



HAL
open science

Etude géochimique des sédiments du lac de Cadagno et de la cinétique de déshydratation des stérols

Yvan Finck

► **To cite this version:**

Yvan Finck. Etude géochimique des sédiments du lac de Cadagno et de la cinétique de déshydratation des stérols. Géochimie. University of Geneva, 2003. Français. NNT : . tel-00214292

HAL Id: tel-00214292

<https://theses.hal.science/tel-00214292>

Submitted on 23 Jan 2008

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.

**Etude géochimique des sédiments du lac de Cadagno
et de la cinétique de déshydratation des stérols**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences, mention chimique

par

Yvan FINCK

(France)

Thèse N° 3490

GENÈVE

Atelier de reproduction de la section de physique

2003

"Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme."

Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794)

A mes parents,
à Françoise

Les recherches réalisées dans le cadre de cette thèse ont été effectuées au cours des années 2000-2003 dans le Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université de Genève sous la direction du Professeur Fazil Gülaçar.

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Fazil Gülaçar de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant pour le cadre de travail excellent dont j'ai pu bénéficier ainsi que pour les nombreuses et fructueuses discussions scientifiques que nous avons eues.

Mes remerciements vont également au Professeur Claude Largeau de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris et au Professeur Georges Gorin de la Section des Sciences de la Terre de l'Université de Genève qui ont accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je tiens encore à remercier le Professeur Georges Gorin et Dr Caroline Pellaton de la Section des Sciences de la Terre de l'Université de Genève pour l'aide et les conseils précieux qu'ils m'ont fournis. Je remercie par la même occasion le Dr Jean-Luc Loizeau de l'Institut F.-A. Forel (Section des Sciences de la Terre) pour son travail concernant les datations de la carotte sédimentaire.

Je suis aussi reconnaissant vis à vis de Dr Francine Dreier pour son aide concernant les recherches bibliographiques.

Ma gratitude va également au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique qui a subventionné une partie de mes travaux.

J'adresse finalement mes sincères remerciements à tous les membres du groupe de Spectrométrie de Masse pour l'aide qu'ils m'ont apportée et avec qui j'ai eu le plaisir de passer la plus grande partie de ma thèse: Catherine Riffé-Chalard, Ludovica Verzegnassi, Geneviève Von Arx, Eliane Sandmeier, Danielle Klink, Gamze Kavran, Aydin Nebahat, Sawsan Daher, André Schäffer, Phillipe Perrottet, Werner Klöti, Robert Biondina, Homayoun Nozary et Patrick Schüpfer.

Table des matières

Section I: Etude géochimique des sédiments du lac de Cadagno & de la cinétique de déshydratation des stérols _____ 1

Introduction Générale _____ 3

Première partie: Généralités et cadre de l'étude _____ 7

1 La géochimie organique _____ 9

- 1.1 Définition _____ 9
- 1.2 Le cycle du carbone _____ 9
- 1.3 Les biomarqueurs _____ 11
- 1.4 La diagenèse _____ 11

2 Biomarqueurs utilisés dans le cadre de cette étude _____ 15

- 2.1 Biomarqueurs de type *n*-alcanes _____ 15
- 2.2 Biomarqueurs terpenoïdiens pentacycliques _____ 16
 - 2.2.1 Vue d'ensemble _____ 16
 - 2.2.2 Diterpénoïdes _____ 16
 - 2.2.3 Triterpénoïdes pentacycliques _____ 17
- 2.3 Biomarqueurs stéroïdiens _____ 22
 - 2.3.1 Nomenclature _____ 22
 - 2.3.2 Identification des stéroïdes par GC-MS _____ 24
 - 2.3.3 Fonctions des stérols _____ 26
 - 2.3.4 Biosynthèse des stérols _____ 26
 - 2.3.5 Distribution des stérols dans les organismes vivants _____ 27
 - 2.3.6 Diagenèse des stéroïdes _____ 32
 - 2.3.7 Indicateurs de maturité thermique _____ 36

3 Le lac de Cadagno _____ 37

- 3.1 Présentation générale _____ 37
- 3.2 Données physico-chimiques _____ 37
- 3.3 Phytoplancton et zooplancton _____ 38
- 3.4 Colonies bactériennes _____ 39
- 3.5 Composition de la matière organique en suspension et des sédiments de surface _____ 40

4 Conclusion _____ 41

5 Références _____ 42

Deuxième partie: Partie expérimentale _____ 51

1 Introduction _____ 53

2 Carottage _____ 53

3 Développement d'une procédure d'extraction et de fractionnement d'un sédiment lacustre récent _____ 53

- 3.1 Vue d'ensemble de la procédure d'extraction et de fractionnement adoptée _____ 53
- 3.2 Lyophilisation et broyage du sédiment _____ 53
- 3.3 Extraction _____ 55

3.3.1	Evaluation de la technique d'extraction par micro-ondes	55
3.3.2	Procédure choisie: Extraction par ultra-sons	63
3.4	Séparation des acides et des neutres	64
3.4.1	Données bibliographiques	64
3.4.2	Partie expérimentale	64
3.5	Elimination du soufre élémentaire	65
3.5.1	Données bibliographiques	65
3.5.2	Partie expérimentale	65
3.5.3	Procédure adoptée	69
3.6	Fractionnement des neutres par Flash Chro	69
3.6.1	Données bibliographiques	69
3.6.2	Partie expérimentale	70
3.6.3	Procédure adoptée	73
3.7	Elimination des hydrocarbures linéaires par inclusion dans un tamis moléculaire	73
3.7.1	Utilisation de tamis moléculaire composé de proportions silice:alumine 1:1	73
3.7.2	Utilisation du tamis moléculaire ZSM-5 composé de proportions silice:alumine 280:1	75
4	<i>Réactions menées sur le sédiment</i>	79
4.1	Réaction de saponification	79
4.2	Réaction de désulfurisation par NaBH ₄ /NiCl ₂	79
4.2.1	Données bibliographiques	79
4.2.2	Désulfurisation d'un mélange de stérols à l'aide de NaBD ₄ /NiCl ₂	80
4.3	Réaction de désulfurisation douce	86
4.3.1	Données bibliographiques	86
4.3.2	Partie expérimentale	87
4.3.3	Procédure adoptée	88
5	<i>Analyse quantitative</i>	88
5.1	Quantification des stérols et des stérènes	88
5.1.1	Standards internes	88
5.1.2	Standard externe	89
5.1.3	Quantification par GC-FID	89
5.1.4	Quantification par GC-MS	90
5.2	Quantification des composés différents des stérols et stérènes	91
5.3	Dérivatisation	92
5.4	Conditions d'analyses	92
5.4.1	Importance des dimensions des colonnes GC employées	92
5.4.2	Conditions d'analyses	93
6	<i>Analyse du TOC</i>	93
6.1	Principe	93
6.2	Mise au point de la méthode d'analyses	94
6.3	Procédure adoptée	94
7	<i>Conclusion</i>	95
8	<i>Références</i>	96

Troisième partie: Analyse géochimique des sédiments du lac de Cadagno & Étude de la cinétique de déshydratation des stérols **101**

1	<i>Introduction</i>	103
2	<i>Carbone organique total (TOC) le long de la carotte sédimentaire</i>	103
3	<i>Examen au microscope optique de la carotte sédimentaire</i>	105

3.1	Résultats	105
3.2	Interprétation des résultats	107
4	<i>Datation de la carotte</i>	109
5	<i>Hydrocarbures acycliques</i>	110
5.1	Hydrocarbures linéaires saturés	110
5.1.1	Analyse de plantes herbacées aux abords du lac	110
5.1.2	Analyse des algues <i>Chara</i>	111
5.1.3	Analyse des n-alcanes libres de la carotte sédimentaire	113
5.2	Pristane et phytane	116
6	<i>Terpénoïdes autres que les stéroïdes</i>	117
6.1	Origines	117
6.2	Variations en fonction de la profondeur	119
7	<i>Stéroïdes</i>	120
7.1	Identification des stéroïdes	120
7.1.1	Identification des stérols	120
7.1.2	Identification des stérènes et stéranes	122
7.2	Origines des biomarqueurs stéroïdiens présents dans les sédiments du lac de Cadagno	124
7.2.1	Origines des stérols présents dans les sédiments	124
7.2.2	Origine des stérènes présents dans les sédiments du lac de Cadagno	132
7.3	Variations des stéroïdes le long de la carotte sédimentaire	137
7.3.1	Variations des stérols et stérènes libres le long de la carotte sédimentaire	137
7.3.2	Stérols liés	143
7.3.3	Stérènes désulphurés	145
7.4	Rapports stanol/sténol	146
7.5	Cinétique de transformation des stérols libres en stérènes	148
7.5.1	Modèle théorique	148
7.5.2	Interprétation des graphiques obtenus	149
8	<i>Conclusions</i>	155
9	<i>Références</i>	158

<i>Conclusion Générale</i>	165
-----------------------------------	------------

Section II: Occurrence d'une nouvelle classe de biomarqueurs stéroïdiens: les 4,14-diméthylstéranes	169
--	------------

Annexe de la Section I	177
-------------------------------	------------

1	<i>Alcanes linéaires et ramifiés</i>	179
2	<i>Terpénoïdes non stéroïdiens</i>	179
3	<i>Stérols</i>	180
4	<i>Stérènes</i>	183
5	<i>Spectres de masse</i>	185
5.1	Remarques préliminaires	185
5.2	Spectres de masse par impact électronique de triterpénoïdes non stéroïdiens	186
5.3	Spectres de masse par impact électronique de stérols dérivatisés sous forme d'éthers triméthylsilylés	187
5.4	Spectres de masse par impact électronique des stérènes	188

Section I:

**Etude Géochimique des Sédiments
du Lac de Cadagno
&
de la Cinétique de Déshydratation
des Stérols**



Introduction Générale

Dans le cycle global du carbone, les bassins aquatiques et sédiments récents constituent l'interface des cycles biochimique et géochimique. Ils sont également le point de départ de la diagenèse précoce correspondant aux premières réactions de transformation de la matière organique d'origine biologique. Les composés organiques contenus dans les sédiments anciens, qualifiés de "marqueurs fossiles" ou "biomarqueurs", sont le résultat des transformations ultérieures des produits de la diagenèse. La nature et la distribution des marqueurs fossiles dans les sédiments anciens sont donc gouvernées, non seulement par les conditions physico-chimiques postérieures à l'enfouissement des sédiments, mais également par les facteurs qui régnaient lors de la déposition.

Une classe de biomarqueurs importante dans l'établissement des sources et de la diagenèse de la matière organique des sédiments anciens est celle des hydrocarbures stéroïdiens. La première étape dans la diagenèse des stérols d'origine biologique est la déshydratation. Les stérènes produits ont été reportés dans des sédiments d'âges très différents, des sédiments de surface (Albaiges *et al.*, 1984; Brassell *et al.*, 1980; Dastillung et Albrecht, 1977; Gagosian et Farrington, 1978; Riolo *et al.*, 1978; Schouten *et al.*, 2000b) aux sédiments de l'époque du Miocène (20 millions d'années) (Brassell *et al.*, 1984; Giger et Schaffner, 1981; MacKenzie *et al.*, 1982). Ils ont également été identifiés dans des particules en suspension suggérant que la réaction de déshydratation est déjà opérante dans la colonne d'eau.

