</i> -oxyde de rose	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1109	1108	1,2	ND	ND	ND	ND	ND
2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène-1-méthanol	β-cyclogéranol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1217	1213	1,4	1,1	1,2	0,7	ND	ND
1-formyl-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène	β-cyclocitral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1228	1225	5,0	3,4	3,1	ND	1,4	ND
<b>Composés aromatiques</b>										
alcool phényléthylique		C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	1124	1107	0,2	ND	0,4	1,4	ND	ND
2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phénol		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	1517	1513	ND	traces	ND	ND	1,0	ND
2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-(1-oxopropyl)-phénol		C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1640	1635	ND	traces	traces	ND	traces	0,8
<b>Norisoprénoïdes</b>										
<b>C<sub>9</sub></b>										
2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	1038	1036	traces	0,6	0,6	traces	0,5	ND
2,3,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one <sup>(t)</sup>		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1084	-	traces	ND	traces	ND	0,7	ND
3,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1087	1198	0,7	2,0	ND	ND	ND	ND
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one	isophorone	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1123	1121	1,3	1,4	traces	0,4	0,4	ND
2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione	4-cétoisophorone	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1147	1142	ND	0,2	ND	ND	1,8	ND

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne *NIST*).

Tableau XXVI. Suite - Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Saint-Armel.

Composés			IRR		Saumure				Fleur de sel	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 2 2009	% lot 3 2009	% lot1 2010	Marais 2009	Commerciale 2007
<b>C<sub>10</sub></b>										
3,3,5,5-tétraméthylcyclohexan-1-one <sup>(1)</sup>		C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	1003	-	traces	0,4	0,5	ND	0,6	traces
2,6,6-triméthyl-1-cyclohex-1-ène-1-carboxaldéhyde <sup>(1)</sup>		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1331	-	ND	ND	ND	2,3	ND	ND
1-(1,4-diméthylcyclohex-3-én-1-yl)-éthan-1-one		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1168	1154	0,2	ND	ND	ND	ND	ND
<b>C<sub>11</sub></b>										
1-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-éthan-1-ol <sup>(1)</sup>		C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	1344	-	1,8	ND	traces	ND	ND	ND
2-(2,6,6-triméthyl-cyclohex-1-én-1-yl)-1-acétaldéhyde		C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O	1265	1261	0,5	ND	ND	traces	ND	ND
5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4H)-benzofuran-1-one	dihydroactinidiolide (DHA)	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	1546	1548	1,5	8,5	5,6	21,3	28,9	1,2
<b>C<sub>13</sub></b>										
2,6,6,10-tétraméthyl-1-oxaspiro[4,5]déc-9-ène	théaspirane A	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1325	1300	0,7	ND	ND	ND	ND	ND
4-(2-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexyl)-but-3-én-2-one <sup>(1)</sup>		C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1327	-	3,4	1,9	2,8	ND	traces	ND
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-ol	α-ionol	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1388	1429	0,7	ND	2,8	2,4	ND	ND
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-butan-2-one	dihydro-α-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1423	1406	8,4	4,4	6,6	ND	ND	traces
(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one	(E)-α-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	1434	1430	2,2	7,5	0,9	ND	2,1	ND
trans-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,5,5-triméthyl-naphtalén-2-ol	cis-α-ambrinol	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1445	1441	9,3	8,2	6	ND	traces	ND

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne NIST).



Tableau XXVI. Suite - Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Saint-Armel.

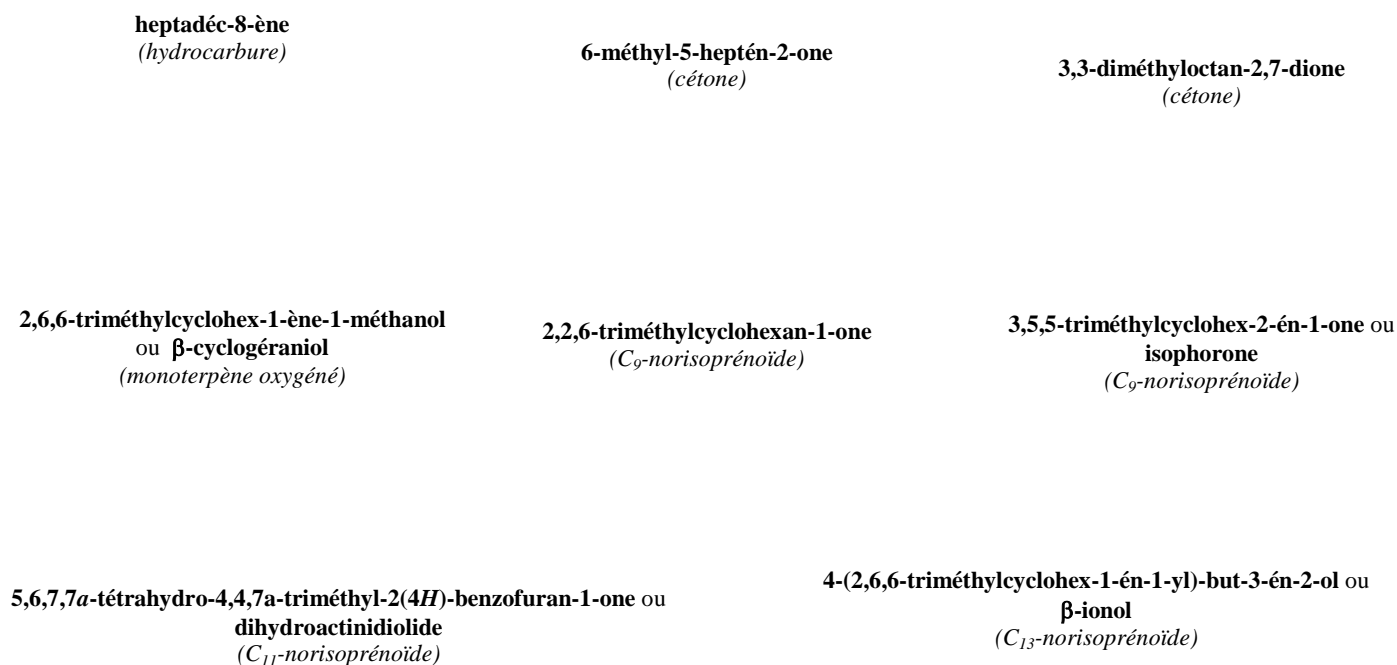
Composés			IRR		Saumure				Fleur de sel	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 2 2009	% lot 3 2009	% lot1 2010	Marais 2009	Commerciale 2007
<b>C<sub>13</sub></b>										
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-butan-2-ol	dihydro-β-ionol	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O	1455	1455	0,8	ND	ND	ND	ND	ND
3-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-2-yl)-oxiran-2-yl-éthan-1-one <sup>(1)</sup>	7,8-époxy-α-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1478	-	3,2	ND	0,8	ND	ND	ND
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol	β-ionol	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1496	1489	23,1	42,8	31	38,2	30,4	2,1
5,6-7,8-diépoxy-mégastigman-2-one (dérivé du β-ionol) <sup>(1)</sup>		C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	1647	-	ND	ND	ND	0,6	ND	ND
1-(1,2,2-triméthylcyclopent-1-yl)-pentane-1,4-dione		C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1531	1492	traces	1,3	1,5	ND	ND	ND
<b>Divers</b>										
Trisulfure de diméthyle		C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>3</sub>	977	970	traces	ND	ND	ND	ND	ND
4,5,6,7-tétrahydro-7,7-diméthyl-1(3H)-isobenzofuran-1-one <sup>(1)</sup>	phthalide γ-lactone	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1466	-	1,0	ND	0,29	1,2	1,8	ND
trans-octahydro-5,5,8a-triméthyl-2H-1-benzopyrane <sup>(1)</sup>		C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1511	-	17,9	10,1	10,3	ND	1,8	0,2
Nombre total de composés identifiés					44	27	33	17	22	11
Pourcentage total					94,5	99,3	94,39	90,69	88,4	19,8

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne NIST).

Un total de 54 composés volatils a été mis en évidence pour les échantillons de Saint-Armel (dont 22 CDC).

❖ *Eaux des marais ou saumures*

Les eaux des marais de l'été 2009 (lots 1 et 3) et de l'été 2010 présentent en commun pas moins de 8 composés volatils : un alcane, deux cétones, un monoterpène oxygéné et quatre norisoprénoïdes (Figure 78).



**Figure 78.** Composés volatils caractéristiques des eaux de Saint-Armel (étés 2009 et 2010).

13 composés supplémentaires sont communs aux trois lots de saumures de l'été 2009 : deux hydrocarbures, deux alcools, deux cétones, un C<sub>9</sub>, cinq norisoprénoïdes et un divers (Figure 79).

**4,5-diéthylocta-3,5-diène**  
(hydrocarbure)

**octadécane**  
(hydrocarbure)

**6-méthylhept-5-én-2-ol**  
(alcool)

**2,3-diméthylcyclohexan-1-ol**  
(alcool)

**6-méthylheptan-2-one**  
(cétone)

**2,4,4-triméthylcyclopentan-1-one**  
(cétone)

**1-formyl-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène** ou  
**β-cyclocitral**  
(monoterpène oxygéné)

**4-(2-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexyl)-but-3-én-2-one**  
(C<sub>13</sub>-norisoprénoïde)

**4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-butan-2-one** ou **dihydro-α-ionone**  
(C<sub>13</sub>-norisoprénoïde)

**(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one** ou **(E)-α-ionone**  
(C<sub>13</sub>-norisoprénoïde)

**trans-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,5,5-triméthyl-naphtalén-2-ol** ou **cis-α-ambrinol**  
(C<sub>13</sub>-norisoprénoïde)

**1-(1,2,2-triméthylcyclopent-1-yl)-pentane-1,4-dione**  
(C<sub>13</sub>-norisoprénoïde)

**trans-octahydro-5,5,8a-triméthyl-2H-1-benzopyrane**  
(divers)

**Figure 79.** Autres composés volatils caractéristiques des eaux des marais de Saint-Armel (été2009).

### ❖ Fleur de sel

Les espaces de tête des fleurs de sel contiennent globalement moins de composés volatils que ceux des eaux des marais. Une analyse comparative des résultats obtenus pour les fleurs de sel montre que le lot « marais » est plus riche que le lot « commercial ». Toutefois ces deux échantillons présentent dans leur espace de tête 9 composés volatils en commun (Figure 80).

<b>heptadéc-8-ène</b> (hydrocarbure)	<b>heptadécane</b> (hydrocarbure)	<b>2,3-diméthylcyclohexan-1-ol</b> (alcool)
<b>dodécan-3-one</b> (cétone)	<b>1,2-benzènedicarboxylate de butyle et de 2-éthylhexyle</b> (ester)	<b>2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-(1-oxopropyl)-phénol</b> (composé aromatique)
<b>3,3,5,5-tétraméthylcyclohexan-1-one</b> (C <sub>10</sub> -norisoprénoïde)	<b>5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4H)-benzofuran-1-one</b> ou <b>dihydroactinidiolide</b> (C <sub>11</sub> -norisoprénoïde)	<b>4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol</b> (C <sub>13</sub> -norisoprénoïde)

**Figure 80.** Composé volatil caractéristique de la fleur de sel de Saint-Armel (marais 2009 et commerciale 2007).

### III.2.3. Composés volatils de la saumure et de la fleur de sel de Guérande

Pour Guérande, ont été analysés :

- 2 saumures échantillonnées dans les œillets du marais « Le Mès » durant l'été 2009 et 2010 (lots « Le Mès », 2009 et 2010),
- 1 saumure des œillets du marais « La Coyée » échantillonnée en 2009 (lot « La Coyée », 2009),
- 1 fleurs de sel achetée en grande surface en 2007 (lot « commerciale », 2007),
- 1 fleur de sel directement prélevée dans le marais juste après récolte en 2009 (lot « marais », 2009).

Les résultats sont exposés Tableau XXVII.

Tableau XXVII. Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Guérande.

Composés			IRR		Saumure Le Mès			Saumure La Coyée	Fleur de sel	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 1 2010	% lot 2 2010	% lot1 2009	Marais 2009	Commerciale 2007
<b>Hydrocarbures</b>										
heptadéc-8-ène (isomère <i>Z/E</i> n.i.)		C <sub>17</sub> H <sub>34</sub>	1678	1677	ND	25	45,8	7,1	ND	ND
heptadécane		C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	1694	1700	ND	1,0	1,8	ND	ND	ND
heptadéca-6,9-diène (isomère <i>Z/E</i> n.i.) <sup>(t)</sup>		C <sub>17</sub> H <sub>32</sub>	1773	-	ND	1,1	2,1	ND	ND	ND
<b>Alcools</b>										
2,6-diméthylcyclohexan-1-ol		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	1217	1110	ND	1,1	traces	13,9	ND	ND
<b>Cétones</b>										
6-méthyl-5-heptén-2-one		C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	987	986	ND	1,1	0,6	ND	ND	ND
2,4,4-triméthylcyclopentan-1-one <sup>(t)</sup>		C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	1002	-	ND	1,1	traces	2,1	ND	ND
2-méthoxy-6-méthyl-4 <i>H</i> -pyran-4-one <sup>(t)</sup>		C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	1194	-	ND	1,0	ND	2,8	ND	ND
<b>Monoterpènes oxygénés</b>										
2,7,7-triméthylbicyclo[3.1.1]hept-2-én-6-one	chrysanthénone	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1161	1126	ND	traces	ND	ND	ND	ND
1-méthyl-4-(1-méthyléthylidène)-cyclohexanol	γ-terpinéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1210	1199	ND	1,6	1,2	ND	ND	ND
2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène-1-méthanol	β-cyclogéranol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1217	1213	ND	1,0	0,9	ND	ND	ND

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne *NIST*).

Tableau XXVII. Suite - Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Guérande.

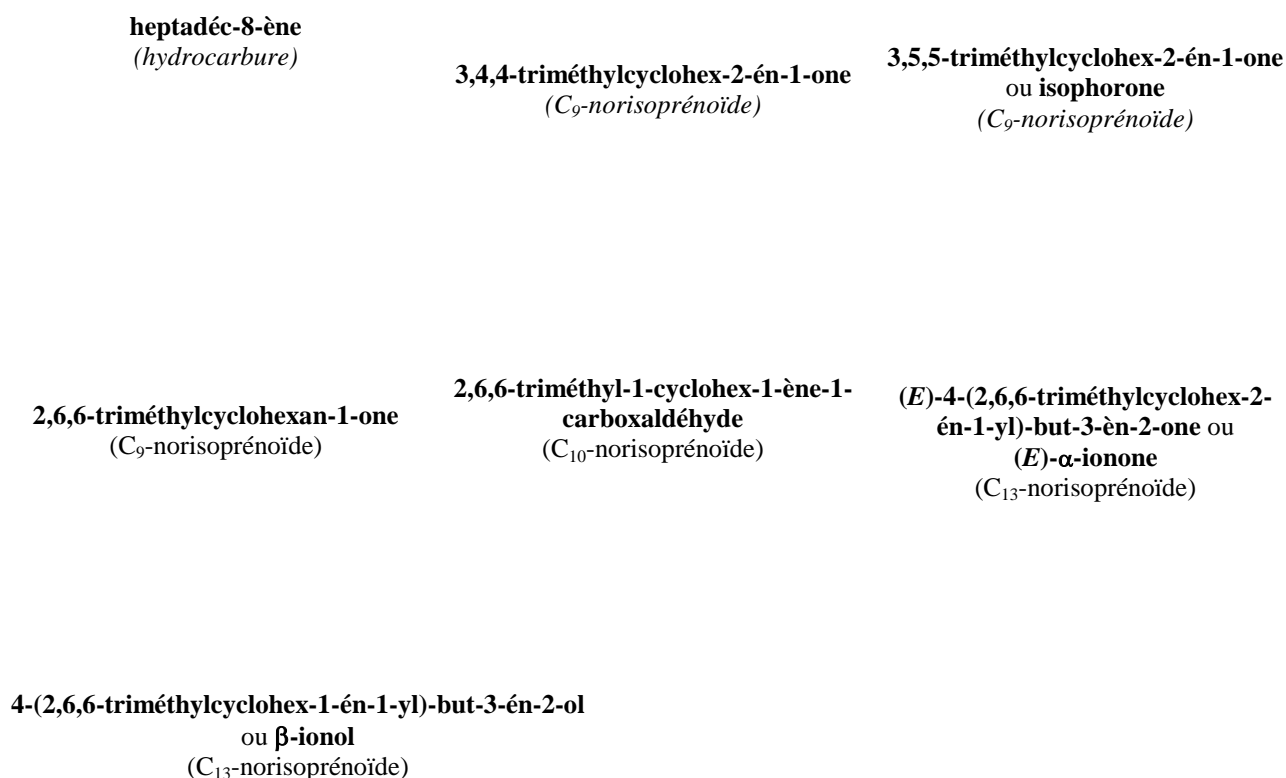
Composés			IRR		Saumure Le Mès			Saumure La Coyée	Fleur de sel	
Noms nomenclature	Noms usuels	Formules brutes	IRR <sub>exp</sub>	IRR <sub>L</sub>	% lot 1 2009	% lot 1 2010	% lot 2 2010	% lot1 2009	Marais 2009	Commerciale 2007
<b>Norisoprénoïdes</b>										
<b>C<sub>9</sub></b>										
2,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-ol <sup>(1)</sup>		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1058	-	ND	ND	ND	4,9	ND	ND
3,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1087	1198	ND	5,6	2,8	3,1	ND	ND
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one	isophorone	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	1123	1121	ND	1,6	0,7	3,2	ND	ND
2,6,6-triméthylcyclohexan-1-one		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	1140	1035	ND	1,9	1,1	4,4	ND	ND
2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione	4-cétoisophorone	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1147	1142	ND	0,9	ND	6,3	ND	ND
<b>C<sub>10</sub></b>										
2,6,6-triméthyl-1-cyclohex-1-ène-1-carboxaldéhyde <sup>(1)</sup>		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1331	-	ND	4,1	2,4	4,1	ND	ND
<b>C<sub>13</sub></b>										
(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one	(E)-α-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	1434	1430	ND	5,9	3,1	3,3	ND	ND
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol	β-ionol	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1496	1489	ND	31,3	19,8	26,7	ND	ND
<b>Divers</b>										
trans-octahydro-5,5,8a-triméthyl-2H-1-benzopyrane		C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	1511	-	ND	ND	ND	traces	ND	ND
Nombre total de composés identifiés					0	18	14	13	0	0
Pourcentage total identifié					0	85,3	82,3	81,9	0	0

ND : non détecté ; IRR<sub>exp</sub> : indice de rétention relatif expérimental obtenu sur colonne capillaire SPB-5 ; IRR<sub>L</sub> : indice de rétention relatif de la littérature obtenu sur colonne capillaire DB-5 (Adams, 2004 ; base de données en ligne NIST).

Un total de 19 composés volatils a été mis en évidence pour les échantillons de Guérande (dont 8 CDC).

❖ *Eaux des marais ou saumures*

A l'exception d'un échantillon prélevé dans le marais « Le Mès » en 2009 pour lequel aucun composé volatil n'a été détecté, les eaux des marais de Guérande sont marquées par la présence d'un alcane et de six norisoprénoïdes (Figure 81).



**Figure 81.** Composés volatils caractéristiques des eaux des marais du Mès et de La Coyée (étés 2010 et 2009).

❖ *Fleur de sel*

Que la fleur de sel de Guérande soit commerciale ou directement issue des marais (analysée directement après récolte sans qu'elle ait subi de blanchiment), aucun composé volatil n'a pu être détecté pour cette origine.

### III.2.4. Analyses en ACP et CAH des saumures et des fleurs de sels de l'Ile de Ré, Noirmoutier, Saint-Armel et Guérande au cours des campagnes de collecte 2007, 2009 et 2010

#### ❖ *Analyses en ACP*

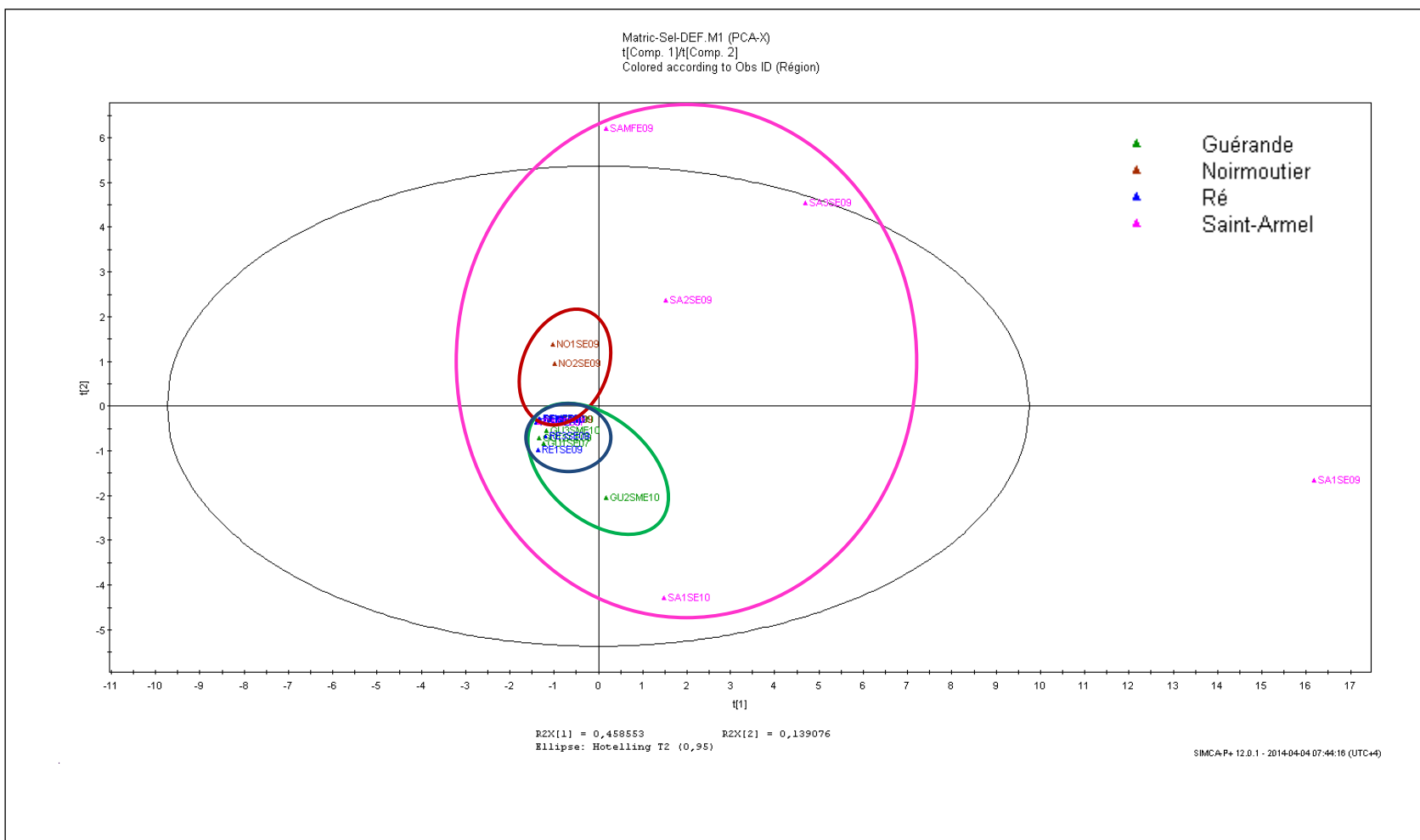
Le modèle obtenu fait appel à deux composantes principales expliquant 59,8% de la variance totale du jeu de données.

#### ➤ **Discrimination en fonction de la localisation des sites étudiés**

Concernant l'influence du terroir, l'examen de la représentation graphique de la projection des échantillons suivant les axes 1 et 2 (Figure 82), obtenue par ACP montre que les échantillons provenant de Saint-Armel sont beaucoup plus hétérogènes que ceux provenant des trois autres régions. En effet, les échantillons provenant de l'Ile de Ré, Noirmoutier et Guérande présentent une certaine homogénéité et plus particulièrement ceux de l'Ile de Ré.

Dans la représentation graphique des variables (Figure 83), 3/6 échantillons provenant de Saint-Armel se distinguent par la diversité des composés chimiques qui les caractérisent :





**Figure 82.** Représentation graphique en ACP de la projection des échantillons de saumure et de Fleur de sel suivant les axes 1 et 2 en considérant les régions de production.

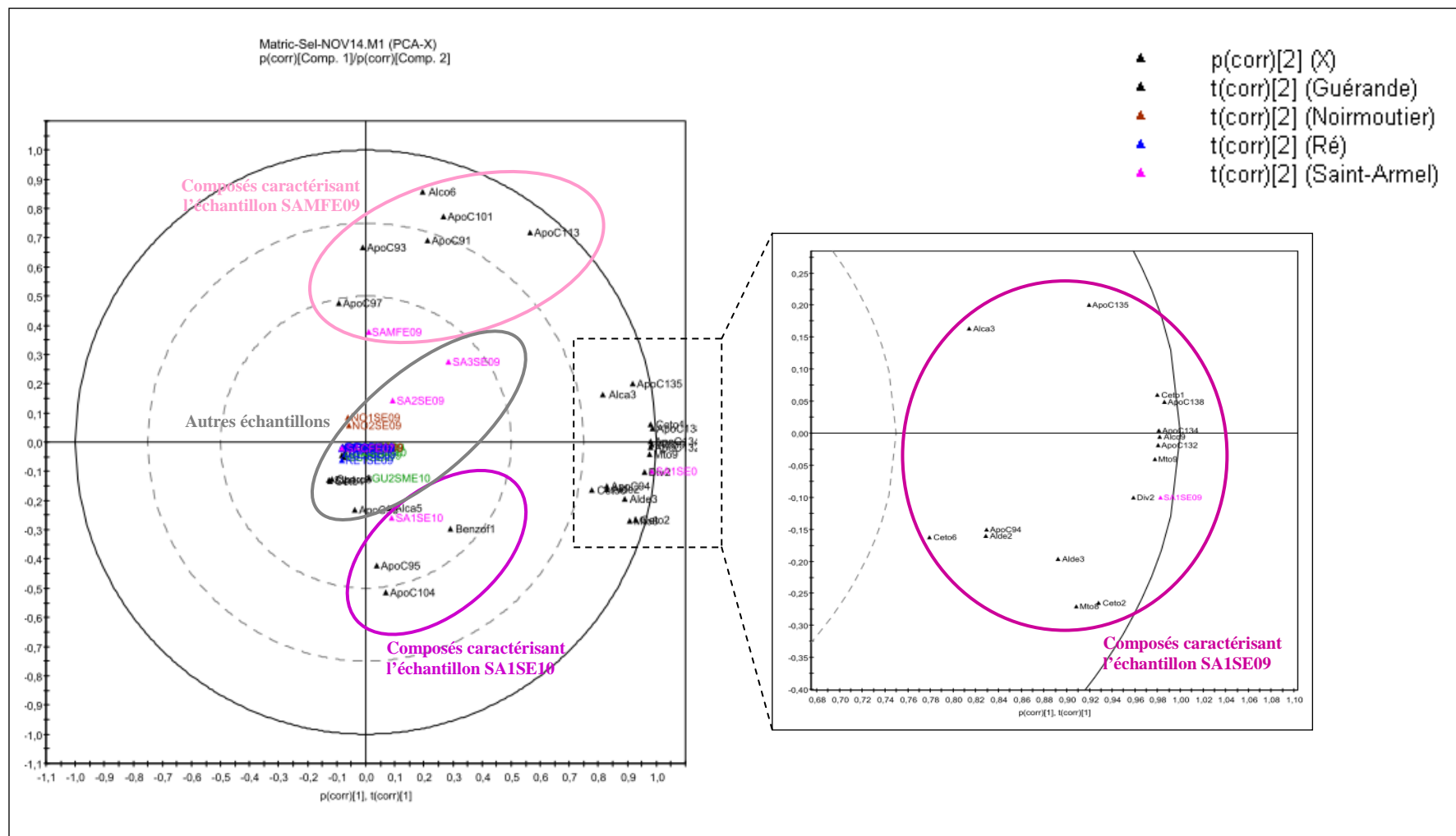


Figure 83. Représentation graphique en ACP des composés chimiques des échantillons de saumure et de Fleur de sel suivant les axes 1 et 2 en considérant les régions de production.

- L'échantillon SA1SE09 (*Saumure de Saint-Armel du Lot 1 de l'été 2009*) est fortement corrélé aux composés chimiques reportés dans le Tableau XXVIII.

**Tableau XXVIII.** Composés chimiques caractéristiques de l'échantillon SA1SE09.

<b>Hydrocarbures</b>
heptadéc-8-ène (isomère <i>Z/E</i> n.i.)
<b>Cétones</b>
6-méthylheptan-2-one
6-méthyl-5-heptén-2-one
3,3-diméthyl-octane-2,7-dione
<b>Monoterpènes oxygénés</b>
2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène-1-méthanol ( $\beta$ -cyclogéranol)
1-formyl-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène ( $\beta$ -cyclocitral)
<b>Norisoprénoides</b>
<b>C<sub>9</sub></b>
3,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one
<b>C<sub>13</sub></b>
4-(2-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexyl)-but-3-én-2-one <sup>(1)</sup>
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-butan-2-one (dihydro- $\alpha$ -ionone)
( <i>E</i> )-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one ( <i>E</i> )- $\alpha$ -ionone)
<i>trans</i> -1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,5,5-triméthyl-naphthalén-2-ol
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol ( $\beta$ -ionol)
<b>Divers</b>
<i>trans</i> -octahydro-5,5,8a-triméthyl-2 <i>H</i> -1-benzopyrane <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> : tentative d'identification

- L'échantillon SAMFE09 (*Fleur de Sel des marais de Saint-Armel de l'été 2009*) est fortement corrélé aux composés présentés dans le Tableau XXIX.

**Tableau XXIX.** Composés chimiques caractéristiques des échantillons SAMFE09.

<b>Alcools</b>
2,3-diméthylcyclohexan-1-ol
<b>Norisoprénoides</b>
<b>C<sub>9</sub></b>
2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one
2,3,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one <sup>(1)</sup>
2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione
<b>C<sub>10</sub></b>
3,3,5,5-tétraméthylcyclohexan-1-one <sup>(1)</sup>
<b>C<sub>11</sub></b>
5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4 <i>H</i> )-benzofuran-1-one (dihydroactinidiolide (DHA))

<sup>(1)</sup> : tentative d'identification

- L'échantillon SA1SE10 (*Saumure de Saint-Armel Lot 1 de l'été 2010*) est fortement corrélé aux composés listés Tableau XXX.

*Tableau XXX. Composés chimiques caractéristiques des échantillons SA1SE10.*

<b>Hydrocarbures</b>
heptadécane
<b>Norisoprénoïdes</b>
<b>C<sub>9</sub></b>
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one (isophorone)
<b>C<sub>10</sub></b>
2,6,6-triméthyl-1-cyclohex-1-ène-1-carboxaldéhyde <sup>(t)</sup>
<b>Benzofurane</b>
4,5,6,7-tétrahydro-7,7-diméthyl-1(3 <i>H</i> )-isobenzofuran-1-one <sup>(t)</sup>

<sup>(t)</sup> : tentative d'identification

En revanche, 3/6 échantillons de Saint-Armel sont regroupés au centre avec tous les autres échantillons toutes régions confondues et sont caractérisés par les mêmes composés chimiques.

#### ► Discrimination par campagne

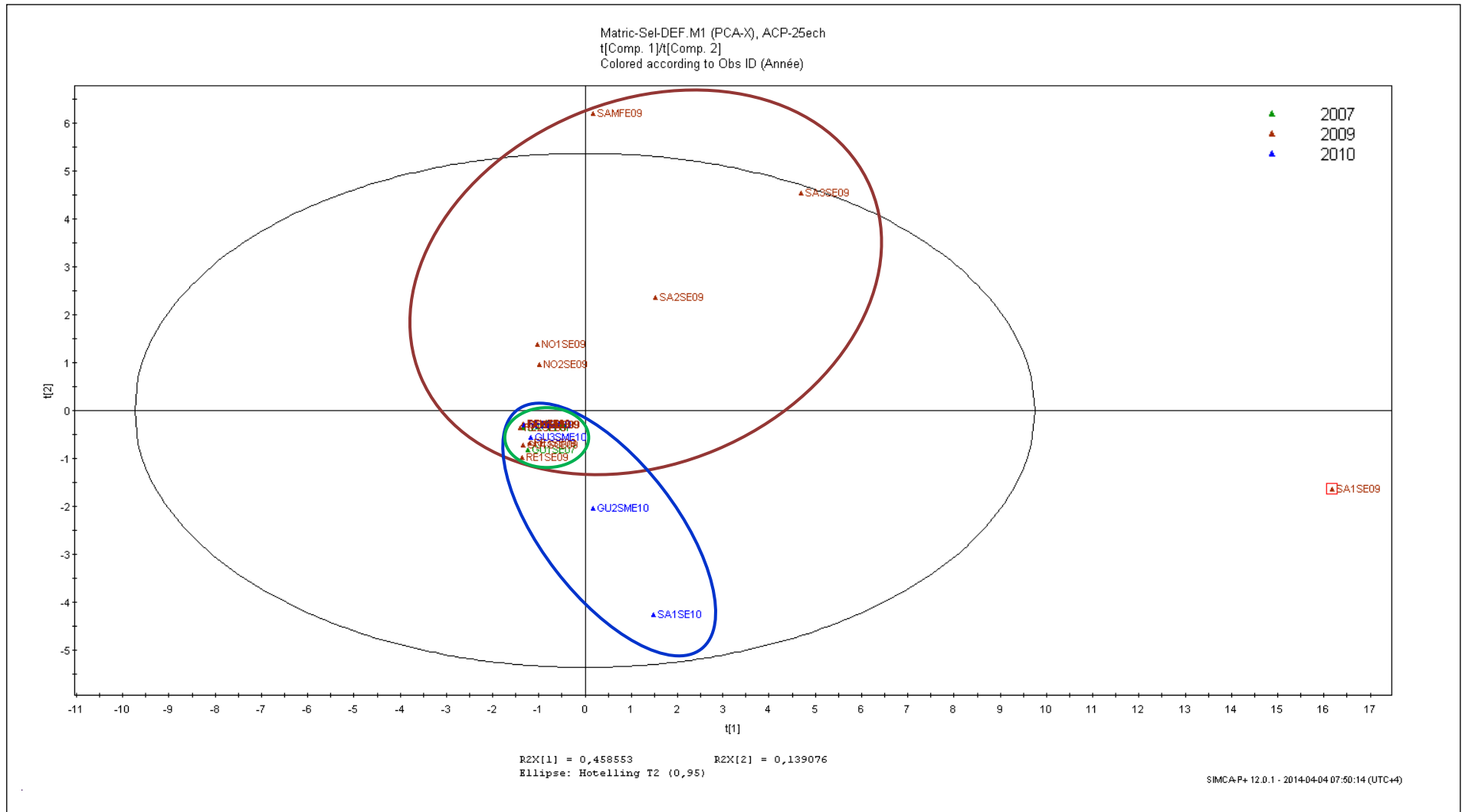
L'examen de la représentation graphique de la projection des échantillons suivant les axes 1 et 2 (Figure 84), obtenue par ACP permet de délimiter 3 groupes correspondant aux trois années (2007, 2009 et 2010), les années 2009 et 2010 se distinguent relativement bien malgré le léger chevauchement observé. L'année 2007, quant à elle, se trouve juste à l'intersection des nuages correspondant aux années 2009 et 2010.