Il est intéressant de remarquer que, dans la plupart des cas, les Δ^2 -stérènes provenant de la déshydratation des stanols correspondants tiennent une place prépondérante parmi les stérènes reportés. Néanmoins, comparés aux Δ^5 -stérols, les stanols sont généralement présents en quantités moins importantes. Pour cette raison, la prédominance des Δ^2 -stérènes observée plutôt que des $\Delta^{3,5}$ -stéradiènes apparaît surprenante. Il faut toutefois remarquer que, parmi les hydrocarbures stéroïdiens identifiés, seule la structure de certains composés a été proposée. Parmi ceux-ci figurent les $\Delta^{3,5}$ -stéradiènes mais aussi des stératriènes possédant une troisième double liaison dans la chaîne latérale. Toutefois, à notre connaissance, il est frappant de constater que les produits de déshydratation des $\Delta^{5,7}$ -stérols ne sont jamais reportés.

Les observations précédentes soulèvent un certain nombre de questions. La déshydratation des stanols dans la colonne d'eau est-elle un processus opérant par voie microbienne? La déshydratation des Δ^5 -, Δ^7 - et $\Delta^{5,7}$ -stérols procède-t-elle par un autre mécanisme? La vitesse de déshydratation est-elle gouvernée par des facteurs structuraux expliquant la présence ou l'absence de certains hydrocarbures stéroïdiens? A l'opposé, est-il possible que, contrairement aux Δ^2 -stérènes, les Δ^5 -, Δ^7 - et $\Delta^{5,7}$ -stérols soient si rapidement transformés (via des réactions d'isomérisation des double liaisons) que leurs produits directs de déshydratation ne soient pas

observables? La littérature géochimique ne donne pas de réponses évidentes à toutes ces interrogations.

Le travail entrepris dans le cadre de cette thèse a pour but d'essayer de répondre à l'ensemble de ces questions par une étude détaillée des stérols et des hydrocarbures stéroïdiens des sédiments du lac Cadagno. Ce dernier apparaît privilégié pour mener à bien ce projet. En effet, l'impact de l'activité anthropogène sur l'écosystème de ce lac situé à moyenne altitude est considéré comme négligeable. De plus, ce site a fait l'objet de nombreuses études géo-, bio- et physico-chimiques. Les travaux de Putschew *et al.* (1995; 1996) ont également montré que les apports allochtones étaient mineurs simplifiant la problématique précurseur-produit stérol-stérène. Enfin les auteurs ont rapporté la présence de nombreux stérols ainsi que de stérènes mono-, di- et tri-insaturés.

L'étude menée dans ce manuscrit est organisée en trois parties. La première partie bibliographique se consacre à la description des transformations diagénétiques des biomarqueurs considérés dans cet ouvrage avec un important développement sur les biomarqueurs stéroïdiens. Les informations bibliographiques relatives au lac de Cadagno sont également examinées. Dans une seconde partie, la procédure expérimentale est présentée en exposant les problèmes rencontrés et les solutions apportées. Dans une troisième et dernière partie, l'étude de la cinétique de déshydratation des stérols dans les sédiments du lac de Cadagno est réalisée après une analyse géochimique menée à l'aide de biomarqueurs classiques.

Première partie:

Généralités et cadre de l'étude

1 La géochimie organique

1.1 Définition

La géochimie organique consiste en l'étude du devenir et de la distribution des composés carbonés dans la biosphère et la géosphère (milieu sédimentaire). Son domaine d'applications est très large. Elle s'intéresse tout aussi bien aux transformations biochimiques de la matière organique dans le milieu aquatique, qu'aux transformations physico-chimiques s'effectuant dans les sédiments de surface ou encore à la genèse du charbon, du pétrole et du gaz naturel dans les strates de la géosphère vieille de plusieurs dizaines de millions d'années. Afin de mieux cerner les transformations auxquelles est soumise la matière carbonée de manière générale, une connaissance préalable du cycle du carbone se révèle nécessaire.

1.2 Le cycle du carbone

La Figure 1.1 permet de visualiser la nature des différents flux de matière organique opérant entre les principaux réservoirs de carbone. Le plus important est constitué par la roche sédimentaire qui contient plus de 99.9 % de la matière carbonée terrestre (Brassell, 1994). Cette dernière y a été concentrée au fil du temps principalement sous la forme de carbonates. Cette accumulation s'est produite en dépit d'un flux de carbone entrant dans la géosphère 100 fois plus réduit que ceux opérant dans la biosphère (Killops et Killops, 1993). Le second réservoir de carbone plus de 1000 fois inférieur en quantité de carbone à la roche sédimentaire mais 50 fois supérieur à la réserve de CO₂ gazeux est constitué par le carbone dissous dans les océans. Une quantité très réduite de cette source de carbone (0.1%) est fixée par les organismes phytoplanctoniques photosynthétiques marins grâce à l'énergie solaire. Cette quantité de carbone fixé, aussi appelée production primaire nette, est tout à fait comparable à celle des plantes terrestres. La biomasse de ces dernières étant très nettement supérieure, le milieu marin se distingue par une productivité beaucoup plus élevée que le milieu terrestre (60 fois supérieure). Il est usuel de considérer le cycle de carbone comme deux cycles juxtaposés (Figure 1.2) échangeant des quantités de carbone mineures par rapport à celles mises en jeu. Le premier cycle dénommé cycle géochimique et possédant une période de l'ordre de dizaines de millions d'années se base sur le recyclage du carbone de la roche sédimentaire. Le second cycle dénommé cycle biochimique regroupe les transformations ayant lieu dans la biosphère (biota terrestre et marin) et se déroule sur une période d'une centaine d'années ou moins.

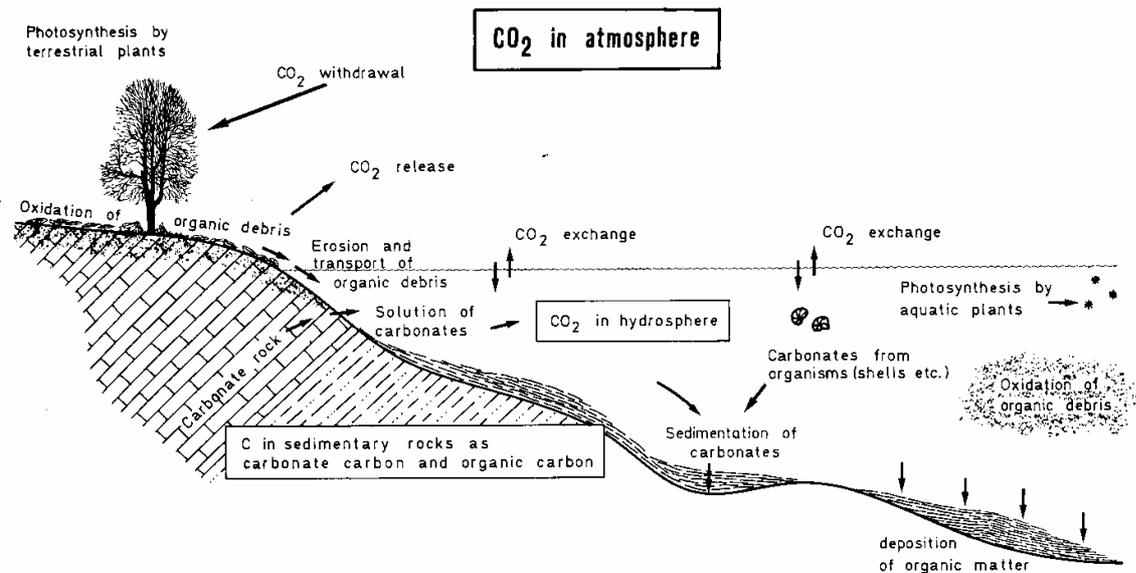


Figure 1.1: Cycle du carbone (Tissot et Welte, 1984).

Le cycle biochimique interagit avec le cycle géochimique en apportant à celui-ci les faibles quantités de matière organique non recyclées (1 Giga tonne par an) à la roche sédimentaire. Cette dernière restitue plusieurs millions d'années plus tard la matière carbonée transformée par le biais de l'érosion, de l'activité tectonique et volcanique ainsi que de l'activité humaine.

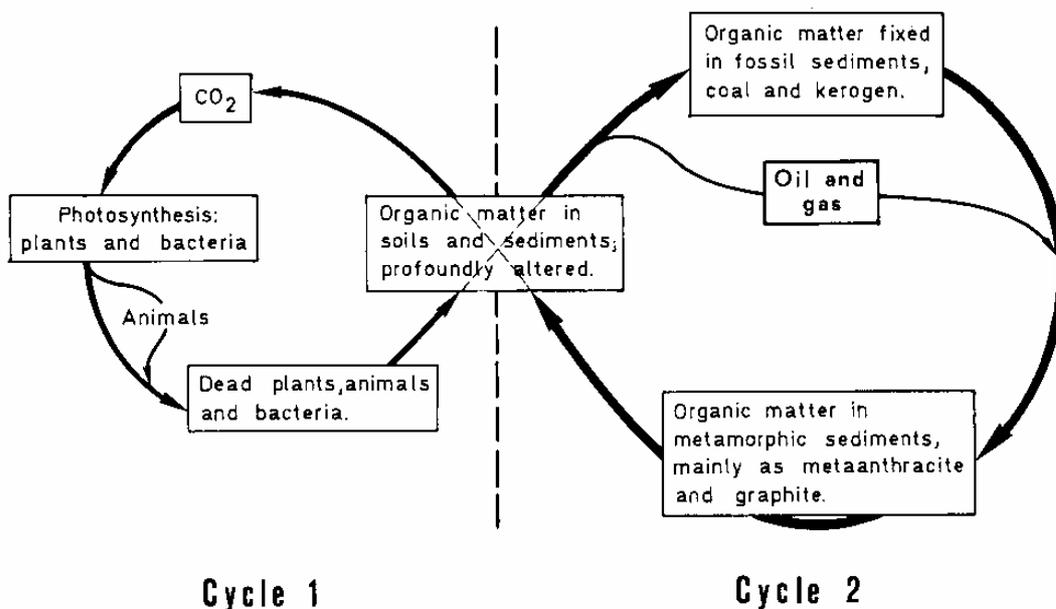


Figure 1.2: Cycles biochimique et géochimique du carbone (Tissot et Welte, 1984).

1.3 Les biomarqueurs

Si la géochimie s'intéresse au devenir de la matière organique, elle se préoccupe tout particulièrement du milieu dont sont issues des molécules organiques bien spécifiques, à savoir les biomarqueurs. Le concept de biomarqueur est né de la découverte de porphyrine, dérivée de la chlorophylle, dans des bitumes et des roches sédimentaires (Treibs, 1934). Pour la première fois une molécule rencontrée communément dans la biosphère et soumise au cycle biochimique a été retrouvée sous une forme transformée dans de la roche sédimentaire de plusieurs millions d'années. Cet exemple conduit naturellement à la définition d'un biomarqueur, aussi appelé marqueur biologique ou encore fossile chimique. Un biomarqueur est une molécule qui possède la propriété de résister au cycle biochimique et de s'intégrer à la géosphère tout en conservant une structure qui permet d'établir un lien non ambigu avec son produit naturel précurseur (Simoneit, 2002). La quantité d'information que peut apporter un biomarqueur dépend du nombre de structures successives et différentes que celui-ci peut adopter au cours du cycle biogéochimique et de la durée de subsistance de chacune de ces structures en fonction des conditions physico-chimiques (température, pression, nature de la matrice minérale et organique). Les biomarqueurs stéroïdiens constituent des marqueurs biologiques de choix (MacKenzie *et al.*, 1982). En effet ils se retrouvent en quantités significatives dans les sédiments récents et anciens, preuve qu'ils résistent aux réactions de décomposition du cycle biogéochimique. De plus, ils sont représentés par une très grande variété de molécules naturelles dont certaines proviennent d'organismes bien spécifiques (notamment phytoplanctoniques). Enfin, lors de l'enfouissement des sédiments, l'altération lente de leur structure s'opère par un grand nombre de transformations permettant de couvrir des durées géologiques de l'ordre de plusieurs millions d'années.

1.4 La diagenèse

La diagenèse correspond à l'ensemble des transformations que subit un biomarqueur, depuis la mort de l'organisme précurseur jusqu'à l'incorporation dans le sédiment, puis l'enfouissement de ce dernier à des profondeurs correspondant à des conditions de faibles pression et température. La diagenèse se termine généralement lorsque la roche sédimentaire commence à libérer des hydrocarbures sous forme liquide. La catagenèse, étape suivante associée aux transformations de la matière organique sous des températures élevées débute alors.

L'ensemble des transformations biochimiques et physico-chimiques que peuvent subir les biomarqueurs lors de leur parcours de la biosphère à la géosphère sont représentées sur la Figure 1.3. La diagenèse débute dès l'apparition des précurseurs des biomarqueurs dans la colonne d'eau située au-dessus du sédiment. Si ces précurseurs proviennent d'apports externes au milieu ou apports allochtones (*p. ex.* matière organique déversée dans un lac via une rivière), les transformations subies par le biomarqueur pendant son transport jusqu'au milieu de déposition devront également être prises en considération. Les origines des biomarqueurs dans le milieu aquatique sont multiples. Ainsi un examen des différents acteurs de ce milieu a son importance. La production primaire du milieu aquatique est assurée par le phytoplancton qui se développe en fixant par photosynthèse le CO₂ dissous. Le phytoplancton constitue la nourriture du maillon suivant de la chaîne alimentaire à savoir le zooplancton herbivore dont s'alimente le zooplancton carnivore. Les détritiques fécaux ainsi que les tissus des organismes sans vie vont contribuer à un apport de matière organique conséquent qui sera principalement dégradé par des communautés bactériennes. La fraction de matière organique non recyclée, autrement dit non reminéralisée, continuera son chemin en direction du fond. Une fois déposée à la surface du sédiment, elle sera soumise à l'action de décomposeurs (bactéries) et d'organismes détritiques (*p. ex.* vers polychaètes) qui, de par leur action, oxygènent le sédiment (bioturbation). La fraction résiduelle de matière organique sera finalement incorporée au sédiment. Au cours de l'enfouissement, l'activité biologique cesse (généralement en dessous de 40 cm) pour laisser place à des réactions uniquement physico-chimiques (*p. ex.* déshydratations, isomérisations, réductions, *etc.*).

La productivité du phytoplancton constitue un paramètre important du taux de sédimentation comme l'est l'oxygénation du milieu. Si la productivité est forte et l'oxygénation élevée tout le long de la colonne d'eau, la productivité élevée pourra être compensée par un fort taux de recyclage conduisant à un taux de sédimentation bas. En l'absence d'oxygène en-dessous d'une certaine profondeur (*p. ex.* Mer Noire), l'activité des organismes aérobies détritiques et décomposeurs sera considérablement réduite dans la zone anoxique. Couplé à une forte productivité primaire, le taux de sédimentation atteindra des valeurs élevées. Les apports allochtones sont également d'importance. Ils peuvent provenir d'apports fluviaux transportant de la matière organique provenant d'organismes vivants en eau douce ou d'origines terrestres (plantes supérieures). Les eaux de ruissellement et eaux profondes sont également à considérer en même temps que les phénomènes d'érosion de la roche sédimentaire affleurante d'un âge différent. Les apports éoliens sont une autre possibilité d'importation de matière organique.

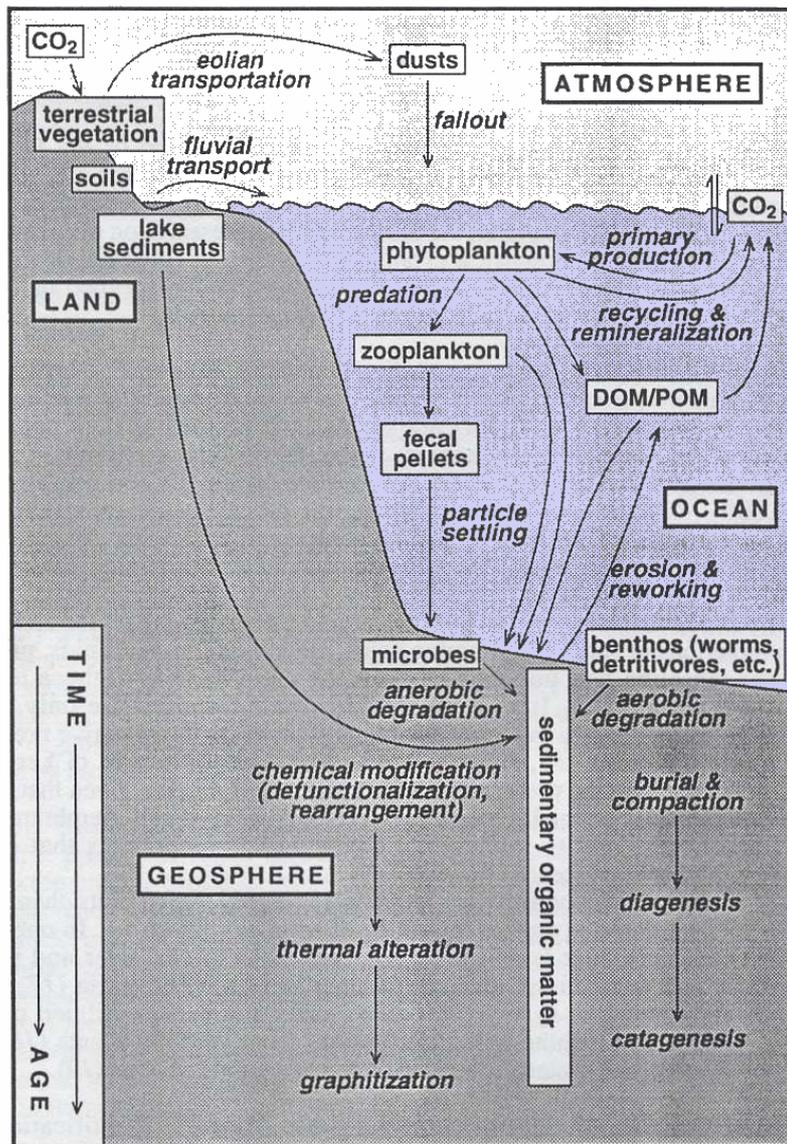


Figure 1.3: Transformations de la matière organique dans la biosphère et géosphère (Brassell, 1994).

La diagenèse demeure un processus complexe car elle est le résultat d'une multitude de processus biochimiques et physico-chimiques. Ainsi pour un biomarqueur d'origine phytoplantonique, il est crucial de considérer l'ensemble de son parcours au sein de la chaîne alimentaire. Il faudra par exemple tenir compte des transformations engendrées par la faune bactérienne présente à l'intérieur des organismes zooplanctoniques. La vitesse de descente des particules fécales produites dans la colonne d'eau devra également être considérée. En effet, plus ces dernières ont un diamètre et une masse élevés, plus leur temps de séjour dans la colonne d'eau sera court, et moins la biodégradation de cette matière fécale par les colonies bactériennes présentes sera prononcée. Par ailleurs, l'origine d'un biomarqueur étant rarement unique, toutes

les sources possibles ainsi que les transformations biochimiques associées devront être considérées (*p. ex.* sitostérol présent en quantités majeures dans les plantes supérieures mais également dans certaines algues).

Les bactéries jouent un rôle majeur dans les transformations subies par la matière organique. La Figure 1.4 résume les principales transformations que peuvent effectuer les bactéries. Les bactéries aérobies sont capables d'utiliser l'oxygène pour dégrader des molécules complexes comme les acides aminés, les sucres, les acides gras provenant de l'hydrolyse respective des protéines, des carbohydrates et des lipides. D'autres bactéries ont la faculté d'oxyder l'ammonium et les formes réduites du soufre (S^{2-} , HS^- , $S(0)$) en nitrates et sulphates respectivement. Trois grands groupes de bactéries anaérobies peuvent être distingués: les réducteurs de sulphates (*p. ex.* *Desulfobacter*), de nitrates (*p. ex.* *Thiobacillus denitrificans*), et les méthanogènes (*p. ex.* *Methanobacillus*). Les bactéries méthanogènes, peu actives en milieu marin, sont très répandues en eau douce. Dans ce milieu, 70% de ces bactéries sont acétogènes (Killops et Killops, 1993). Les bactéries sulfatoréductrices sont très abondantes dans le milieu marin riche en sulphates. En eau douce, ce sont les bactéries réductrices de nitrates qui sont majoritaires étant donné la concentration en sulphates de ces eaux nettement plus réduite.