#### ► Discrimination par type de sel

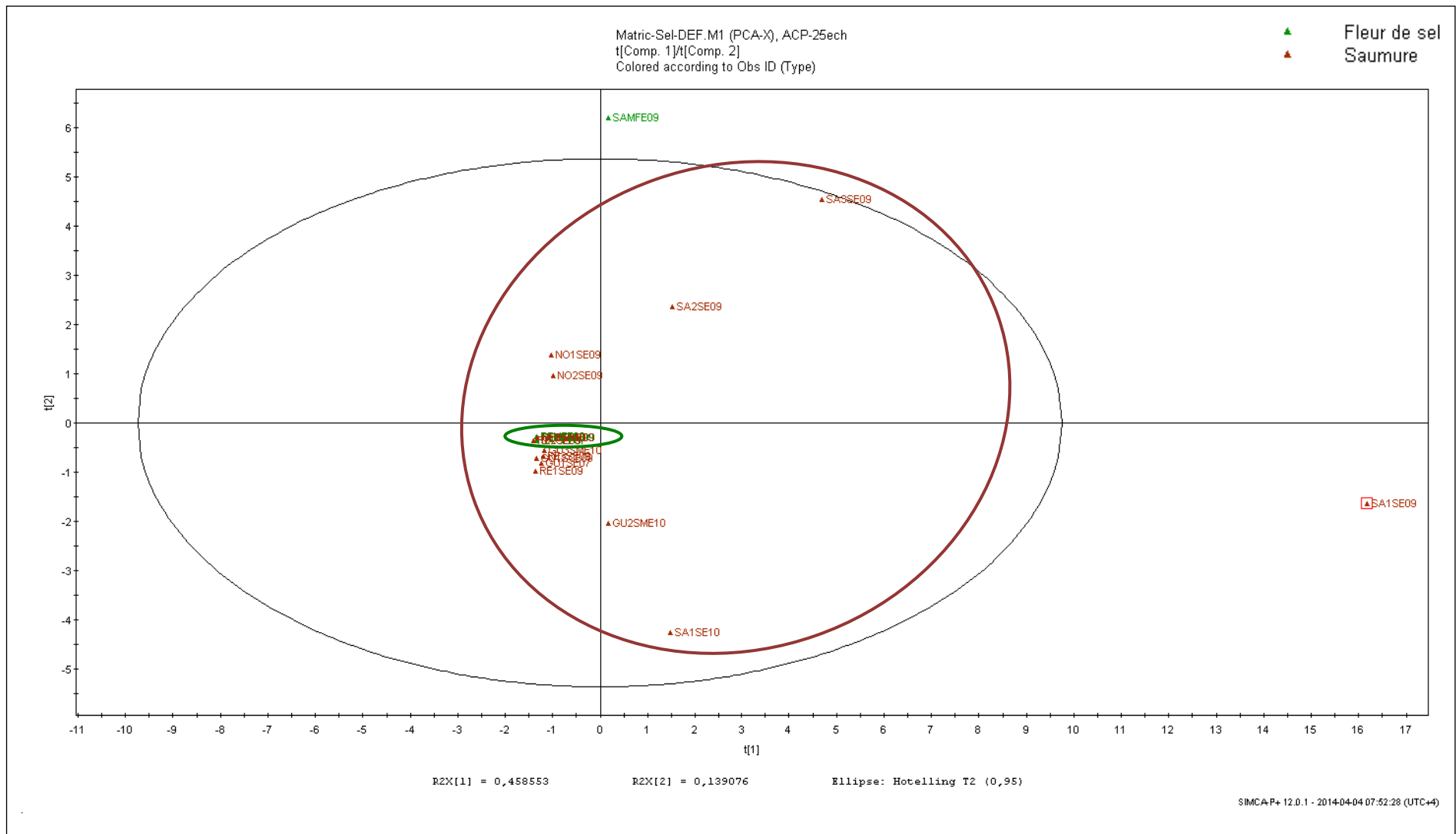
L'examen de la représentation graphique de la projection des échantillons suivant les axes 1 et 2 (Figure 85), obtenue par ACP permet de constater que les saumures forment un groupe beaucoup plus dispersé même si l'échantillon de 2009 provenant de Saint Armel (SA1SE09) n'est pas pris en compte.

En revanche, il existe une homogénéité au niveau des fleurs de sel avec une superposition de tous les échantillons hormis celui provenant de 2009 provenant de Saint Armel (SAMFE09).

Les axes 1 et 2 dans ces trois types de discrimination véhiculent respectivement 45,8% et 13,9% de l'information.



**Figure 84.** Représentation graphique en ACP de la projection des échantillons de saumure et de Fleur de sel suivant les axes 1 et 2 en considérant les campagnes de production (2007, 2009 et 2010).



**Figure 85.** Représentation graphique en ACP de la projection des échantillons suivant les axes 1 et 2 en considérant le type de sel (saumure et de Fleur de sel).

### ❖ Analyses par CAH

Les analyses par CAH par région et par année n'ont pas permis d'observer un classement convenable des échantillons. Seule la Classification Ascendante Hiérarchique effectuée à partir du type de sel, montre dans le dendrogramme de la Figure 86, un certain regroupement des échantillons mis à part l'échantillon de fleur de sel de Saint Armel de 2009 (SAMFE09) classé dans les saumures et trois échantillons de saumure de l'Ile de Ré (RE1SH10, RE2SH10 et RE3SH10) ainsi qu'un échantillon de saumure de Guérande (GU1SME09) classés dans les fleurs de sel.

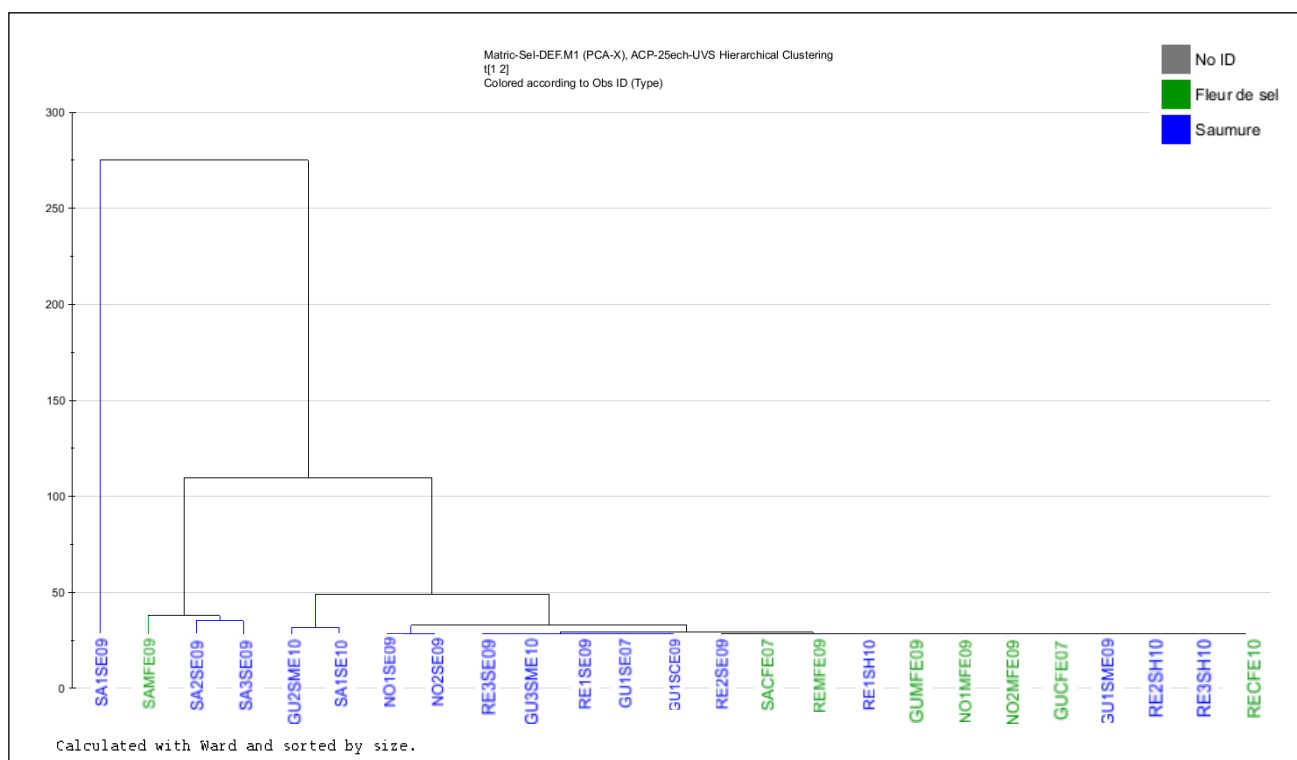


Figure 86. Dendrogramme obtenu par CAH des échantillons de saumure et de Fleur de sel.

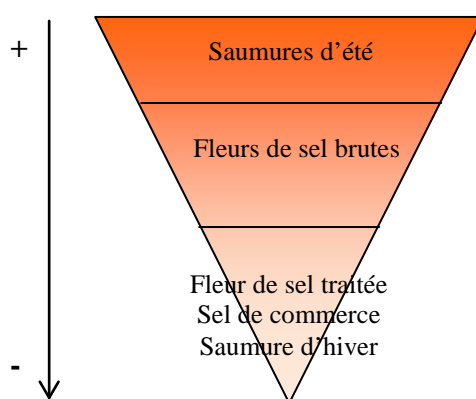
### III.3. Discussion

De nombreux composés volatils (107) ont été mis en évidence à partir des différentes matrices étudiées. Certains sont communs et d'autres propres à un bassin ou à un échantillon.

### III.3.1. Analyse comparative par type d'échantillon (eau des marais / fleur de sel) de la composition chimique des espaces de tête

Les résultats obtenus au cours des travaux mettent en évidence des différences significatives (qualitatives et quantitatives) dans la distribution des composés volatils et notamment des norisoprénoïdes au sein des échantillons. Les eaux des marais contiennent, par exemple, plus de composés volatils que les sels. La transformation saumure / fleur de sel entraîne ainsi une perte de composés volatils qui se traduit par une diminution de la discrimination (ACP Figures 84 et 85 pages 199 et 200) en raison du nombre restreint des composés qui caractérisent les fleurs de sel par rapport à ceux qui caractérisent les saumures.

De plus, la quantité de dérivés mise en évidence pour les échantillons de fleur de sel brute est plus importante que celle pour les échantillons de sel du commerce. Par exemple, pour Saint-Armel, 22 composés volatils ont été détectés pour la fleur de sel brute contre seulement 11 dans la fleur de sel du commerce. Cette différence peut s'expliquer par le traitement que subit la fleur avant sa commercialisation (traitement thermique, blanchiment) : une exposition prolongée au soleil ou un séchage artificiel (flux d'air chaud) peuvent en effet engendrer des évaporations, des destructions et/ou des modifications chimiques des molécules présentes sur le cristal (Britton, 2008). L'analyse de la couleur confirme d'ailleurs ces observations, la fleur de sel du commerce étant bien plus blanche que la fleur de sel brute (Figure 87).



**Figure 87.** Nombre de composés volatils détectés dans les eaux des marais en fonction du type d'échantillon analysé.

Certains sels commerciaux, quant à eux, présentent parmi les molécules volatiles extraites, des composés contaminants tels que le 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phénol (2,4-

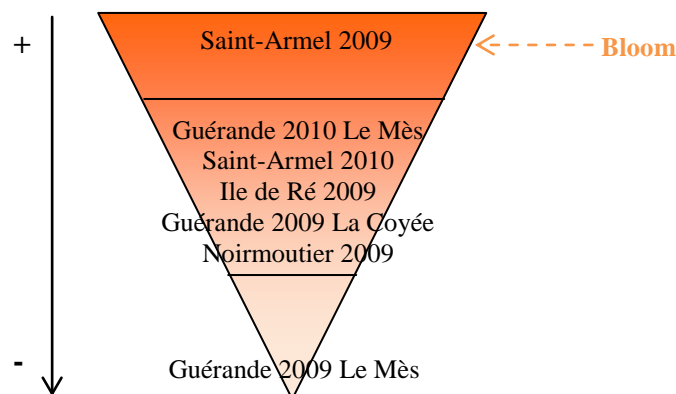


DTBP), le diéthyl-phthalate ou encore le 1,2-benzènedicarboxylate de butyle et de 2-éthylhexyle qui pourraient notamment provenir des polluants de l'environnement, ceux des marais mais aussi des composés plastiques d'emballage par exemple. En effet, comme l'ont démontré plusieurs travaux sur la question, les contaminants identifiés dans les marais peuvent être issus de l'activité humaine (en fonction de leur proximité avec des zones industrielles ou urbaines importantes) et transportés par la mer et les rivières puis fréquemment déposés sur les zones côtières telles que les marais salants, les estuaires de rivières ou les deltas (Cundy *et al.*, 1997, Cundy *et al.*, 2002 ; Serrano *et al.*, 2011). Ceci démontre d'une part, la précision de la technique d'extraction et d'analyse et d'autre part, la capacité du sel à s'imprégner des composés environnants. Il est donc essentiel, pour sa commercialisation, de stocker ce type de produit dans des contenants neutres (verre ou matières inertes).

### III.3.2. Analyse comparative par année et par saison de la composition chimique des espaces de tête

#### ❖ Variation annuelle

La Figure 88 représente schématiquement le nombre de composés volatils présents dans les espaces de tête des eaux des marais en fonction de leur zone et de leur date de collecte.



**Figure 88.** Nombre de composés volatils détectés dans les eaux des marais en fonction de l'année de récolte de l'échantillon.

Si l'on considère chaque bassin individuellement, il apparaît par exemple que :

- Pour les eaux de Saint-Armel la majorité des composés volatils a été identifiée dans les eaux des marais de l'été 2009 lots 1 à 3, 49 composés identifiés (échantillons prélevés lors d'un bloom) contre 17 composés identifiés dans l'échantillon de l'été 2010.
- Pour les eaux de Guérande - Le Mès, la majorité des composés volatils a, au contraire, été identifiée dans l'échantillon prélevé au cours de l'été 2010 : 18 composés contre 0 mis en évidence au sein de l'échantillon de l'été 2009.

Cette analyse semble donc montrer qu'il n'est pas possible de classer les échantillons en fonction de l'année de leur collecte. Cette variabilité est sans doute imputable à des variations de conditions environnementales influençant le développement des bactéries ou des algues du milieu et donc la production de composés volatils dont elles sont à l'origine. Les conditions environnementales influencent, de plus, après la mort de ces microorganismes, les conditions de conservation et/ou de dégradation des composés volatils qu'elles contenaient et donc leur présence dans les eaux des marais, par exemple.

#### ❖ *Variation saisonnière*

L'influence de la variation saisonnière sur la production des composés volatils a pu être étudiée pour les eaux des marais de l'Ile de Ré. Il est apparu que la majorité des composés a pu être mise en évidence dans l'eau de l'été 2009 : 14 composés mis en évidence contre 0 dans l'eau d'hiver. En effet, c'est pendant l'été que le sel est récolté et que les marais sont fonctionnels et chargés de microorganismes. Au contraire, en hiver, ils sont inondés afin d'être protégés, les microorganismes présents étant donc beaucoup moins concentrés et soumis à des conditions environnementales très différentes (températures froides, pas d'ensoleillement).

#### ❖ *Conclusion*

La production de sel est saisonnière (récolte des produits uniquement en été) et elle varie d'une année sur l'autre en fonction des conditions environnementales : si les conditions estivales ne sont pas optimales lors d'une année, la quantité totale produite sur une année sera faible et de qualité inférieure.

### III.3.3. Analyse comparative par bassin de la composition chimique des espaces de tête des eaux des marais et des fleurs de sel

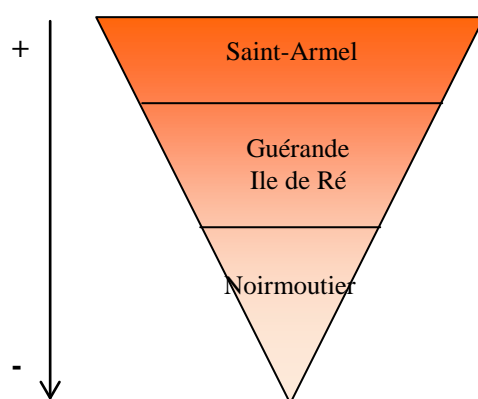
#### ❖ Comparaison quantitative

Quelle que soit l'origine géographique des échantillons, différents composés volatils ont pu être mis en évidence pour chaque échantillon et quasiment la moitié de ces composés volatils sont des norisoprénoïdes présentant un squelette en C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub> (Tableau XXXI) fréquemment décrits dans la littérature (Fleischmann *et al.*, 2001).

**Tableau XXXI.** Nombre total de composés détectés par marais (tous échantillons confondus).

	Ile de Ré	Noirmoutier	Saint-Armel	Guérande	Total
Nombre total de composés identifiés	21	13	54	19	107
Dont norisoprénoïdes	8	7	22	8	50

Il existe cependant une différence importante dans le nombre de composés volatils mis en évidence (Figure 89).



**Figure 89.** Nombre de composés volatils détectés dans l'eau des marais en fonction de l'origine de l'échantillon.

Ainsi, par exemple, la fleur de sel brute et les eaux de Saint-Armel sont les échantillons pour lesquels les espaces de tête étaient les plus riches en composés volatils.

Deux hypothèses sont alors envisageables pour expliquer cette observation :

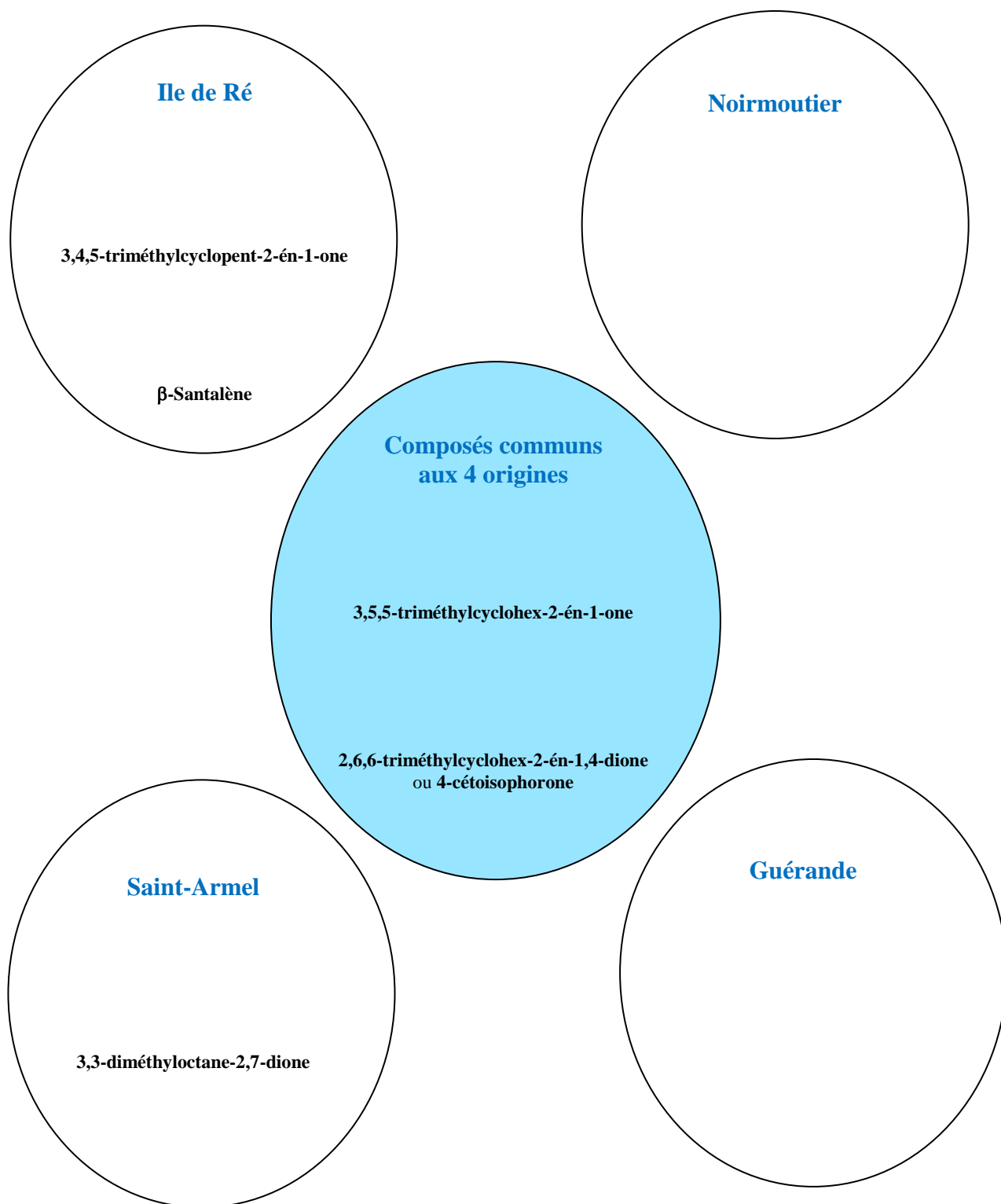
- 1/ Un impact direct du sous-sol sur la qualité des eaux et donc de leur microfaune et flore.
- 2/ Un marais avec des conditions environnementales particulières impliquant un échantillonnage différent.

Concernant la première hypothèse : les différents bassins étudiés sont tous issus du pourtour atlantique, la différence de sous-sol (roche profonde) et surtout les argiles ou limons utilisés pour étanchéifier les marais ne diffèrent pas selon les cartes géologiques étudiées (site Internet Infoterre, maj 2014). Cette hypothèse semble donc peu probable. Concernant la seconde hypothèse : il est à noter que les échantillons de Saint-Armel ont été récoltés alors qu'un bloom pouvait être observé au niveau du marais. Or, lors d'un bloom, les eaux et les fleurs de sel sont en contact avec une population microbienne et algale plus importante qu'à l'accoutumée. Ceci explique donc très certainement les particularités visuelles (échantillons les plus colorés de couleur orange voire marron pour certaines eaux) observées pour les échantillons de Saint-Armel. Particularités, se traduisant notamment par une grande richesse en composés volatils détectés au cours des analyses HS-SPME / CG-SM.

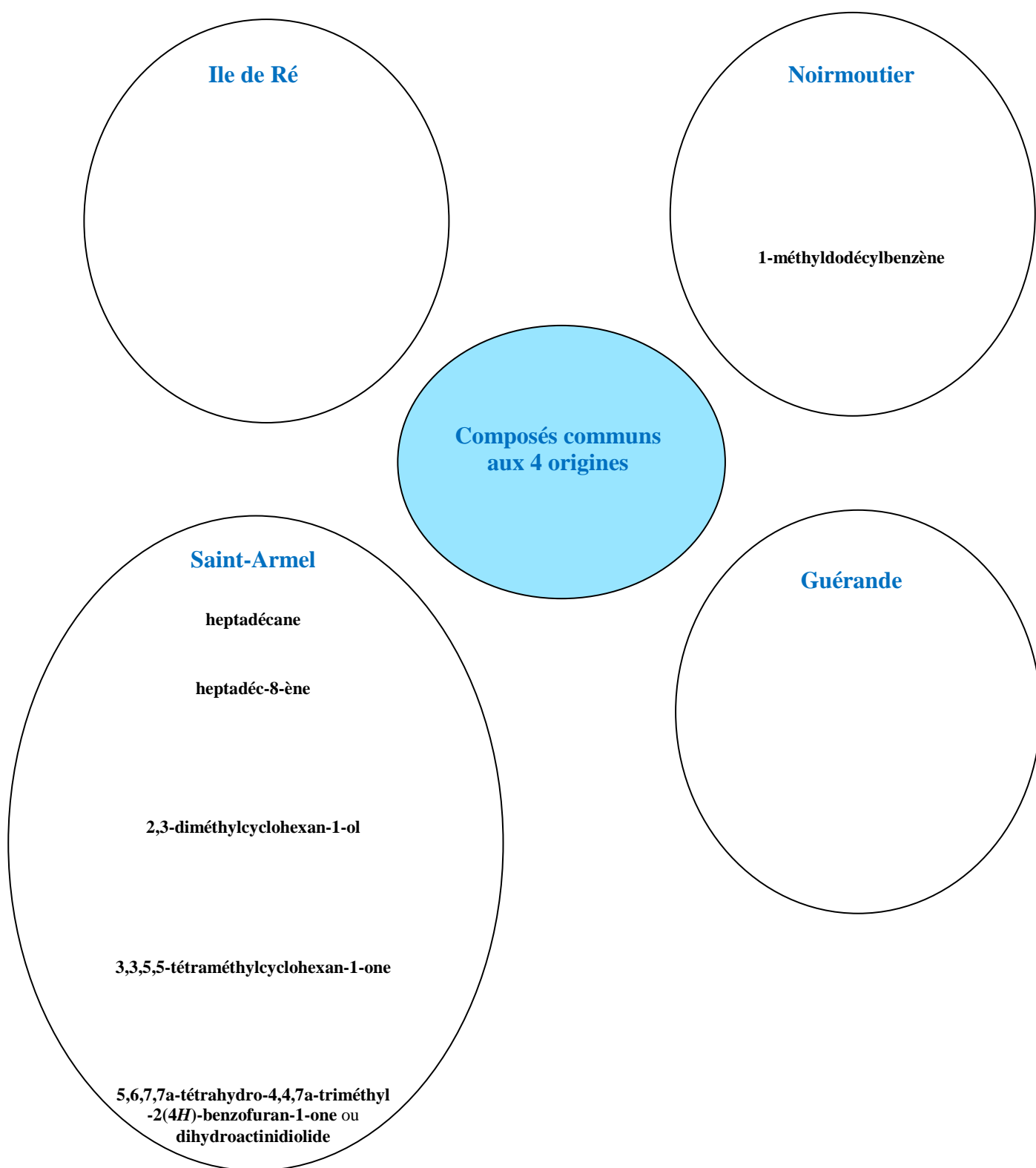
#### ❖ *Comparaison qualitative*

Les Figures 90 et 91 ci-après indiquent respectivement pour les eaux des marais et pour les sels :

- Les composés communs aux 4 zones. Il s'agit des composés repérés systématiquement dans les espaces de tête des différentes eaux des marais ou des différents sels à forte ou faible teneur, dans un ou plusieurs lots.
- Les composés spécifiques à chacun des bassins. Il s'agit des composés à forte teneur, repérés dans les espaces de tête de plusieurs lots d'eaux des marais ou de sels d'une seule zone.



**Figure 90.** Composés volatils spécifiques aux eaux des marais de l'Ile de Ré, Noirmoutier, Guérande et Saint-Armel.



**Figure 91.** Composés volatils spécifiques aux sels de l'Ile de Ré, Noirmoutier, Guérande et Saint-Armel.

### *Les eaux des marais*

L'île de Ré et Saint-Armel apparaissent comme les deux seuls bassins ayant des composés spécifiques dans leurs eaux. Pour l'eau des marais de l'île de Ré, il s'agit d'une cétone (le 3,4,5-triméthylcyclopent-2-én-1-one) et d'un sésquiterpène hydrocarboné (le  $\beta$ -santalène). Pour l'eau des marais de Saint-Armel, une cétone (le 3,3-diméthyl-octane-2,7-dione) caractérise ce bassin. Les composés mis en évidence dans les eaux de Noirmoutier et de Guérande, lors des analyses, se retrouvent systématiquement dans les autres bassins ou ne sont pas reproductibles d'un échantillon à l'autre, ils n'ont donc pas de composés spécifiques.

Deux composés sont communs à toutes les eaux quelle que soit leur origine géographique (c'est-à-dire, à au moins un échantillon de chaque bassin) : le 3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one et le 2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione (4-céto-isophorone).

### *Les sels*

Noirmoutier et Saint-Armel apparaissent comme les deux seuls bassins ayant des composés spécifiques dans leurs sels. Pour les échantillons de sel de Noirmoutier, il s'agit d'un composé aromatique (le 1-méthyl-dodécylbenzène). Pour les sels de Saint-Armel, il s'agit de deux hydrocarbures (l'heptadéc-8-ène et l'heptadécane), d'un alcool (le 2,3-diméthylcyclohexan-1-ol) et de deux norisoprénoïdes (le 3,3,5,5-tétraméthylcyclohexan-1-one et le 5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4H)-benzofuran-1-one ou dihydroactinidiolide). A noter que certains composés de ces sels se retrouvent également dans les eaux. Les composés des sels de l'île de Ré, mis en évidence lors des analyses, se retrouvent systématiquement dans les autres bassins ou ne sont pas reproductible d'un échantillon à l'autre, ils ne peuvent donc pas être considérés comme des composés spécifiques. Aucun composé n'a été détecté dans l'espace de tête des sels de Guérande.

De même, aucun composé commun à tous les sels n'a pu être mis en évidence dans les conditions d'analyses de ce travail. Cependant, de nombreux composés volatils mis en évidence dans les sels se retrouvent également dans les eaux. Le 3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one, par exemple, se retrouve non seulement dans les sels de Saint-Armel mais dans les eaux de tous les bassins.

## *Conclusion*

L'ensemble des composés volatils mis en évidence pour chaque bassin est donc complexe et dépend d'une part, du type de matrice utilisée (eaux des marais ou sel) et d'autre part, de sa date de récolte et de sa composition en microorganismes. En effet, chaque bassin, voire même chaque œillet de chaque bassin, se caractérise par un pool de microorganismes précis qui semble définir une localisation géographique car :

- Le ratio microalgues / bactéries / champignons et moisissures identifiés est différent pour chaque échantillon d'eau.
- Les traces d'ADNr-16S mises en évidence dans les échantillons de sel, correspondent à différents microorganismes en fonction de leur origine.
- Certains composés volatils ne sont présents que pour certaines eaux et/ou certains sels (voir Figures 90 et 91 pages 207 et 208).

Ces derniers résultats renforcent les conclusions de l'équipe d'Isabel Silva (2009 et 2010) ayant déjà travaillé sur des matrices similaires : sels de Aveiro, Catro Marim, Tavira, Ile de Sal et Guérande. Au cours de ces travaux, il a été démontré qu'il existe (1) des composés volatils communs à chaque bassin (Tableau XXXII) et (2) des composés volatils spécifiques à chacun d'entre eux.

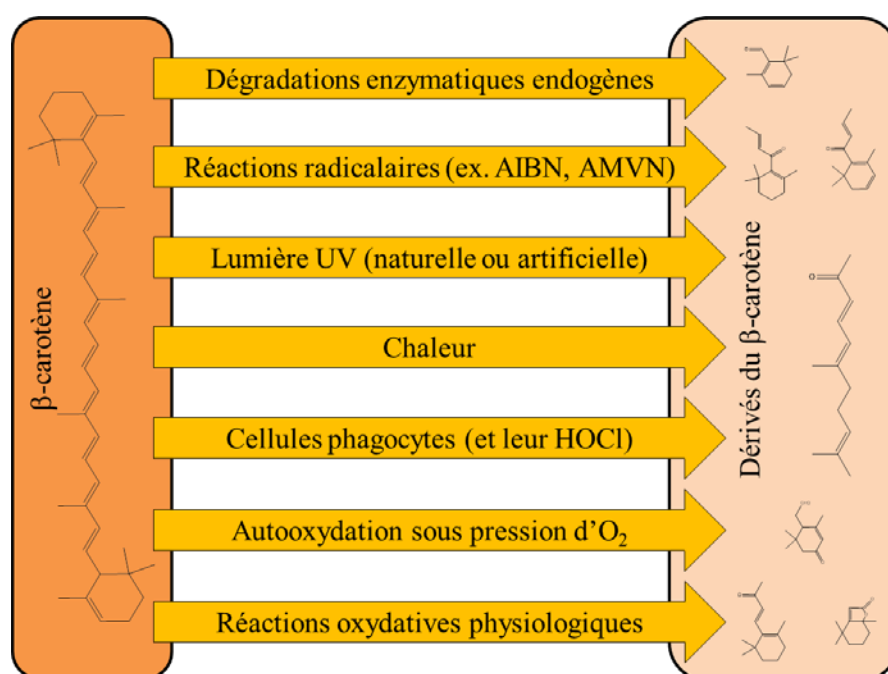


Tableau XXXII. Composés communs mis en évidence dans les différentes études sur les sels et eaux des marais d'origines diverses.

Composés communs identifiés	Etudes antérieures (Silva <i>et al.</i> 2009, 2010a)					Présente étude			
	Portugal			Cap Vert	France	France			
	Aveiro	Catro Marim	Tavira	Ile de Sal	Guérande	Ile de Ré	Noirmoutier	Saint-Armel	Guérande
<b>Hydrocarbures</b>									
heptadécane	x							x	
heptadéc-8-ène	x				x			x	x
heptadéca-6,9-diène	x								x
<b>Alcool</b>									
octan-1-ol	x							x	
<b>Aldéhydes</b>									
nonanal	x					x	x	x	
décanal	x					x		x	
<b>Cétones</b>									
6-méthylheptan-2-one	x						x	x	
6-méthyl-5-heptén-2-one	x	x	x	x	x			x	x
2,4,4-triméthylcyclopentan-1-one	x							x	x
<b>Monoterpènes oxygénés</b>									
1-formyl-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène	x							x	
<b>Ester</b>									
diéthyl phtalate	x					x	x	x	
<b>Norisoprénoïde</b>									
<b>C<sub>9</sub></b>									
2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one	x				x	x	x	x	
3,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one	x							x	x
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one	x					x		x	x
<b>C<sub>11</sub></b>									
5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4H)-benzofuran-1-one	x					x	x	x	
<b>C<sub>13</sub></b>									
(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one	x						x	x	x

### III.3.4. Cas particulier des norisoprénoïdes : origines possibles de leur présence dans les eaux des marais et dans le sel.

Les caroténoïdes ont, dans un premier temps, été étudiés en raison de leur intérêt en tant que pigments, antioxydants ou nutriments (pro vitamine A). Cependant, on sait aujourd'hui que les caroténoïdes peuvent également être précurseurs d'arômes, ajoutant une dimension supplémentaire à leur étude (Fleischmann *et al.*, 2001). Les norisoprénoïdes possèdent ainsi une structure commune, un squelette carboné mégastigmane, plus ou moins modifié. L'obtention des dérivés de caroténoïdes peut se faire *via* différentes voies (Figure 92) (Mendes-Pinto, 2009 ; Rodriguez-Bustamante *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Bustamante *et al.*, 2007 ; Fleischmann *et al.*, 2001 ; Zorn *et al.*, 2003a,b).



**Figure 92.** Exemples de voies (naturelles et artificielles) de dégradation du  $\beta$ -carotène (Siems *et al.*, 2005).

AIBN : azobisisobutyronitrile (radical libre) ; AMVN : 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléro nitrile) (radical libre) ; HOCl : acide hypochlorique.

Ces différentes voies de dégradation cohabitent sans doute dans les marais salants et les composés mis en avant au cours de ce travail en sont probablement le résultat ; le mécanisme de dégradation précis reste cependant à déterminer pour ce milieu particulier. On retiendra cependant en priorité pour ce type de milieu, le rôle des facteurs environnementaux non-sélectifs (température, lumière) et celui des microorganismes (enzymes).

### ❖ *Clivages non-sélectifs*

Les clivages non-sélectifs de la chaîne polyène, induits par des facteurs abiotiques tels que la température et/ou la lumière, aboutissent à la formation de radicaux libres ou de dérivés oxydés. Les radicaux sont des espèces hautement réactives qui peuvent réagir avec d'autres espèces radicalaires ou non-radicalaires (Haila *et al.*, 1997 ; Liebler *et al.*, 1996).

Par ce processus de réaction radicalaire induite par la température et/ou la lumière, les chercheurs ont pu démontrer la formation d'un bon nombre de dérivés du  $\beta$ -carotène tels que la  $\beta$ -ionone, la 5,6-époxy- $\beta$ -ionone, le DHA ou encore le  $\beta$ -cyclocitral (Figure 93). Ces CDC se retrouvent dans les feuilles (thé, café), les fruits (raisin, abricot, mangue, *etc.*) ou encore dans les algues (Crouzet *et al.*, 2001) .

De même, il a été étudié, chez certaines algues, la formation de norisoprénoïdes cycliques (C<sub>9</sub>). Ainsi Flamente & Ohloff (1984) ont montré que la 2,6,6-triméthyl-2-cyclohexén-1-one se formait par une succession de mécanismes nécessitant de l'énergie lumineuse (Figure 94).

Enfin, encore à titre d'exemples, une équipe de chercheurs (Gerdes *et al.*, 2001) a montré que chez le raisin, la lumière du soleil influençait la formation et la composition des norisoprénoïdes du fruit. Les teneurs pouvant augmenter de 20% lorsque l'exposition des grappes au soleil passe de 4% à 97%. En effet, le soleil change la température interne des grains ce qui permet la transformation des caroténoïdes en dérivés. Ce lien entre soleil et température étant également extrêmement présent dans les marais, l'ensoleillement et donc la température ont très certainement un rôle non négligeable dans le processus de formation des norisoprénoïdes détectés dans les échantillons de sel marin.

Cette dégradation des caroténoïdes peut quelque fois s'observer à l'œil nu car elle peut notamment se traduire par une perte de couleur du milieu (Lee & Coates, 2003). C'est pourquoi, par exemple, le sel n'est pas orange vif alors qu'il porte bel et bien des traces de dérivés de caroténoïdes.