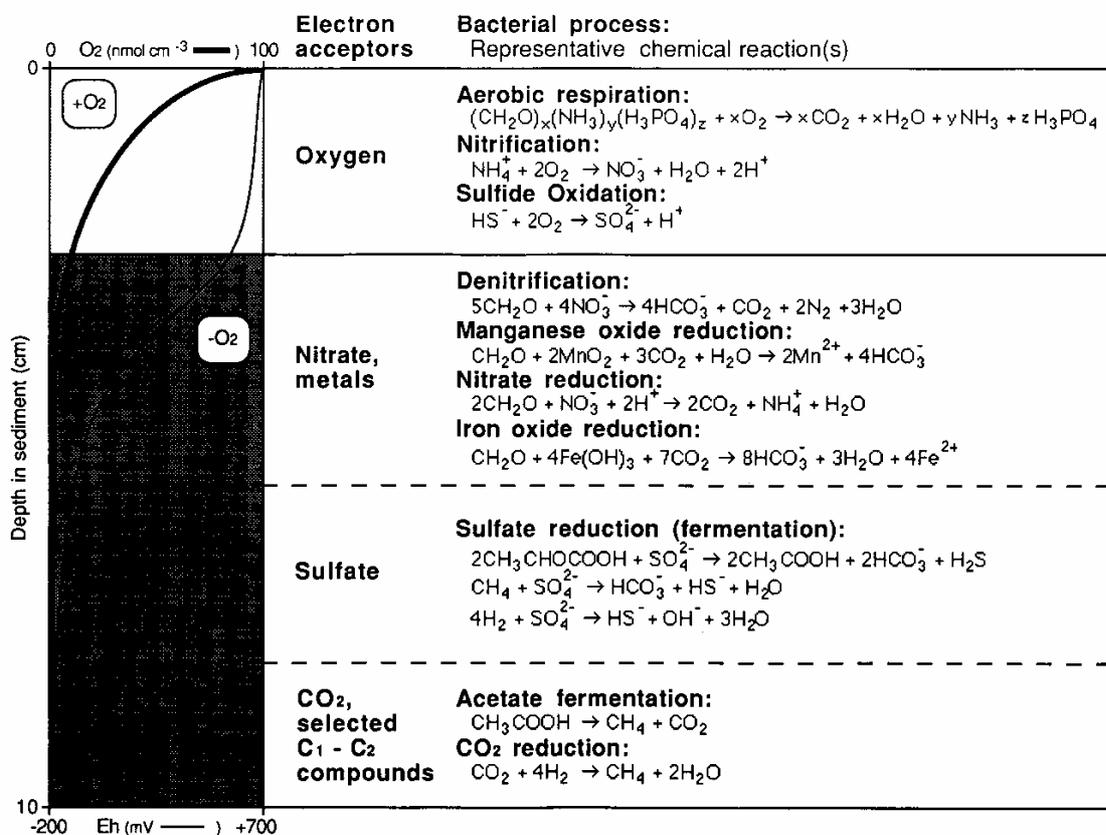


Figure 1.4: Populations bactériennes en fonction de la profondeur et de la concentration en oxygène dissous (Deming et Baross, 1993).

2 Biomarqueurs utilisés dans le cadre de cette étude

2.1 Biomarqueurs de type *n*-alcanes

Les *n*-alcanes sont des composés présents en larges quantités dans le milieu sédimentaire. (Killops et Killops, 1993). Dans les plantes, les cires contiennent des *n*-alcanes à chaînes longues. Les alcanes à nombre de carbones impair dominant. Leur distribution s'étale généralement entre C₂₃ et C₃₃ avec C₂₇, C₂₉ et C₃₁ prédominants. Ces alcanes sont le résultat d'une biosynthèse qui fait intervenir la décarboxylation enzymatique par perte de CO₂ des acides gras possédant une distribution à nombre de carbones pair dominant. C'est également le cas des alcools biosynthétisés à partir des acides gras par réduction enzymatique. Les cellules des champignons ont des distributions analogues à celles des plantes supérieures. Dans les bactéries, sauf exception, les hydrocarbures linéaires saturés sont absents. Dans les autres micro-organismes et notamment les algues multicellulaires, les *n*-alcanes ont un nombre de carbones généralement inférieur à 20 atomes. Ainsi une prédominance des alcanes en C₁₅, C₁₇, C₁₉ est caractéristique d'algues d'un environnement marin ou lacustre (Volkman *et al.*, 1998). Toutefois la distribution de C₂₃ à C₃₁ avec une dominance des *n*-alcanes à nombre de carbones impair a été mise en évidence pour certaines algues lacustres (Peters et Moldowan, 1993). Des distributions s'étalant de C₂₁ à C₃₆ et montrant une dominance faible voire absente des alcanes à nombre de carbones impair ont également été mises en évidence pour les diatomées (Volkman *et al.*, 1998) ainsi que pour des sédiments possédant une forte concentration de diatomées. Des distributions sans dominance d'hydrocarbures à nombre de carbones impair ont par ailleurs été reportées lors de floraisons printanières dans la baie Conception de Newfoundland (Bieger *et al.*, 1997).

Le CPI, Indice de Carbone Préférentiel, défini par l'Equation 1.1, permet de traduire le degré de prédominance des hydrocarbures linéaires saturés à nombre de carbones pair (CPI inférieur à 1) ou impair (CPI supérieur à 1) (Peters et Moldowan, 1993). Généralement le CPI est supérieur à l'unité pour les sédiments immatures bien qu'il y ait des exceptions comme le démontrent les exemples précédents. Avec l'augmentation de maturité du sédiment, le CPI va tendre vers la valeur de 1 en raison de la libération d'hydrocarbures linéaires saturés liquides ne possédant pas de prédominance de nombre pair ou impair de carbones.

$$\text{CPI} = \frac{1}{2} * \left(\frac{\text{C}_{25} + \text{C}_{27} + \text{C}_{29} + \text{C}_{31} + \text{C}_{33}}{\text{C}_{24} + \text{C}_{26} + \text{C}_{28} + \text{C}_{30} + \text{C}_{32}} + \frac{\text{C}_{25} + \text{C}_{27} + \text{C}_{29} + \text{C}_{31} + \text{C}_{33}}{\text{C}_{26} + \text{C}_{28} + \text{C}_{30} + \text{C}_{32} + \text{C}_{34}} \right) \quad \text{Equation 1.1}$$

2.2 Biomarqueurs terpénoïdiens pentacycliques

2.2.1 *Vue d'ensemble*

Les terpenoïdes possèdent une très large diversité de structures avec des représentants tels que les petites molécules comme le menthol ou les biopolymères comme le caoutchouc. Ils sont toutefois synthétisés à partir d'une molécule de base commune à l'ensemble des organismes vivants: l'isopentényle pyrophosphate ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OP}_2\text{O}_6^{3-}$). La condensation de l'unité isoprénoïde en présence d'enzymes donnera lieu aux différents sous-groupes de terpénoïdes que sont les mono-, sesqui-, di-, tri-, tétra- et polyterpénoïdes possédant 2, 3, 4, 6, 8 ou n unités isopentényles respectivement. Ces composés naturels acycliques ou cycliques se rencontrent pour la plupart sous la forme alcool, aldéhyde, cétone ou acide. Les réactions biosynthétiques ultérieures auxquelles ils peuvent être soumis impliquent que leur nombre de carbones ne reste pas systématiquement un multiple de 5.

2.2.2 *Diterpénoïdes*

Parmi les diterpénoïdes, le phytol constitue probablement le plus abondant des isoprénoïdes acycliques de la biosphère (Killops et Killops, 1993). Contenu majoritairement dans la chlorophylle *a* sous forme estérifiée, le phytol peut être dégradé dans des conditions oxydantes ou réductrices. Dans les conditions oxydantes, le phytol est transformé en acide phyténique puis par perte de CO_2 , en pristène qui conduit finalement au pristane par réduction. En milieu anoxique par contre, le phytol est réduit en dihydrophytol puis, par déshydratation et réduction, en phytane. Le rapport pristane sur phytane permet de juger de l'oxicité du milieu. Si ce rapport est supérieur à 1, le milieu de déposition est oxique et vice versa. Il est toutefois important de signaler que cet indicateur souffre de nombreuses exceptions et ne doit pas être pris seul en considération (Peters et Moldowan, 1993). De plus la formation de pristane par certains invertébrés, de phytènes et pristène par catalyse sur argile et la production de phytènes par des bactéries sulfatoréductrices (Grossi *et al.*, 1998) soulignent la prudence devant être adoptée lors de l'usage de cet indicateur (Rontani et Volkman, 2003).

2.2.3 Triterpénoïdes pentacycliques

2.2.3.1 Vue d'ensemble

Les triterpénoïdes se décomposent en deux sous-groupes, les composés tétracycliques et pentacycliques (Killops et Killops, 1993). Les composés tétracycliques forment la classe des stéroïdes qui sera considérée dans la partie 2.3. Les squelettes carbonés des principaux composés pentacycliques d'intérêt géochimique sont présentés sur la Figure 1.5. Ainsi peuvent être distingués les triterpénoïdes pentacycliques dérivant de l'oléanane, du taraxerane, de l'ursane, du lupane, du gammacérane, de l'arborane et du diploptène. Cette dernière classe de biomarqueurs qui est une des plus importantes est encore appelée la classe des hopanoïdes.

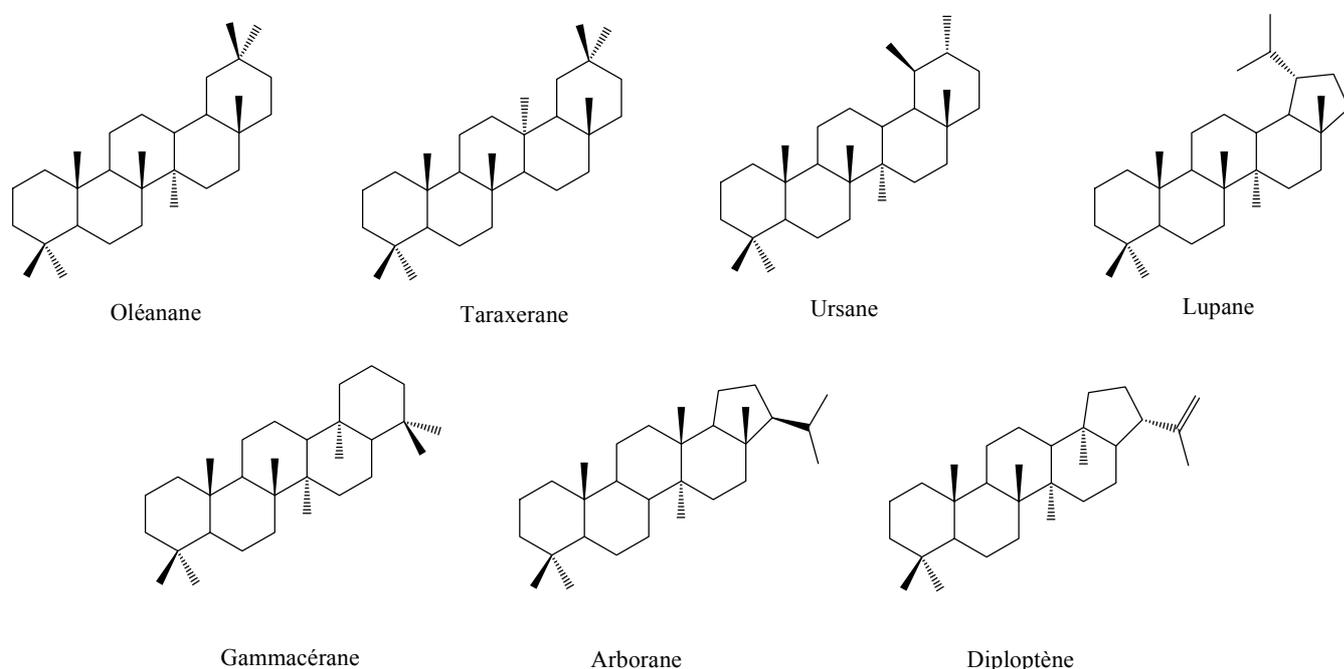


Figure 1.5: Principaux squelettes des triterpanes pentacycliques utilisés en tant que biomarqueurs.