$\beta$ -carotène

5,6,5',6-diépoxy- $\beta$ -carotène

5,8,5',8'-diépoxy- $\beta$ -carotène

$\beta$ -ionone

5,6-époxy- $\beta$ -ionone

**dihydroactinidiolide  
(DHA)**

2,2,6-triméthylcyclohexanone  
(TCH)

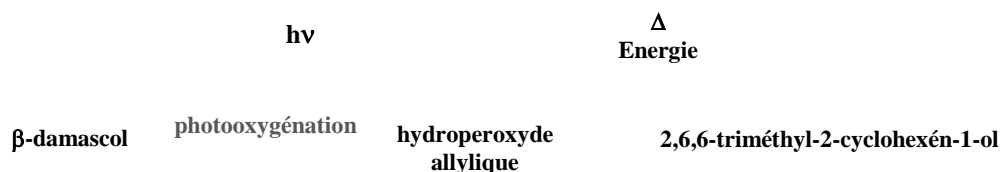
2-hydroxy-2,6,6-  
triméthylcyclohexanone

2-hydroxy-2,6,6-  
triméthylcyclohexane-1-  
carboxaldéhyde

2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-one

**$\beta$ -cyclocitral**

**Figure 93.** Dégradation du  $\beta$ -carotène (et de ses dérivés) sous l'effet de la chaleur (Mendes-Pinto, 2009).  
*En rouge* les composés mis en évidence durant la présente étude.

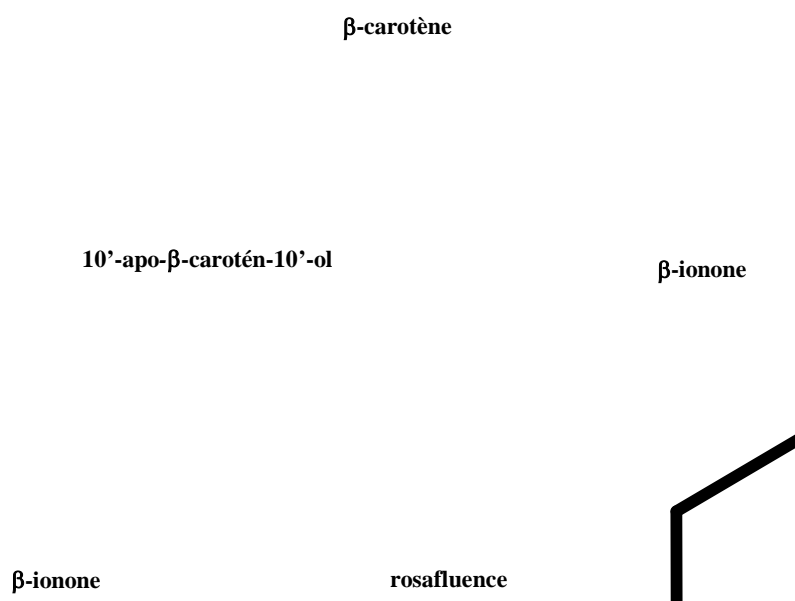


**Figure 94.** Formation de norisoprénoïdes sous l'effet de la lumière chez certaines algues (Flament & Ohloff, 1984).

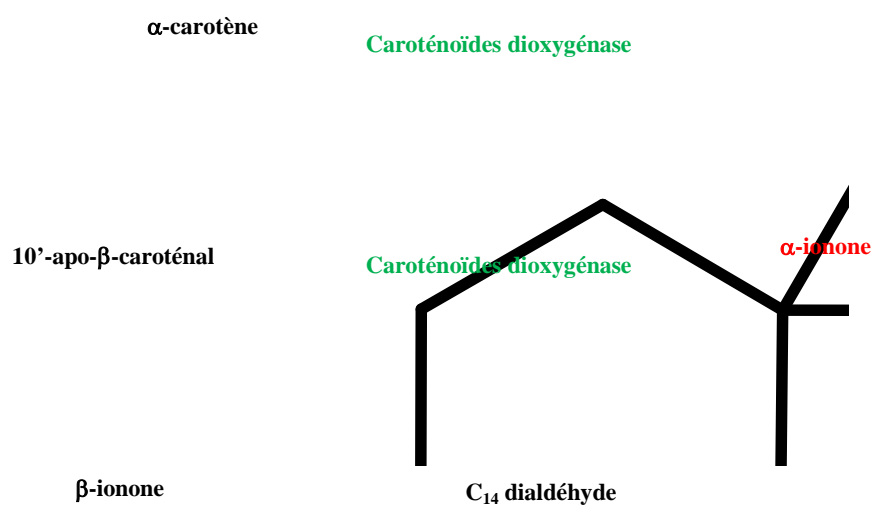
Dans les marais salants, la concentration en sel est également un facteur extérieur indirect important dans la formation des norisoprénoïdes. En effet, les microalgues telles que *Dunaliella salina* sont connues dans les marais pour stocker de grandes quantités de caroténoïdes afin d'équilibrer leur pression osmotique avec celle du milieu, chaud et hypersalin, qui les entoure (>10% de leur poids sec, lors des blooms dans les marais, cette teneur peut même être supérieure à 30% du poids sec des cellules) (Fazeli *et al.*, 2006 ; Gomez *et al.*, 2003 ; Marin *et al.*, 1998). Lorsque les microalgues meurent ou que leurs conditions de croissance changent (diminution de la salinité, de la photopériode...), les caroténoïdes qu'elles contiennent peuvent se retrouver dans le milieu et être transformés en norisoprénoïdes.

#### ❖ *Clivages par des microorganismes (enzymatique)*

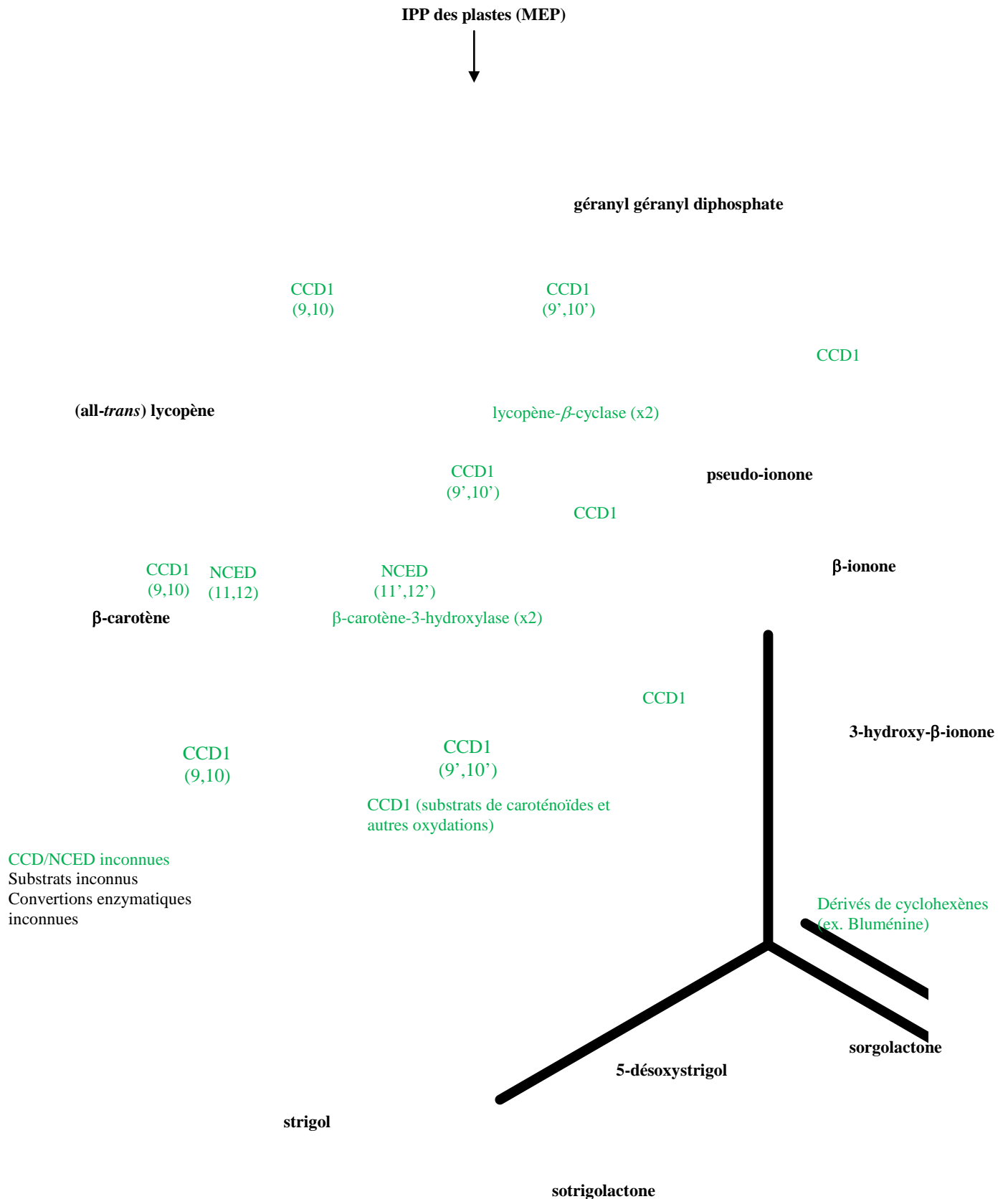
Certains microorganismes tels que les archées, les bactéries, les champignons, les levures ou les microalgues possèdent des enzymes responsables de la dégradation de caroténoïdes dans le cadre de leur métabolisme. Plusieurs enzymes peuvent ainsi intervenir dans le clivage des caroténoïdes, telles que l'hydroxylase, la désaturase, la dioxygénase... (Baumes *et al.*, 2002 ; Sergeant *et al.*, 2009). Ces clivages résultent de l'activité biologique de l'organisme et concernent un petit nombre de composés dérivés. Quelques exemples de clivages enzymatiques des caroténoïdes sont présentés dans les Figures 95 à 97.



*Figure 95. Exemples de clivages enzymatiques du β-carotène (Mendes-Pinto, 2009)*



*Figure 96. Exemples de clivages enzymatiques de l'α-carotène (Baldermannl et al., 2010)*  
*En rouge composé mis en évidence durant la présente étude.*



**Figure 97.** Exemples de dégradations de caroténoïdes par des enzymes fongiques (Sun et al., 2008).

MEP : méthylérythritol phosphate ; IPP : isopentényl-pyrophosphate ; CCD : dioxygénase de clivage des caroténoïdes ; NCED : 9-cis-époxy-caroténoïde dioxygénase.

**CHAPITRE IV – DISCUSSION GÉNÉRALE : CORRÉLATION DES DONNÉES  
MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES**



## IV.1. Corrélations des données microbiologiques et chimiques

Les résultats mis en évidence lors des différentes études microbiologiques ou chimiques ont permis dans un premier temps, d'établir un lien étroit entre microorganismes, traces d'ADNr-16S et composés volatils. Ainsi, il apparaît que : **plus le bassin est riche en microorganismes plus son eau sera riche en composés volatils et plus son sel comportera des traces d'ADNr-16S**. Il apparaît en outre, que la variation de ces trois paramètres est fonction de plusieurs facteurs liés au type de matrice étudiée :

- **Le type d'eau** : une eau hivernale ne sera que très peu représentative des microorganismes et des composés volatils qui caractérisent les marais en été (cas des échantillons d'eau estivales et hivernales de l'Ile de Ré). De même, une eau récoltée lors d'un bloom, donnera des réponses supérieures à la normale (cas des échantillons d'eaux estivales de Saint-Armel 2009).
- **Le type de sel** : la taille du cristal et donc sa surface de contact avec l'environnement ou encore ses conditions de formation et de récolte (le gros sel se récolte après « coulage », la fleur de sel par écrémage et le sel fin est un gros sel purifié et broyé) sont autant de paramètres qui feront varier la précision des résultats.
- **La fraîcheur des échantillons** : plus les échantillons seront frais, plus la caractérisation sera facile : l'eau « vieille » ne renseigne que très peu sur son bouquet odorant et le sel de commerce par exemple ne contient presque plus de composés volatils.

Une étude précise de la littérature a permis dans un second temps, d'apporter quelques éléments d'explications aux résultats obtenus lors de la présente étude. Ces éléments sont exposés ci-après.

### IV.1.1 Variations des microorganismes : quelques éléments d'explications

Les microorganismes mis en évidence au cours de cette thèse, même s'ils restent encore à caractériser précisément, proviennent majoritairement de l'Océan Atlantique qui, en été, approvisionne les marais en continu au travers du labyrinthe de bassins qui les constitue. Arrivés dans des bassins contenant très peu d'eau et soumis à un fort ensoleillement, ces microorganismes se retrouvent à devoir se développer dans un milieu extrême hypersalin :

c'est la prolifération des organismes halophiles. Les halophiles sont, en effet, les habitants des lacs salés ou des lagunes côtières où l'évaporation est intense et la concentration en sel élevée. Ces milieux naturels hypersalés sont par exemple, la Mer Morte, les sebkhas d'Afrique du Nord, le Grand Lac Salé et le Salton Sea aux Etats-Unis (Pelmont, 1993). Les microorganismes halophiles mettent, ainsi, en place des mécanismes de résistance pour pouvoir survivre, ils peuvent par exemple, se « charger » de pigments caroténoïdes (Podell *et al.*, 2013 ; Ghai *et al.* 2011). Ainsi, les marais salants, contenant une saumure à 20-30% de NaCl (eau de mer 3,5%), se teintent souvent de couleurs extraordinaires allant du jaune au rouge vif donnant, vu du ciel, une palette de tons généralement superbes.

Plusieurs facteurs environnementaux jouent un rôle sur le développement des microorganismes halophiles et notamment celui des algues (De Reviers, 2002) et donc sur la production de norisoprénoïdes (Exton *et al.*, 2012) :

- La **lumière** : indispensable aux organismes photosynthétiques (même si certaines algues sont mixotrophes<sup>④</sup>). Chaque espèce a son point de compensation, c'est-à-dire, une zone où la photosynthèse compense exactement les dépenses énergétiques : les algues rouges par exemple, ayant un faible point de compensation peuvent se développer plus en profondeur. Le niveau de l'eau (influencé ou non par les marées) ainsi que la photopériode sont également des paramètres importants dans la perception de la lumière et jouent un véritable filtre sur les espèces en présence.
- La **température** : elle varie principalement avec la latitude. Les microorganismes savent s'adapter à tous types de température, les rendant plus ou moins endémiques d'une région (comme par exemple l'algue *Ascoseira* qui ne se trouve qu'au niveau du continent Antarctique). Il est possible toutefois de définir 7 zones biogéographiques principalement établies sur la base de profondes modifications de la faune et de la flore côtières à leurs frontières (Lüning, 1990). De plus, dans un milieu donné, la température présente des variations journalières dans les zones émergées ou peu profondes. D'autres variations, plus longues, seront, quant à elles, liées à la saison (Apple *et al.*, 2006 ; De Toni *et al.*, 2009).
- La **salinité** : elle influence la pression osmotique de la cellule. Si elle est élevée, la cellule va perdre son eau, inversement, si la salinité est trop basse, la cellule peut éclater. Les microorganismes vivant en milieu salin ne sont donc généralement pas

adaptés aux eaux douces et *vice et versa*. L'algue *Dunaliella salina*, par exemple, équilibre sa pression osmotique en synthétisant du glycérol, alors que l'archée *Halobacterium*, protège sa membrane par adjonction de dérivés de caroténoïdes. Ces différents systèmes d'adaptation à de fortes salinités, permettent à ces organismes de se développer dans des eaux très concentrées en sel comme celles des marais salants. Ces microorganismes sont colorés par des pigments caroténoïdes qui masquent la chlorophylle et teintent d'ailleurs les eaux de ces marais en orange. Dans la zone de balancement des marées, les microorganismes peuvent subir des variations de salinité liées à l'immersion. En cas de dessiccation (soleil, vent, comme c'est le cas dans les salins), le milieu cellulaire se concentre et le sel cristallise à la surface ; au niveau des microorganismes, le contact est donc très important entre le produit issu des marais salants et son environnement. A *contrario*, une pluie peut apporter de l'eau douce plus ou moins brutalement.

- **La durée d'émersion** : souvent liée aux marées, cette durée peut aller jusqu'à 12 heures pour les algues des couches supérieures (un cycle de marée). La plus grande conséquence des émergences est la dessiccation, qui peut, qui plus est, être amplifiée par le vent, l'ensoleillement ou le gel pouvant entraîner la mort de la cellule et la libération de ses composés dans le milieu environnant.

Il y a donc un gradient vertical de contraintes auquel les organismes sont soumis et une cellule, ne supportant pas un ou plusieurs des stress induits par une modification de ces contraintes, verra sa distribution altitudinale limitée. Ces conditions sélectives entraînent des peuplements contrastés, aisément observables et caractéristiques des divers niveaux et zones géographiques. La maîtrise du développement des microorganismes du marais salant est indispensable pour les paludiers car il a été prouvé que l'interaction entre l'environnement et le biotope qu'il contient pouvait également être important : en l'absence de microorganisme, la production de sel est moins rapide et moins efficace (Oren, 2002b) :

- La communauté de microorganismes colorés (les archées et les *Dunaliella* ou les matières mortes des cyanobactéries dans les bassins les plus concentrés) permet d'augmenter la capacité d'absorption lumineuse des saumures : la température des eaux peut monter au-delà de 41°C augmentant ainsi la vitesse d'évaporation et donc la formation des cristaux.

- Les cyanobactéries (*Aphanothece halophytica*, *Cyanothece*, *Halothece*...) produisent ainsi des polysaccharides qui jouent un rôle important dans la tenue des bassins d'évaporation : ils étanchéifient les marais en réduisant les infiltrations ou les fuites d'eau en formant une couche protectrice dans le fond des bassins.
- La présence d'archées (tels que *Salinicoccus halitifaciens*) elle-même, influence la formation et la qualité des cristaux : l'enveloppe de ces halobactéries peut, en effet, servir de « modèle » initial dans la formation du cristal (point d'ancrage et forme générale). La cristallisation est ainsi induite et orientée par la croissance des bactéries du milieu, qui régulent leur concentration intracellulaire *via* des pompes à ions Na<sup>+</sup> notamment lors de leur multiplication (Castanier *et al.*, 1998 ; Oren, 2002b ; Oren, 2010 ; Venkata Ramana *et al.*, 2013).

L'effet bénéfique du biote sur la production encourage donc les paludiers à entretenir leur marais en respectant les microorganismes mais aussi en les contrôlant. Ainsi, une forte concentration en microorganismes (bloom), peut réduire le temps de formation des cristaux car les bassins, trop engorgés ne sont plus à la bonne température et/ou le soleil ne parvient plus à leur transmettre son énergie évaporatrice. Dans le cas particulier des cyanobactéries, leur trop forte concentration peut saturer le milieu en polysaccharides et réduire ou empêcher toute cristallisation. Les cristaux alors récoltés sont d'ailleurs souvent sales et/ou avec des teneurs trop importantes en magnésium ou en sulfate. Le savoir-faire des sauniers est donc important car celui-ci doit constamment surveiller un environnement microscopique afin de garantir une production de sel optimale (Oren, 2002b). C'est d'ailleurs lorsque la concentration en microorganismes des eaux est optimale pour la formation des cristaux qu'ils peuvent récolter leurs plus « beaux sels » : gros cristaux, légèrement colorés et odorants. L'environnement peut donc directement impacter sur les caractéristiques des cristaux de sel produits au cœur des salins. Qui plus est, à la fin de leur cycle de vie, les cellules mortes libèrent dans les bassins leur contenu cellulaire qui est alors dégradé *via* différentes voies : thermique, enzymatique... c'est alors que l'ADN bactérien peut se fixer sur les cristaux en formation (certains microorganismes encore vivants pourront même être emprisonnés) ou que peuvent être produits les dérivés des caroténoïdes. Ces norisoprénoïdes pouvant notamment être responsables de l'odeur de violette qui peut « diffuser » au dessus de certains marais salants durant un court instant.

#### IV.1.2. Variation des composés volatils : quelques éléments d'explication

Les caroténoïdes sont présents dans certains organites (chloroplastes par exemple) au niveau des complexes antennaires où ils jouent un rôle de pigments auxiliaires pour la photosynthèse. La forte absorption des caroténoïdes de la lumière bleue leur permet de transférer de l'énergie à la chlorophylle et de protéger celle-ci de la photooxydation. Ainsi au niveau des marais salants, ce sont souvent les caroténoïdes qui sont responsables de la couleur des eaux, véritables révélateurs de la vie microscopique qui y réside. Les cristaux de sel formés dans cet environnement « rougeoyant » se retrouvent donc tout naturellement légèrement teintés eux-mêmes, tout au moins lors de leur formation. C'est ainsi qu'il peut subsister sur le sel ou dans l'eau des marais des traces de caroténoïdes ou de dérivés de ces caroténoïdes dégradés sous l'effet d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux.

Dans cette thèse, la microextraction sur phase solide en espace de tête couplée à la CG-SM a permis de définir de façon fiable, simple, économique et assez rapidement les molécules volatiles présentes dans la saumure ou les sels. Au total plus de 107 composés volatils ont pu être mis en évidence. La moitié d'entre eux sont des norisoprénoïdes présentant un squelette en C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>. Ces CDC rentrent notamment en jeu dans la composition du bouquet odorant des différents échantillons étudiés (Tableau XXXIII) apportant entre autres, des notes sucrée, fruitée, florale ainsi que de violette et de tabac. Ces données, bien qu'incomplètes (la littérature (Flavor Base, 2007) n'offrant, en effet, la caractérisation olfactive que d'un nombre limité des CDC identifiés) confirment les observations des paludiers relatives à l'odeur de fleur ou de violette de certains produits (fleurs de sel notamment).

**Tableau XXXIII.** Notes olfactives liées à quelques CDC identifiés dans les échantillons de saumures ou de sel des quatre bassins étudiés

Composés	Notes olfactives*	Origine			
		Ile de Ré	Noirmoutier	Saint Armel	Guérande
1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,5,5-triméthylnaphtalén-2-ol ( <i>cis</i> - $\alpha$ -ambrinol)	<i>Forte, terreuse, animale, rappelant l'ambre gris</i>			X	
5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-2(4 <i>H</i> )-benzofuran-1-one (dihydroactinidiolide (DHA))	<i>Sucrée, fruitée-florale type osmanthus, tabac</i>	X	X	X	
2,6,6,10-tétraméthyl-1-oxaspiro[4,5]déc-9-ène (théaspirane)	<i>Sucrée, boisée, fruitée, faiblement camphrée rappelant l'ionone</i>			X	
2,2,6-triméthylcyclohexan-1,4-dione	<i>Faible, acide, thé, tabac</i>	X			
2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one	<i>Tabac, camphrée</i>	X	X	X	
2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1,4-dione (4-cétoisophorone)	<i>Tabac, foin, thé</i>	X	X	X	X
3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one (isophorone)	<i>Verte, camphrée. En dilution, odeur de miel et de tabac</i>	X	X	X	X
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-butan-2-ol (dihydro- $\beta$ -ionol)	<i>Sucrée, florale, avec un arrière fond légèrement boisée</i>			X	
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-butan-2-one (dihydro- $\alpha$ -ionone)	<i>Boisée, fruitée, iris-violette, framboise</i>			X	
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol ( $\beta$ -ionol)	<i>Florale, violette, fruitée, boisée, baies, légèrement poudrée</i>	X	X	X	X
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-ol ( $\alpha$ -ionol)	<i>Florale, violette, vetiver, baies</i>			X	
(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one ((E)- $\alpha$ -ionone)	<i>Boisée, balsamique, violette, framboise</i>		X	X	X

\* Identifiées à l'aide du logiciel Flavor base (2007)

## IV.2. Marqueurs géographiques

Bien que cette étude ait démontré une grande variabilité des paramètres de mesures (ADNr-16S, composés volatils) en fonction du type d'échantillonnage, est-il possible de définir des marqueurs géographiques du sel produits dans les bassins de l'Île de Ré, de Guérande, de Noirmoutier et de Saint-Armel ? On entend par marqueur géographique tout élément chimique (ex : composé volatil) ou microbiologique (ex : ADNr-16S) permettant de caractériser précisément l'origine d'un échantillon.

### IV.4.1. Marqueurs géographiques génétiques : l'ADNr-16S

Dans ce travail, la présence de traces d'ADN bactérien, notamment *via* l'étude sur l'ADNr-16S a ainsi permis de mettre en évidence la corrélation entre un marais et son sel, puisque les profils obtenus en DGGE soulignent le lien qui existe entre une origine et le type de génome retrouvé sur les échantillons de sels. Les « **empreintes génomiques** » de chaque sel peuvent s'expliquer par la différence d'environnement dans lequel les cristaux se sont formés : salinité, qualité de l'eau, teneur en nutriments, température, pH... qui peuvent varier en fonction des saisons, des années mais aussi des latitudes (Oliveira *et al.*, 2012).

Ainsi, bien que certains types d'ADNr-16S mis en évidence soient commun à plusieurs échantillons (cas de l'ADN de *Gracilomonas tropica* et de celui *Balneola vulgaris*, par exemple), d'autres semblent caractériser plus spécifiquement une origine :

- ⇒ **L'Île de Ré** pourrait être en partie, définie par la présence spécifique de *Pseudomonas halophila*.
- ⇒ **Noirmoutier**, par celle de *Persicobacter diffluens*
- ⇒ **Saint-Armel**, par celle d'*Halanaerobium saccharolyticum*.
- ⇒ En revanche, aucun ADNr-16S spécifique n'a pu être mis en évidence pour les échantillons de sels de **Guérande** étudiés.

Bien que ces résultats soient à confirmer et à consolider par l'extension de l'étude à d'autres marais salants, il semble donc que les traces d'ADN puissent dans certains cas, être un outil de traçabilité dans le cadre d'une étude de caractérisation géographique du sel de mer. Cette « signature bactérienne » présente l'avantage de se retrouver d'un type de sel à l'autre pour un même bassin d'origine alors que des différences peuvent déjà être observées pour des bassins relativement proches (100 Km seulement entre l'Île de Ré et Noirmoutier et déjà des marqueurs différents mis en évidence, par exemple). Par ailleurs, comme cette étude a pu le

démontrer (*via* des ensemencements) mais aussi comme cela a été prouvé dans d'autres études sur des halites fossiles (McGenity *et al.*, 2000 ; Jayappripan *et al.*, 2010), ces traces d'ADN, bien que diminuées, peuvent être détectées après plusieurs années de stockage. Certaines archées peuvent même survivre plusieurs années voire même plusieurs centaines de milliers d'années dans des « poches » d'eau résiduelles hypersalines internes aux cristaux de sel (Norton & Grant, 1988 ; Casamayor *et al.*, 2002), l'étude de leur ADN permettrait donc d'affiner encore plus les résultats précédents.

#### IV.4.2. Marqueurs géographiques chimiques : les composés volatils

Outre leur rôle de marqueurs génétiques de l'origine, les microorganismes peuvent aussi être à l'origine de **marqueurs géographiques chimiques**. En effet, dans les marais salants, existe une véritable synergie entre voie biologique et voie photochimique de dégradation des molécules (caroténoïdes). Il s'agit d'un processus continu : le cycle jour / nuit, fait varier l'exposition des microorganismes au soleil, et donc stimule la dégradation bactérienne au niveau des marais. La photopériode, contrôle ainsi en partie le taux de microorganismes présents et les composés qu'ils « produisent » (Miller & Moran, 1997).

Si les analyses HS/SPME/CG-SM menées sur les eaux des marais et les sels ont permis de tracer des profils olfactifs propres à chaque bassin, elle ne permettent pas en revanche de définir systématiquement des marqueurs spécifiques à chaque bassin.

Ainsi, dans le cas des *eaux des marais*, ont pu être attribués des marqueurs spécifiques uniquement pour :

⇒ **L'Ile de Ré** : le 3,4,5-triméthylcyclopent-2-én-1-one et le  $\beta$ -santalène.

⇒ **Saint Armel** : le 3,3-diméthyl-octane-2,7-dione.

Dans le cas des *sels*, des marqueurs spécifiques ont été associés uniquement aux bassins de :

⇒ **Noirmoutier** : le 1-méthyl-dodécylbenzène.

⇒ **Saint Armel** : l'heptadécane, l'heptadéc-8-ène, le 2,3-diméthylcyclohexan-1-ol, le 3,3,5,5-tétraméthylcyclohexan-1-one et le dihydroactinidiolide.

A l'issue de cette étude, il apparaît donc que l'utilisation des composés volatils en tant que marqueurs géographiques ne puisse se faire uniquement sur la base de quelques composés



spécifiques d'un bassin (présents dans un bassin, absents dans les autres) mais plutôt à partir d'un **profil olfactif global**.

Par ailleurs, l'utilisation des composés volatils en tant que marqueurs d'une origine, afin d'assurer la protection des produits salins et d'éviter les contrefaçons semble délicate à mettre en œuvre et exigera la mise en place de conditions particulières de traitement et de stockage des sels. En effet, pour atteindre cet objectif, les analyses seront nécessairement conduites sur les produits commerciaux (sel ou fleur de sel) et non sur les eaux des marais. Or, la présente étude a montré que la plupart des échantillons de sel ou de fleur de sel étaient dépourvus de composés volatils. Ceci s'explique par le fait que ces échantillons ont subi un traitement thermique pour les rendre conformes aux attentes du consommateur (sel blanc et sec). Ce blanchiment détruit alors les résidus naturels pouvant éventuellement encore se trouver sur ou dans le cristal ou les dégrade au point de ne plus les rendre détectables par les techniques mises en place. De plus, il est à noter que les transferts entre le sel et son environnement ne s'arrêtent pas là pour autant et il n'est pas rare de retrouver sur le sel de commerce, des phtalates, composés présents par exemple, dans certains plastiques utilisés pour le stockage temporaire du sel ou pour sa commercialisation (emballage de vente).

Afin de conserver au mieux les caractéristiques organoleptiques des sels, il faudrait donc que les producteurs de sel veillent à ce que : (1) le temps de séchage soit minimum ; (2) le stockage se fasse à l'abri de la lumière, avec des températures comprises entre 20 et 25°C et dans un bocal en verre opaque. Ces précautions permettront de diminuer toute dégradation ultérieure des composés colorants et/ou odorants et d'éviter le transfert de composés « polluants » pouvant provenir de l'emballage.

# CONCLUSION

---

Ces dernières années, plusieurs études ont été menées pour prouver le lien effectif qui existe entre un marais (eau, sel) et son environnement. C'est dans ce cadre que s'est inscrit ce travail de thèse, en abordant deux axes d'étude : microbiologique *via* l'analyse des **traces d'ADN** présentes sur le sel, et chimique *via* l'étude des **composés volatils** issus du marais et de son sel. Des échantillons d'eaux et de sels provenant de quatre marais salants de la côte Atlantique française (Ile de Ré, Noirmoutier, Saint-Armel et Guérande) ont été étudiés afin de déterminer s'il existe réellement un lien entre site de production (bassin) et produits (sels, fleurs de sel).

L'analyse des traces d'ADNr-16S bactérien s'est faite respectivement par PCR, DGGE, séquençage et cytométrie de flux. Elle a permis de déterminer trois marqueurs **marqueurs génétiques d'origine** pouvant caractériser l'Ile de Ré (*Pseudomonas halophila*), Noirmoutier (*Persicobacter diffluens*) et Saint-Armel (*Halanaerobium saccharolyticum*). Même si l'ADN bactérien résiduel et/ou dormant apparaît ainsi comme une signature biologique fiable (falsification difficile), rapide (moins de 24h) et facile à mettre en œuvre, des études supplémentaires sur les microorganismes des marais, notamment sur l'ADN d'archées, genre majoritaire dans les marais, devraient être conduites pour permettre de mieux définir l'empreinte génomique de chaque marais.

L'analyse des composés volatils s'est faite *via* une extraction SPME couplée à une CG-SM. Bien que n'ayant pu définir systématiquement des marqueurs chimiques spécifiques à chaque bassin, la présente étude a mis en évidence des profils olfactifs propres à chaque bassin. Il est à noter que chacun des bouquets olfactifs caractérisés, présentait une forte teneur en norisoprénoïdes dont la présence est étroitement liée à celle des microorganismes. Ces résultats, bien qu'issus d'un échantillonnage très hétérogène, permettent de valider les observations organoleptiques des paludiers (couleur et odeur spécifiques d'un marais salant) et de confirmer les premiers résultats obtenus en 2009 sur le bouquet spécifique d'un marais (Silva *et al.*, 2009). Une nouvelle campagne d'échantillonnage sur plusieurs années consécutives devrait être menée, à raison d'un prélèvement d'eau tous les six mois et d'un échantillon de sel par année, afin de définir plus spécifiquement les marqueurs chimiques répétitifs dans le temps.

Il n'existe donc pas un mais des sels et les sels récoltés à la main dans des marais tels que ceux du littoral Atlantique possèdent chacun une identité qui doit leur permettre d'être reconnu par les consommateurs (Gouin & Perraud, 2011 ; Drake S.L. & Drake M.A., 2011).

En 1995, le sel moulu (fin) et le gros sel des Salines de Guérande deviennent ainsi les seuls produits salins européens détenteurs d'un label rouge. En mars 2012, ces mêmes Salines de Guérande obtiennent l'IGP Sel de Guérande (Indication Géographique Protégée). Ce sigle de qualité reconnu au niveau européen assure la protection du produit (le sel) dont la réputation est liée à son territoire. Et même si, du fait du lien très fort entre saison et qualité du produit, un label est difficile à pérenniser au cours du temps pour ce type de produit, car le cahier des charges de tels sigles qualité se base sur des seuils minimums précis qu'il ne faut pas dépasser (teneur en certains minéraux par exemple), la preuve que du sel labellisé existe depuis maintenant presque dix ans, est que ce type de démarche est tout à fait possible. En effet, il s'agit à la fois de défendre et de valoriser une origine mais aussi une méthode de production manuelle et artisanale provenant d'un savoir-faire ancestral.

Même si les enjeux d'obtention de ce type de label sont tout aussi économiques qu'environnementaux, le désir d'acquisition de tels signes qualité par les sauniers prouve néanmoins que le sel et son environnement sont intimement liés, ne serait-ce qu'à travers le savoir-faire régional et les observations des producteurs.

Enfin, le peu de littérature disponible sur le(s) lien(s) entre le sel lui-même, les marais dont il est issu et les conclusions de ce travail de recherche (reposant en grande partie sur des méthodes d'analyses microbiologiques et chimiques) laissent à penser que marais et produits salins n'ont pas fini de surprendre par leur variété et leur richesse. Tant de pistes à étudier. Tant de domaines à explorer. Ces premiers résultats ne sont qu'un « petit grain de sel dans l'Océan des Possibles »...

# LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

---

## TABLEAUX

Tableau I.	Teneur en sel de quelques aliments classés par ordre croissant .....	20
Tableau II.	Principales caractéristiques physico-chimiques du chlorure de sodium. ....	28
Tableau III.	Comparaison de la consommation de sel par secteur d'utilisation en milliers de tonnes en France et aux Etats-Unis (2011).....	38
Tableau IV.	Réglementation relative au sel iodé et fluoré .....	43
Tableau V.	Les différentes classes de terpènes. ....	67
Tableau VI.	Récapitulatif des échantillons à disposition (eaux, sels). ....	116
Tableau VII.	Correspondance échantillons / codes. ....	124
Tableau VIII.	Résultats des observations au microscope des états frais et des colorations de Gram.....	128
Tableau IX.	Nombre de microorganismes mis en évidence pour les eaux des marais. ....	128
Tableau X.	Résultats colorimétriques (eaux des marais). ....	135
Tableau XI.	Synthèse des résultats du dénombrement de microorganismes, de l'étude de couleur et du nombre de norisoprénoïdes mis en avant pour les eaux de Saint-Armel échantillons 2009. ..	146
Tableau XII.	Paramètres testés pour optimiser l'extraction de composés volatils issus des eaux ou du sel de marais par SPME. ....	161
Tableau XIII.	Conditions d'analyse par CG-SM. ....	162
Tableau XIV.	Correspondance échantillons / codes échantillons. ....	164
Tableau XV.	Correspondance composés volatils / code composé. ....	164
Tableau XVI.	Conditions testées pour définir le type de fibre utilisé. ....	167
Tableau XVII.	Conditions testées pour définir le type d'extraction utilisée. ....	167
Tableau XVIII.	Conditions testées pour définir la durée de l'extraction. ....	168
Tableau XIX.	Conditions testées pour définir la température d'extraction. ....	168
Tableau XX.	Conditions testées pour définir la quantité d'échantillon à utiliser pour chaque extraction. ....	169
Tableau XXI.	Conditions testées pour connaître la nécessité de l'agitation. ....	169
Tableau XXII.	Conditions testées pour définir le type de verrerie à utiliser. ....	170
Tableau XXIII.	Conditions optimales pour l'extraction de composés volatils par SPME à partir de matrice sels ou saumures. ....	171
Tableau XXIV.	Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de l'Ile de Ré.....	174
Tableau XXV.	Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Noirmoutier.....	178
Tableau XXVI.	Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Saint-Armel. ....	181

Tableau XXVII. Analyse HS-SPME / CG-SM des composés volatils des saumures et des fleurs de sel de Guérande.....	188
Tableau XXVIII. Composés chimiques caractéristiques de l'échantillon SA1SE09.....	194
Tableau XXIX. Composés chimiques caractéristiques des échantillons SAMFE09.....	194
Tableau XXX. Composés chimiques caractéristiques des échantillons SA1SE10.....	195
Tableau XXXI. Nombre total de composés détectés par marais (tous échantillons confondus).....	202
Tableau XXXII. Composés communs mis en évidence dans les différentes études sur les sels et eaux des marais d'origines diverses.....	208
Tableau XXXIII. Notes olfactives liées à quelques CDC identifiés dans les échantillons de saumures ou de sel des quatre bassins étudiés.....	221

## FIGURES

Figure 1. Structure cristalline du NaCl.....	27
Figure 2. Schéma et photographies de l'extraction minière du sel gemme.....	31
Figure 3. Obtention de sel ignigène à partir de saumures souterraines.....	32
Figure 4. Un marais salant.....	33
Figure 5. Obtention des différents sels et conditionnement.....	37
Figure 6. Evolution de la production mondiale de sel entre 2007 et 2011 en millions de tonnes (toutes origines confondues).....	40
Figure 7. Répartition de la production de sel en France.....	41
Figure 8. Réaction cyclique d'amplification par PCR.....	55
Figure 9. Les trois étapes clé de la PCR : Dénaturation, hybridation, polymérisation.....	56
Figure 10. Migration des amplicons sur gel dénaturant pour isolement des fragments et identification (DGGE).....	57
Figure 11. Schéma général du fonctionnement de la cytométrie en flux.....	58
Figure 12. Synthèse des méthodes moléculaires pour l'analyse des communautés microbiennes d'un échantillon.....	59
Figure 13. Résumé des processus cellulaires impliqués dans la biosynthèse des composés volatils.....	66
Figure 14. Unité isoprénique en C <sub>5</sub> et Isoprène ou 2-méthyl-1,3-butadiène.....	67
Figure 15. Série terpénique - Enchaînement des unités isopréniques « tête-queue » et « queue-queue ».....	68
Figure 16. Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP) à partir de l'acétyl-CoA...	70
Figure 17. Voie de MEP.....	72
Figure 18. Elongation de la chaîne isoprénique.....	74
Figure 19. Principaux squelettes monoterpéniques.....	75
Figure 20. Exemples de monoterpènes acycliques.....	76
Figure 21. Exemples de monoterpènes monocycliques.....	77
Figure 22. Exemples de monoterpènes bicycliques.....	78
Figure 23. Principaux squelettes sesquiterpéniques.....	79
Figure 24. Exemples de sesquiterpènes linéaires.....	80
Figure 25. Exemples de sesquiterpènes monocycliques.....	81
Figure 26. Exemples de sesquiterpènes bicycliques.....	82

Figure 27. Exemples de sesquiterpènes tricycliques. ....	83
Figure 28. Exemples de sesquiterpènes polycycliques.....	83
Figure 29. Exemples de pigments de caroténoïdes. ....	84
Figure 30. Les différentes voies de dégradation des caroténoïdes. ....	85
Figure 31. Principales coupures de caroténoïdes conduisant à la formation de norisoprénoïdes. ....	86
Figure 32. Exemple de coupures des caroténoïdes conduisant à la formation de norisoprénoïdes. ....	87
Figure 33. Exemples de norisoprénoïdes C <sub>9</sub> -C <sub>13</sub> . ....	88
Figure 34. Les précurseurs des phénylpropanoïdes et des benzénoïdes. ....	89
Figure 35. Principaux phénylpropanoïdes.....	89
Figure 36. Exemples de benzénoïdes. ....	89
Figure 37. Formation de dérivés d'acides gras.....	91
Figure 38. Formation de dérivés d'acides aminés. ....	92
Figure 39. Formation de dérivés soufrés d'acides aminés. ....	92
Figure 40. Porte fibre et fibre SPME.....	94
Figure 41. Vue schématique de la structure d'un pore de Carboxen 1006.....	96
Figure 42. Microextraction.....	97
Figure 43. Les différents modules de la chromatographie gazeuse.....	99
Figure 44. Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	104
Figure 45. Localisation des échantillons analysés.....	112
Figure 46. (A) Bloom d'algue à Saint-Armel ; (B) Echantillonnage de l'eau des marais. ....	113
Figure 47. Récolte des échantillons de sel .....	114
Figure 48. Différence de couleur d'eau des marais.....	114
Figure 49. Gros sel, fleur de sel et sel fin.....	115
Figure 50. Etude des échantillons d'eau par l'ARVAM, différence de couleur après remise en culture .....	129
Figure 51. Différentes formes de <i>Dunaliella</i> spp. lorsqu'elles sont exposées à de fortes salinités et/ou températures. ....	130
Figure 52. Microalgues <i>Dunaliella</i> présentes dans l'eau des marais de St-Armel (œillet) .....	130
Figure 53. Exemples de colonies de bactéries non-identifiées observées sur PCA 3,5% sel.....	131
Figure 54. Exemples de colonies de levures ou de moisissures non-identifiées observées sur Malt 3,5% sel... ..	132
Figure 55. Concentration estimée des microorganismes en fonction de leur zone géographique. ....	133
Figure 56. La perception visuelle de la couleur peut être représentée selon un système simple de 3 variables : la luminosité (value, L*), la couleur (hue, h*) et l'intensité (chroma, C*). ....	134
Figure 57. Diagramme chromatique, système CIE. ....	134
Figure 58. Répartition des échantillons en fonction de leur couleur et de leur origine. ....	135
Figure 59. Exemples de différence de couleurs entre les eaux des marais.....	135
Figure 60. Bandes d'ANDr-16S mises en évidence après PCR-DGGE pour 4 sels de mer d'origines géographiques différentes. ....	137
Figure 61. Analyse factorielle des correspondances pour les bandes d'ADNr-16S obtenues après DGGE à partir de sels de 4 différentes zones géographiques. ....	138
Figure 62. Dendrogramme basé sur l'analyse de l'ADNr-16S sur DGGE des sels de différentes origines. ....	139

Figure 63. Teneur en microorganismes des différentes eaux.....	141
Figure 64. Variation de la couleur des eaux en fonction des bassins.....	141
Figure 65. Evolution des microorganismes des eaux au cours du temps.....	142
Figure 66. Réponses métaboliques de <i>Dunaliella salina</i> au stress abiotique de son milieu.....	144
Figure 67. Corrélations entre la couleur (valeur de C*) de la saumure des marais de Saint-Armel et d'autres paramètres.....	147
Figure 68. Corrélation entre la couleur des eaux pour l'ensemble des bassins étudiés et (A) la présence en microalgues (tous bassins confondus) ; (B) la teneur en norisoprénoïdes.....	149
Figure 69. Résultats de l'ACP entre microorganismes et couleur.....	153
Figure 70. Résultats de l'ACP entre microorganismes, couleur et composés volatils.....	155
Figure 71. Colonies non-pigmentées (barres blanches) et pigmentées (barres noires) en fonction de la teneur en sel du milieu.....	158
Figure 72. (A) Dispositifs expérimentaux pour l'extraction par SPME des composés volatils émis par les saumures (B) et les fleurs de sel (C).....	160
Figure 73. Microextraction sur phase solide en espace de tête et analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HS-SPME / CG-SM) de la saumure de Saint-Armel (lot 1).....	172
Figure 74. Composés volatils caractéristiques des eaux des marais de l'Ile de Ré (été 2009).....	176
Figure 75. Composés volatils caractéristiques de la fleur de sel des marais de l'Ile de Ré (été 2009).....	177
Figure 76. Composés volatils caractéristiques des eaux de Noirmoutier (été 2009).....	179
Figure 77. Composé volatil caractéristique de la fleur de sel commerciale de Noirmoutier (achat 2009).....	179
Figure 78. Composés volatils caractéristiques des eaux de Saint-Armel (étés 2009 et 2010).....	185
Figure 79. Autres composés volatils caractéristiques des eaux des marais de Saint-Armel (été 2009).....	186
Figure 80. Composé volatil caractéristique de la fleur de sel de Saint-Armel (marais 2009 et commerciale 2007).....	187
Figure 81. Composés volatils caractéristiques des eaux des marais du Mès et de La Coyée (étés 2010 et 2009).....	190
Figure 82. Représentation graphique en ACP de la projection des échantillons de saumure et de Fleur de sel suivant les axes 1 et 2 en considérant les régions de production.....	192
Figure 83. Représentation graphique en ACP des composés chimiques des échantillons de saumure et de Fleur de sel suivant les axes 1 et 2 en considérant les régions de production.....	193
Figure 84. Représentation graphique en ACP de la projection des échantillons de saumure et de Fleur de sel suivant les axes 1 et 2 en considérant les campagnes de production (2007, 2009 et 2010).....	196
Figure 85. Représentation graphique en ACP de la projection des échantillons suivant les axes 1 et 2 en considérant le type de sel (saumure et de Fleur de sel).....	197
Figure 86. Dendrogramme obtenu par CAH des échantillons de saumure et de Fleur de sel.....	198
Figure 87. Nombre de composés volatils détectés dans les eaux des marais en fonction du type d'échantillon analysé.....	199
Figure 88. Nombre de composés volatils détectés dans les eaux des marais en fonction de l'année de récolte de l'échantillon.....	200



Figure 89. Nombre de composés volatils détectés dans l'eau des marais en fonction de l'origine de l'échantillon. .....	202
Figure 90. Composés volatils spécifiques aux eaux des marais de l'Ile de Ré, Noirmoutier, Guérande et Saint-Armel. ....	204
Figure 91. Composés volatils spécifiques aux sels de l'Ile de Ré, Noirmoutier, Guérande et Saint-Armel. ....	205
Figure 92. Exemples de voies (naturelles et artificielles) de dégradation du $\beta$ -carotène. ....	209
Figure 93. Dégradation du $\beta$ -carotène (et de ses dérivés) sous l'effet de la chaleur. ....	211
Figure 94. Formation de norisoprénoïdes sous l'effet de la lumière chez certaines algues.....	212
Figure 95. Exemples de clivages enzymatiques du $\beta$ -carotène .....	213
Figure 96. Exemples de clivages enzymatiques de l' $\alpha$ -carotène .....	213
Figure 97. Exemples de dégradations de caroténoïdes par des enzymes fongiques.....	214

# BIBLIOGRAPHIE

---

## Publications et ouvrages littéraires complets (ordre alphabétique)

- Adams R.P. (2004) Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation.
- Alvarez L.A. (2009) Exton D.A., Timmis K.N., Suggett D.J., McGenity T.J., Characterization of marine isoprene-degrading communities, *Environmental Microbiology* 11 (12), 3280-3291.
- Antón J., Peñal A., Santos F., Martínez-García M., Schmitt-Kopplin P., Rosselló-Mora R. (2008) Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*, *BioMed Central, Saline Systems*, 4-15.
- Antón J., Rosselló-Mora R., Rodríguez-Valera F., Amann R. (2000) Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7), 3052-3057.
- Apple J.K., Del Gioglio P.A., Kemp W.M. (2006) Temperature regulation of bacterial production, respiration, and growth efficiency in a temperate salt-marsh estuary, *Aquatic microbial ecology* 43, 243-254.
- Arcuri E.F., El Sheikha A.F., Rychlik T., Piro-Métayer I., Montet D. (2013) Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE : Preliminary application to traditional Minas cheese, *Food Control* 30, 1-6.
- Baati H., Guerhazi S., Amdouni R., Gharsallah N., Sghir A., Ammar E. (2008) Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern, *Extremophiles* 12, 505-518.
- Baldermann S., Kato M., Kurosawa M., Kurobayashi Y., Fujita A., Fleischmann P., Watanabe N. (2010) Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour, *Journal of Experimental Botany* 61(11), 2967–2997.
- Bardavid R.E., Khristo P., Oren A. (2008) Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* 12, 5-14.

- Baribault C. (2003) Ca ne manque pas de Sel !, *Alternative santé* 301, mensuel, 40p.
- Baumes R., Wirth J., Bureau S., Gunata Y.Z., Razungles A. (2002) Biogenesis of C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines, *Analytica Chimica Acta* 458, 3-14.
- Ben-Amotz A., Polle J.E.W., Subba Rao D.V. (2009) *The Alga Dunaliella. Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*, Science Publishers, Enfield, NH, 555p.
- Bialecki A., Smadja J. (2014) Identification of Volatile Compounds from Flowers and Aromatic Plants: How and Why?, *Chemistry: The Key to our Sustainable Future*, éd. M. Gupta Bhowon, S. Jhaumeer-Laulloo, H.L. Kam Wah, P. Ramasami, 15-39.
- Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Sgorbini B., Rubiolo P. (2007) Reliability of fibres in solid-phase microextraction for routine analysis of the headspace of aromatic and medicinal plants, *Journal of Chromatography A* 1152, 138-149.
- Bohlmann J., Meyer-Gauen G., Croteau R. (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4126-4133.
- Boujelben I., Gomariz M., Martínez-García M., Santos F., Peña A., López C., Antón J., Maalej S. (2012) Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia, *Antonie van leeuwenhoek* 101, 845-857.
- Bouwmeester H.J., Gershenzon J., Konings M.C.J.M., Croteau R. (1998) Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway - Demonstration of enzyme activities and their changes with development, *Plant Physiology* 117(3), 901-912.
- Breitmaier E. (2006) *Terpenes, Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 214p.
- Britton G. (2008) Function of carotenoids metabolites and breakdown products, *Carotenoids: natural functions*, vol. 4. Birkhäuser Publ., Basel, Switzerland, 309-324.
- Casamayor E.O., Massana R., Benlloch S., Ovreas L., Diez B., Goddard V.J., Gasol M., Joint I., Rodriguez-Valera F., Pedros-Alio C. (2002) Changes in archeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern, *Environmental Microbiology* 4(6), 338-348.

- Castanier S., Perthuisot J-P., Matrat M., Morvan J-Y. (1999) The salt ooids of Berre salt works (Bouches du Rhône, France): the role of bacteria in salt crystallisation, *Sedimentary geology* 125, 9-21.
- Choi D.H., Zhang G.I., Noh J.H., Woong-Seo K., Cho B.C. (2009) *Gracilimonas tropica* gen. nov., sp. nov., isolated from a *Synechococcus* culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1167-1172.
- Christianson D. W. (2008) Unearthing the roots of the terpenome, *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 141-150.
- Codex Alimentarius Volume 1A, Section 5 (2006) Normes codex pour le sel de qualité alimentaire, codex STAN 150-1985 (Rév.1-1997, amend. 1-1999, 2001 et 2006), 5p.
- Colas A. (1994) *Le Sel*, PUF 3ème édition, Que sais-je, 127p.
- Collins A.M., Jones H.D.T., Han D., Hu Q., Beechem T.E., Timlin J.A. (2011) Carotenoids distribution in living cell of *Haemotococcus pulvialis* (chlorophyceae), éd. T. Evens, US dept. Of Agriculture - Agricultural research service (USDA-ARS), United States of America, *PLoS ONE* 6 (9), 1-7.
- Connolly, J.D., Hill R.A. (1991) *Dictionary of terpenoids*. London, Chapman and Hall.
- Crouzet J., Kanasawud P., Sakho M. (2001) Thermal generation of carotenoid-derived compounds, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, American chemical society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 9, 115-129.
- Cundy A.B., Croudace I.W., Thomson J., Lewis J.T. (1997) Reliability of salt marshes as “geochemical recorders” of pollution input: a case study from contrasting estuaries in southern England, *Environnemental Sciences and Technology* 31(4), 1093-1101.
- Cundy A.B., Croudace I.W., Warwick P.E., Oh J-S., Haslett S.K. (2002) Accumulation of COGEMA-La Hague-derived reprocessing wastes in french salt marsh sediments, *Environnemental Sciences and Technology* 36(23), 4990-4997.
- Cuny J-F. (2005) *Le Sel que j’aime*, éd. Hachette, 125p.
- De Reviere B. (2002) *Biologie et phylogénie des algues*, tome 1, Belin Sup, 352p.
- De Toni A., Touron-Bodilis A., Wallet F. (2009) Effet du changement climatique sur les micro-organismes aquatiques pathogènes : quelques exemples, *Environnement, risques et santé* 8(4), 311-321.

- Dewulf J., Van Langenhove H. (2002) Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography, Trends in Analytical Chemistry 21(9-10), 637-645.
- Direction générale de l'alimentation (2013) Rapport du groupe PNNS / PNA sur le sel, Ministère de l'agriculture, l'agroalimentaire et de la forêt, 204p.
- Donadio C., Bialecki A., Valla A., Dufossé L. (2011) Carotenoid-derived aroma compounds detected and identified in brines and speciality sea salt (fleur de sel), produced in solar salterns from Saint-Armel (France), Journal of Food Composition and Analysis 24, 801-810.
- Drake S.L., Drake M.A. (2011) Comparison of salty taste and time intensity of sea and land salts from around the world, Journal of sensory studies 26, 25-34.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I. (2006) Plant volatiles: recent advances and futur perspectives, Critical Reviews in Plant Sciences 25, 417-440.
- Dufossé L., Donadio C., Valla A., Meile J-C., Montet D. (2013) Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR–DGGE: An application on marine salts produced in solar salterns from the French Atlantic Ocean, Food Control 32(2), 644-649.
- Dyall-Smith M.L., Pfeiffer F., Klee K., Palm P., Gross K., Schuster S.C., Rampp M., Oesterhelt D. (2011) *Haloquadratum walsbyi*: limited diversity in a global pond, PLOS ONE 6(6), 23p.
- El Sheikha A.F., Durand N., Sarter S., Okullo J.B.L., Montet D. (2012) Study of the microbial discrimination of fruits by PC-DGGE: application to the determination of the geographical origin of Physalis fruits from Colombia, Egypt, Uganda and Madagascar, Food Control 21, 57-63.
- Exton D.A., McGenity T.J., Steinke M., Suggett D.J. (2012) Spatial and temporal variability of biogenic isoprene emissions from a temperate estuary, Global biogeochemical cycles 26(2).
- Exton D.A., Suggett D.J., McGenity T.J., Steinke M. (2013) Chlorophyll-normalized isoprene production in laboratory cultures of marine microalgae and implications for global models, Association for the Sciences of Limnology and Oceanography, 58(4), 1301-1311.
- Fazeli M.R., Tofighi H., Samadi N., Jamalifar H. (2006) Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran, Bioresource Technology 97(18), 2453-2456.

- Ferris M.J., Muyzer G., Ward G.M. (1996) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities, *Molecular Microbial Ecology Manual* 34, 1-23.
- Flament I., Ohloff G. (1984) Volatile constituents of algae, odoriferous constituents of seaweeds and structure of nor-terpenoids identified in asakusa-nori flavour, *Progress in flavour research*, éd. J. Adda. Proceeding of the 4th. Weurman Flavour research symposium, 281-300.
- Fleischmann P., Lutz-Röder A., Winterhalter P., Watanabe N. (2001) Carotenoid cleavage enzymes in animals and plants, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, American chemical society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 6, 76-88.
- Friedrich J.E., Acree T.E. (2001) Analyzing carotenoid-derived aroma compounds using gas chromatography-olfactometry, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, American chemical society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 5, 67-74.
- Fu H-Y., Chang Y-N., M Jheng M-J., Yang C-S (2012) Ser262 determines the chloride-dependent colour tuning of a new halorhodopsin from *Haloquadratum walsbyi*, *Bioscience reports* 23, 501-509.
- Gauvin A. (2006) Analysis and characterization of essential oils using GC-MS, *The encyclopedia of Mass Spectrometry* 8, Elsevier, Oxford, UK, éd. W. Niessen.
- Gerdes S.M., Winterhalter P., Ebeler S.E. (2001) Effect of sunlight exposure on norisoprenoid formation in white riesling grapes, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, American chemical society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 19, 262-272.
- Gershenzon J., Croteau R.B. (1993) Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In *Lipid metabolism in plants*, TS, éd. CRC Press, Boca Raton, 340-388.
- Gershenzon J., Dudareva N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world, *Nature Chemical Biology* 3(7), 408-414.
- Ghai R., Pasic L., Fernandez A.B., Martin-Cuadrado A-B., Megumi Mizuno C., Mc Mahon K.D., Papke R.T., Stepanauskas R., Rodriguez-Brito B., Rohwer F., Sanchez-Porro C., Ventosa A., Rodriguez-Valera F. (2011) New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments, *Scientific reports* 1(135), 10p.

- Gómez P.I., Barriga A., Cifuentes A.S., González M.A. (2003) Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta, Biological Research 36, 185-192.
- Goto T., Takahashi N., Hirai S., Kawada T. (2010) Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism, PPAR Research 2010, 9p.
- Gouin S., Perraud C. (2011) Coopératives de sel du littoral Atlantique : quelle réflexion stratégique produits / marchés développer face aux perceptions, usages et attitudes des consommateurs ? Société Française d'Economie Rurale, Actes « Les entreprises coopératives agricoles, mutations et perspectives », 13 p.
- Gross M.L., Caprioli R. (2003) The encyclopedia of mass spectrometry, éd. M.L. Gross et R. Caprioli, Elsevier Science.
- Haila K.M., Nielsen B.R., Heinonen M.I., Skibsted L.H. (1997) Carotenoid reaction with free radicals in acetone and toluene at different oxygen partial pressures: An ESR spin-trapping study of structure-activity relationships, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A, European food research and technology 204(2), 81-87.
- Harborne J.B. (1991) Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids, éd. J.B. Harborne et F.A. Tomas-Barberan, Clarendon Press, 396-426.
- Heidelberg K.B., Nelson W.C., Holm J.B., Eisenkolb N., Andrade K., Emerson J.B. (2013) Characterization of eukaryotic microbial diversity in hypersaline Lake Tyrrell, Australia, Frontiers in Microbiology 4, 115.
- Hejazi M.A., Barzegari A., Gharajeh N.H., Hejazi M.S. (2010) Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalgae *Dunaliella*, Saline System 6(4), 11p.
- Hercberg S. (2002) Une politique de santé publique pour réduire les apports de sel en France. Les recommandations du Groupe de Travail « Sel » de l'AFSSA. INSERM / CNAM, Paris, 1p.
- Herderich M. (2001) HPLC-MS analysis of carotenoid-derived aroma precursors, American chemical society, Carotenoid-Derived Aroma Compounds, American chemical society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 3, 36-55.

- Hernández M., Morgante V., Flores C., Villalobos P., González M., Miralles P., Dinamarca A., Seeger M. (2008) Modern approaches for the study of s-triazine herbicide bioremediation in agricultural soils, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 8(2), 19-30.
- Heyndrickx M., Vauterin L., Vandamme P., Kersters K., De Vos P. (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy, *Journal of Microbiological Methods* 26, 247-259.
- Jaenicke L. (1998) Clara Hamburger and *Dunaliella salina* Teodoresco - a case study from the first half of the XX<sup>th</sup> century, *Protist* 149, 381-388.
- Jayappriyan K.R., Rajkumar R., Kannan P.R., Divya S., Rengasamy R. (2010) Significance of 18S rDNA specific primers in the identification of genus *Dunaliella*, *Journal of Experimental Sciences* 1(1), 27-31.
- Joulain D., König W.A. (1998) The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Hamburg: E.B-Verlag, 658p.
- Knapp H., Straubinger M., Stingl C., Winterhalter P. (2001) Analysis of norisoprenoid aroma precursors, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, American chemical society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 2, 20-35.
- Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C.H., Bino R.J., Wijffels R.H. (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology* 26, 631-638.
- Le Nguyen D.D., Ngoc H.H., Dijoux D., Loiseau G., Montet D. (2008) Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: an application on Pangasus fish from Viet Nam. *Food Control* 19 (5), 454-460.
- Lee H.S., Coates G.A. (2003) Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, Food Science and Technology 36(1), 153-156.
- Leesing R. (2005) Identification and validation of specific markers for traceability of aquaculture fish for import/export, mémoire de thèse, Université de Montpellier 2, p.183.
- Li L.Y., Huang Q.J., Wu S.H., Lin D., Chen J.H., Chen Y.Q. (2008) The spatial and temporal distribution of microalgae in the South China Sea: evidence from GIS-based



analysis of 18S rDNA sequences, *Science in China Series C: Life Sciences* 51(15), 1121-1128.

- Li S., Weber S.G. (1999) Selectivity of SPME, *Applications of Solid Phase Microextraction*, éd. J. Pawliszyn, The Royal Chemistry, Cambridge, 49-56.
- Lichtenthaler H.K. (1999) The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1), 47-65.
- Liebler D.C., McClure T.D. (1996) Antioxidant reactions of  $\beta$ -carotene: identification of carotenoid - Radical adducts, *Chemical Research in Toxicology* 9(1), 8-11.
- Litchfield C.D., Gillevet P.M. (2008) Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28(1), 48-55.
- Lüning K. (1990) *Seaweeds: Their environment, biogeography and ecophysiology*. Wiley, New York, 544p.
- Mani V. (1999) Properties of commercial coatings, *Applications of solid phase microextraction*, éd. J. Pawliszyn, The Royal Chemistry, Cambridge, 57-72.
- Margesin R., Schinner F. (2001) Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology, *Extremophiles* 5, 73-83.
- Marín N., Morales F., Lodeiros C., Tamigneaux E. (1998) Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities, *Journal of Applied Phycology* 10, 405-411.
- Martín J.F., Gudiña E., Barredo J.L. (2008) Conversion of  $\beta$ -carotene into astaxanthin: two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microbial Cell Factories* 7(3), 6p.
- McGenity T.J., Gemmell R.T., Grant W.D., Stan-Lotter H. (2000) Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits, *Environmental Microbiology* 2(3), 243-250.
- Mendes-Pinto M.M. (2009) Carotenoid breakdown products, the norisoprenoids, in wine aroma, *Biochemistry and Biophysics* 483(2), 236-245.
- Mendes-Pinto M.M., Ferreira A.C.S., Caris-Veyrat C., Guedes de Pinho P. (2013) Monitoring carotenoids and derived compounds in grapes and port wines: impact on

quality, carotenoid cleavage products, éd. P. Winterhalter et S.E. Ebeler, chapitre 12, 139-154.

- Menet M.C. (2011) Principes de la spectrométrie de masse, Revue Francophone des Laboratoires, 41-53.
- Miller W.L., Moran M.A. (1997) Interaction of photochemical and microbial processes in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment, *Limnology and Oceanography* 42(6), 1317-1324.
- Moinier B. (1997) Sel et société, Une affaire de métier, éd. Nathan, 159p.
- Mortain-Bertrand A, Rey P. (1997) El Amrani A., Lamant A., Pyrophosphatase inorganique et synthèse de carotène chez *Dunaliella salina*, *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris* 317, 489-493.
- Mouron R., Michel J-C., Vasquez-Lopez R. (1999) Panorama des activités minières en France en 1999, Bureau de Recherches Géologiques et Minières, 1-19.
- Muramatsu Y., Takahashi M., Kaneyasu M., Iino T., Suzuki K-I, Nakagawa Y. (2010) *Persicobacter psychrovividus* sp. nov., isolated from shellfish, and emended descriptions of the genus *Persicobacter* and *Persicobacter diffluens*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1735-1739.
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA, *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Negre-Zakharov F., Long M.C., Dudareva N. (2009) Floral scents and fruit aromas inspired by nature, *Plant-derived Natural Products*, éd. A.E. Osbourn et V. Lanzotti, 405-431.
- Norton C.F., Grant W.D. (1988) Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals, *Journal of General Microbiology* 134, 1365-1373.
- Obiol-Pardo C., Rubio-Martinez J., Imperial S. (2011) The methylerythritol phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis as a target for the development of new drugs against tuberculosis, *Current Medicinal Chemistry* 18(9), 1325-1338.
- Oh D., Porter K., Russ B., Burns D., Dyall-Smith M. (2012) Diversity of *Haloquadratum* and other haloarchaea in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds, *Extremophiles* 14(2), 161-169.

- Oliveira V., Santos A.L., Aguiar C., Santos L., Salvador A.C., Gomes N.C.M, Silva H., Rocha S.M., Almeida A., Cunha A. (2012) Prokaryotes in salt marsh sediments of Ria de Aveiro: Effects of halophyte vegetation on abundance and diversity, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 110, 61-68.
- Oren A. (2002a) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.
- Oren A. (2002b) Halophilic microorganisms and their environments, *Cellular origin and life in extreme habitats*, 600p.
- Oren A. (2002c) Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria, *FEMS Microbiology ecology* 39, 1-7.
- Oren A. (2010) Thoughts on the “missing link” between saltworks biology and solar salt quality, *Global NEST journal* 12(4), 417-425.
- Oren A., Rodriguez-Valera F. (2001) The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds (1), *Federation of European Microbiological Societies, Microbioly Ecology* 36(2-3), 123-130.
- Parker M., Pollnitz A.P., Cozzolino D., Francis I.L., Herderich M.J. (2007) Identification and quantification of a marker compound for “Pepper” aroma and flavor in Shiraz grape berries by combination of chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(15), 5948-5955.
- Pawliszyn J. (1999) Solid phase microextraction theory, solid phase microextraction a practical guide, Sue Ann Scheppers Wercinski, éd. M. Dekker, 257p.
- Pelmont J. (1993) Bactéries et environnement, *Adaptations Physiologiques*, Collection Grenoble Sciences, éd. Presses Universitaires de Grenoble, 899p.
- Pinet P.R. (2013) *Invitation to Oceanography*, 6<sup>ème</sup> Edition, Jones & Bartlett Learning, 612p.
- Podell S., Ugalde J.A., Narasingarao P., Banfield J.F., Heidelberg K.B., Allen E.E. (2013) Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem, *PLoS ONE* 8(4).
- Prescott L-M., Harley J-P., Klein D-A. (2003) *Microbiologie*, 2<sup>ème</sup> édition française, traduction de la 5<sup>ème</sup> édition américaine par Claire-Michelle Bacq-Calberg et Jean Dusart., éd. De Boeck, 1137p.

- Price P.B., Todd Sowers (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(13), 4631-4636.
- Rafson H.J. (1998) *Odor and VOC control handbook*, éd. McGraw-Hill, 800 p.
- Rainey F.A., Zhilina T.N., Boulygina E.S., Stackebrandt E., Tourova T.P., Zavarzin G.A. (1995) The taxonomic study of the fermentative halophilic bacteria: description of Haloanaerobiales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., Orenia gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level, *Anaerobe* 1, 185-199.
- Raja R., Iswarya S.H., Balasubramanyam D., Rengasamy R. (2007) PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics, *Microbiological Research* 162, 168-176.
- Ramos A.A., Polle J., Tran D., Cushman J.C., Jin E.S., Varela J.C. (2011) The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives, *Algae* 26(1), 3-20.
- Ramos-Valdivia A.C., Van der Heijden R., Verpoorte R. (1997) Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function, *Natural Product Reports* 14, 591-603.
- Riyahi J, Haouazin Y., Akallal R., Mouradi A., Creach A., Givernaud T., Mouradi A. (2007) Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en b-carotène de *Dunaliella salina*, *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* 146, 235-250.
- Rodríguez-Bustamante E., Maldonado-Robledo G., Ortiz M.A., Díaz-Avalos C., Sanchez S. (2005) Bioconversion of lutein using a microbial mixture-maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium, *Applied Microbiology and Biotechnology* 68, 174-182.
- Rodríguez-Bustamante E., Sanchez S. (2007) Microbial production of C<sub>13</sub>-norisoprenoids and other aroma compounds *via* carotenoids cleavage, *Critical reviews in Microbiology* 33, 211-230.
- Rohdich F., Hecht S., Gärtner K., Adam P., Krieger C., Amslinger S., Arigoni D., Bacher A., Eisenreich W. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 1158-1163.

- Rohmer M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* 16, 565-574.
- Salazar K., McNutt M.K. (2013) Mineral commodity summaries 2013, Salt, U.S. Department of the interior and U.S. Geological Survey, éd. USGS Science for a changing world, 198p.
- Sánchez-Contreras A., Jiménez M., Sanchez S. (2000) Bioconversion of lutein to products with aroma, *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 528-534.
- Saponetti M.S., Bobba F., Salerno G., Scarfato A., Corcelli A., Cucolo A. (2011) Morphological and structural aspects of the extremely halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*, *PLoS ONE* 6(4), 9p.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E. (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds, *The plant journal* 54 (4), 712-732.
- Sergeant M.J., Li J-J., Fox C., Brookbank N., Rea D., Bugg T.D.H., Thompson A.J. (2009) Selective inhibition of carotenoid cleavage dioxygenases, *Journal of Biological Chemistry* 284(8), 5257-5264.
- Serrano R., Nácher-Mestre J., Portolés T., Amat F., Hernández F. (2011) Non-target screening of organic contaminants in marine salts by gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Talanta* 85, 877-884.
- Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S., Myers R.M. (1989) Attachment of 40 bp G + C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 232-236.
- Shirey R.E. (1999) SPME fibers and selection for specific applications, solid phase microextraction, a practical guide, Sue Ann Scheppers Wercinski, éd. M. Dekker, 257p.
- Siems W., Wiswedel I., Salerno C., Crifò C., Augustin W., Schild L., Langhans C-D., Sommerburg O. (2005)  $\beta$ -Carotene breakdown products may impair mitochondrial functions - potential side effects of high-dose  $\beta$ -carotene supplementation, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16(7), 385-397.
- Silva I., Rocha S.M., Coimbra M.A. (2009) Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry methodology for analysis of volatile compounds of marine salt as potential origin biomarkers, *Analytica Chimica Acta* 635, 167-174.

- Silva I., Rocha S.M., Coimbra M.A., Marriott M.J. (2010a) Headspace solid phase microextraction combine with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for the determination of volatile compounds from marine salt, *Journal of Chromatography A* 1217, 5511-5521.
- Silva I., Rocha S.M., Coimbra M.A. (2010b) Quantification and potential aroma contribution of  $\beta$ -ionone in marine salt, *Flavour and Fragrance Journal* 25, 93-97.
- Singh R.J. (2011) *Solid state physics*, Pearson Education India éd. Kindle, 604p.
- Sorokin D.Y., Tindall B.J. (2006) The status of the genus name *Halovibrio Fendrich* 1989 and the identity of the strains *Pseudomonas halophila* DSM 3050 and *Halomonas variabilis* DSM 3051. Request for an opinion, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 487-489.
- Stashenko E.E., Martínez J.R. (2012) GC-MS Analysis of volatile plant secondary metabolites in gaz chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific application, éd. Dr. Bekir Salih, InTech, chapitre 12, 247-270.
- Sun Z., Hans J., Walter M.H., Matusova R., Beekwilder J., Verstappen F.W.A., Ming Z., Van Echtelt E., Strack D., Bisseling T., Bouwmeester H.J. (2008) Cloning and characterisation of a maize carotenoid cleavage dioxygenase (ZmCCD1) and its involvement in the biosynthesis of apocarotenoids with various roles in mutualistic and parasitic interactions, *Planta* 228(5), 789-801.
- Tatsadjieu N.L., Maiworé J., Hadjia M.B., Loiseau G., Montet D., Mbofung C.M.F. (2010) Study of the microbial diversity of *Oreochromis niloticus* of three lakes of Cameroon by PCR-DGGE: application to the determination of the geographical origin, *Food Control* 21, 673-678.
- Trigui H., Masmoudi S., Brochier-Armanet C., Barani A., Grégori G., Denis M., Dukan S., Maalej S. (2011) Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and pylogenetic analysis, *Extremophiles* 15, 347-358.
- Urios L., Agogué H., Lesongeur F., Stackebrandt E., Lebaron P. (2006) *Balneola vulgaris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* from the north-western Mediterranean Sea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1883-1887.
- Van Hannen E.J., Zwart G., Van Agterveld M.P., Gons H.J., Ebert J., Laanbroek H.J. (1999) Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of

filamentous cyanobacteria associated with viruses, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 795-801.

- Venkata Ramana C., Srinivas A., Subhash Y., Tushar L., Mukherjee, Kiran P.U., Sasikala C. (2013) *Salinicoccus halitifaciens* sp. Nov., a novel bacterium participating in halite formation, *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 885-898.
- Waché Y., Bosser-De Ratuld A., Belin J-M. (2001) Production of aroma compounds by enzymatic cooxidation of carotenoids, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, American chemical society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 8, 102-113.
- Wen H., Yang L., Shen L., Hu B., Li Z., Jin Q. (2009) Isolation and characterization of culturable halophilic microorganisms of salt ponds in Lianyungang, China, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1727-1732.
- Winterhalter P., Rouseff R.L. (2001a) Carotenoid-derived aroma compounds, *American Chemical Society*, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, 323p.
- Winterhalter P., Rouseff R.L. (2001b) Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction, *carotenoid-derived aroma Compounds*, American Chemical Society, éd. P. Winterhalter et R.L. Rouseff, chapitre 1, p.1-17.
- Ye Z-W., Jiang J-G., Wu G-H. (2008) Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects, *Biotechnology Advances* 26(4), 352-360.
- Zhang C., Qi M., Shao Q., Zhou S., Fu R. (2007) Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort., using HS-SPME-GC-MS, *Pharmaceutical Biomedical Analysis* 44, 464-470.
- Zedler J.B., Bonin C.L., Larkin D.J., Varty A. (2008) Salt marshes, *Ecosystems*, 3132-3141.
- Zorn H., Langhoff S., Scheibner M., Nimtz M., Berger R.G. (2003a) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta,\beta$ -carotene to flavor compounds, *Biological Chemistry* 384(7), 1049-1056.
- Zorn H., Langhoff S., Scheibner M., Berger R.G. (2003b) Cleavage of  $\beta,\beta$ -carotene to flavor compounds by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62(4), 331-336.

### **Sites Internet (ordre alphabétique des pages d'accueil)**

- ASSELVIA, Association pour le sel au service de la viabilité hivernale, [www.asselvial.fr](http://www.asselvial.fr), site consulté le 20/01/2013, dernière mise à jour en 2012.

- CSF, Comité des Salines de France, [www.salines.com](http://www.salines.com), site consulté le 20/01/2013, dernière mise à jour le 01/01/2013.
- Google Map, <https://maps.google.fr>, site consulté le 04/01/2014, dernière mise à jour en 2014.
- Info Terre, le visualisateur de données géoscientifiques, [infoterre.brgm.fr](http://infoterre.brgm.fr), site consulté le 23/04/2014, dernière mise à jour en 2014.
- Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, [www.developpement-durable.gouv.fr/-Natura-2000,2414-.html](http://www.developpement-durable.gouv.fr/-Natura-2000,2414-.html), site consulté le 23/01/2013, dernière mise à jour le 23/01/2013.
- NIST, WebBook de Chimie NIST, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, site consulté le 03/04/2011, dernière mise à jour en 2011.
- Salt, [www.saltinstitute.org](http://www.saltinstitute.org), site consulté le 23/01/2013, dernière mise à jour le 15/01/2013.

### **Logiciels (ordre alphabétique des auteurs)**

- GE Healthcare Amersham Biosciences (2003) ImageQuant TL, Etats-Unis.
- Joulain D., König W.A., Hochmuth D.H. (2008) Terpenoids and related constituents of essential oils. MassFinder 4. éd Hochmuth D.H. Convenient and Rapid Analysis of GCMS, Hamburg, Allemagne.
- Leffingwell et associés (2007) Flavor Base 2007 Professional, Canton, Etats-Unis.
- McLafferty F.W. (2009) Wiley Registry of Mass Spectral Data, 9<sup>ème</sup> éd.
- National Institute of Standards and Technology (2011) Mass spectral database for windows (data version: NIST11).
- Shimadzu Scientific Instruments (2011) BioSpec-Nano.



# ANNEXES

---

# SOMMAIRE DES ANNEXES

## **ANNEXE 1 : POSTERS SCIENTIFIQUES ET PUBLICATIONS..... 250**

Poster IUFoST 2010 - World congress of food science and technology - Cape Town, South Africa .....	251
Poster Food integrity and tracability conference 2014 - Queen's University Belfast, England.....	252
Publication Journal of Food Composition and Analysis 2011.....	253
Publication Food Control 2013.....	263

## **ANNEXE 2 : VULGARISATION ..... 269**

Poster de doctoriales 2012.....	270
Article de presse - Témoignages (interview de Manuel Marchal 15/06/2011).....	271
Article de presse - Le Figaro (Yves Miserey, le 05/07/2013).....	273

## **ANNEXE 3 : METHODES D'EXTRACTION DES COMPOSES VOLATILS PAR HEADSPACE**

### **DYNAMIQUE ..... 275**

« Closed-Loop Stripping » .....	276
« Pull systems » .....	276
« Push-pull systems » .....	277

## **ANNEXE 4 : PROTOCOLE DE RECOLTE DES ECHANTILLONS..... 279**

## **ANNEXE 5 : DESCRIPTION DES COLONIES ENSEMENCEES SUR PCA ET MALT-AGAR ET**

### **OBSERVEES A L'ŒIL NU POUR L'ENSEMBLE DES ECHANTILLONS DES EAUX DES MARAIS ..... 281**

## **ANNEXE 6 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES : MICROORGANISMES ET COULEUR DES MARAIS (TOUTES ORIGINES CONFONDUES)..... 284**

Matrice ACP 1. Bactéries - Levures - Microalgues - Chroma.....	285
Matrice ACP 2. Bactéries - Levures - Microalgues - Couleur - Total composés volatils - Total norisoprénoides.....	285

## **ANNEXE 7 : LISTE DES COMPOSES VOLATILS IDENTIFIES LORS DES ANALYSES SPME / CG- SM ..... 286**

## ANNEXE 1 : Posters scientifiques et publications

- [1] *Carotenoid-derived aroma compounds in speciality sea salt products, towards scientific elements in order to associate the products with a region of production* - C. Donadio, A. Bialecki, J. Brune, L. Adama, A. Rochefeuille, A. Shum Cheong Sing, A. Valla, L. Dufossé (IUFoST 2010 - World congress of food science and technology - Cape Town, South Africa, 2010).
- [2] *Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities* - J-C. Meile, C. Donadio, A. Valla, D. Montet, L. Dufossé, (Food integrity and tracability conference 2014 - Belfast, England, 2014).
- [3] *Carotenoid-derived aroma compounds of speciality sea salts produced in solar salterns from Saint-Armel (France), a first step towards scientific elements in order to associate salt products with a region of production* - C. Donadio, A. Bialecki, A. Valla, L. Dufossé - Journal of Food Composition and Analysis vol. 24, 801-810, 2011.
- [4] *Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on marine salts produced in solar salterns from the French Atlantic Ocean* - L. Dufossé, C. Donadio, A. Valla, J.C. Meile, D. Montet - Food Control vol. 32, 644-649, 2013.



## CAROTENOID-DERIVED AROMA COMPOUNDS IN SPECIALITY SEA SALT PRODUCTS,

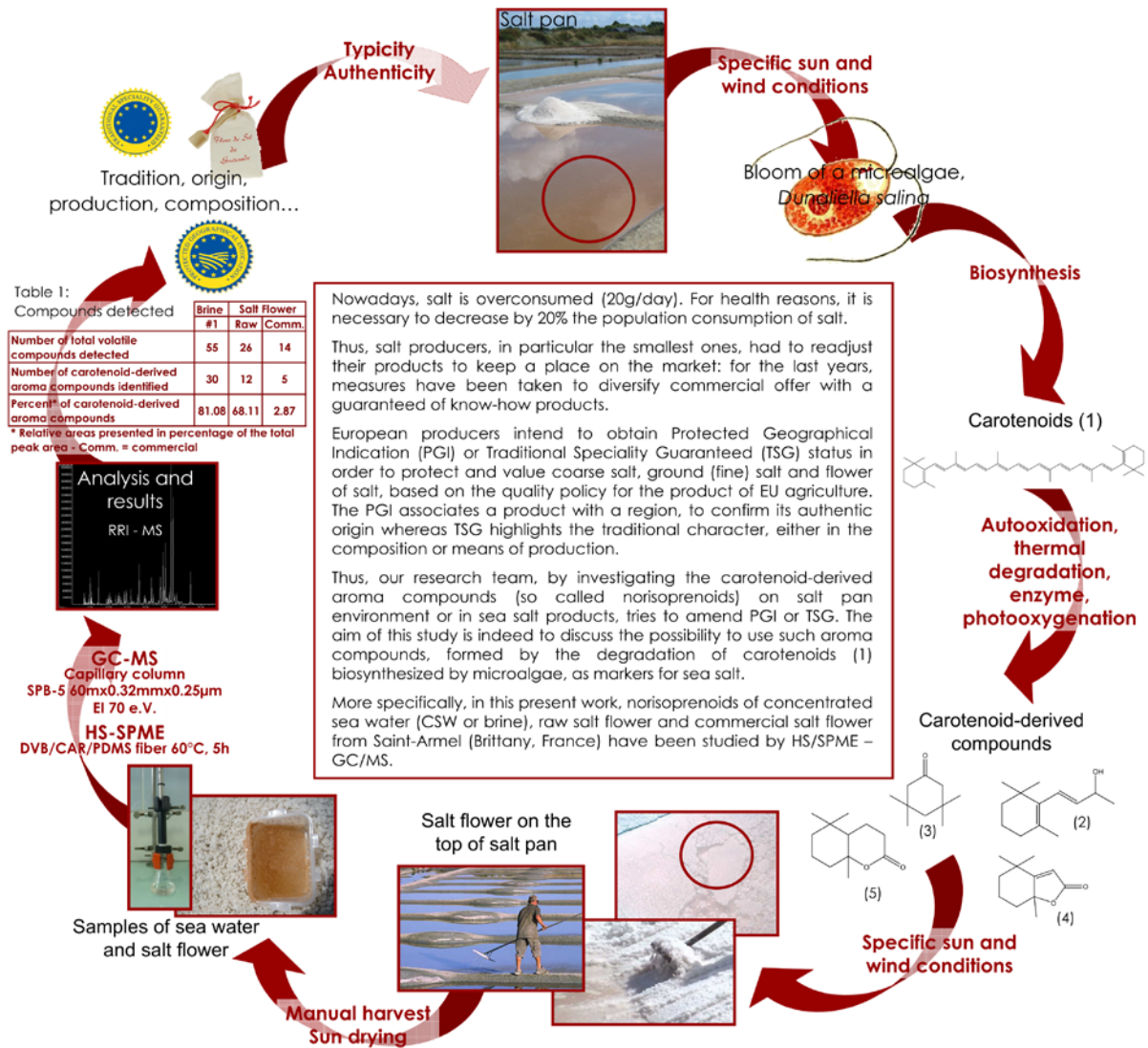
Towards scientific elements in order to associate the products with a region of production

Clara Donadio<sup>1</sup>, Anne Bialecki<sup>1</sup>, Justine Brune<sup>1</sup>, Laurie Adama<sup>1</sup>, Angélique Rochefeuille<sup>1</sup>, Alain Shum Cheong Sing<sup>1</sup>, Alain Valla<sup>2</sup>, and Laurent Dufossé<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de La Réunion, LCSNSA & ESIROI-IDAI, Reunion Island, France

<sup>2</sup> CNRS, Quimper, France

Clara.donadio@univ-reunion.fr



A total of 63 volatile compounds were identified among which a considerable number of apparently carotenoid-derived compounds (table 1). Many of volatile carotenoid metabolites present the current C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, and C<sub>13</sub> skeletons frequently described in the literature.

Each sample have specific qualitative and quantitative characteristics. A link seems to exist between microalgae concentration (orange colour), sun treatment for drying (evaporation or destruction of some compounds) and aroma (included norisprenoïds).

Despite the differences observed between the studied samples, 4 common norisprenoïds were identified: 3,3,5,5-tetramethylcyclohexan-1-one (2), dihydroactinidiolide (3), β-ionol (4), and trans-octahydro-5,5,8a-trimethyl-2H-1-benzopyran-2-one (5). Thus, it could be assumed that these 4 carotenoid-derived compounds may be used as tracers to characterize salt from Saint-Armel.

However, these results are the first data about the aroma of sea salt. Our sampling campaign is still currently running at a worldwide level in order to obtain enough evidences that corroborate our hypothesis that the flavor profile and the geographical origin are related.

# Determination of specialty food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities

**S**PECIALTY salt producers intend to access Protected Geographical Indication (PGI) status in order to protect and value coarse salt, ground (fine) salt and salt flower. The PGI associates a product with a region, to confirm its authentic origin. The first PGI obtained by marine salt producers was those of Guérande (France) in 2012. In order to further characterize and associate a salt product with its region of production, we searched for a microbial signature that could be rapidly detected at the molecular level. To this end, bacterial communities of salts from different French Atlantic coast locations were analyzed and compared. The 16S rDNA fingerprinting method used provides an overview of the diversity of bacteria by detecting both cultivable and non-cultivable germs in a given ecosystem. Our results showed that it is possible to statistically link the bacterial ecology of salts and its geographical origin.

Jean-Christophe MEILE<sup>1</sup>, Clara DONADIO<sup>2</sup>,  
Alain VALLA<sup>3</sup>, Didier MONTET<sup>1</sup>,  
Laurent DUFOSSÉ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UMR 95 Quailud, CIRAD, 73 rue Jean-François Breton  
F-34398 Montpellier cedex 5, France

<sup>2</sup> Université de La Réunion, Laboratoire de Chimie  
des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments,  
Ecole Supérieure d'Ingénieurs Réunion Océan Indien  
Département Innovation et Développement

Agroalimentaire Intégré,  
2, rue Joseph Wetzell, Parc Technologique Universitaire F-97490

<sup>3</sup> CNRS, Chimie et Biologie des Substances Naturelles  
F-29000 Quimper, France

Contact: jean-christophe.meile@cirad.fr

## Material and method

- Raw salt flower (collected at the surface of the salt pan, before landing and bleaching under sun drying) (Fig. 1) and marketed salt flower (after sun drying) from four locations of the French Atlantic Ocean coast (north west of France, Fig. 2).
- Total DNA was extracted from samples by using a DNA purification kit based on magnetic silica beads (Ademtech, France).
- The V3 variable region of 16S rDNA was PCR amplified by using JCM2 (GC<sub>cl</sub>amp-40-ACGGGAGGCAGCA, derived from gc338f) and 518r (ATTACCGCGGCTGCTGG) primers.
- PCR products were analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) by using a Bio-Rad Dcode TM universal mutation detection system.
- Statistical comparisons between DGGE patterns were based on the presence/absence of co-migrating DNA bands in the corresponding samples (1).
- Discriminating DNA bands were further PCR-amplified and sequenced for identification (see Fig. 3).



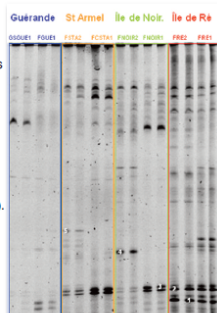
Figure 1. Manual harvesting of specialty marine salt (fleur de sel) in Saint-Armel solar ponds (France).



Figure 2. Geographical localisation of sampling sites in France.

## Results

Figure 3. PCR-DGGE band patterns of bacterial 16S rDNA of salt samples of four different geographical origins. Identification of DNA bands: *Pseudomonas halophila* (1); *Gracilimonas tropica* (2); *Balneola vulgaris* (3); *Persicobacter diffluens* (4); *Halanaerobium saccharolyticum* (5).



- DGGE patterns showed variations between salt samples, exhibiting 10-20 discrete bands with various intensities (Fig. 3)
- Factorial analysis (PCA) was used to describe most (>63%) of the variation in the dataset and showed that the bacterial ecology of salt samples tend to vary according to the geographical origins of salts (Fig. 4).
- The five DNA markers sequenced correspond to halophilic or halotolerant bacterial species previously isolated from marine or saline samples (see Fig. 3).

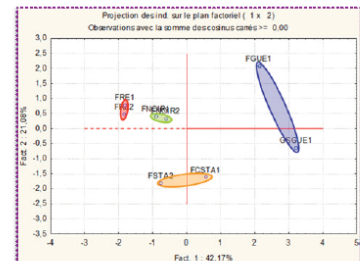


Figure 4. Factorial variance analysis of bacterial (16S rDNA) DGGE patterns of salt samples of four different geographical origins.

## Discussions & perspectives

- Residual DNA and/or dormant bacteria appear as a quasi-permanent biological signature or barcode and can be easily used as a reliable traceability marker for salt products, specific of the origin of production, stable and very difficult (if not impossible) to falsify.
- Global molecular approaches of bacterial ecology could be used as a rapid analytical traceability tool for salt products.
- The analysis will be extended to a comprehensive set of samples from additional geographical locations and various years of harvest to test the robustness of the approach.
- The method will be coupled to rapid DNA profiling methods (2) to deliver a faster, cost-effective method for salt bacterial ecology analyses (see Fig.5).

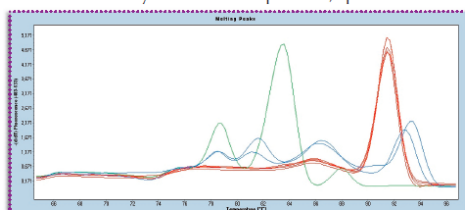


Figure 5. Melting profile of bacterial DNA populations from different salt samples.

### References

- (1) Determination of specialty food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on marine salts produced in solar salt pans from the French Atlantic Ocean. Dufosse L., Donadio C., Valla A., Meile J.C., Montet D. Food Control, 32, 2, 644-649 (2013)
- (2) High Resolution Melt analysis for rapid comparison of bacterial community composition. Hjeltnes M.H., Hansen L.H., Bælum J., Feld L., Holben W.E., Jacobsen C.S. Appl Environ Microbiol. 2014 Mar 7. PMID: 24610653



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfca](http://www.elsevier.com/locate/jfca)



Original Article

## Carotenoid-derived aroma compounds detected and identified in brines and speciality sea salts (*fleur de sel*) produced in solar salterns from Saint-Armel (France)

Clara Donadio<sup>a</sup>, Anne Bialecki<sup>a</sup>, Alain Valla<sup>b</sup>, Laurent Dufossé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de La Réunion, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, Ecole Supérieure d'Ingénieurs Réunion Océan Indien, Département Innovation et Développement Agroalimentaire Intégré, 2 rue Joseph Wetzell, Parc Technologique Universitaire, F-97490 Sainte-Clotilde, France

<sup>b</sup> CNRS, Chimie et Biologie des Substances Naturelles, F-29000 Quimper, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2010  
Received in revised form 4 March 2011  
Accepted 5 March 2011  
Available online 12 March 2011

Keywords:

*Fleur de sel*  
Flower of salt  
Brine  
Solid-phase microextraction  
Carotenoid-derived aroma compounds  
Norisoprenoid  
*Dunaliella salina*  
Food analysis  
Food composition  
Solar salterns

ABSTRACT

The flavor compounds of brines and *fleur de sel* collected in solar salterns from Saint-Armel (Brittany, France) were investigated by means of headspace-solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME/GC–MS) analysis in order to find elements to link the salt product and its area of production. A total of 58 volatile compounds were identified with considerable number of apparently carotenoid-derived compounds, i.e. norisoprenoids. Some of these could be considered as tracers to characterize products from Saint-Armel salterns. Indeed, 4 common compounds were detected in the different samples: 3,3,5,5-tetramethyl-cyclohexan-1-one, 4-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-en-1-yl)-but-3-en-2-ol ( $\beta$ -ionol), 5,5,8a-trimethyloctahydro-2H-chromen-2-one and 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuran-1-one (dihydroactinidiolide). At the same time, preliminary studies were conducted to gain knowledge about microorganisms present in solar salterns, such as halophilic microalgae like *Dunaliella salina*, bacteria, fungi or yeasts. Some of these living organisms produce carotenoids, the starting material of some volatiles, and could either be responsible through their metabolisms for the generation of flavor compounds detected. Color attribute  $C^*$  of the brine was closely positively correlated with the concentration of *D. salina* in the saline medium, linked to the concentration of viable and cultivable bacteria and highly correlated with the number of norisoprenoids detected.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Salt (NaCl) has always been consumed by humans and is essential for the health of our cells (water transfer, muscular contraction, pH in stomach) (Kurlansky, 2002). Naturally present in fruits and vegetables (around 20% of daily contributions), added to precooked meals (around 50% of contribution) or directly added to home-made meals (around 30%), salt is consumed more than is advised (between 5 and 10 times more than the recommended 2 g/day) (He and MacGregor, 2003; Brown et al., 2009).

**Abbreviations:** AU, arbitrary unit; CAR, carboxen; CFU, colony forming unit; CSW, concentrated sea water; DHA, dihydroactinidiolide; DVB, divinylbenzene; EU, European Union; GPS, global positioning system; h, hour; HS-SPME–GC–MS, headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry; LOD, limit of detection; LRI, linear retention indices; min, minute; NaCl, salt or sodium chloride; ND, not detected; PCA, plate count agar; PDMS, polydimethylsiloxane; PGI, protected geographical indication; RAs, relatives amounts; STD, standard deviation; TSG, traditional speciality guaranteed; UV, ultraviolet.

\* Corresponding author. Tel.: +262 262 483362; fax: +262 262 483348.

E-mail address: [laurent.dufosse@univ-reunion.fr](mailto:laurent.dufosse@univ-reunion.fr) (L. Dufossé).

Academic literature is very scarce about the characteristics of salt products used in food. But it is known that salt overconsumption can contribute to the deterioration of health: increased blood pressure, obesity, cardiovascular diseases, and so on (Alderman, 2002; He and MacGregor, 2010). This is the reason why, in many parts of the world, workgroups associating scientists, administrations, agencies, economic actors, and association of consumers were set up to decrease by 20% the population consumption of salt in: (1) proposing implemented measures to respect a statistical distribution of NaCl consumption from 2 to 6 g/day; (2) identifying the salt food vectors; (3) proposing effective recommendations for lowering sodium chloride content in some food vectors; (4) carrying out simulations of salt supply in population; (5) thinking about means to limit consumption of salt (He and MacGregor, 2009).

After an analysis of the situation, these workgroups proposed a set of recommendations to decrease population consumption of salt.

Recommendations are: (1) salt content optimization in food products, that is to say, in food vectors (in particular, those facilitating the risk of excess) but vectors have to stay gustative,

technological and safety acceptable and (2) consumers education and information by giving them responsibilities in the control and the management of their salt contribution.

Because of this situation, salt producers, in particular the smallest ones, have had to readjust their products to keep a place on the market. Thus, over the past few years, measures have been taken to diversify commercial offers of producers with standing salt products and products with a guarantee of know-how (i.e. speciality sea salt products) (Arfini, 1999).

Common salt, i.e. table salt, commonly employed in cooking, is cheaper than speciality sea salt obtained by evaporation of seawater in solar salterns. European producers (Michelin, 2009) intend to obtain protected geographical indication (PGI) or traditional speciality guaranteed (TSG) status in order to protect and value coarse salt, ground (fine) salt and *fleur de sel*, based on the quality policy for the products of European Union (EU) agriculture. The PGI associates a product with a region, to confirm its authentic origin whereas TSG highlights the traditional character, either in the composition or means of production.

The recent evolutions of globalization raise the question of the increase of standardization and delocalization of the production of some foods (Pecqueur, 2001). That is why, during food crises, in particular at the end of the nineties (mad cow, chicken diseases such as H1N1 or dioxin, and so on), certificates and labels played part of reassurance for the population (Tavoularis, 2008): quality control label and identification label of origin (e.g. Red Label) provided the consumers a greater legibility of the offer especially in Europe (Tavoularis, 2008; Arfini, 1999). In Europe, consumers are, for example, attracted by high price salt products that could be used in gourmet cooking. Moreover, empirical observation highlighted a concept of revenue linked with territorial qualities, that is to say, combining intrinsic quality of the product and its anchoring in a specific place with its history and its knowledge-to make (Pecqueur, 2001). This observation is worldwide known for all kind of food and the hand-collected products are usually linked, by producers, to an area of production, like olive oil or wine (Pecqueur, 2001; Arfini, 1999).

SPME is a powerful method for the characterization of aroma systems, readily used in quality control and food characterization (Cajka et al., 2009; Flamini, 2007). This is a fast, inexpensive and accurate method, which starts to be used for detection and characterization of volatile compounds from labeled food products with various qualities and/or geographic origins, e.g. honey (different flowers used in one honey) or olive oil (oil from Provence).

Flower of salt is a very specific salt, famous in some parts of Europe, such as in France where it is called *fleur de sel* or in Portugal where its name is *flor de sal*. Specific names are given in other countries and its quality for cooking is recognized worldwide. Its harvest is possible only 3 or 4 months in a year under very specific sun and wind conditions (e.g. between June and August in France). This is the first crystal formed at the surface of the salt pan. Manual harvest conditions of *fleur de sel*, raked like cream on the very top of ponds with specific tools, permits contact between crystals formed and microorganisms of brine. This characteristic allows to differentiate *fleur de sel* and the other types of sea salt. Indeed, for example, table salt obtained with coarse salt crushed, contains 97% of NaCl and iodine or fluor could be add in. Coarse salt, large crystals harvested on the ground of the condenser, contains 97% of NaCl. And grey salt, large salt crystals mixed with clay particles of salt pan during harvest, contains 94% NaCl. This last salt being the moistest and the less refined (Codex Alimentarius, 2006).

Average salt concentration (25% NaCl) and temperature (34 °C) in salt pan permits the formation of these different salts in the condensers (final basin of the salt pan cycle, also called crystallizer ponds) (Antón et al., 2000). But the *fleur de sel* is the only salt that

stays always on the surface of the condensers before it is harvested. Moreover, each environment presents specific microorganisms. In solar salterns, halotolerant and halophilic microorganisms develop specific biological ways to control their osmotic pressure under high salinity (Margesin and Schinner, 2001; Jaenicke, 1998) or high light. Microbiology of saltern crystallizer ponds was re-evaluated quite recently in Spain, Israel and Australia. Molecular, 16S rRNA targeted methods were applied to hypersaline brines. Archea and bacteria coexist and among archea, *Haloquadratum walsbyi*, is very predominant (50% of total cell number). The second quantitatively important component of the biota is *Salinibacter ruber* (20–25% of the total prokaryote community) (Bardavid et al., 2008). Many other archea and bacteria (*Halobacterium*, *Halococcus*, and so on) were then described and many of them produce pigments, such as carotenoids (salinixanthin,  $\beta$ -carotene, spirilloxanthin, bacterioruberin, and so on).

As a result, in salt pan, derived compounds could appear from degradation of carotenoids, pigments known to allow safe life for halotolerant and halophilic species (e.g. UV protection) (Ye et al., 2008). Free in the salt pan after the death of microorganisms or resulting from microorganism metabolism, such carotenoid-derived aroma compounds could be found in the first formed crystals in the condenser, the *fleur de sel*.

Thus, our research team, by investigating the carotenoid-derived aroma compounds (so called norisoprenoids) on salt pan environment or *fleur de sel*, tries to amend PGI or TSG. Carotenoids are important precursors of a variety of compounds, e.g. C<sub>20</sub>-retinoids or C<sub>13</sub>-aroma (norisoprenoids). Carotenoid molecules and fragments of carotenoid molecules have important natural functions and actions, e.g. vitamin A or retinol which play a significant role in health and nutrition; others compounds contribute to the complex mixture that characterize a particular perfume or aroma. Carotenoid-derived aroma compounds have not only been detected in leaf products, such as tobacco, tea, and mate, but also in many essential oils, fruits (grapes, passionfruit, starfruit, quince, apple, nectarine), vegetables (tomato, melon), spices (saffron, red pepper), as well as additional sources such as wine, rum, coffee, oak wood, honey, seaweeds etc. (Winterhalter and Rouseff, 2002; Rodriguez-Bustamante et al., 2005).

The aim of this study is indeed to discuss the possibility to use such aroma compounds, formed by the degradation of carotenoids, biosynthesized by microorganisms, as markers for sea salt. The present work describes more specifically the results of the headspace GC–MS analysis of concentrated sea water and *fleur de sel* collected in solar salterns from Saint-Armel (Brittany, France, GPS coordinates: latitude 48°0'49.29" north and longitude 1°35'34.55" west). This old French salt marsh (existed since 1400) was chosen because of its preserved environment: (1) no pollution was detected in soil or in surrounding sea due to reduced human activities (no industries, boats, or cars; manual harvest); (2) clay and silt of the soil permit the conservation of fauna and flora; (3) environment and method of production permitted to have a natural product recognized by the Chefs all around the world for its gustative and gastronomic characteristics (Chenelle, 2010).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Concentrated sea water (brine) and *fleur de sel* samples

Concentrated sea water (CSW or brine), raw *fleur de sel* ("flower" of salt collected at the surface of the salt pan, before landing and bleaching under sun drying) and marketed *fleur de sel* (*fleur de sel* after sun drying) from Saint-Armel (north west of France) have been studied.

Marketed *fleur de sel* was bought in a store. Samples of concentrated sea water and raw *fleur de sel* were collected during



**Fig. 1.** (A) Salt pan (shallow basin) with bloom of *Dunaliella salina* in Saint-Armel salt ponds (orange color linked to the accumulation of carotenoid pigments). (B) Last basins (crystallizing areas) of Saint-Armel salt ponds with sun drying of fleur de sel on the edge of ponds. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

bloom of the microalgae *Dunaliella salina* (Fig. 1A) in the last basin of salt pan (Fig. 1B). Three batches (#1, #2, #3—batch number given according to the sampling sequence) of concentrated sea water were selected according to the intensity of their orange color.

Color analysis was carried out using a Minolta spectrophotometer CM-3500d (Konica Minolta, Roissy, France), driven with SpectraMagic NX software (Konica Minolta). The reference illuminant was D 65 (standard daylight) and the geometry was d/8: incident light was diffuse and the observation angle was 10°. Data were reported in the L\*, a\*, b\* and L\*, C\*, h° colorimetric systems. All brine samples were analyzed in transmittance, in one single session, five replicates per sample (Table 1). According to decreasing chroma results (C\*), products were ranked as #1 > #3 > #2. The fleur de sel was analyzed in reflectance, in one single session, five replicates per sample (Table 1).

## 2.2. Numeration of microorganisms

### 2.2.1. Microalgae

Microalgae were kept in glass bottles with natural brine. Any transfer was made between the harvest of sample and the enumeration.

A Thoma cell (0.1 mm<sup>3</sup>; 1 large square, 0.004 mm<sup>3</sup>; provided by Precis France CE) was used to determine the *D. salina* concentration in the CSW (three numerations per sample). With this device, bacterial cells are enumerated individually.

0.01 mL of the sample was put in the center of the cell and was covered with a lamella. The sample was observed 400× with an optical microscope (Olympus CX41 RF). Cells were counted on 5 large squares and cell concentration was calculated as follows:

$$[\text{concentration}] (\text{cell/mL}) = (n \times 16) \times 10 \quad \text{with } n \\ = \text{number of cells found on one large square.}$$

**Table 1**  
Data about samples of salt products collected in salt ponds from Saint-Armel (France).

	Salt pan water (concentrated sea water)			Raw fleur de sel (no sun bleaching/drying)			Marketed fleur de sel
Origin	Saint-Armel salt pan			Saint-Armel salt pan			Saint-Armel store
Day of collect	2010-08-21			2010-08-21			2007-03-06
Packing	Glass bottle (Fisher)			Plastic box (Fisher)			Plastic bag <sup>a</sup>
Quantity	3 × 1 L			2 × 1 kg			2 × 0.25 kg
Colorimetric data							
Batch number	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
L*	61.86 (±0.239)	93.75 (±0.00)	86.24 (±0.076)	63.65 (±0.526)	62.76 (±0.55)	80.16 (±0.21)	81.17 (±0.12)
a*	7.93 (±0.006)	0.18 (±0.017)	1.31 (±0.012)	1.26 (±0.026)	1.32 (±0.05)	0.71 (±0.12)	0.08 (±0.03)
b*	25.06 (±0.049)	9.03 (±0.020)	12.47 (±0.050)	12.51 (±0.074)	12.36 (±0.33)	9.03 (±0.24)	9.01 (±0.10)
C*	26.28 (±0.046)	9.03 (±0.020)	12.53 (±0.051)	12.57 (±0.078)	12.43 (±0.33)	9.06 (±0.25)	9.01 (±0.12)
h°	72.43 (±0.032)	88.87 (±0.112)	83.99 (±0.020)	84.25 (±0.095)	85.48 (±0.63)	85.48 (±0.63)	89.53 (±0.10)

L\*, or lightness, scales the luminous intensity from 0 (black) to 100 (white). Perpendicular to the L\* axis, chromatic coordinates a\* and b\* part into four orthogonal directions with +a\* (red) at 0°, +b\* (yellow) at 90°, -a\* (green) at 180°, and -b\* (blue) at 270°. Beside these attributes, the (a\*; b\*) combination also determines parameters h° and C\*. The hue angle, or h°, gives the predominant wavelength composing the color. C\*, or chroma, or saturation, accounts for the vividness or the color purity from the distance between the (a\*; b\*) dot and the origin. The longer the distance, the more vivid or saturated a color, with the origin as achromatic zero.

<sup>a</sup> As provided by salt producer, Chenelle, Saint-Armel.



### 2.2.2. Bacteria

Bacteria were grown in an artificial hypersaline Plate Count Agar (PCA) medium (provided by Merck). Medium was prepared with 22.5 g of PCA powder (5 g/L of peptone from casein, 2.5 g/L yeast extract, 1 g/L D(+) glucose, 14 g/L agar-agar) up to 1 L of demineralised hot water (85 °C) to dissolve agar-agar and supplemented with different concentrations of NaCl (0%, w/v as blank; 3.5%, w/v like in the ocean and 33%, w/v like in the saturated salt pan). The pH of the agar medium was then adjusted to  $7.0 \pm 0.2$  at 25 °C and, before use, the growth medium was autoclaved 15 min at 121 °C.

Inoculum was put in the agar (1 mL/Petri dish) [growth in mass] or spread at the surface (0.1 mL/Petri dish) [surface growth] and cultures were grown at 34 °C (average salt pan temperature) under fluorescent 15 W illumination (incubator Sanyo MIR-253) for 10 days. Cell counts are the results of triplicate platings.

### 2.2.3. Yeasts and fungi

Yeasts and fungi were grown in an artificial hypersaline malt extract agar medium provided by Merck. It was prepared with 48 g of malt extract agar powder (30 g/L of malt extract, 3 g/L of peptone from soymeal, 15 g/L of agar-agar) up to 1 L of demineralised hot water (85 °C) to dissolve agar-agar and supplemented with 35 g of NaCl. The pH of the agar medium was then adjusted to  $5.6 \pm 0.2$  at 25 °C and, before use, the growth medium was autoclaved 10 min at 121 °C.

Inoculum was grown in same conditions as previously described. Cell counts are the results of triplicate platings.

### 2.3. HS-SPME

Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) is a unique sample preparation technique, which uses a fused silica fiber (length of 1–2 cm) coated with a polymeric phase (Li and Weber, 1999; Mani, 1999). The SPME holder for manual sampling and the fused silica fiber (length of 2 cm, film thickness of 50/30 μm) coated with divinylbenzene (DVB)/carboxen (CAR)/polydimethylsiloxane (PDMS) were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). This fiber, known for its high extraction ability (Bicchi et al., 2007; Zhang et al., 2007), was chosen to obtain the best “headspace” extract with the least selectivity and the most representative volatile compounds of the sample. Before experiments, the fiber was conditioned for 1 h at 270 °C.

The sample (concentrated sea water 10 mL or fleur de sel 10 g) was put in a 25 mL Erlenmeyer closed with a stopper. The SPME

fiber was inserted into the sample headspace by the stopper hole. The sample was then heated to 60 °C in a thermostatic bath during 5 h. In order to ensure the repeatability of the results, 3 SPME extractions were carried out for each sample.

Each day, a blank experience with an empty Erlenmeyer was carried out to determinate the extent of any laboratory contamination.