2.2.3.2 Triterpénoïdes différents des hopanoïdes

Les triterpénoïdes issus des plantes supérieures ont des structures appartenant à la classe de l'oléanane (*p. ex.* β -amyrin), de l'ursane (α -amyrin), du lupane et de l'arborane. La classe du gammacérane est représentative de composés issus des protozoaires.

La diagenèse des composés de la série des oléananes débute à partir d'apports biologiques des alcools correspondants, principalement la β -amyrin et le taraxerol. Leur déshydratation et

réduction conduisent à l'oléan-12-ène et au taraxer-14-ène, hydrocarbures monoinsaturés correspondants. Alors que le taraxer-14-ène est transformé en taraxerane, l'oléan-12-ène subit des isomérisations passant par l'oléan-18-ène et l'oléan-13(18)-ène avant d'aboutir à l'oléanane. Toutefois ces deux processus sont compliqués par un équilibre existant entre taraxer-14-ène et oléan-12-ène.

2.2.3.3 Hopanoïdes

2.2.3.3.1 Numérotation du squelette

La Figure 1.6 représente la numérotation conventionnelle adoptée pour le squelette carboné des hopanoïdes.

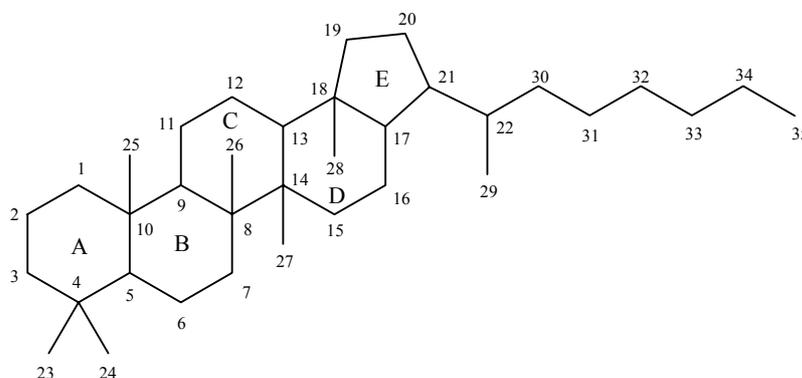


Figure 1.6: Convention de numérotation du squelette carboné des hopanoïdes.

2.2.3.3.2 Fonctions

Mis à part leurs fonctions de cires ou résines (*p. ex.* la résine dammar de l'*Hopea*), la fonction des hopanoïdes dans les plantes n'est pas encore élucidée. Chez les bactéries, les hopanes agissent comme pièces de construction et de renfort de la membrane, modulant sa fluidité et sa perméabilité (Kannenberget Poralla, 1999).

2.2.3.3.3 Biosynthèse

La biosynthèse des hopanoïdes chez les bactéries est décrite sur la Figure 1.7. Le mécanisme biosynthétique est différent chez les plantes, utilisant l'oxydosqualène et non pas le squalène comme précurseur.

fougères, quelques mousses et champignons (Mahato et Sen, 1997; Ourisson et Albrecht, 1992). Identifiés dans 50% des bactéries, les hopanoïdes possédant une chaîne latérale (*p. ex.* bacteriohopanetétrol) sont largement majoritaires par rapport au diploptène et au diploptérol, également présents en quantités réduites (Farrimond *et al.*, 1998).

Les hopanoïdes sont notamment présents dans le groupe des bactéries Gram-négatives chez les cyanobactéries, les *Rhodospirillaceae*, les *Methanotrophicbacteria*, les *Zymomonas mobilis*, les *Bradyrhizobium japonicum*, les *Azotobacter vinelandii*, les espèces appartenant au *Méthylbacterium*, à l'*Acetobacter*, au *Beijerincki*, dans le groupe des bactéries Gram-positives, chez les espèces de l'*Alicyclobacillus*, du *Frankia* et du *Streptomyces* ainsi que dans certaines espèces du groupe α des *Proteobacteria* (Kannenberget Poralla, 1999).

2.2.3.3.5 Identification des hopanoïdes par GC-MS

L'identification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) des hopanoïdes est effectuée grâce aux deux pics caractéristiques à $m/z = 191$ et $148 + R$ avec R représentant la masse de la chaîne latérale (Philp, 1985) (Figure 1.8).

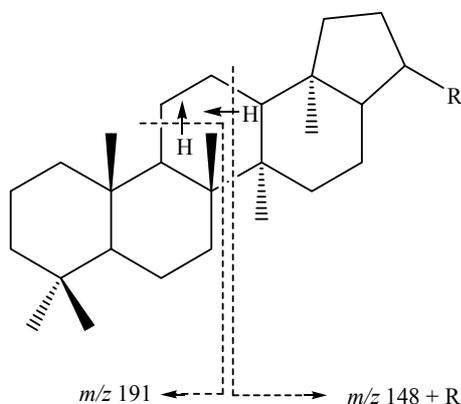


Figure 1.8: Fragmentations principales des hopanoïdes.

2.2.3.3.6 Diagenèse

Un schéma diagénétique a pu être établi pour le diploptène provenant d'apports biologiques (Figure 1.9(a)). Toutefois ce constituant est présent en faibles quantités dans les organismes vivants comparé aux polyhydroxybactériohopanes. Ces derniers sont considérés comme des précurseurs majeurs des hopanoïdes présents dans les sédiments (Ourisson et Albrecht, 1992). Dans des conditions oxydées, les polyhydroxybactériohopanes conduisent aux acides

hopanoïques correspondants avec une abondance maximale pour l'homologue possédant 32 carbones (Figure 1.9(b)). La diagenèse ultérieure de ces acides conduit aux hopanes par réduction. Dans des conditions anoxiques, il y a réduction directe des polyhydroxybactériohopanes aboutissant à des hopanes avec un nombre de carbones atteignant 35 (Figure 1.9(b)). A un stade diagénétique plus avancé, les hopanes obtenus voient leur configuration 17β , 21β se modifier pour conduire à des configurations thermodynamiquement plus stables à savoir 17β , 21α et 17α , 21β (Figure 1.9(b)).

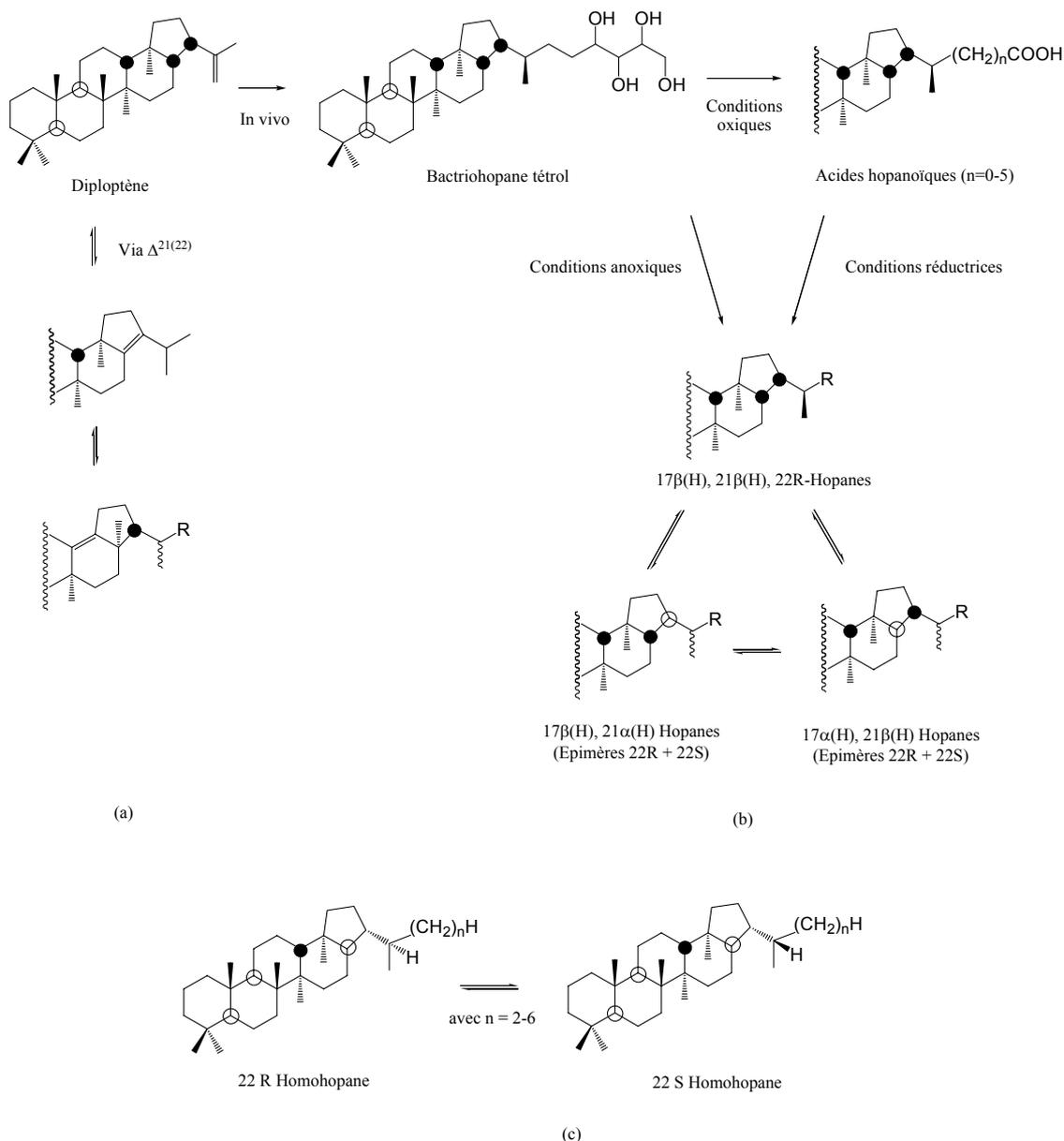


Figure 1.9: Diagenèse du diploptène (a), du bactériohopane tétrol (b) et isomérisation des homohopanes (c) (Killops et Killops, 1993; Simoneit, 2002).

Un certain nombre d'indicateurs de maturité thermique peut être déduit de ce qui précède (Ourisson et Albrecht, 1992; Peters et Moldowan, 1993). Ainsi le rapport des quantités des

stéréoisomères $(17\beta 21\beta)/(17\beta 21\beta + 17\beta 21\alpha + 17\alpha 21\beta)$ diminue avec l'augmentation de maturité du sédiment jusqu'à une valeur nulle correspondant à la disparition complète de l'isomère $17\beta, 21\beta$. La configuration $17\alpha, 21\beta$ étant légèrement plus stable que la configuration $17\beta, 21\alpha$, un second indicateur de maturité peut être défini. Celui-ci s'exprime par le rapport $(17\beta 21\alpha)/(17\beta 21\alpha + 17\alpha 21\beta)$ et diminue avec l'augmentation de maturité du sédiment jusqu'à une valeur de 5%. Cette dernière valeur coïncide avec le début de la fenêtre de génération d'huile. En termes pétrochimiques cela correspond à un sédiment sur le point de libérer les hydrocarbures de masses moléculaires moyennes sous forme liquide constituant le pétrole brut. Par ailleurs, les homohopanes possèdent la configuration naturelle 22R. Or la configuration 22S possède une stabilité thermodynamique légèrement plus élevée. Avec l'augmentation de la maturité, une conversion d'une partie des stéréoisomères 22R en 22S est observée (Figure 1.9(c)). Ainsi l'indicateur de maturité $22S/(22S+22R)$ atteint une valeur maximale de 60% au tout début de la fenêtre de génération d'huile et à la fin de la diagenèse.