### 2.4. GC-MS analysis

GC-MS analyses were conducted on a Hewlett-Packard 6890-5972 GC-MS system equipped with a non-polar capillary column (SPB™-5, 60 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). GC-MS instrument was operated at 70 eV in the EI mode over the *m/z* range 30–550. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.7 mL/min. The temperature of the oven was programmed from 60 to 230 °C at 4 °C/min and then held isothermal for 40 min; the injector temperature and the transfer line were selected at 250 °C. All analyses were done using splitless injection mode.

### 2.5. Qualitative and semi-quantitative analysis

The comparison of the fragmentation patterns of the mass spectra with both those stored in the MS data banks (Wiley7, NIST 2002) and those reported in the literature (Adams, 2004) confirmed the identification of the components. In addition, linear retention indices (LRIs) on the non-polar column, determined in relation to a homologous series of *n*-alkanes (C<sub>8</sub>–C<sub>22</sub>), were compared with published index data (Adams, 2004).

The relative amounts (RAs) of individual components are expressed as percent peak areas to total peak areas.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microorganisms concentration in samples of brine

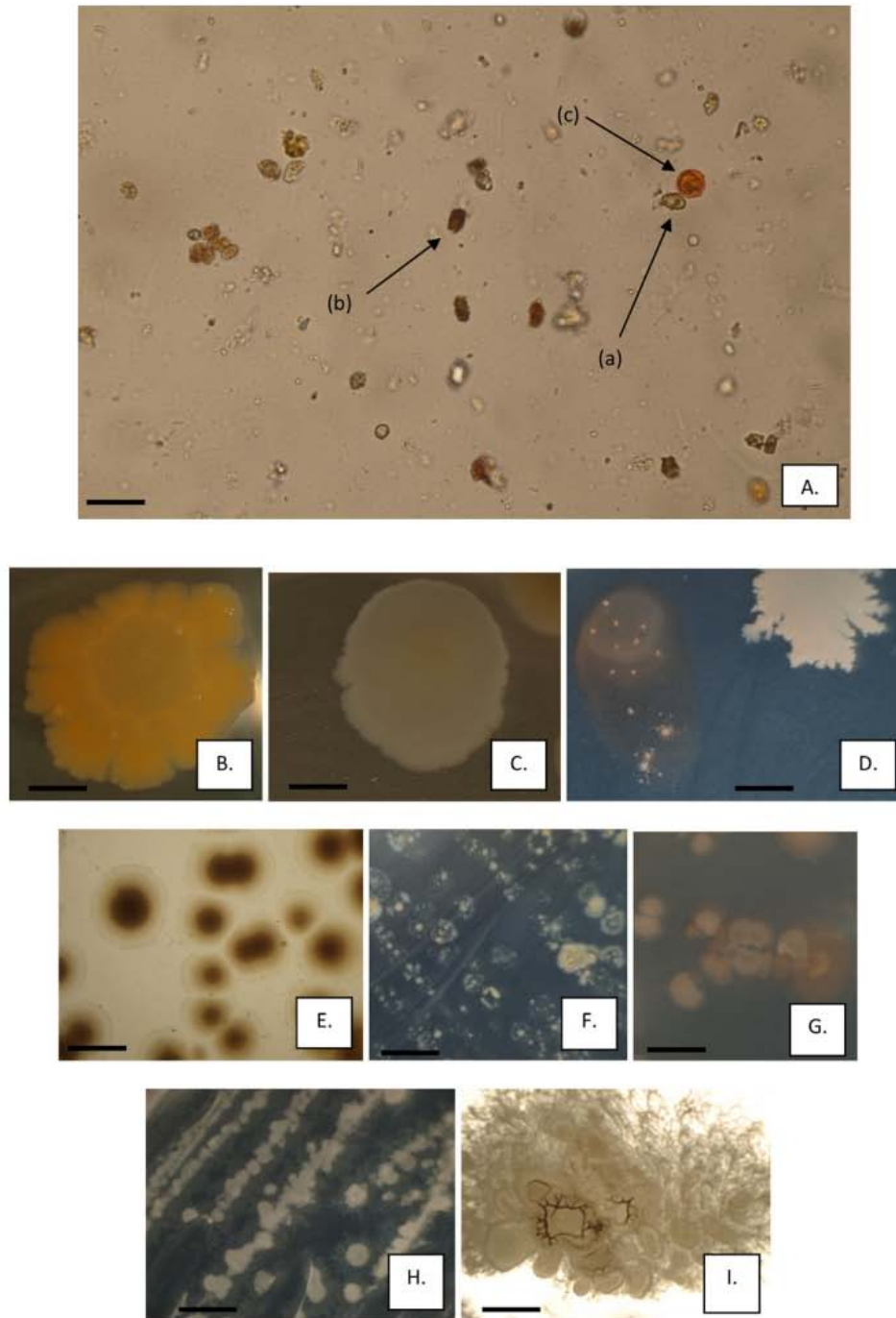
A total of 9 microorganisms looking different were observed in brine samples (see Table 2 and Fig. 2). Many of microorganisms present orange color, frequently described in the literature as carotenoid occurrence marker (Raja et al., 2007). Numerations will be detailed and discussed group by group, i.e. microalgae, bacteria, yeasts and fungi.

**Table 2**

Concentrations of viable and cultivable microorganisms in concentrated sea water (CSW) i.e. brine of Saint-Armel salt ponds determined by numeration on agar media (PCA: Plate Count Agar; CFU: colony forming unit; STD: standard deviation).

Batch	Bacteria (CFU/mL of sample) <sup>a</sup>											
	PCA + salt 0%				PCA + salt 3.5%				PCA + salt 33%			
	Mass	STD	Surface	STD	Mass	STD	Surface	STD	Mass	STD	Surface	STD
#1	387	81	493	83	300	200	1000	0	0	0	0	0
#2	50	20	213	31	367	115	540	79	0	0	0	0
#3	77	31	153	31	643	318	360	115	0	0	0	0
Batch	Yeasts and fungi (CFU/mL of sample) <sup>a</sup>								Microalgae (cells/mL of sample) <sup>a</sup>			
	Malt extract agar + salt 3.5%								Thoma cell			
	Mass	STD	Surface	STD	Mass	STD	Surface	STD	Mass	STD	Surface	STD
#1	100	100	67	58	22,400	3997						
#2	43	32	3	6	1451	176						
#3	14	8	0	0	6613	489						

<sup>a</sup> CFU/mL of sample; calculated from the number of colonies present in the volume of brine included in the agar mass (1 mL) or spread at the surface of the Petri dish (0.1 mL).



**Fig. 2.** Pictures of some microorganisms present in concentrated sea water from Saint-Armel (Brittany, France) salt ponds. (A) *Dunaliella salina* (batch #1). (a) Vegetative, motile, green cell and (b) vegetative, motile, orange cell and (c) orange cell that is non-motile, either an aplanospore or a zygote (Ben-Amotz et al., 2009). Observation with optical microscope (Olympus CX41RF), magnification of 400 $\times$ —the bar represents 26  $\mu$ m. (B–H) Various types of colonies of unidentified bacteria grown on PCA agar medium with 3.5% added salt (0.1 mL of inoculum at surface). Observation with a stereo microscope (Olympus SZX2-ILLK), magnification of 2.5 $\times$ —the bar represents 4 mm. (I) Colony of unidentified fungus grown on malt extract agar medium with 3.5% added salt (0.1 mL of inoculum at surface) observed with a stereo microscope (Olympus SZX2-ILLK). Magnification of 2.5 $\times$ —the bar represents 4 mm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

### 3.1.1. Microalgae

Salt producers description and microscopy observations of brine samples compared to literature permitted to identify, at least, one microalga, *D. salina* (Jaenicke, 1998).

In Saint-Armel brines, different forms and different colors of microalgae were observed during the weeks of sample collection, such as orange aplanospores (full and/or empty), green spores, green algae with two flagella, orange motile forms (Fig. 2) (Jaenicke, 1998; Ben-Amotz et al., 2009).

*D. salina* is a naked unicellular green alga that can survive at high salinities, i.e. 0.6–35% NaCl and high irradiance (Raja et al., 2007). This is the only eukaryotic alga which can accumulate maximum amount of various carotenoids in its interthylakoid spaces of chloroplast (in oil-containing globules) when subjected to optimum conditions (Raja et al., 2007; Lamers et al., 2008; Ye et al., 2008). The presence of secondary  $\beta$ -carotene has been identified and confirmed (Raja et al., 2007). Thus, *D. salina* can accumulate an extremely large amount of  $\beta$ -carotene up to 10% of the dry algal biomass (Lamers et al., 2008; Ye et al., 2008). But, when the cells are cultivated under non-induced conditions, few or even no globule exists (Ye et al., 2008).

Thus, the most colored CSW is the brine that contained the highest concentration of microalgae (batch #1, C\* 26.28; 22,400 cells/mL) and the less colored CSW is the one that presented

the lowest concentration (batch #2, C\* 9.03; 1450 cells/mL). These data suggest that for brine, a link between orange color and microalgae concentration could be established (Lamers et al., 2008; Ye et al., 2008; Raja et al., 2007).

Salt pan seems to be an induced medium for production of carotenoids by the algae because of high light intensity and high salinity. That is why aroma compounds could be in the CSW or in salt after algae death and degradation. But a combination between microalga and bacteria could be necessary for the bioproduction of norisoprenoids (Jaenicke, 1998; Bardavid et al., 2008).

### 3.1.2. Bacteria

Bacteria were grown under uniform illumination on each medium. Higher number of bacteria was detected on the culture medium with the salt concentration of 3.5%, so those bacteria are most adapted to salt concentration of sea water. In the media with 0% salt, bacteria could be detected under hypo salt stress (e.g. resistance forms; Table 2). Whatever the batch and the salt concentration of the medium, colonies looked very similar: diffusing orange, circular yellow or circular white (Fig. 2). These results are limited to our selected medium, light, and temperature conditions.

There are two strategies to cope with a saline environment. Halophilic archaea maintain an osmotic balance of their cytoplasm

**Table 3**

Relative amounts of norisoprenoids (carotenoid-derived aroma compounds) detected in concentrated sea water (CSW), raw salt (Raw) and commercial (Com.) fleur de sel from Saint-Armel solar salterns.

Compounds	Usual name	Relative amounts <sup>a</sup> (%)				
		CSW			Fleur de sel	
		#1	#2	#3	Raw	Com.
<b>C8</b>						
6-Methyl-heptan-2-one		0.5	0.5	0.6	ND	ND
6-Methyl-heptan-2-ol		Traces	ND	ND	ND	ND
C8 unknown		0.5	ND	ND	ND	ND
6-Methyl-5-hepten-2-one		1.1	0.4	1.1	ND	ND
3,3-Dimethylcyclohexan-1-ol		Traces	ND	ND	ND	ND
<b>C9</b>						
2,4,4-Trimethyl-cyclohex-2-en-1-ol		0.7	ND	ND	ND	ND
2,2,6-Trimethyl-cyclohexan-1-one		Traces	0.6	0.6	0.5	ND
3,5,5-Trimethyl-cyclohex-2-en-1-one	Isophorone	1.3	1.4	Traces	0.4	ND
2,3,4-Trimethyl-cyclohex-2-en-1-one		Traces	ND	Traces	0.7	ND
2-(1-Methylethylidene)-cyclohexan-1-one		Traces	ND	1.9	ND	ND
3,4,4-Trimethyl-cyclohex-2-en-1-one		0.7	2.0	ND	ND	ND
2,6,6-Trimethyl-cyclohex-2-en-1,4-dione		ND	0.2	ND	1.8	ND
<b>C10</b>						
3,3,5,5-Tetramethyl-cyclohexan-1-one		Traces	0.4	0.5	0.6	Traces
1-(1,4-Dimethyl-cyclohex-3-en-1-yl)-ethan-1-one		0.2	ND	ND	ND	ND
2,6,6-Trimethyl-cyclohex-1-ene-1-methanol	$\beta$ -Cyclogeraniol	1.4	1.1	1.2	ND	ND
2,6,6-Trimethyl-cyclohex-1-ene-1-carboxaldehyde	$\beta$ -Cyclocitral	5.0	3.4	3.1	1.4	ND
<b>C11</b>						
1-(2,6,6-Trimethyl-cyclohex-1-en-1-yl)-ethan-1-ol		1.8	ND	Traces	ND	ND
2-(2,6,6-Trimethyl-cyclohex-1-en-1-yl)-1-acetaldehyde		0.5	ND	ND	ND	ND
5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuran-1-one	Dihydroactinidiolide (DHA)	1.5	8.5	5.6	28.9	1.2
<b>C13</b>						
Theaspirane A		0.7	ND	ND	ND	ND
4-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl)-but-3-en-2-one		3.4	1.9	2.8	Traces	ND
4-(2,6,6-Trimethyl-cyclohex-2-en-1-yl)-but-3-en-2-ol	$\alpha$ -Ionol	0.7	ND	2.8	ND	ND
4-(2,6,6-Trimethyl-cyclohex-2-en-1-yl)-butan-2-one	Deshydro- $\alpha$ -ionone	8.4	4.4	6.6	ND	Traces
C13 unknown		1.6	ND	ND	ND	ND
(E)-4-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-2-en-1-yl)-but-3-en-2-one	(E)- $\alpha$ -ionone	2.2	7.5	0.9	2.1	ND
4-(2,6,6-Trimethyl-cyclohex-1-en-1-yl)-butan-2-ol	Dihydro- $\beta$ -ionol	0.8	ND	ND	ND	ND
Hexahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-2H-1-benzopyran-4a (5H)-ol		0.9	ND	ND	ND	ND
3-(2,6,6-Trimethyl-cyclohex-1-en-2-yl)-oxiran-2-yl]-ethan-1-one	7,8-Epoxy- $\alpha$ -ionone	3.2	ND	0.8	ND	ND
4-(2,6,6-Trimethyl-cyclohex-1-en-1-yl)-but-3-en-2-ol	$\beta$ -Ionol	23.1	42.8	31.0	30.4	2.1
5,5,8a-Trimethyloctahydro-2H-chromen-2-one		17.9	10.1	10.3	1.8	0.2
Hexahydro-4,4,7a-trimethyl-2(3H)-benzofuran-1-one		Traces	ND	ND	ND	ND
1-(1,2,2-Trimethyl-cyclopent-1-yl)-pentan-1,4-dione		Traces	1.3	1.5	ND	ND
Total number of norisoprenoids detected		31	15	19	11	5
	% total	77.9	86.5	71.3	68.6	3.6

<sup>a</sup> Refers to the mean percentage of all samples analyzed against the total peak area; traces: <0.1%; ND: not detected, smaller than 0.01% which is the limit of detection (LOD).

with the hypersaline environment by accumulating high concentrations of salt. This mechanism of osmoregulation requires special adaptations of the intracellular enzymes that have to function in the presence of salt. In contrast, halophilic or halotolerant eubacteria are characterized by a much greater metabolic diversity. Their intracellular salt concentration is low, and they maintain an osmotic balance of their cytoplasm with the external medium by accumulating high concentrations of various organic osmotic solutes; their intracellular enzymes have no special salt tolerance (Margesin and Schinner, 2001).

Salt pans consist of a series of shallow ponds connected in a sequence of increasingly saline brines. Crystallizers are the last ponds and have salinity above 25%. Therefore, the presence in these ponds of bacteria could be due either to their import from previous ponds with lower salinity or to their active growth in the crystallizers. The key point that would determine the relevance of finding bacteria in the crystallizers was, then, whether they were in fact extreme halophiles forming part of the autochthonous microbiota of these ponds (Margesin and Schinner, 2001).

In Saint-Armel CSW, more bacteria may be there but not detected by the culture conditions selected (medium, light, temperature). Other studies have to be conducted in various media or a research about bacteria debris should be done by microscopy (if they died when salt concentration rose up).

In order to characterize this bacterial community and assess this point, rRNA approach will be used, that allows direct, cultivation-independent 16S rDNA sequence retrieval and identification of the microorganisms (Margesin and Schinner, 2001).

Indeed, the volatile compounds detected in speciality sea salt products could be the result of combination between different microorganisms production or interaction (Bardavid et al., 2008).

### 3.1.3. Yeasts and fungi

Yeasts and fungi were grown under uniform illumination on malt extract agar medium and the results obtained with bacteria permitted to choose salt concentration of 3.5%. Batch #1 has the highest concentration for yeasts and fungi (batch #1 concentration > batch #3 > batch #2, Table 2). These data suggest that for brine, a link between orange color and yeasts and fungi concentration could be established, as it was already the case for microalgae. Moreover, as past studies confirmed that fungi could take part in the carotenoid degradation (Zorn et al., 2003a,b; Rodriguez-Bustamante et al., 2005), the species found in this study will have to be characterized.

The different microorganisms found in the CSW could be responsible for the color of brine (Fig. 1) and/or the degradation of carotenoids.

### 3.2. Optimisation of the volatile extraction conditions

HS-SPME method was used to extract volatile compounds and GC-MS permitted to identify them. Any analysis was found in the literature about SPME and salt so some conditions of extraction were tested in order to optimize the method.

The fiber employed in our study (DVB/CAR/PDMS) was selected without testing different coatings, because it is known suitable for the extraction of volatile compounds with relatively wide range of polarities and volatilities (Bicchi et al., 2007; Cajka et al., 2009; Flamini, 2007).

The operating conditions were optimized taking into account the overall amount of the extracted volatiles, as well as the formation of artefacts. Temperatures of 20 °C, 40 °C, 60 °C and 80 °C were tested. For each temperature, different extraction times were investigated: 1 h, 3 h, 5 h, 9 h and 12 h.

At water bath temperatures of 20 °C and 40 °C no volatile compounds were detected that is to say, no relevant peaks were

observed in chromatograms, whatever the time of extraction (excepted for most concentrated sample batch #1 that answered at 20 °C). At 60 °C, peaks could be exploited without background noise and intensity of the answer was enough to eluate the different compounds with a good resolution. Over 60 °C, the extracted compounds were the same or decreased (high background noise, smaller peaks, no apparition of new peaks whatever the time of extraction). The increase in temperature does not permit to extract more compounds. The water bath temperature was then set at 60 °C for all experiments.

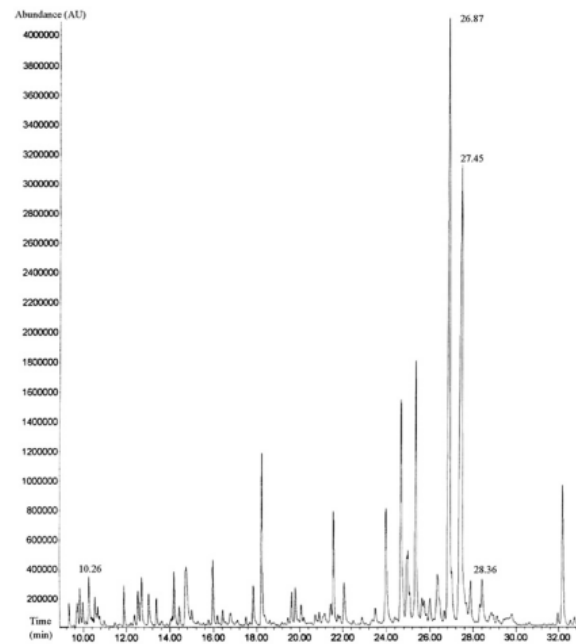
At 60 °C, 5 h of sampling increased the overall extractives compared to 1 h and 3 h. No significant differences were observed at 9 h or 12 h. Therefore, sampling time was set at 5 h.

Under temperature and extraction time conditions described above, the sample volume of 10 mL or sample weight of 10 g gave better results (relevant peaks, correct abundance and no background noise) than those obtained with 5 mL or 5 g (lower abundance) and same results than those with 25 mL or 25 g (same chromatographic profile but more quantity of the product used for each experiment). To summarize, optimum conditions for HS-SPME were 5 h extraction at 60 °C with 10 mL of brine or 10 g of salt products.

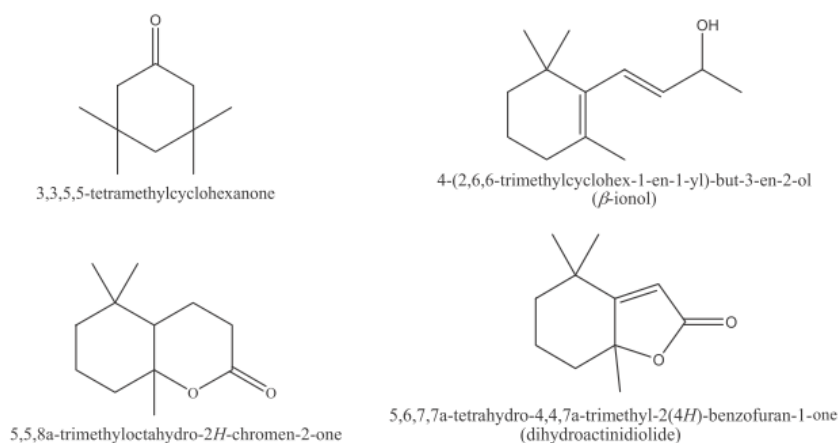
The samples (brine or salt) were already rich in salt so, salt addition was not necessary, like it is used to be in some experiments to enhance the volatilization.

### 3.3. Aroma compounds of brine and fleur de sel

From the extractions performed by SPME on concentrated sea water and fleur de sel (before and after sun drying), a total of 58



**Fig. 3.** Head space-solid phase micro extraction–gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME–GC–MS) (total ion current–TIC) of brine of Saint-Armel batch #1 with detected and identified compounds that could play a role in authenticity [retention time (RT) 10.26 min = 3,3,5,5-tetramethyl-cyclohexan-1-one; RT 26.87 min = 4-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)-but-3-en-2-ol (or  $\beta$ -ionol); RT 27.45 min = 5,5,8a-trimethyloctahydro-2H-chromen-2-one; RT 28.36 min = 4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one (or dihydroactinidiolide)] using a non-polar capillary column (SPB™-5) [AU: arbitrary unit].



**Fig. 4.** Structures of the major compounds found by head space-solid phase micro extraction–gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME–GC–MS) in Saint-Armel salt products.

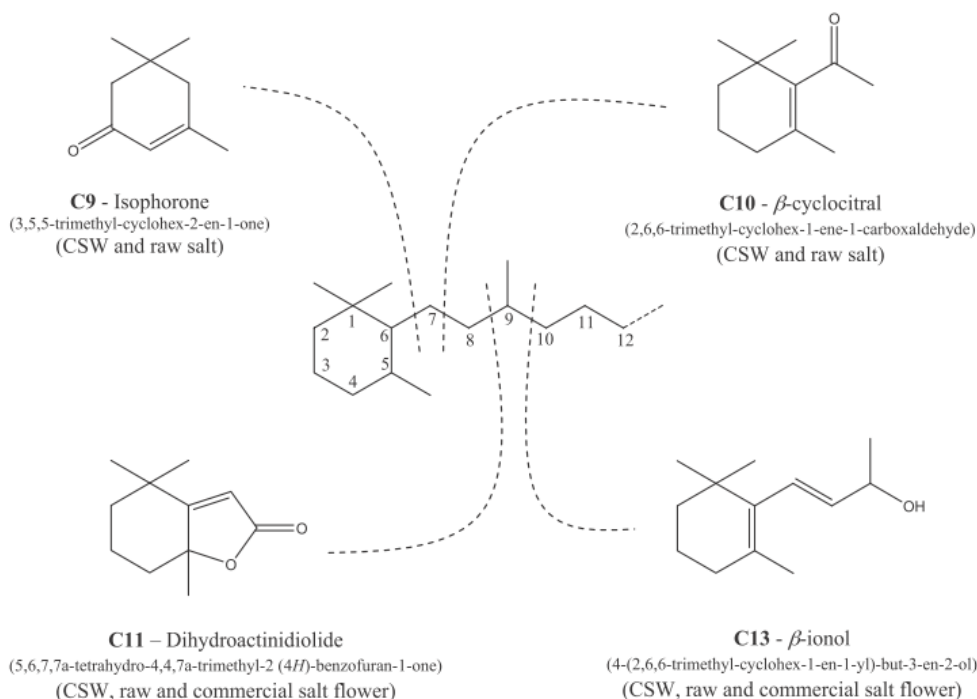
volatile compounds were identified among which a considerable number of apparently carotenoid-derived compounds (Table 3). Many of volatile carotenoid metabolites present the regular  $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{11}$ , and  $C_{13}$  skeletons frequently described in the literature (Winterhalter and Rouseff, 2002). In Fig. 3, a representative chromatogram is presented with time retention of major compounds detected by GC–MS from CSW of Saint-Armel.

Data in Table 3 show that great differences can be observed on the basis of qualitative and quantitative distributions of norisoprenoids in the studied samples. Salt pan water samples contain

more volatile carotenoid-derived compounds than *fleur de sel* samples.

HS-SPME/GC–MS is a qualitative method, the relative amounts (%) given in Table 3, present intensity of the answer but not the real quantity of each compound detected. Some compounds could give a high answer with a small concentration in the sample.

Among the concentrated sea water samples, batch #1 with the highest concentration of *D. salina* (Table 2) shows the highest number of norisoprenoids (31 for batch #1 against 15 and 19 respectively for batch #2 and batch #3). These data suggest that for



**Fig. 5.** Different classes of degradation products of carotenoids and examples for potent odorants from the  $C_9$ -,  $C_{10}$ -,  $C_{11}$ - and  $C_{13}$ -norisoprenoids related to our concentrated sea waters (CSW) and fleur de sel collected in solar ponds from Saint-Armel, Brittany, France. Analyses based on head space-solid phase micro extraction-gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME–GC–MS).

concentrated sea water, a link between orange color (Table 1) and number of norisoprenoids, i.e. between microalgae concentration and occurrence of carotenoid-derived compounds, could be established (Raja et al., 2007; Lamers et al., 2008; Ye et al., 2008). The bacteria *S. ruber*, producing the red carotenoid salinixanthin, a C40 carotenoid acyl glycoside, may also have an impact.

Among the *fleur de sel* samples, the amount of norisoprenoids is higher for the raw *fleur de sel* than for the marketed one. 11 volatile norisoprenoids accounting for 68.6% were present in the headspace of the raw *fleur de sel* whereas only 5 volatile norisoprenoids (3.6%) were detected in the headspace of marketed *fleur de sel*. This decrease of norisoprenoids content between the two samples of *fleur de sel* may probably be the result of sun treatment (light radiation: destruction, evaporation, modification of the chemical structure) (Britton, 2008). Color analysis of marketed *fleur de sel* compared to raw *fleur de sel* demonstrated the bleaching effect (Table 1).

As marketed *fleur de sel* included in this study was from year 2007, additional experiments will be conducted later on with marketed *fleur de sel* from 2008 to 2011 to investigate the season effect, as climatic changes could modify microbial and salt composition.

Despite the differences observed between the studied samples, 4 common norisoprenoids were identified (Figs. 4 and 5): 3,3,5,5-tetramethyl-cyclohexan-1-one, 4-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-en-1-yl)-but-3-en-2-ol ( $\beta$ -ionol), 5,5,8a-trimethyloctahydro-2H-chromen-2-one and 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuran-1-one (dihydroactinidiolide or DHA). Thus, it could be assumed that these four carotenoid-derived compounds may be used as tracers to characterize salt from Saint-Armel as this combination of flavor molecules was not found up to now in other geographic areas (e.g. Ré, Noirmoutier, Guérande) under study (unpublished results). The fact that these four common compounds were already detected in all the different samples investigated here bring some elements about some stability that may occur in the production of volatiles within a solar saltern over years.

However, these results are the first data about the aroma of sea salt. Our sampling campaign is still currently running at a worldwide level in order to obtain enough evidences that corroborate our hypothesis that the flavor profile and the geographical origin are related.

Moreover, brine and *fleur de sel* of Saint-Armel have to be evaluated through sensory analysis for their characteristic aroma notes as follows (observation from sea salt producers): violet, floral, sea. The level of such aroma detection and the link between global aroma and carotenoid-derived aroma compounds have to be established.

#### 3.4. Carotenoids and carotenoid-derived aroma compounds

Carotenoids have been studied primarily because of their value as pigments, antioxidants, or nutriment (pro vitamin A). The fact that carotenoids can also function as aroma precursors added a surprising new dimension to carotenoid research (Winterhalter and Rouseff, 2002).

A considerable number of norisoprenoids has been identified in nature, many of them playing an important role as flavor and fragrance substances (Winterhalter and Rouseff, 2002). Norisoprenoids possess a common structure, a megastigmane carbon skeleton, more or less modified (Fig. 5).

Different ways exist to obtain derivatives from carotenoids (Winterhalter and Rouseff, 2002; Zorn et al., 2003a,b; Rodriguez-Bustamante et al., 2005): (1) non-selective fissions of the polyene chain, induced by abiotic factors like heat (thermal degradation) or

light (photooxidation), result in a broad spectrum of oxidized breakdown products (Zorn et al., 2003a,b; Winterhalter and Rouseff, 2002); (2) a smaller range of products, which often display biological activity, is released by enzymatic cleavage reactions (e.g. hydroxylase, desaturase, dioxygenase, and so on) (Zorn et al., 2003a,b; Winterhalter and Rouseff, 2002); (3) the last way of degradation is by microorganisms such as bacteria, yeasts or fungi (Zorn et al., 2003a,b; Rodriguez-Bustamante et al., 2005).

Abiotic, enzymatic or biological ways of carotenoid degradation could coexist in salt pans and the nature of carotenoid-derived aroma compounds detected in this study may be the result of these. The mechanisms at work in solar salterns still remain to be determined.

#### 3.5. Relationships between (a) color of brines and concentrations of *D. salina*, (b) color of brines and concentrations of viable and cultivable bacteria, (c) color of brines and number of norisoprenoids detected

In an attempt to link color of concentrated sea water (brines) of the crystallizers with data such as concentrations of the microalgae *D. salina*, the concentrations of viable and cultivable bacteria and the number of volatile norisoprenoids detected, C\* values were plotted together with data obtained in these fields (Fig. 6).

Color attribute C\* is closely positively correlated with the concentration of *D. salina* in the saline medium. The contribution of pigments produced by the microalga is major regarding the final aspect of the water.

For other microorganisms, three numerations of bacteria out of four consolidate the positive relationship between color (C\* value)

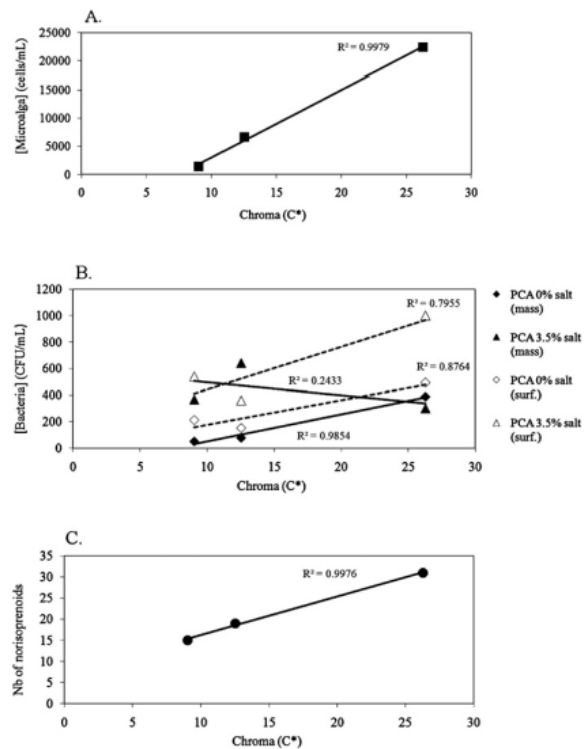


Fig. 6. Correlations between color (C\* value) of concentrated sea water (brine) produced in solar ponds of Saint-Armel, Brittany, France. (A) Microalga concentration (cells/mL). (B) Viable and cultivable bacteria (CFU/mL). (C) Number of norisoprenoids described [CFU: colony forming unit; PCA: Plate Count Agar].

and microbial biomass. When C\* increases, the number of viable and cultivable bacteria detected on Plate Count Agar, with non added NaCl (surface and mass determinations), or with added 3.5% NaCl (surface cultivation) increase also. The only condition where a different result was obtained was PCA with 3.5% NaCl (mass cultivation). Combining restricted access to oxygen and salt stress could interfere with bacterial growth.

#### 4. Conclusion

On basis of this study, it is concluded that the HS-SPME/CG-MS analysis technique described herein is technically feasible for sampling and analysis of brine or sea salt. HS-SPME coupled to GC-MS represents a simple, time-saving, highly sensitive, solvent-free, and organoleptically correlated testing method, which has great prospects for future use as a regular analysis to characterized specialty sea salt products. It gives access to the nature of volatile compounds detected in sea salt product without modifications of the sample.

A total of 58 volatile compounds were identified with considerable number of apparently carotenoid-derived compounds, i.e. norisoprenoids. Some of these could be considered as tracers to characterize products from Saint-Armel salterns. Concentrated sea water collected in the solar ponds contain over 20,000 *Dunaliella* cells, 1000 bacteria and 100 yeasts/fungi per mL. This microflora produces pigments such as carotenoids and a close relationship was established between color of the brine, microflora density and the number of norisoprenoids detected.

This work is the first step of a large study, the first one dedicated to the characterization of speciality food salts. On the first hand, the collecting campaign of samples is still running at a worldwide level and our results have to be complemented with techniques such as DNA sequencing for microorganisms determination, carotenoids analyses, and so on. Thus, our aim with the complete study will be to link a product with a geographical area in order to help small producers to obtain PGI, TSG label.

#### Acknowledgements

The authors thank Olivier Chenelle from *Les Salines de Saint-Armel*, Morbihan, Brittany, France, for supplying the samples. They also thank ARVAM for keeping algae samples in their algae bank.

#### References

- Adams, R.P., 2004. Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publ., Carol Stream, IL, USA.
- Alderman, M.H., 2002. Salt, blood pressure and health: a cautionary tale. *International Journal of Epidemiology* 31, 311–315.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., 2000. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3052–3057.
- Arfini, F., 1999. The value of typical products: the case of Prosciutto di Parma and Parmigiano Reggiano cheese. In: *European Association of Agricultural Economics Seminar n° 67*, 28/10/1999, Le Mans, France.
- Bardavid, R.E., Khristo, P., Oren, A., 2008. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* 12, 5–14.
- Ben-Amotz, A., Polle, J.E.W., Subba Rao, D.V., 2009. The Alga *Dunaliella*. Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., Rubiolo, P., 2007. Reliability of fibres in solid-phase microextraction for routine analysis of the headspace of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 1152, 138–149.
- Britton, G., 2008. Function of carotenoids metabolites and breakdown products. *Carotenoids: Natural Functions*, vol. 4. Birkhäuser Publ., Basel, Switzerland, pp. 309–324.
- Brown, I.J., Tzoulaki, I., Candeias, V., Elliott, P., 2009. Salt intakes around the world: implications for public health. *International Journal of Epidemiology* 38, 791–813.
- Cajka, T., Hajslova, J., Pudil, F., Riddellova, K., 2009. Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks. *Journal of Chromatography A* 1216, 1458–1462.
- Chenelle, O., 2010. Unpublished data about Saint-Armel salt pan.
- Codex Alimentarius, 2006. Norme Codex pour le sel de qualité alimentaire. CODEX STAN 150-1985 Rev.1-1997 Amendé 1-1999, Amendé 2-2001, Amendé 3-2006.
- Flamini, G., 2007. Headspace analyses in valuable and functional foods: application of SPME in the quality control and characterization of olive oils. *Current Analytical Chemistry* 3, 149–159.
- He, F.J., MacGregor, G.A., 2003. How far should salt intake be reduced? *Hypertension* 42, 1093–1099.
- He, F.J., MacGregor, G.A., 2009. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of Human Hypertension* 23, 363–384.
- He, F.J., MacGregor, G.A., 2010. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Progress in Cardiovascular Diseases* 52, 363–382.
- Jaenicke, L., 1998. Clara Hamburger and *Dunaliella salina* Teodoro—case study from the first half of the XXth century. *Protist* 149, 381–388.
- Kurlansky, M., 2002. *Salt: A World History*. Penguin Group, London, England.
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J., Wijffels, R.H., 2008. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology* 26, 631–638.
- Li, S., Weber, S.G., 1999. Selectivity of SPME. In: Pawliszyn, J. (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*. The Royal Chemistry, Cambridge, England, pp. 49–56.
- Mani, V., 1999. Properties of commercial coatings. In: Pawliszyn, J. (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*. The Royal Chemistry, England, Cambridge, pp. 57–72.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, 73–83.
- Michelin™, 2009. Map of European salt pans. Provided by Les Salines de France, Paris, France.
- Pecqueur, B., 2001. Qualité et développement territorial: l'hypothèse du panier des biens et des services territorialisés. *Economie Rurale* 261, 37–49.
- Raja, R., Iswarya, S.H., Balasubramanyam, D., Rengasamy, R., 2007. PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiological Research* 162, 168–176.
- Rodríguez-Bustamante, E., Maldonado-Robledo, G., Ortiz, M.A., Diaz-Avalos, C., Sanchez, S., 2005. Bioconversion of lutein using a microbial mixture—maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68, 174–182.
- Tavoularis, G., 2008. Les signes officiels de qualité en perte de reconnaissance. *Consommation et Mode de vie* 212, 1–4.
- Winterhalter, P., Rouseff, R.L., 2002. Carotenoid-derived aroma compounds. In: *American Chemical Society, Symposium Series 802*, Washington, DC, USA.
- Ye, Z.W., Jiang, J.G., Wu, G.H., 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnology Advances* 26, 352–360.
- Zhang, C., Qi, M., Shao, Q., Zhou, S., Fu, R., 2007. Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME-GC-MS. *Pharmaceutical Biomedical Analysis* 44, 464–470.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Berger, R.G., 2003a. Cleavage of  $\beta,\beta$ -carotene to flavor compounds by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62, 331–336.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., Berger, R.G., 2003b. A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta,\beta$ -carotene to flavor compounds. *Biological Chemistry* 384, 1049–1056.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR–DGGE: An application on marine salts produced in solar salterns from the French Atlantic Ocean

Laurent Dufossé<sup>a,\*</sup>, Clara Donadio<sup>a</sup>, Alain Valla<sup>b</sup>, Jean-Christophe Meile<sup>c</sup>, Didier Montet<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Université de La Réunion, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, Ecole Supérieure d'Ingénieurs Réunion Océan Indien, Département Innovation et Développement Agroalimentaire Intégré, 2 rue Joseph Wetzell, Parc Technologique Universitaire, F-97490 Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France

<sup>b</sup> CNRS, Chimie et Biologie des Substances Naturelles, F-29000 Quimper, France

<sup>c</sup> UMR 95 Qualisud, CIRAD, TA B-95/16 73 rue Jean-François Breton, F-34398 Montpellier cedex 5, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 November 2012

Received in revised form

25 January 2013

Accepted 29 January 2013

#### Keywords:

Bacteria

Salt

Microbial ecology

Food traceability

Geographical origin

PCR–DGGE

### ABSTRACT

The determination of geographical origin is part of the demand of the traceability system of food products. A hypothesis of tracing the source of a product is to analyse in a global way the bacterial communities of the food samples after their production. For this purpose, molecular techniques employing 16S rDNA profiles generated by PCR–DGGE were used to detect the variation in bacterial community structures of salts from four French regions. When the 16S rDNA profiles were analysed by multivariate analysis, distinct microbial communities were detected. The band profiles of the salt bacteria from different producing areas were different and were specific for each location and could be used as a bar code to certify the origin of salts. These band profiles can be used as specific markers for a specific location. This method is proposed as a new traceability tool which provides salts with a unique bar code that permits to trace back salts from store shelves to their original location.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Salt (NaCl) has always been consumed by humans and is essential for the health of our cells (water transfer, muscular contraction, pH in stomach) (Kurlansky, 2002). Naturally present in fruits and vegetables which represents around 20% of daily contributions, added to precooked meals (around 50% of contribution) or directly added to home-made meals (around 30%), salt is consumed more than is advised (between 5 and 10 times more than the recommended 2 g per day) (Brown, Tzoulaki, Candeias, & Elliott, 2009; He & MacGregor, 2003).

It is known that salt overconsumption can contribute to the deterioration of health by increasing blood pressure, obesity, cardiovascular diseases... (Alderman, 2002; He & MacGregor, 2010). This is the reason why, in many parts of the world, workgroups associating scientists, administrations, agencies, economic actors, and associations of consumers were set up to decrease by 20% the population consumption of salt.

In front of this situation, salt producers, in particular the smallest ones had to readjust their products to keep a place on the market. Thus, for the last years, measures have been taken to diversify commercial offers of producers with standing salt products and products with a guarantee of know-how (i.e. speciality marine salt products) (Arfini, 1999).

Common salt, i.e. table salt, commonly employed in cooking, is cheaper than speciality marine salt obtained by evaporation of seawater in solar salterns. For a decade some European producers intended to access Protected Geographical Indication (PGI) or Traditional Speciality Guaranteed (TSG) status in order to protect and value coarse salt, ground (fine) salt and salt flower, based on the quality policy for the products of European Union (EU) agriculture. The PGI associates a product with a region, to confirm its authentic origin whereas TSG highlights the traditional character, either in the composition or means of production. The first success in this field was obtained by marine salt producers of Guérande, France that received a PGI label on March 20, 2012 (Anonymous, 2012).

In Europe, consumers are, for example, attracted by high price salt products that could be used in gourmet cooking. Moreover, empirical observation highlighted a concept of revenue linked with territorial qualities, that is to say, combining intrinsic quality of the

\* Corresponding author. Tel.: +262 262 483 362; fax: +262 262 483 348.  
E-mail address: [laurent.dufosse@univ-reunion.fr](mailto:laurent.dufosse@univ-reunion.fr) (L. Dufossé).



product and its anchoring in a specific place with its history and its knowledge-to make (Pecqueur, 2001). This observation is world-wide known for all kind of food and the hand-collected products are usually linked, by producers, to an area of production, like olive oil or wine (Arfini, 1999; Pecqueur, 2001).

Salt flower is a very specific salt, famous in some parts of Europe, like in France where it is called *Fleur de Sel* or in Portugal where its name is *Flor de sal*. Specific names are given in other countries and its quality for cooking is recognized all around the world by Chefs. Its harvest is possible only 3 or 4 months in a year under very specific sun and wind conditions (e.g. between June and August in France). This is the first crystal formed at the surface of the salt pan. Manual harvest conditions of salt flower, raked like a cream on the very top of ponds with specific tools, permits contact between crystals formed and microorganisms of brine (Fig. 1). This characteristic could allow salt flower and other types of sea salt to be differentiated. Indeed, for example, table salt obtained with coarse salt crushed, contains 97% of NaCl and iodine or fluorine could be added in. Coarse salt, large crystals harvested on the ground of the condenser, contains 97% of NaCl. Grey salt, large salt crystals mixed with clay particles of salt pan during harvest, contains 94% NaCl. The latter being the moistest and the less refined (Codex Alimentarius, 2006).

Average salt concentration (25% NaCl) and temperature (34 °C) in salt pan permits the formation of these different salts in the

condensers (final basin of the salt pan cycle, also called crystallizer ponds) (Antón, Rosselló-Mora, Rodríguez-Valera, & Amann, 2000). But the salt flower is the only salt that stays always at the surface of the condensers before it is harvested. Moreover, each environment presents specific microorganisms. In solar salterns, halotolerant and halophilic microorganisms develop specific biological ways to control their osmotic pressure under high salinity (Jaenicke, 1998; Margesin & Schinner, 2001) or high light. Microbiology of saltern crystallizer ponds was re-evaluated quite recently in Spain, Israel and Australia. Molecular, 16S rRNA targeted methods were applied to hypersaline brines. Archea and Bacteria coexist and among Archea, *Haloquadratum walsbyi*, is very predominant with 50% of total cell number. The second quantitatively important component of the biota is *Salinibacter ruber* which represents 20–25% of the total prokaryote community (Bardavid, Khristo, & Oren, 2008). Many other Archea and Bacteria (*Halobacterium*, *Halococcus*...) were then described and many of them produce pigments, such as carotenoids (salinixanthin,  $\beta$ -carotene, spirilloxanthin, bacterioruberin...) (Fig. 1).

Academic literature is very scarce about the characteristics of salt products used in food, even if some papers dealing with volatile compounds present in marine salts were published these last years. Using headspace–solid phase micro extraction (HS–SPME) combined with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) Silva, Rocha, and Coimbra (2009) described 40 volatile compounds in marine salts from Portugal, France and Cape Verde whereas Donadio, Bialecki, Valla, and Dufossé (2011) summarized 58 volatile compounds in brines and fleurs de sel collected in solar salterns from Saint-Armel (Brittany, France). Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC  $\times$  GC/TOFMS) increased the number of volatile compounds up to 157 (Silva, Rocha, Coimbra, & Marriott, 2010) in samples from salt pans of Aveiro (Portugal) and researchers proposed to use some of the volatiles as origin “bio” markers. To our opinion the whole picture is not clear enough at present time to establish such a link and more studies are required.

The aim of the present study is indeed to discuss the possibility to use another technique to associate a salt product with its region of production, i.e. the 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by Polymerase Chain Reaction–Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. By using PCR–DGGE it is possible to estimate the microorganisms’ diversity and to reveal the cultivable and non cultivable germs in a given ecosystem (Leising, 2005, p. 173). Such a technique was successfully applied for traceability and origin determination of food products such as fish (Le Nguyen, Hanh, Dijoux, Loiseau, & Montet, 2008; Tatsadjieu et al., 2010) or fruits (El Sheikh, Bouvet, & Montet, 2011; El Sheikh & Montet, 2011; Montet et al., 2008). The principal objective of this work is to characterize by PCR–DGGE the total bacterial community of marine salts produced in solar salt ponds from four locations of the French Atlantic coast and subsequently to try linking the PCR products with the geographical origin of the salts.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling

Raw salt flower (salt flower collected at the surface of the salt pan, before landing and bleaching under sun drying) (Fig. 1) and marketed salt flower (salt flower after sun drying) from four locations of the French Atlantic Ocean coast (north west of France) have been studied. Samples from two on shore locations, i.e. Saint-Armel, Guérande and two islands, i.e. Noirmoutier and Ré (Table 1) were collected during the production season which lasts from June to September, usually. As production may not occur each

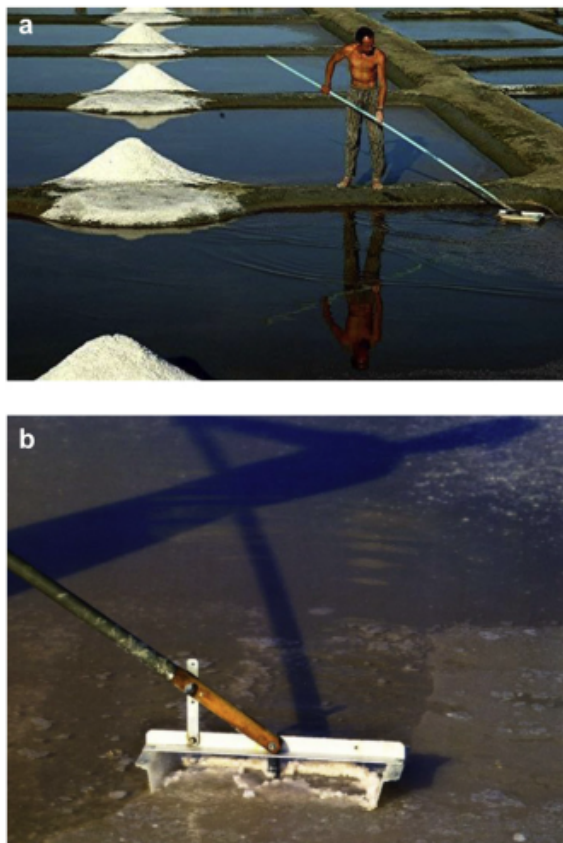


Fig. 1. Manual harvesting of speciality marine salt (*fleur de sel*) in Saint-Armel solar ponds (France) (1a : crystallizer ponds, 1b : detail of handling device).

**Table 1**  
Data about samples of salts collected in salt ponds from the French Atlantic coast (France).

	Guérande		Noirmoutier		Ré		Saint-Armel	
Location	On shore		Island		Island		On shore	
GPS data	47° 19'41"N 2° 25'46"W		47° 00'16"N 2° 15'12"W		46° 13'24"N 1° 26'28"W		47° 34'40"N 2° 42'43"W	
Day of collect	2007-06-10	2009-08-28	2009-08-23	2009-08-23	2005-07-01	2005-07-01	2007-06-03	2009-07-01
Sample names	FGUE1,	GSGUE1,	FNOIR1,	FNOIR2,	FRE1,	FRE2,	FCSTA1,	FSTA2,
& type of salt	fleur de sel	coarse salt	fleur de sel	fleur de sel	fleur de sel	fleur de sel	fleur de sel	fleur de sel

year, due to rainy summers, years of sampling are spread from 2005 to 2009. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2. Extraction of bacterial total DNA

Total DNA was extracted from samples by using a DNA purification kit based on magnetic silica beads (Adembeads from Ademtech, France), following a protocol adapted from the manufacturer. For each sample (in duplicate), 2.5 g of salt were dissolved in 10 mL of molecular water in 50 mL Falcon tubes and incubated on rotating wheel for 15 min. Tubes were then centrifuged at 500 g for 5 min to pellet impurities. 2 mL of supernatant were sampled in Eppendorf tubes and centrifuged at 20,000 g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended with 200  $\mu\text{L}$  of water and 4  $\mu\text{L}$  of RNase added. Then, 400  $\mu\text{L}$  of binding buffer was added and tubes were incubated for 10 min at room temperature. 400  $\mu\text{L}$  of absolute ethanol was added and mixed. 35  $\mu\text{L}$  of Adembeads were added, mixed and the tubes incubated at room temperature for 5 min. Three cycles of magnetic separations coupled with washes using buffers (provided by the manufacturer) were performed by using a (dedicated) magnetic tube rack. The beads pellet was left to dry (cap opened) at room temperature for at least 5 min. The beads were then mixed with 100  $\mu\text{L}$  of water and transferred to a clean Eppendorf tube. Tubes were heated at  $50^{\circ}\text{C}$  for 5 min, briefly vortexed and subjected to magnetic separation. The supernatant (containing the genomic DNA) was collected into a clean Eppendorf tube. An additional magnetic separation was performed as a final step.

DNA quantities were estimated by running purified DNA samples through a 0.8% agarose gel and by using spectrophotometer (BioSpec-Nano, Shimadzu). Gels were photographed on a UV transilluminator with the Gel Smart 7.3 system (Clara Vision, Les Ulis, France).

## 2.3. PCR–Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) analysis

The V3 variable region 16S DNA of the bacterial flora from marine salts was amplified by PCR using forward JCM2 (derived from gc338f) (5'-CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGGCGGGGGACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCA) and reverse 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTTGG) primers (Sigma, France) (inspired from Ampe, Ben Omar, Moizan, Wachter, & Guyot, 1999; Leesing, 2005, p. 173; Le Nguyen et al., 2008). A 40-bp GC-clamp (Sigma, France) at the 5' end of the forward primer ensure that the DNA fragment will remain partial double-stranded and that the region screened is in the lowest melting domain (Sheffield, Beck, Stone, & Myers, 1989).

Each mixture (final volume of 50  $\mu\text{L}$ ) contained less than 25 ng of template DNA, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, all the deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) at 200  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{L}$  of  $10\times$  reaction Taq buffer and 0.5 U of Top Taq polymerase (Qiagen). The amplification was carried out as follow: an initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min and 30 cycles of denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min, followed by a final extension step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Aliquots (5  $\mu\text{L}$ ) of PCR products were analysed by conventional electrophoresis in 2% (w/v) agarose gel with TAE  $1\times$  buffer (40 mM Tris–HCl pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 1.0 mM

$\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ), stained with  $1.5\times$  Gel Red (VWR) in TAE. Gels were photographed and PCR bands quantified by using a standard DNA (100 bp ladder, Promega).

PCR products were analysed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) by using a Bio-Rad Dcode TM universal mutation detection system (Bio-Rad, USA), using the procedure first described by Muyzer, De Waal, and Uitterlinden (1993) and improved by Leesing (2005, p. 173). Samples containing similar amounts of PCR amplicons were loaded into 8% (w/v) polyacrylamide gels (acrylamide/N,N-methylene bisacrylamide, 37.5/1, Promega, France) in  $1\times$  TAE buffer (40 mM Tris–HCl, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 1.0 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ). Electrophoreses were performed at  $60^{\circ}\text{C}$ , using a denaturing gradient in the 30–60% range (100% corresponding to 7 M urea and 40% v/v formamide, Promega, France). The gels were electrophoresed at 20 V for 10 min and then at 80 V for 12 h. After electrophoresis, the gels were stained for 30 min with Gel Red and then photographed as described above.

## 2.4. Image and statistical analysis

Individual lanes of gel images were aligned and processed using ImageQuant TL software (Amersham Biosciences, USA). This software allows detection, precise measure and records of the relative position of each DNA band. The DGGE banding pattern is considered as an image of all of the major bacterial species in the population. An individual discrete band refers to a unique sequence type (Muyzer, Hottenträger, Teske, & Wawer, 1996; Van Hannen et al., 1999), which is treated as a discrete bacterial population. This was confirmed by Kowalchuk et al. (1997), who showed that co-migrating bands generally corresponded to identical sequences. DGGE fingerprints were manually scored by presence and absence of co-migrating bands, independent of intensity. Pairwise community similarities were quantified using the Dice similarity coefficient (SD) (Heyndrickx, Vauterin, Vandamme, Kersters, & De Vos, 1996):

$$\text{SD} = 2N_{\text{c}} / (N_{\text{a}} + N_{\text{b}})$$

where  $N_{\text{a}}$  represents the number of bands detected in sample A,  $N_{\text{b}}$  the number of bands in sample B, and  $N_{\text{c}}$  the number of bands common to both samples. The similarity index was expressed within a range of 0 (completely dissimilar) to 100 (perfect similarity). Significant differences of bacterial communities of salt samples were determined by factorial correspondence analysis, using the first two factors that described most of the variation in the dataset.

A Cluster Analysis was performed using the similarity matrix to group samples according to their similarity index. The reconstruction method used was group average by using Primer v.6 software (UK) and data grouped into dendrograms.

## 2.5. Purification and sequencing of major amplicons

The bands were then cut from the gel and the amplicons purified using a Wizard PCR purification kit (Preps DNA Purification System, Promega, France) followed by a PCR amplification but with

primers without GC clamp. The PCR products were then sent to GATC Biotech company (Germany) where they were submitted to a second DNA purification followed by sequencing. Sequences of 16S rDNA were compared using the data bank Site NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) with the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. DNA extraction and PCR amplification

The DNA extraction method used allowed total DNA quantities ranging from 0.3 to 2 µg per gram of salt to be retrieved. This was evaluated by agarose gel electrophoresis and Biospec analyses (data not shown). These variations were not associated to a type of salt, its day of collect, or its origin of production.

PCR amplifications of bacterial DNA were performed using universal primers and standard protocols. Bacterial 16S rDNA was amplified and gave satisfactory yields. However, neither yeast nor fungal DNA (26S and 28S rDNA respectively) could be detected by PCR amplification using universal primers. This observation suggests that bacteria are dominant in the microbial flora in salt, as observed for environments displaying high salt concentrations (Baxter et al., 2005; Wen et al., 2009), whereas yeast and fungal species are absent or present in scarce quantities. Cultivable/living bacteria were isolated from the same samples in a previous work (Donadio et al., 2011) and it is intended in another study to make 16S rDNA sequencing of some of these to compare with bacterial species identified after sequencing of bands obtained from DGGE gels (see further).

#### 3.2. DGGE analysis of PCR products

PCR products of amplified bacterial 16S rDNA were separated by migration through DGGE gels. DGGE patterns showed variations between salt samples, exhibiting 10–20 discrete bands with various intensities. For each sample, DNA extractions and PCR were performed in duplicates each of which showed identical DGGE patterns indicating a very low (i.e. undetectable) variability within each sample. Co-migrating bands as well as overall patterns variation between samples were clearly visible and further evaluated by statistical analyses (Fig. 2).

#### 3.3. Statistical analyses

Comparisons between DGGE patterns were based on the presence/absence of co-migrating bands in the corresponding samples as previously described (Le Nguyen et al., 2008; Tatsadjieu et al., 2010).

A factorial analysis (PCA) was used to describe most (>63%) of the variation in the dataset. Sample duplicates showed identical DGGE patterns and therefore were merged into a unique sampling point (Fig. 3). Our results showed that, in general, variations between samples of the same location tend to be much lower than variations between samples having different geographical origins (Fig. 3).

Remarkably, high variations between samples originating from Guérande and Saint-Armel could be observed, as compared to those of Ré and Noirmoutier. This might be explained by the fact that samplings were performed at different times (2 year-difference; difference due to the fact that there is no marine salt production during rainy summers). In the case of Guérande, for which samples showed higher variability, the nature of the salt samples (coarse salt vs fleur de sel) could add more variability in the bacterial communities. However, it is important to note that variations

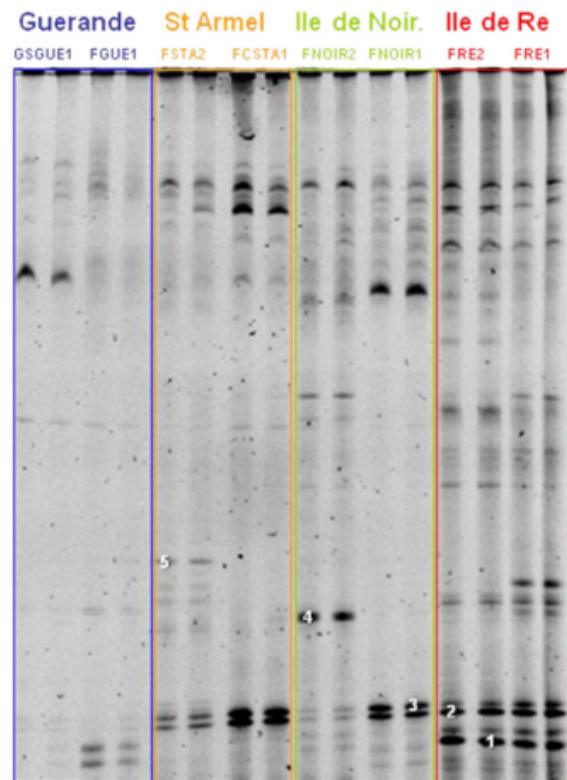


Fig. 2. PCR–DGGE band patterns of bacterial 16S rDNA of salt samples of four different geographical origins (Table 1 for sample name and description).

observed between these samples (GUE and STA) were not high enough to alter the overall pattern of the ACP analysis, positioning samples according to their geographical origin (Fig. 3).

The Cluster analysis orderly groups samples according to their similarity index. As shown in Fig. 4, samples appear grouped according to their geographical origin. The samples from Ré showed the highest similarity level with 75% and Guérande, as expected,

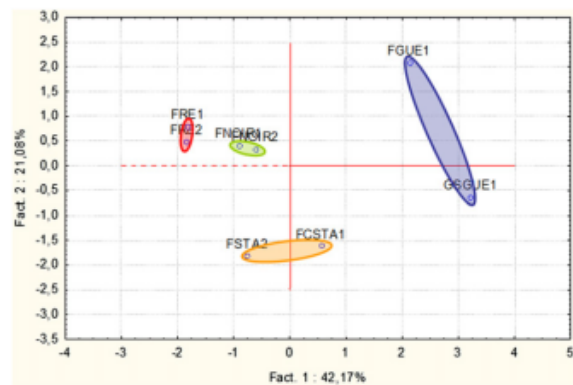


Fig. 3. Factorial variance analysis of bacterial (16S rDNA) DGGE patterns of salt samples of four different geographical origins (Table 1 for sample name and description).

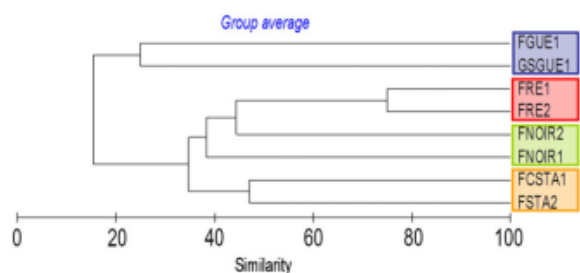


Fig. 4. Cluster analysis of bacterial 16S rDNA DGGE patterns of salt samples from four different locations of production (Table 1 for sample name and description).

the lowest with 25%. Even with modest similarity levels (around 40–50%), and whatever the method of the grouping method used, the samples linkage remains unchanged, indicating the robustness of the approach.

#### 3.4. Bacterial species identified after sequencing of bands obtained from DGGE gels

DNA bands were chosen according to their relative intensity (abundance) and their specificity to a given geographical region of salt production. These bands could correspond to potential biological markers of the region. Five bands were cut from the DGGE gel (Fig. 2), purified, PCR amplified and sequenced (see Section 2.5 for details). Sequences obtained were compared to genome database (Blast) to search for the nearest corresponding bacterial species.

All five bands correspond to halophilic or halotolerant bacterial species isolated from marine or saline samples.

The apparent dominant species present in most samples (bands 2 and 3) are close relatives to *Gracilomonas tropica* (with 93% of sequence identity; strain CL-CB462, accession number EF988655) and *Balneola vulgaris* (with 84% of sequence identity; strain 131X/A01/164, accession number AY576749) that were previously isolated and described from tropical Pacific Ocean (Choi, Zhang, Noh, Kim, & Cho, 2009) and from the north-western Mediterranean Sea (Urios, Agogué, Lesongeur, Stackebrandt, & Lebaron, 2006), respectively.

*Pseudomonas halophila* (corresponding to band 1 with >99% of identity; strain DSM 305, accession number AB021383) seems to be specific of the samples from “Ile de Ré” as it is present in samples FRE1 and FRE2 only (Fig. 2) and previously isolated from Great Salt Lake, USA (Sorokin & Tindall, 2006).

Band 4 appeared to be very specific of the samples FNOIR2 and the closest species is *Persicobacter diffluens* (84% of identity; strain NBRC 15940, accession number AB260929), which was previously isolated from shellfish (Muramatsu et al., 2010).

Samples from Saint-Armel (FSTA2) have a specific band (band 5) that corresponds to *Halanaerobium saccharolyticum* (>99% of identity; strain DSM 6643, accession number X89070) that is absent from sample (FSTA1) that was harvested 2 years before. *H. saccharolyticum* was previously described as a halophilic fermentative species (Rainey et al., 1995).

It is interesting to note that samples coming from the same region tend to have a similar microbial ecology. However, among samples from the same region, variations can occur, for example from one season to another, providing every “vintage” with a unique molecular signature and biological markers that could be used for traceability.

Further work needs to test the relevance of these specific biological markers by studying the persistence over time (seasons) for each producing regions. In addition, it would be interesting to compare our results with those obtained from classical (cultural) methods.

#### 4. Conclusions

In our study, we found that the DGGE pattern of the bacterial communities from marine salts produced in solar salterns from the French Atlantic Ocean was strongly linked to the location of production. Indeed, the analysis of salt samples that originated from different locations showed some significant differences in the DGGE patterns.

The differences in the DGGE patterns can be attributed to differences in environmental conditions of salt productions, water salinity and quality, nutrient concentration, temperature, pH, etc... that can vary according to seasons. However, some common bands obtained by DGGE have been found in all the profiles within the same sampling period and origin. This indicates that the DGGE patterns remain specific to the geographical location and stable over time.

Most analyses of bacterial communities in salt samples were performed using culture dependent methods and only few studies used culture-independent methods. Our study clearly demonstrated the potential of PCR–DDGE technique to be used as a traceability tool for salt samples using bacterial DNA markers. We showed that a specific bacterial 16S rDNA signature persists in salt samples according to their geographical origin of production. Interestingly, the observed and measured variations within samples originating from relatively proximate locations (100 km) gave enough resolution to discriminate the samples.

This technique which is easily applicable to salt samples to assess their geographical origin could be used also for sanitary analyses i.e. to detect pathogens and/or microalgae characterization (another target for traceability assessment).

As bacterial DNA diversity itself is sufficient to describe and discriminate salt samples, it would be interesting to explore the microbial diversity using this time primers targeting archeal DNA. It might be also interesting to investigate and discuss the fact that residual DNA persists after several years of storage. In the present study analyses were performed after up to 6 years following sampling, such a 6-year storage period being longer than 2 to 3-year usual shelf life’s recommended by producers (Anonymous, 2012).

Residual DNA and/or dormant bacteria appear as a quasi-permanent biological signature or bar code and can be easily used as a reliable traceability marker for salt products, a marker that appear specific of the origin of production, stable and very difficult (if not impossible) to falsify.

The global technique PCR–DGGE is relatively fast (less than 24 h) as compared to other classical microbial techniques and this work shows that this molecular technique could be used as a rapid analytical traceability tool for salt products.

#### Acknowledgements

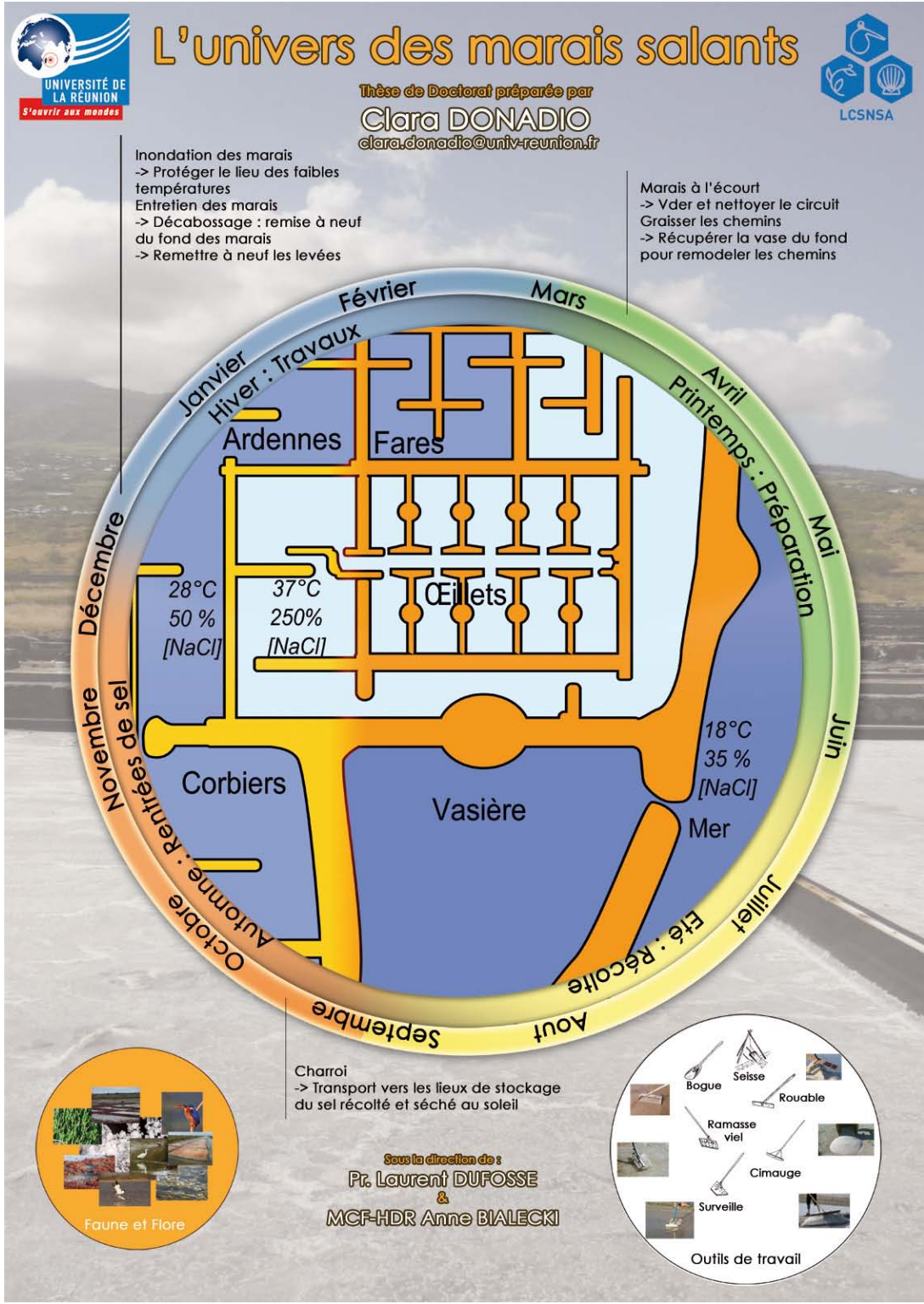
The authors would like to thank salt workers for supplying the samples. From Morbihan, Brittany (France): Olivier Chenelle (*Les Salines de Saint-Armel*). From Loire-Atlantique, Pays de la Loire (France): Pascal Donini, Michel Coquard, Sophie Bonnet-Questiot and Emmanuel Violleau (*Salines de Guérande*). From Noirmoutier, Vendée (France): Bernadette Guitton (*Coopérative du sel de Noirmoutier*). From Ré Island, Charente-Maritime (France): Jean-Michel Pelin (*Esprit du sel, Ars-en-Ré*).

## References

- Alderman, M. H. (2002). Salt, blood pressure and health: a cautionary tale. *International Journal of Epidemiology*, 31, 311–315.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrated the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5464–5473.
- Anonymous. (2012). Commission implementing regulation (EU) no 238/2012 of 19 March 2012 entering a name in the register of protected designations of origin and protected geographical indications [Sel de Guérande/Fleur de sel de Guérande (PGI)]. *Official Journal of the European Union*, (published on March 20, 2012), L80/4–L80/8.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., & Amann, R. (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3052–3057.
- Arfini, F. (1999). The value of typical products: the case of Prosciutto di Parma and Parmigiano Reggiano cheese. In *European Association of Agricultural Economics seminar n° 67, 28/10/1999, Le Mans, France*.
- Bardavid, R. E., Khristo, P., & Oren, A. (2008). Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles*, 12, 5–14.
- Baxter, B. K., Litchfield, C. D., Sowers, K., Griffith, J. D., Dassarma, P. A., & Dassarma, S. (2005). Microbial diversity of great salt lake. In N. Gunde-Cimerman, A. Oren, & A. Plemenintás (Eds.), *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Series: Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*, Vol. 9 (pp. 9–25). Amsterdam: Springer.
- Brown, I. J., Tzoulaki, L., Candeias, V., & Elliott, P. (2009). Salt intakes around the world: implications for public health. *International Journal of Epidemiology*, 38, 791–813.
- Choi, D. H., Zhang, G. I., Noh, J. H., Kim, W. S., & Cho, B. C. (2009). *Gracilimonas tropica* gen. nov., sp. nov., isolated from a *Synechococcus* culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1167–1172.
- Codex Alimentarius. (2006). *Norme Codex pour le sel de qualité alimentaire*. CODEX STAN 150-1985 Rev.1-1997 Amendé 1-1999, Amendé 2-2001, Amendé 3-2006.
- Donadio, C., Bialecki, A., Valla, A., & Dufossé, L. (2011). Carotenoid-derived aroma compounds detected and identified in brines and speciality sea salts (fleur de sel) produced in solar salterns from Saint-Armel (France). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 801–810.
- El Sheikh, A. F., Bouvet, J.-M., & Montet, D. (2011). Novel molecular fingerprinting for the geographical origin of fruits. *Mansoura Journal of Biology*, 37(2), 35–43.
- El Sheikh, A. F., & Montet, D. (2011). Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: an application to Physalis fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits*, 66(2), 79–90.
- He, F. J., & MacGregor, G. A. (2003). How far should salt intake be reduced? *Hypertension*, 42, 1093–1099.
- He, F. J., & MacGregor, G. A. (2010). Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52, 363–382.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., & De Vos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, 26, 247–259.
- Jaenicke, L. (1998). Clara Hamburger and *Dunaliella salina* Teodoresco – a case study from the first half of the XXth century. *Protist*, 149, 381–388.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. L., Embley, T. M., & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1489–1497.
- Kurlansky, M. (2002). *Salt: A world history*. London, England: Penguin Group.
- Le Nguyen, D. D., Hanh, H. N., Dijoux, D., Loiseau, G., & Montet, D. (2008). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: an application on Pangasius fish from Viet Nam. *Food Control*, 19, 454–460.
- Leesing, R. (2005). *Identification and validation of specific markers for traceability of aquaculture fish for import/export*. Ph.D. dissertation, University of Montpellier 2, France.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 73–83.
- Montet, D., Le Nguyen, D. D., El Sheikh, A. F., Condur, A., Métayer, I., & Loiseau, G. (2008). Application of PCR-DGGE in determining food origin: cases studies of fish and fruits. *Aspects of Applied Biology*, 87, 11–22.
- Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Iino, T., Suzuki, K., & Nakagawa, Y. (2010). *Persicobacter psychroviduus* sp. nov., isolated from shellfish, and emended descriptions of the genus *Persicobacter* and *Persicobacter diffuens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1735–1739.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695–700.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., & Wawer, C. (1996). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 34, 1–23.
- Pecqueur, B. (2001). Qualité et développement territorial: l'hypothèse du panier des biens et des services territorialisés. *Economie Rurale*, 261, 37–49.
- Rainey, F. A., Zhilina, T. N., Boulygina, E. S., Stackebrandt, E., Tourova, T. P., & Zavarzin, G. A. (1995). The taxonomic study of the fermentative halophilic bacteria: description of *Haloanaerobiales* ord. nov., *Halobacteroidaceae* fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe*, 1, 185–199.
- Sheffield, V. C., Beck, J. S., Stone, E. M., & Myers, R. M. (1989). Attachment of 40 bp G + C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 232–236.
- Silva, I., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2009). Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry methodology for analysis of volatile compounds of marine salt as potential origin biomarkers. *Analytica Chimica Acta*, 635, 167–174.
- Silva, I., Rocha, S. M., Coimbra, M. A., & Marriott, P. J. (2010). Headspace solid-phase microextraction combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for the determination of volatile compounds from marine salt. *Journal of Chromatography A*, 1217, 5511–5521.
- Sorokin, D. Y., & Tindall, B. J. (2006). The status of the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 and the identity of the strains *Pseudomonas halophila* DSM 3050 and *Halomonas variabilis* DSM 3051. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 487–489.
- Tatsadjieu, N. L., Maïworé, J., Hadjia, M. B., Loiseau, G., Montet, D., & Mbofung, C. M. F. (2010). Study of the microbial diversity of *Oreochromis niloticus* of three lakes of Cameroon by PCR-DGGE: application to the determination of the geographical origin. *Food Control*, 21, 673–678.
- Urios, L., Agogué, H., Lesongeur, F., Stackebrandt, E., & Lebaron, P. (2006). *Balneola vulgaris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes from the north-western Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1883–1887.
- Van Hanne, E. J., Zwart, G., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J., & Laanbroek, H. J. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 795–801.
- Wen, H., Yang, L., Shen, L., Hu, B., Li, Z., & Jin, Q. (2009). Isolation and characterization of culturable halophilic microorganisms of salt ponds in Lianyungang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1727–1732.