2.3 Biomarqueurs stéroïdiens

2.3.1 Nomenclature

Le mot stérol provient de cholestérol originaire du grec stereo signifiant solide et correspondant à son état physique à température ambiante. Le suffixe "oïde" du terme stéroïde regroupe par extension tous les composés apparentés au cholestérol (Nes et McKean, 1977). Une définition admise est celle donnée par Louis et Mary Fieser: "Le terme stéroïde est employé pour désigner toutes les substances structurellement apparentées aux stérols et acides biliaires dans la mesure où ils possèdent le système cyclique du perhydro-1,2-cyclopentanophenanthrène". Ce squelette est représenté sur la Figure 1.10 en plus de la désignation des cycles et de la numérotation appliquée par convention pour les stéroïdes. L'ancienne nomenclature, désignant les positions 24^1 et 24^2 par 28 et 29 respectivement, reste toutefois employée dans la plupart des cas.

La configuration généralement adoptée par les stéroïdes est formée de deux surfaces coplanaires dans lesquelles la majorité des atomes du noyau perhydro-1,2-cyclopentanophenanthrène se retrouvent (Figure 1.11(a)). Ainsi les carbones C(1), C(3), C(5), C(7), C(9), C(12) et C(14) sont situés dans le plan inférieur tandis que les carbones C(2), C(4), C(6), C(8), C(10), C(11) et C(13) font partie du plan supérieur. Les carbones C(15), C(16) et C(17) du cycle D bien qu'en dehors des deux plans se rapprochent plus du plan supérieur. Les méthyles C(18) et C(19) sont perpendiculaires à ces deux plans et fréquemment dénommés groupes méthyles angulaires.

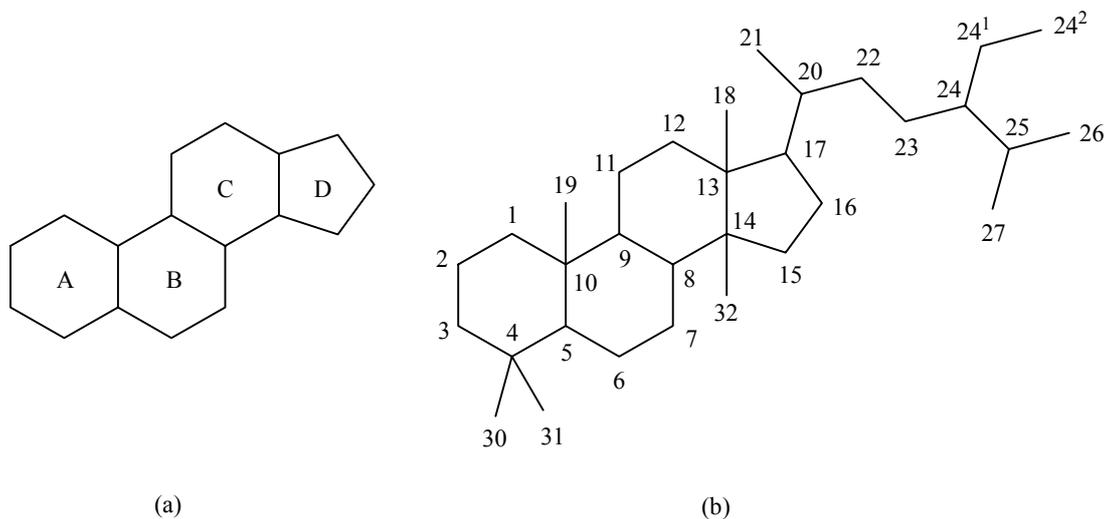


Figure 1.10: Structure du 1,2-Cyclopentanoperhydrophenanthène avec désignation des cycles (a) et numérotation conventionnelle adoptée pour les stéroïdes (b).

Lorsqu'un des carbones des jonctions de cycles voit sa configuration modifiée, la configuration plate est perdue. L'exemple d'une inversion au niveau de C(5) aboutit à une configuration en forme de L dont l'angle se trouve à la jonction A et B (Figure 1.11(b)). L'hydrogène en position C(5) et le méthyle en position C(10) se retrouvent donc avec la stéréochimie *cis*. Le méthyle et l'hydrogène en position C(13) et C(14) respectivement ainsi que les hydrogènes en position C(8) et C(9) demeurent dans la stéréochimie *trans* d'où la configuration dénommée *cis-anti-trans-anti-trans*.

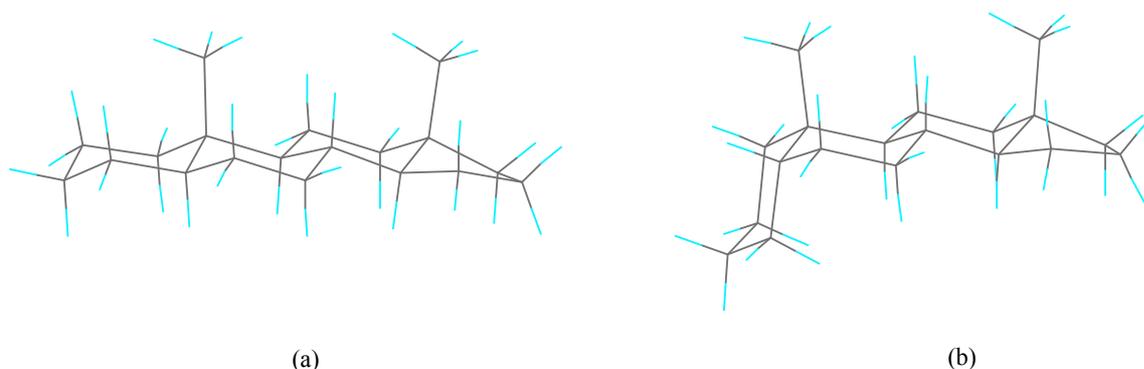


Figure 1.11: Configuration du 5 α -androstane *trans-anti-trans-anti-trans* (a) et *cis-anti-trans-anti-trans* (b).

Lorsqu'une double liaison est introduite, dans un cycle à six carbones, la configuration s'en trouve modifiée mais reste sensiblement similaire à celle de la configuration *cis* ou *trans* originale. Ainsi le cholestérol (possédant une double liaison entre C(5) et C(6), le lanostérol (possédant une double liaison au niveau de la jonction entre le C(8) et C(9)) et le 5 α -cholestan-3 β -ol (sans double-liaison) sont des molécules ayant une configuration sensiblement similaire.

La position des méthyles angulaires est qualifiée de "Bêta" de même que tous les substituants qui se trouveraient au-dessus du noyau stéroïdien si toutes ses liaisons cycliques étaient virtuellement amenées dans un plan commun. Ainsi dans une configuration "plate", un hydrogène en position équatoriale en C(8) est "Alpha" tandis qu'en C(9) est "Bêta". La configuration naturelle peut donc être décrite par $8\beta(\text{H})$, $9\alpha(\text{H})$, $10\beta(\text{CH}_3)$, $13\beta(\text{CH}_3)$, $14\alpha(\text{H})$, $17\alpha(\text{H})$ en plus d'une configuration 20R et 24R ou S .

La nomenclature des stéroïdes utilise des préfixes dont il est intéressant de rappeler ici la définition. Ainsi le préfixe *X-nor* indique l'absence d'un atome de carbone à la position C(X). Le préfixe *X,Y-cyclo* correspond à la présence d'un cycle supplémentaire dont fait partie la liaison C(X)-C(Y). La désignation des stéroïdes utilise également le formalisme Δ^X pour indiquer la présence d'une double liaison entre C(X) et C(X+1) dans le squelette du cholestane représenté sur la Figure 1.12 (*p. ex.* 24-méthyl- $\Delta^{5,7,22\text{E}}$ - $3\beta\text{-ol}$ correspond au 24-méthylcholesta-5,7,22E-trién- $3\beta\text{-ol}$ dont le nom trivial est l'ergostérol). Les noms triviaux sont également utilisés par extension pour désigner les stéroïdes possédant un squelette similaire (*p. ex.* l'ergosta-5,7-diène correspond au 24-méthylcholesta-5,7-diène). Parmi les nom triviaux peuvent être cités comme exemples le sitostérol abrégé 24-éthyl- $5\alpha\text{-}\Delta^5\text{-}3\beta\text{-ol}$, le stigmastérol (24-éthyl- $\Delta^{5,22\text{E}}$ - $3\beta\text{-ol}$), le fucostérol (24-méthyl- $\Delta^{5,24(28)\text{E}}$ - $3\beta\text{-ol}$) et le coprostanol ou $5\beta\text{-cholestan-}3\beta\text{-ol}$.

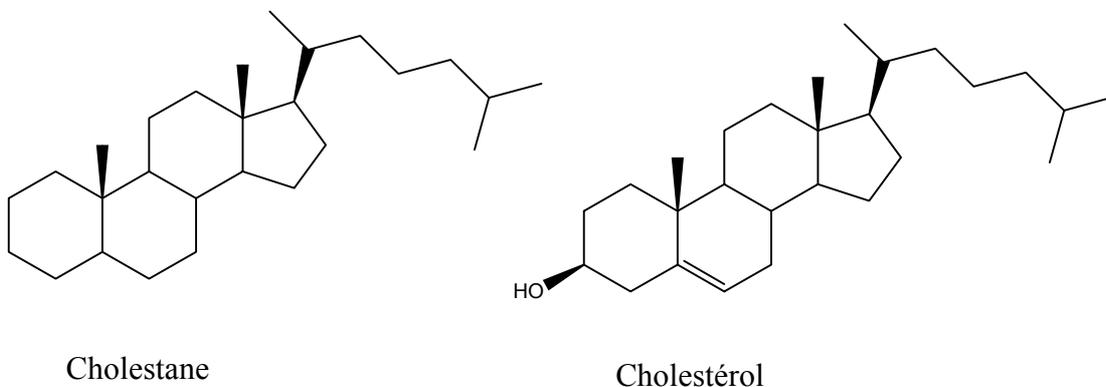


Figure 1.12: Structures du cholestane et du cholestérol.

2.3.2 Identification des stéroïdes par GC-MS

Les fragmentations principales des stéranes et stérènes sont schématisées sur la Figure 1.13(a) (Budzikiewicz *et al.*, 1964; Djerassi, 1970; Zaretskii, 1976). L'examen des spectres de masse de nombreux hydrocarbures stéroïdiens disponibles dans la littérature permet de formuler quelques remarques quant à l'intensité des pics. Ainsi, l'ion m/z 149 n'est intense que pour les stéranes. En ce qui concerne l'ion m/z M-R, il n'est intense que lorsque la chaîne latérale R est saturée. Si la

chaîne latérale possède une ou plusieurs double liaisons, l'ion m/z M-R-2 est alors intense. Enfin, l'intensité de l'ion m/z M-R-42 diminue à mesure que la ou les double liaisons présentes dans les cycles se rapprochent de la chaîne latérale.

Les isomères configurationnels des stéranes donnent des spectres de masse très semblables mais avec de petites différences remarquables (Gallegos et Moldowan, 1992). Ainsi les 5α -stéranes possèdent un ion m/z 149 nettement plus intense que l'ion m/z 151 et *vice versa* pour les 5β -stéranes. Les 14α -stéranes disposent d'un pic plus intense à m/z 217 qu'à m/z 218 et *vice versa* pour les 14β -stéranes. Enfin les 17α (H) stéranes ont un pic à m/z 257 nettement plus intense que celui à m/z 259 et *vice versa* pour les 17β (H) stéranes. Par ailleurs les indices de rétention permettent de distinguer la configuration R ou S en position C(20) (Gallegos et Moldowan, 1992; Peters et Moldowan, 1993; Wang *et al.*, 1994). De plus ils facilitent considérablement l'identification de stérènes isomères (Gerst *et al.*, 1997; Homberg, 1977).

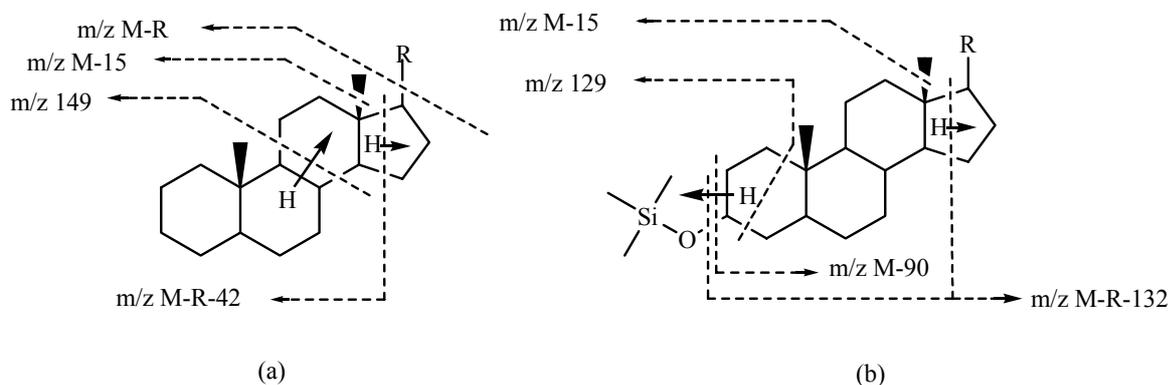


Figure 1.13: Fragmentations des stéranes et stérènes (a) ainsi que des stérols 3-triméthyle silylle éthers (Brooks, 1979; Budzikiewicz *et al.*, 1964; Zaretskii, 1976).

Les principaux fragments ioniques des stérols 3-triméthyle silylle éthers sont représentés sur la Figure 1.13(b) (Brooks, 1979; Zaretskii, 1976). L'ion m/z M-R-132 correspond à la perte de Me_3SiOH ainsi qu'à la chaîne latérale, au cycle D et à un hydrogène. L'examen des spectres de masse de nombreux stérols 3-triméthyle silylle éthers permet de constater que l'intensité de l'ion m/z M-R-132 diminue avec le rapprochement vers la chaîne latérale d'une double liaison présente dans les cycles.

Comme pour les stérènes et stéranes, des tables d'indices de rétention sont très souvent utilisées facilitant grandement l'identification des composés (Gerst *et al.*, 1997; Ikekawa *et al.*, 1968; Patterson, 1971; Xu *et al.*, 1988)

2.3.3 Fonctions des stérols

Les stéroïdes peuvent être regroupés selon leur fonction sous quatre grandes catégories: les constituants membranaires, les acides et sels biliaries, la vitamine D et ses précurseurs et enfin les hormones (Nes et McKean, 1977). Le rôle membranaire des stéroïdes consiste en la rigidification et la modulation de la perméabilité de la membrane (Banthorpe, 1994). Ceci est rendu possible par la rigidité et la forme allongée de leur structure et par le caractère hydrophile du groupe hydroxy et hydrophobe du restant de la chaîne (Yeagle, 1985). Les fonctions hormonales des stéroïdes sont très diverses. Ainsi il peut être distingué les progestogènes et les oestrogènes (hormones sexuelles chez la femme) et les androgènes (hormones sexuelles chez l'homme), les corticoïdes (ayant une activité sur le métabolisme des hydrates de carbone et la concentration en ions sodium et potassium) et les stéroïdes à activité cardiaque.

2.3.4 Biosynthèse des stérols

La biosynthèse des stérols débute de la même façon que celle des hopanoïdes en combinant trois unités isopentényle pyrophosphate entre elles conduisant au farnesyldiphosphate puis en associant ce dernier à un homologue (Figure 1.7) pour aboutir au squalène. Les étapes suivantes sont exposées sur la Figure 1.14.

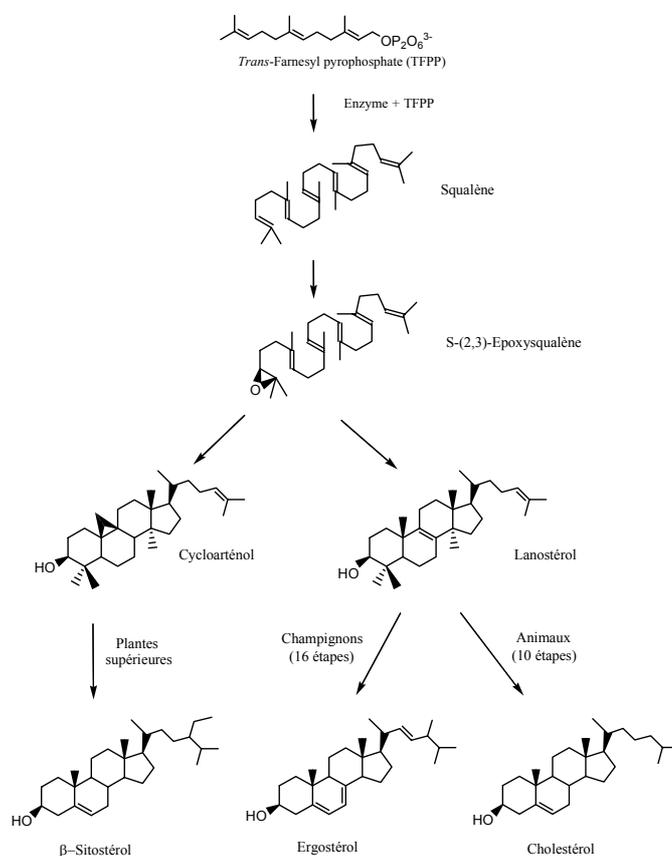


Figure 1.14: Biosynthèse du sitostérol, de l'ergostérol et du cholestérol.

Le squalène est transformé en oxidosqualène. Cette étape nécessitant la présence d'oxygène a été évoquée pour justifier de l'antériorité des bactéries sur les autres organismes apparus *a posteriori* lors du développement de la vie sur terre (Nes et Venkatramesh, 1994). La formation des stérols des plantes s'effectue ensuite via le cycloarténol. Le détail du mécanisme de biosynthèse commun à la majorité des plantes est décrit par Brown (1998) en prenant l'exemple du sitostérol. Il fait intervenir la séquence des positions de déméthylation 4,14,4. Dans le cas des champignons et des animaux, le mécanisme qui fait intervenir le lanostérol procède par la séquence 14,4,4.

2.3.5 Distribution des stérols dans les organismes vivants

2.3.5.1 Introduction

De manière générale, les quatre sources de la matière organique sédimentaire sont le phytoplancton, les bactéries, les plantes supérieures et le zooplancton. Les champignons sont considérés comme une source mineure de matière sédimentaire dans le milieu aquatique et sont donc généralement négligés. La connaissance de la distribution des stérols dans les différents groupes d'organismes vivants constitue une étape majeure pour garantir une interprétation géochimique fiable.

2.3.5.2 Phytoplancton

La distribution des stérols dans le phytoplancton est relativement complexe comme le montre la Figure 1.15. Cholestérol, sitostérol et stigmastérol sont généralement présents en proportions importantes. Toutefois d'autres stérols se trouvent en quantités majeures dans certaines espèces bien spécifiques.

Ainsi le 24-méthylcholesta-5,22E-diène-3 β -ol, aussi dénommé diatomstérol est commun à un grand nombre de diatomées (Bacillariophyta) (Volkman, 2003). C'est également le cas pour le 24-méthylcholesta-5,24(28)-diène-3 β -ol, représentant unique de l'espèce *Nitzschia alba*. Les deux stérols précédents sont pratiquement systématiquement accompagnés du cholestérol et du 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol, présents en quantités significatives voire majoritaires. Le sitostérol est également très souvent présent et parfois en quantités majeures (*p. ex.* 95% dans l'espèce *Asterionella glacialis*).

Les dinoflagellés (Dinophyta) se distinguent par la présence abondante du 4 α ,23,24-triméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol aussi appelé dinostérol (Mansour *et al.*, 1999). Cependant plusieurs espèces de *Gymnodinium* contiennent le 4 α ,24-diméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol comme stérol

majoritaire avec des quantités très faibles de dinostérol (Withers, 1987). Certains dinoflagellés se distinguent même par l'absence des 4 α -méthylstérols (*p. ex. Ceratium furcoides*) (Robinson *et al.*, 1987). Comme pour les diatomées le cholestérol peut constituer une part importante voire la totalité de la teneur en stérols (*p. ex. espèces Gonyaulax, Peridium foliaceum*). Le 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol dans une moindre mesure est également un constituant majeur pour beaucoup de dinoflagellés.

	$\Delta 5$	$\Delta 5,22E$	24-Me $\Delta 5$	24-Me $\Delta 7$	24-Me $\Delta 5,22E$	24-Me $\Delta 5,24(28)$	24-Me $\Delta 7,22E$	24-Me $\Delta 5,7,22E$	24-Et $\Delta 5$	24-Et $\Delta 7$	24-Et $\Delta 5,7$	24-Et $\Delta 5,22E$	24-Et $\Delta 5,24(28)Z/E$	4-Me	4-Me $\Delta 8(14)$	4-Me $\Delta 8(14),24$	4,24-DiMe	4,24-DiMe $\Delta 8,22E$	4,4,14-TriMe $\Delta 8$	4,23,24-TriMe $\Delta 22E$
Bactéries																				
Algues																				
Plantes supérieures																				
Algues																				
Cryptophyta																				
Chlorophyta (algues vertes)																				
Chrysophyta (algues dorées)																				
Rhodophyta (algues rouges)																				
Phaeophyta (algues brunes)																				
Xanthophyta (algues jaunes vertes)																				
Haptophyta (algues jaunes brunes)																				
Dinophyta (dinoflagellés)																				
Euglenophyta (flagellés)																				
Eustigmatophyta																				
Bacillariophyta (diatomées)																				
Prasinophyta																				
Bangiophyta																				
Raphidophyta																				
Pellagophyta																				

Une case noire indique la présence du stérol correspondant en quantités significatives soit représentant plus de 5% de la quantité totale de stérols. Une case grise indique la présence du stérol correspondant en quantités mineures soit généralement identifié à l'état de trace ou représentant moins de 5% de la quantité totale de stérols.