## ANNEXE 2 : Vulgarisation

- [1] Poster pour les doctoriales 2012, Université de La Réunion : *L'univers des marais salants* - Clara Donadio, décembre 2011.
- [2] *Témoignages* du 15 juin 2011 : *La recherche en y associant enseignement et échange de savoir interview de Clara Donadio, doctorante* - Manuel Marchal, juin 2011.
- [3] *Le Figaro* du 05 juillet 2013 : *Le sel marin a du bouquet* – d'Yves Miserey, juillet 2013.



Clara Donadio, doctorante en 2ème année de thèse en agro-alimentaire au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Sciences des Aliments (LCSNSA). Sujet de thèse : Caractérisation chimique et biologique des produits salins en fonction de leur site de production.

[...]

**Lors du Forum des Jeunes Chercheurs 2011, vous avez présenté "l'influence de la géolocalisation sur le sel : un premier pas vers une labellisation du sel", pourriez-vous nous en parler ?**

► Le constat est assez simple : actuellement, nous consommons 20 fois plus de sel que les 2g/jour nécessaires au bon fonctionnement de notre corps. Qui plus est, des études récentes (depuis 2001) ont démontré qu'une surconsommation de sel pouvait avoir des impacts sur la santé (pression artérielle...).

C'est pourquoi, à travers le Monde, et même si ces résultats d'étude sont encore soumis à débat, de nombreuses organisations pour la protection de la santé et du consommateur ont mis en place des contrôles afin de réduire la quantité de sel consommé par jour et par personne. Cette diminution de l'utilisation du sel n'est donc pas sans impact sur les petits producteurs de sel (5 T/an/ha contre 100 T/an/ha pour des industriels) qui souhaitent, pour rester compétitifs, apporter une valeur ajoutée à leur produit. Ils essaient donc trouver un moyen de relier leur terroir à leur produit.

En effet, un postulat simple peut être fait : un marais salant est soumis à différents facteurs climatiques (soleil, vent, pluie...). La faune et la flore qui le composent sont donc aussi propres à cet environnement. Les cristaux de sel se formant à la surface des marais, ils peuvent être en contact avec les différentes formes de vie (ou leurs traces). Il y a donc de fortes chances que le sel puisse refléter l'environnement, le terroir duquel il est issu. Mon travail de thèse a donc pour but d'essayer de définir des paramètres pouvant permettre de relier le sel à son site de production. J'étudie ainsi, les micro-organismes de l'eau des marais et donc la couleur et l'odeur qu'ils peuvent donner aux cristaux de sel et les molécules responsables de ces caractéristiques (quelles sont-elles, d'où viennent-elles ?). Les 1ers résultats tendent à prouver qu'il existe bel et bien un lien entre le sel et son terroir, même s'il est inéluctable que le savoir-faire du paludier (producteur de sel) n'y est pas pour rien, puisque c'est lui qui permet, lors de la récolte du sel, un contact entre l'environnement et les cristaux formés (brassage des eaux et du sel, stockage du sel sur les rives des marais...). Certains marqueurs géographiques (molécules chimiques) ont été prédéfinis pour le bassin de Saint-Armel (Guérande, France Métropole) et des études complémentaires sont actuellement en cours pour valider ces hypothèses et déterminer les marqueurs spécifiques d'autres bassins (La Réunion, l'Ile de Ré, le Portugal...) permettant ainsi de placer un premier "grain de sel" dans la démarche vers une labellisation pour les petits producteurs (appellation d'origine contrôlée par exemple).



## **Le sel est-il représentatif de l'île et de sa formation volcanique ?**

► La formation volcanique de l'île oblige les paludiers exploitant les marais de la Pointe-au-sel, de mettre en place des techniques bien spécifiques pour permettre la formation de cristaux. En effet, le sol "poreux" de La Réunion se prête mal à la rétention d'eau naturelle nécessaire pour l'obtention de sel. En Méditerranée ou en Atlantique, le sol est argilo-calcaire et la formation de cristaux de sel se fait grâce à l'évaporation de l'eau salée dans des œillets (petits bassins aménagés dans les marais). Un tel procédé a dû être adapté aux conditions pédoclimatiques de l'île.

Il y a donc de fortes chances pour que les produits issus de nos marais réunionnais soient spécifiques de notre terroir et de ses spécificités !

## Le sel marin a du bouquet

**Riches en composés volatils, les sels de l'Atlantique ont une « signature génétique » différente selon les marais salants où ils ont été récoltés.**

Les recommandations et les normes alimentaires masquent souvent des réalités complexes et diversifiées. Le sel alimentaire en est un bon exemple. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) et les institutions sanitaires des pays riches le répètent: il ne faut pas manger trop de sel. Indispensable à la vie, il peut néanmoins augmenter le **risque d'hypertension, d'accidents vasculaires cérébraux**, etc., s'il est absorbé en trop grande quantité. L'idéal, selon l'OMS, serait de ne pas dépasser 2 mg par jour. On en est loin car il y a beaucoup de sel dans l'alimentation industrielle, le pain, la charcuterie et les fromages...



En réalité, il y a deux sortes de sel alimentaire: le sel gemme ou sel de terre, qui est extrait des mines, et le sel marin, récolté dans ce qu'on appelle les marais salants. Ce n'est pas du tout la même chose. Produit industriellement par dilution et chauffage, le sel terrestre est totalement stérile. En revanche, dans le sel marin qui est produit artisanalement, on trouve des traces de pollen, d'algues, de crustacés présents dans l'eau de mer. «On trouve aussi des **oligoéléments** qui proviennent de l'argile tapissant le fond des marais salants», explique Erwan Bourdic, patron de Natursel, une petite entreprise basée à **Guérande** (Loire-Atlantique).

Une étude récente a montré que la fleur de sel de Saint-Armel (Morbihan) a pas moins de 58 composés volatils parmi lesquels des caroténoïdes présents dans le vin, l'huile d'olive et la tomate (*Journal of Food Composition and Analysis*, septembre 2011). La fleur de sel est constituée de cristaux qui se forment à la surface des marais salants. «Ils proviennent des colorants produits par la microflore marine pour se protéger des UV», indique Laurent Dufossé, de l'université de la Réunion, qui a piloté l'étude. «Les paludiers disent tous que le sel marin a une très forte odeur de violette.»

### Des sels de terroir

Les outils d'analyse de plus en plus performants changent notre perception. En 2009, des chercheurs portugais avaient identifié quarante composés volatils dans les sels de mer des côtes atlantiques. Un an plus tard, la même équipe en recensait 157 dans le sel des marais d'Aveiro, au Portugal. «Le sel marin a plus de goût. Les boulangers et les charcutiers qui l'utilisent ont tendance à en mettre moins», assure Erwan Bourdic.

Au début des années 2000, les producteurs de sel gemme ont voulu faire interdire la commercialisation de sel marin sous prétexte que son taux en chlorure de sodium (NaCl) était inférieur à 97 %. Peine perdue, un décret publié en 2007 a stoppé leur offensive en distinguant

le sel de qualité alimentaire (pas moins de 97 % de NaCl) et le sel marin gris (pas moins de 94 % de NaCl).

Les producteurs de sel marin veulent désormais faire la promotion de **leur produit en mettant en avant la notion de terroir**. Ils vont peut-être pouvoir y parvenir car une étude montre qu'il est possible de déterminer l'origine géographique du sel marin à partir du seul ADN bactérien. Publiée dans le numéro d'août de la revue *Food Control*, elle a été elle aussi pilotée par Laurent Dufossé. Il s'intéresse au sel depuis les années 2000, une époque où les seules recherches portaient sur le risque pour la santé. Il devrait prochainement se pencher sur la cristallographie du sel avec la Nasa.

Les analyses ont été effectuées chaque année pendant six ans et elles montrent que les caractéristiques et les différences sont constantes. «Il en va pour le sel marin comme pour le vin bio dont la saveur et le bouquet sont liés à l'écologie du vignoble», affirme Didier Montet, du Cirad-unité de recherche Qualisud. Les paludiers mettent aussi en avant leur activité artisanale. Le sel qu'ils récoltent est produit par évaporation par le soleil et le vent. Le sel gemme est chauffé après avoir été dilué.

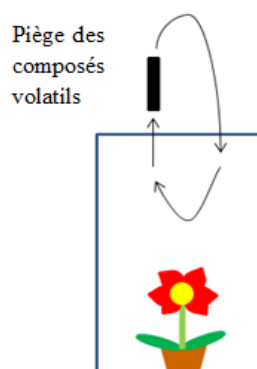


## **ANNEXE 3 : Méthodes d'extraction des composés volatils par headspace dynamique**

L'ensemble de ces techniques d'extraction dynamique consiste à piéger les composés volatils sur un matériau de piégeage. Les composés volatils recueillis, sont par la suite élués du piège par un solvant et sont analysés par chromatographie gazeuse.

#### « Closed-Loop Stripping »

Dans le système « closed-loop stripping » (Figure 1.1), les composés volatils sont recueillis à l'intérieur d'un dispositif fermé en faisant circuler l'espace de tête d'ab(ad)sorption. L'inconvénient de ce procédé est la forte réduction d'échange d'air entre l'intérieur et l'extérieur de la chambre, ce qui affecte l'échange de gaz de la plante pendant les longues périodes d'échantillonnage. Les composés volatils, qui ne sont pas ab(ad)sorbés dans le matériau de piégeage ou qui passent au travers du piège car la surface ab(ad)sorbante est saturée, s'accumulent dans la chambre et peuvent influencer le métabolisme de la plante.



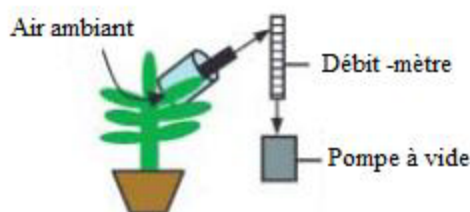
**Figure 1.1.** Extraction headspace dynamique par « closed-loop stripping » (Tholl & Röse, 2006)

#### « Pull systems »

Le « pull system » (Figure 1.2) est un piège ab(ad)sorbant connecté à une pompe à vide qui est directement positionnée à côté de la fleur. Ce procédé est adapté aux plantes qui émettent de grandes quantités de composés volatils mais il présente un fort risque de piéger de l'air ambiant contenant des impuretés, non liées à la fleur, risquant de masquer les composés mineurs des échantillons lors de l'analyse CG. L'isolement de la plante dans un petit récipient en verre ou dans un sac en polyacétate libérant très peu de composés volatils peut réduire la quantité d'impuretés de l'air ambiant. Bien que cette méthode soit simple à mettre en place, elle présente quelques inconvénients :

- La température peut augmenter quand la chambre est directement exposée au soleil,
- L'humidité relative à l'intérieur de la chambre peut augmenter jusqu'à 100% dans un délai court et peut provoquer de la condensation sur les parois de la chambre,

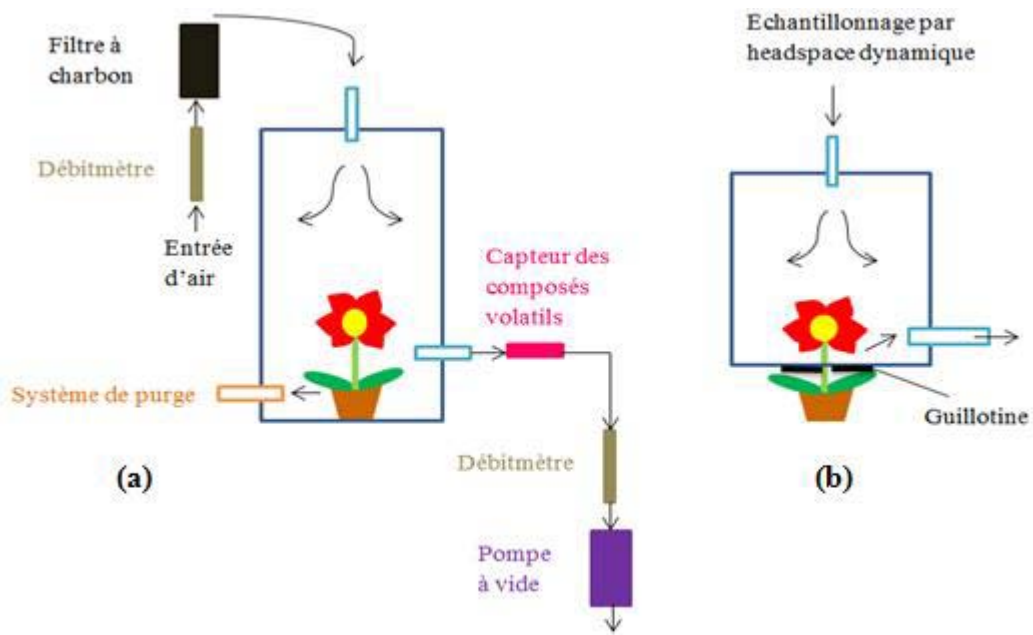
- L'utilisation d'un sac peut endommager les tissus de la plante lors de la pause altérant ainsi l'émission des composés volatils,
- Des ouvertures dans la chambre peuvent fournir des sources supplémentaires d'air impur entrant dans le système.



**Figure 1.2.** Extraction en headspace dynamique par « pull system » (Tholl & Röse, 2006)

### « Push-pull systems »

Dans le système « push-pull » (Figure 1.3(a)), de l'air purifié, pouvant être humidifié au niveau souhaité, est propulsé dans une chambre contenant la plante, avec un débit contrôlé et régulé par un débitmètre. Une quantité définie de cet air est éliminée par une pompe à vide régulée par un deuxième débitmètre. Ainsi, un pourcentage connu des composés volatils émis est collecté. Pour éviter le vide ou une surpression du système, un dispositif de purge est placé dans la chambre. La ventilation à pression positive empêche l'air ambiant de contaminer les composés volatils recueillis. Cette ventilation à pression positive est également utilisée dans quelques grandes chambres de collecte de verre dont le fond est constitué d'une sorte de guillotine (Figure 1.3(b)). La guillotine est constituée de deux lames amovibles revêtues de téflon qui ferment la partie inférieure de la chambre autour de la tige de la plante, en laissant une ouverture pour la tige lorsque les lames s'emboîtent. Ce système de collecte permet l'échantillonnage de composés volatils de certaines parties intactes de la plante en croissance tandis que la partie inférieure de la plante comprenant la terre et le pot, est complètement isolée. Les composés volatils recueillis sont par la suite élués du piège par un solvant et sont analysés par CG. Cette technique a été améliorée, avec l'automatisation par ordinateur qui permet l'analyse des échantillons à des intervalles de temps prédéfinis pendant plusieurs jours pour suivre l'évolution de l'émission de substances volatiles.



**Figure 1.3.** Extraction en headspace dynamique par « push-pull system » (a) Collecte avec des pièges à filtres ; (b) collecte par le système de guillotine (Tholl & Röse, 2006)



## **ANNEXE 4 : Protocole de récolte des échantillons**



## Fiche de prélèvement

### *Saumure et sel brut*

en population naturelle (directement au niveau des marais)

Les saumures (eaux) doivent être récoltées dans des bouteilles en verre avec bouchon hermétique.

Les sels doivent être récoltés soit par effleurage de la surface du marais (fleur en formation), soit au niveau dans les mulons (tas formés juste récolte).

Chaque échantillon doit être associé à un code qui reprend de façon synthétique, zone de prélèvement, année...

Site d'échantillonnage (nom usuel, adresse et coordonnées GPS si possible) :

Date d'échantillonnage :

Nom du préleveur :

Code de l'échantillon\* :

\*Le code doit être court et simple pour permettre une traçabilité efficace et sans équivoque.

Description du site : Climat, environnement, état des marais...

Remarques / commentaires :

Vous pouvez aussi fournir un plan de vos marais avec une croix pour localiser l'origine exacte des échantillons. Merci.

**ANNEXE 5 : Description des coloniesensemencées sur PCA et malt-agar et observées à l’œil nu pour l’ensemble des échantillons des eaux des marais**

**Tableau 3.1.** Description des colonies observées à l'œil nu pour l'ensemble des échantillons d'eaux des marais

	<b>Origines</b>	<b>Aspect des colonies sur PCA</b>	<b>Aspect des colonies sur Malt-Agar</b>
	Eau, été 2009, lot 1	Colonies en masse non dénombrables	Colonies blanches avec de grands filaments
	Eau, été 2009, lot 2	Colonies en masse non dénombrables, petites colonies blanches	Gélose "troublée", colonies blanches
<b>Ile de Ré</b>	Eau, été 2009, lot 3	Colonies en masse non dénombrables, colonies orange en surface et en profondeur, colonies blanches en bloc, mélange de différentes colonies en profondeur et en surface blanche et orange	Colonies en "fleur" blanches, petites colonies blanches
	Eau, été 2009, lot 4	Colonies en masse non dénombrables, colonies orangâtres, un filament blanc	Colonies sombres, avec des spores
	Eau, été 2009, lot 5	Colonies en masse non dénombrables, colonies orange en profondeur, colonies blanches en cercle	NV
	Eau, hiver 2010, lot 1, 2 et 3	Colonies en masse non dénombrables	Colonies très développées et étendues, filaments importants
<b>Noirmoutier</b>	Eau, été 2009, lot 1	Colonies en masse non dénombrables, colonies orange en surface et en profondeur, colonies blanches, colonies orange en "fleur"	Colonies blanches très petites, colonies jaunes circulaires
	Eau, été 2009, lot 2	Colonies en bloc et colonies blanches, colonies orange en profondeur	Gélose "troublée", colonies blanches
	Eau, été 2007	Colonies blanches en profondeur, colonies orange en surface et petites en profondeur, colonies en dôme, contours irréguliers	Quelques colonies minuscules, gélose "troublée"
<b>Saint-Armel</b>	Eau, été 2009, lot 1	Colonies en masse non dénombrables, filaments blancs, petites colonies en profondeur	Colonies en masse non dénombrables, colonies blanches en surface, colonies rondes et jaunes, filaments avec spores
	Eau, été 2009, lot 2	Colonies en masse non dénombrables, colonies rouges, orange, jaunes, blanches, de différentes grandeurs, colonies en "fleur"	Colonies en "fleur" orange, colonies rondes, jaunes et/ou blanches, gélose "troublée"
	Eau, été 2009, lot 3	Colonies en masse non dénombrables, une grande colonie orange en "fleur" en surface, colonies blanches	Colonies filamenteuses grises avec bords blancs, colonies en masse blanches
	Eau, été 2010	Colonies en masse non dénombrables, colonies orange en "fleur" en surface, colonies blanches	Colonies rondes et blanches, colonies avec le centre plus foncé, colonies jaunes

Gélose « troublée » : gélose non limpide, dénotant la présence de microorganismes ; NV : non visible ; en profondeur : sur toute l'épaisseur de la gélose ; en surface : à la surface de la gélose ; PCA : plate count agar

**Tableau 3.1. Suite - Description des colonies observées à l'œil nu pour l'ensemble des échantillons d'eaux des marais**

	<b>Origines</b>	<b>Aspect des colonies sur PCA</b>	<b>Aspect des colonies sur Malt-Agar</b>
<b>Guérande</b>	Eau, été 2009, Lotie 18	Colonies blanches à centre jaune, colonies en "fleur" orange	Petites colonies de toutes les couleurs (blanches, jaunes, orange)
	Eau, été 2009, Lotie 24	Colonies jaunes regroupées, certaines en "fleur"	Colonies petites blanches
	Eau, été 2009, Le Mès lot 1	Colonies orange avec contours irréguliers	Colonies claires avec centres plus foncés
	Eau, La Coyée	Colonies "œuf sur le plat" blanches, colonies filaments épais orange	Colonies poilues grises à bords blancs
	Eau, automne 2009, Dpt bras mort	Colonies blanches irrégulières	Grandes colonies blanches
	Eau, automne 2009, Joestryer	Colonies orange et petites colonies blanches	Colonies blanches avec de grands filaments
	Eau, automne 2009, Boulanger	Colonies blanches en dôme, colonies orange en "fleur"	Colonies en spots noirs
	Eau, été 2010, lot 1	Colonies blanches très petites et colonies en masse difficilement dénombrables	Colonies de différentes formes et couleurs, assez petites
	Eau, été 2010, lot 2	Colonies rosées et colonies en "fleur" orange	Colonies blanches rondes en dôme
	Eau, été 2010, Le Mès lot 2	Colonies rouges, colonies en masse difficilement dénombrables	Colonies blanches en filaments avec un centre plus clair
	Eau, été 2010, Le Mès lot 3	Colonies en masse non dénombrables, colonies orange en surface et en profondeur, colonies blanches en bloc, mélange de différentes colonies en profondeur et en surface blanche et orange	Colonies poilues grises à bords blancs
	Témoin	NV	NV

Gélose « troublée » : gélose non limpide, dénotant la présence de microorganismes ; NV : non visible ; en profondeur : sur toute l'épaisseur de la gélose ; en surface : à la surface de la gélose ; PCA : plate count agar, Dpt : département

**ANNEXE 6 : Analyse en composantes principales : microorganismes et couleur des marais (toutes origines confondues)**

## Matrice ACP 1. Bactéries - Levures - Microalgues - Chroma

	[Bactéries] (UFC/mL)	[Levures et moisissures] (UFC/mL)	[Microalgues] (UFC/mL)	Couleur (Chroma C*)
Ile de Ré lot 1 2009	5	0	160	4,42
Ile de Ré lot 2 2009	101	267	0	8,57
Ile de Ré lot 3 2009	840	0	64	6,66
Ile de Ré lot 4 2009	2584	167	160	3,36
Ile de Ré lot 5 2009	1854	0	64	5,31
Ile de Ré hiver lot 1 2010	20213	11750	80	0,54
Ile de Ré hiver lot 2 2010	20147	11803	100	0,59
Ile de Ré hiver lot 3 2010	20212	10796	106	0,62
Guérande Boulanger œillet 12 2009	204978	576590	458	8,9
Guérande lotie 24 2009	213049	234353	235	6,37
Guérande La Coyée 2009	240820	267208	256	6,12
Guérande Département bras mort 2009	227035	251830	200	2,66
Guérande lotie 18 2009	814958	683833	301	3,47
Guérande Joestryer œillet 12 2009	273190	359480	279	7,67
Guérande Le Mès 2009	341200	63173	175	4,07
Guérande lot 1 2010	705000	nc	853	14,76
Guérande lot 2 2010	1650000	2460000	759	12,34
Guérande Le Mès lot 1 2010	270000	1676667	679	13,53
Guérande Le Mès lot 2 2010	nc	230000	586	13,72
Saint-Leu Mer 2011	11944	0	5	0,1
Saint-Leu Cristallisoire 2011	3240	0	0	0,35
Saint-Armel lot 1 2009	3833	67	5152	25,2
Saint-Armel lot 2 2009	1084	10	320	9,21
Saint-Armel lot 3 2009	247	0	576	10,67
Saint-Armel 2007	1060	51	256	1,92
Saint-Armel 2010	4027	62	523	19,94
Noirmoutier lot 1 2009	936	833	224	3,78
Noirmoutier lot 2 2009	2771	835	180	4,06

## Matrice ACP 2. Bactéries - Levures - Microalgues - Couleur - Total composés volatils - Total norisoprénoides

	[Bactéries] (UFC/mL)	[Levures et moisissures] (UFC/mL)	[Microalgues] (UFC/mL)	Couleur (Chroma C*)	Nombre total de composés	Nombre total de norisoprénoides identifiés
Ile de Ré lot 1 2009	5	0	160	4,42	25	4
Ile de Ré lot 2 2009	101	267	0	8,57	13	5
Ile de Ré lot 3 2009	840	0	64	6,66	17	4
Guérande lot 1 2010	705000		853	14,76	20	12
Guérande lot 2 2010	1650000	2460000	759	12,34	15	10
Saint-Armel lot 1 2009	3833	67	5152	25,2	58	31
Saint-Armel lot 2 2009	1084	10	320	9,21	37	16
Saint-Armel lot 3 2009	247	0	576	10,67	37	19
Saint-Armel 2010	4027	62	523	19,94	25	10
Noirmoutier lot 1 2009	936	833	224	3,78	11	8
Noirmoutier lot 2 2009	2771	835	180	4,06	11	6

**ANNEXE 7 : Liste des composés volatils identifiés lors des analyses SPME /  
CG-SM**

### Hydrocarbures

heptadécane

octadécane

heptadéc-3-ène

heptadéc-8-ène

heptadéca-6,9-diène

4,5-diéthyl-octa-3,5-diène

### Alcools

heptan-1-ol

octan-1-ol

nonan-1-ol

6-méthylheptan-2-ol

6-méthylhept-5-én-2-ol

oct-1-én-3-ol

2,3-diméthylcyclohexan-1-ol

2,6-diméthylcyclohexan-1-ol

### Aldéhydes

octanal

nonanal

décanal

dodécanal

### Cétones

6-méthylheptan-2-one

6-méthyl-5-heptén-2-one

dodécan-3-one

3,3-diméthyl-octane-2,7-dione

2,4,4-triméthylcyclopentane-1-one

3,4,5-triméthylcyclopent-2-én-1-one

2-méthoxy-6-méthyl-4H-pyran-4-one



## Composés aromatiques

alcool phényléthylique

diéthyl-phtalate

2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phénol  
(2,4-DTBP)

2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-(1-oxopropyl)-phénol

1-méthylododécylbenzène

## Esters et lactones

1,2-benzènedicarboxylate de butyle et de 2-éthylhexyle

dihydro-5-pentyl-2(3*H*)-furanone  
( $\gamma$ -nonalactone)

dihydro-5-heptyl-2(3*H*)-furanone

## Monoterpènes oxygénés

tétrahydro-2-isobutyl-4-méthylpyrane  
(*cis*-dihydro-oxyde de rose)

tétrahydro-4-méthyl-2-(2-méthylpropén-1-yl)-(2*H*)-pyrane  
(*cis*-oxyde de rose)

5-méthyl-2-(1-méthyléthyl)-cyclohexan-1-one  
(*p*-menthan-3-one)

4-méthyl-1-(1-méthyléthyl)-cyclohex-3-én-1-ol  
(terpinén-4-ol)

$\alpha,\alpha,4$ -triméthylcyclohex-3-én-1-méthanol  
( $\alpha$ -terpinéol)

1-méthyl-4-(1-méthyléthylidène)-cyclohexanol

2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène-1-méthanol  
( $\beta$ -cyclogéranol)

1-formyl-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène  
( $\beta$ -cyclocitral)

2,7,7-triméthylbicyclo[3.1.1]hept-2-én-6-one  
(chrysanthénone)

1-méthyl-4-(1-méthyléthylidène)-cyclohexanol  
( $\gamma$ -terpinéol)

**Sesquiterpènes hydrocarbonés**

(1*S*-exo)-2-méthyl-3-méthylène-2-(4-méthyl-3-pentényl)-bicyclo(2.2.1)heptane  
( $\beta$ -santalène)

**Norisoprénoides****C<sub>9</sub>**

2,2,6-triméthylcyclohexan-1-one

2,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-ol

2,3,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one

3,4,4-triméthylcyclohex-2-én-1-one

3,5,5-triméthylcyclohex-2-én-1-one  
(isophorone)

2,6,6-triméthylcyclohexan-1-one

2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-  
dione  
(4-citroisophorone)

2,2,6-triméthylcyclohexane-1,4-dione

**C<sub>10</sub>**

3,3,5,5-tétraméthylcyclohexan-1-one

1-(1,4-diméthylcyclohex-3-én-1-yl)-éthan-  
1-one

car-2-én-4-one

2,6,6-triméthyl-1-cyclohex-1-ène-1-  
carboxaldéhyde**C<sub>11</sub>**2-(2,6,6-triméthyl-cyclohex-1-én-1-  
yl)-1-acétaldéhyde1-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-  
éthan-1-ol5,6,7,7a-tétrahydro-4,4,7a-triméthyl-  
2(4*H*)-benzofuran-1-one  
(dihydroactinidiolide - DHA)

Norisoprénoïdes		
C <sub>13</sub>		
2,6,6,10-tétraméthyl-1-oxaspiro[4,5]déc-9-ène (théaspirane A)	4-(2-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexyl)-but-3-én-2-one	4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-ol (α-ionol)
4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-butan-2-one (dihydro-α-ionone)	(E)-4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2-én-1-yl)-but-3-én-2-one ((E)-α-ionone)	4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-butan-2-ol (dihydro-β-ionol)
3-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-2-yl)-oxiran-2-yl-éthan-1-one (7,8-époxy-α-ionone)	4-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-én-1-yl)-but-3-én-2-ol (β-ionol)	1-(1,2,2-triméthylcyclopent-1-yl)-pentane-1,4-dione
5,6-7,8-diépoxy mégastigman-2-one	<i>trans</i> -1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,5,5-triméthyl naphthalén-2-ol ( <i>cis</i> -α-ambrinol)	

Divers		
2-méthyl-5-isopropénylfurane	4,5,6,7-tétrahydro-7,7-diméthyl-1(3 <i>H</i> )-isobenzofuran-1-one (phthalide γ-lactone)	<i>trans</i> -octahydro-5,5,8a-triméthyl-2 <i>H</i> -1-benzopyrane
trisulfure de diméthyle		

# RÉSUMÉ

---

Exploité depuis toujours, le sel a connu, au temps de la Gabelle notamment, des heures de gloire certaines, faisant de lui un métal blanc précieux, recherché et coûteux. Cependant, de nos jours, il est considéré comme un minéral essentiel, certes, mais aussi dangereux pour la santé si surconsommé. Ainsi, les paludiers d'aujourd'hui doivent mettre en avant le caractère authentique de leur produit et leur savoir-faire ancestral, symboles de qualité dans l'esprit des contemporains, pour réussir à maintenir leur activité et leur part de marché. L'objectif de cette étude était ainsi de définir des pistes qui garantiraient aux paludiers la protection de leur travail, par exemple dans le cadre d'une démarche d'appellation d'origine contrôlée ou protégée. Pour ce faire, un partenariat avec des sauniers de la Côte Atlantique Française (Ile de Ré, Ile de Noirmoutier, presque Ile de Guérande, salines de Saint-Armel) a permis de collecter divers échantillons (eaux des marais, sels).

Dans un premier temps, une recherche de microorganismes et une étude sur les traces d'ADNr-16S présent sur les cristaux de sel, ont permis de caractériser une partie du microbiote halophile se développant au niveau des bassins de production du sel de mer, alors que leur teneur en sel peut aller jusqu'à 25 %.

Dans un second temps, une recherche de composés volatils a été conduite afin de déterminer si l'environnement pouvait influencer l'empreinte olfactive des eaux des marais et du sel lors de sa formation et / ou de sa récolte. Un protocole d'extraction et d'analyses a été développé et a permis la mise en évidence d'un profil en composés volatils propre à chaque bassin. Parmi les composés volatils détectés, de nombreux norisoprénoides, provenant probablement de la dégradation de caroténoïdes produits par les microorganismes halophiles, ont ainsi été identifiés : pour le « bassin » Ile de Ré, 21 composés volatils ont été identifiés dont 8 composés dérivés des caroténoïdes (CDC) ; pour le « bassin » de Noirmoutier, 13 composés dont 7 CDC ; pour le « bassin » de Saint-Armel, 54 composés dont 22 CDC ; pour le « bassin » Guérandais, 19 composés dont 8 CDC.

D'une façon générale, les résultats obtenus aussi bien d'un point de vue microbiologique que chimique, ont révélé une forte corrélation entre les marais salants et le sel qu'ils produisent : les microorganismes spécifiques d'un environnement laissent des empreintes sur les eaux et le sel, ce qui permettrait notamment aux paludiers de caractériser leur produit en vue d'une protection basée sur de véritables marqueurs propres à chaque marais (pour des origines distantes de quelques kilomètres, des différences sont déjà notables entre salines tant au niveau « odeur » qu'au niveau microbiote).

**Mots clés :** marais salants, sel, *Dunaliella salina*, norisoprénoides, ADNr-16S, typicité, caroténoïdes, halobactéries.

# ABSTRACT

---

Salt has always been exploited in living memory. It has known its heyday at several occasions throughout history, particularly during the period of the French Gabelle, and therefore came to be seen as a precious white metal both sought after and expensive. Yet, nowadays, although it has been considered as an essential mineral, it has also turned up to be unhealthy when taken in excessive amounts. Consequently, salt workers of our day and age have to highlight the genuine nature of their product as well as their ancestral skills, for they both stand out as tokens of quality for our contemporaries. Meeting the expectations of the consumer is the only way for them to keep up with their work and maintain their share on the market. Thus, this study aimed to define ways for salt workers to have their work preserved, for instance throughout a Protected Designation of Origin. Therefore, a partnership with Atlantic French salt workers (from Ré Island, Noirmoutier, Guérande and Saint-Armel) has been established, allowing us to collect samples of salt marsh water and salts.

First, an overview of microorganism population and 16S-rDNA in each water or salt sample permitted to define what kinds of microorganism populations were to be found in salt marshes. Secondly, a search for volatile components was led so as to determine whether the environment might affect the olfactory footprint of salt marshes and of salt itself during its formation and its harvest. A process of extraction and analysis has been developed, shedding light on a link between the origin and the olfactory footprint of salt. As an example, the halophilous microorganisms which are extremely rich in carotenoid (hence the red-orange colour of some marshes) are partly responsible for the presence of norisoprenoids in the volatile components which have been identified: 21 compounds were identified in Ré Island (including 8 norisoprenoids), 13 in Noirmoutier (including 7 norisoprenoids), 54 in Saint-Armel (including 22 norisoprenoids), 19 in Guérande (including 8 norisoprenoids).

For each area, DNA traces and volatile profiles were identified. Therefore, a strong link can be established between salt marshes and the salt they produce. It appears that the differences between salt flats regarding either their smell or their microbiota are always noteworthy, even when marshes are only a few miles apart. Thus, the specific pool of the identified microorganisms which leave prints on the salt would allow saltworkers to define their product so as to ensure a form of protection based on specific markers which are proper to each marsh.

**Key words:** salt marshes, salt, *Dunaliella salina*, norisoprenoids, 16S-rADN, typicity, carotenoids, halobacteria.