Figure 1.15: Distribution de stérols dans les bactéries, les microalgues et les plantes supérieures d'après Volkman (1986), Patterson (1993), Volkman *et al.* (1993), Volkman *et al.* (1998) et Volkman (2003).

Les algues vertes (Chlorophyta) possèdent une grande variété de stérols (Volkman, 1986). Elles contiennent des quantités élevées de 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol et de stigmastérol

accompagnées bien souvent de sitostérol. Il faut noter toutefois que certaines espèces contiennent des quantités considérables d'ergostérol et de 24-méthyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol (*p. ex.* 36% et 20% pour ces deux derniers stérols respectivement pour l'espèce *Chlorella autotrophica*) ainsi que du 24-éthylcholesta-7,5,22E-trién-3 β -ol (*p. ex.* 46% *Dunaliella tertiolecta*) (Patterson *et al.*, 1992). Ceci démontre que l'ergostérol, présent en quantités majeures dans les champignons (Montgomery *et al.*, 2000), n'est pas propre à cette catégorie d'organismes.

Les Prasinophyta, une autre variété d'algues vertes, possèdent une distribution de stérols plus simple que celle des Chlorophyta (Volkman, 1986). Le 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol et le 24-méthylcholesta-5,24(28)-dién-3 β -ol représentent près de la totalité des stérols présents. L'espèce *Pyramimonas gelidicola* se distingue par sa teneur de 95% en 24-méthylcholesta-5,24(28)-dién-3 β -ol. Néanmoins comme pour les Chlorophyta, certaines espèces se différencient par des teneurs élevées en ergostérol et 24-éthylcholesta-7,5,22E-trién-3 β -ol de 31 et 53 % respectivement pour l'espèce *Pyramimonas grossi* (Patterson *et al.*, 1992).

Les algues dorées (Chrysophyta) contiennent essentiellement du stigmastérol (*p. ex.* 90 et 98% de la composition en stérols pour les espèces *Ochromonas sociabilis* et *Ochromonas malhamensis* respectivement) (Volkman, 2003). Il faut remarquer que des quantités significatives de 24-éthylcholest-5-én-3 β -ol et du 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol accompagnent souvent le stigmastérol.

Sur 152 espèces d'algues rouges ou Rhodophytes, toutes excepté deux contiennent le cholestérol qui est le composant majeur (Patterson, 1993). Des 4 α -méthylstérols (4 α -méthyl-5 α -cholesta-8,22E-dién-3 β -ol, 4 α ,24-diméthyl-5 α -cholesta-8,22E-dién-3 β -ol, 4 α -méthyl-5 α -cholest-8-én-3 β -ol, 4 α ,24-diméthyl-5 α -cholest-8-én-3 β -ol) ont également été identifiés dans l'espèce *Porphyridium*.

Les Eustigmatophyta d'eau douce ont une distribution en stérols composée majoritairement de sitostérol ou de cholestérol accompagnés de 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol et 24-éthylcholesta-5,24(28)Z-dién-3 β -ol (Volkman *et al.*, 1992; Volkman *et al.*, 1999).

Les Haptophyta (algues jaunes brunes) contiennent généralement un à cinq stérols majoritaires avec une large prédominance de 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol (*p. ex.* teneur supérieure à 85% pour les espèces *Isochrysis*, *Emiliana huxleyi*, *Coccolithus pelagicus* et supérieure à 49% pour les espèces *Hymenomonas carterae* et *Chrysofila*) (Volkman, 1986). Le cholestérol est également présent en grandes proportions, suivi du stigmastérol, du sitostérol et du 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol. Toutefois, du 4 α -méthyl-24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol a été identifié en quantités importantes voire majoritaires accompagné de faibles quantités de 4 α ,24-

diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol, de 4 α ,24-diméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol et de 4 α -méthyl-24-éthyl-5 α -cholestan-3 β -ol chez l'espèce *Pavlova*, appartenant à la sous catégorie des Prymnesiophyta, (Volkman *et al.*, 1990). Ceci confirme que les 4 α -méthylstérois ne sont pas uniquement synthétisés par les dinoflagellés.

Les algues jaunes vertes ou Xanthophyta possèdent le sitostérol en quantités majoritaires généralement accompagné du cholestérol, tandis que les algues brunes (Phaseophyta) possèdent une forte teneur en 24-éthylcholesta-5,24(28)E-dién-3 β -ol et les Chryptophyta des quantités significatives voire majoritaires de 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol (*p. ex. Cryptomonas*) (Patterson, 1993). Les Raphidophyta se distinguent par une forte teneur en 24-éthyl-5 α -cholestan-3 β -ol (30%) (Patterson et Van Valkenburg, 1990). La distribution en stérois d'autres algues telles que les Bangiophyta et les Pellagophyta est détaillée sur la Figure 1.15.

2.3.5.3 Zooplancton

Le zooplancton est en grande partie représenté par la catégorie des arthropodes (Patterson, 1993). Ces derniers incluent les copépodes, principaux membres du macroplancton. Ces organismes ne synthétisent généralement pas les stérois mais produisent principalement le cholestérol à partir des phytostérois contenus dans leur nourriture. Par ailleurs la matière fécale rejetée par certains mammifères marins contient des quantités significatives de coprostanol (Venkatesan et Santiago, 1989) comme c'est également le cas pour les mammifères terrestres (Leeming *et al.*, 1996) suggérant une origine fécale de cette molécule (Volkman *et al.*, 1998).

2.3.5.4 Plantes

La composition en stérois a été analysée pour des centaines de plantes (Patterson, 1993). Elle laisse apparaître une prédominance de 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol, de sitostérol et de stigmastérol. De faibles quantités de cholestérol ont également été mises en évidence dans de nombreuses espèces tandis que quelques plantes contiennent du 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol (Volkman, 1986). Toutefois un nombre substantiel d'angiospermes de la famille des Caryophyllales montre des compositions comportant d'importantes quantités pouvant être majoritaires de stigmastanol et de 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol (*p. ex.* groupe *Tribe Rivineae*) ou de 24-éthyl-5 α -cholesta-7,22E-dién-3 β -ol et de 24-éthyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol (*p. ex. Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Portulacaceae, Basellaceae, Molluginaceae, Caryophyllaceae*) (Salt *et al.*, 1991).

2.3.5.5 Bactéries

Très peu de bactéries se sont révélées productrices de stérols (Volkman, 2003). La plupart des bactéries contiennent en effet des hopanoïdes qui occupent les mêmes fonctions que les stérols dans les organismes eukaryotes (Kannenbergh et Poralla, 1999). Les cyanobactéries communément appelées algues bleues vertes ont vu leur composition être sujette à débat. La présence du cholestérol, du sitostérol, du 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et du stigmastérol a été plusieurs fois reportée (Volkman, 2003). Bien que l'identification de ces stérols demeure indiscutable, ces stérols pourraient très bien provenir de contaminations par de champignons ou des levures ou lors des manipulations en laboratoire. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les quantités de stérols reportées sont dans beaucoup de cas plus basses que dans les algues. De plus le cholestérol, le sitostérol et le stigmastérol ont été reportés comme contaminants dans le caoutchouc naturel dont sont constitués les poirettes ou les gants en latex (Nes, 1987). Par ailleurs Schouten *et al.* (2000a) ont reportés la présence dans la bactérie méthanotrophe *Méthylosphaera hansonii* de lanostérol de lanost-8(9)-én-3 β -ol, 4,4-diméthyl-5 α -cholesta-8(14),24-dién-3 β -ol, 4,4-diméthyl-5 α -cholest-8(14)-én-3 β -ol, 4 α -méthyl-5 α -cholesta-8(14),24-dién-3 β -ol et 4 α -méthyl-5 α -cholest-8(14)-én-3 β -ol. Toutefois les auteurs suggèrent que la capacité de biosynthèse des stérols par les bactéries méthanotrophes se limite à la famille *Méthylcocccaceae* connue pour la production des 4 α -méthyl- et 4,4-diméthylstérols (Bird *et al.*, 1971; Bouvier *et al.*, 1976).

2.3.5.6 Indicateurs de sources

L'analyse précédente montre que la démarche consistant à rechercher un stérol spécifique à une classe d'organismes précurseurs apparaît inadaptée (Volkman, 1986). En effet, peu nombreux sont les stérols pouvant être considérés comme caractéristiques d'une classe d'organismes précise comme le rend compte la Figure 1.15. Certains 4 α -méthylstérols caractéristiques des dinoflagellés (4 α ,23,24-triméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol et 4 α -méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol) (Rieley *et al.*, 1991) ou le 4 α ,24-diméthyl-5 α -cholesta-8,22E-dién-3 β -ol caractéristique des rhodophytes (Patterson, 1993) peuvent tout de même être cités (Volkman, 2003). Toutefois même ces stérols spécifiques doivent être utilisés avec prudence comme indicateur de source. Ceci est justifié par l'analyse de la composition en stérol d'un nombre très restreint d'espèces comparé au nombre colossal d'espèces existantes. De plus la composition en stérol peut être sujette à variation pendant la phase de croissance des organismes et dépendre de facteurs externes (température, intensité lumineuse, *etc.*) (Ballantine *et al.*, 1979; Piretti *et al.*, 1997).

Parmi les stérols communs à plusieurs classes d'organismes, un examen de la distribution en stérols dans le sédiment et dans les organismes précurseurs apparaît, d'après Volkmann (1986), plus approprié pour mettre en évidence un lien entre le stérol et son ou ses organismes producteurs. L'auteur attire l'attention sur le fait que distinguer la part des apports allochtones de plantes terrestres des apports autochtones planctoniques n'est pas une tâche aisée. En effet, les stérols des plantes supérieures à savoir le 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol, le 24-éthylcholest-5-én-3 β -ol et le 24-éthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol (Patterson, 1993) se retrouvent également dans une large majorité des algues phytoplanctoniques (Figure 1.15). Ces stérols ne peuvent donc pas être utilisés de manière non équivoque pour démontrer la contribution des plantes terrestres comme le démontre l'étude géochimique d'un lac en Antarctique (Matsumoto *et al.*, 1982). Volkmann (1986) suggère donc qu'une comparaison avec d'autres biomarqueurs plus spécifiques des plantes supérieures (*p. ex. n*-alcanes) soit réalisée avant de tirer une quelconque conclusion. Cette démarche est d'autant plus justifiée par le fait que les stérols associés avec la matière organique terrestre sont moins facilement dégradables que ceux d'origine aquatique (Rieley *et al.*, 1998; Wünsche *et al.*, 1988) exagérant la contribution allochtone terrestre dans les sédiments analysés.

Enfin, dans le cas de l'étude de sédiments soumis à la diagenèse précoce, l'analyse en lipides de la faune planctonique du site d'étude et d'échantillons prélevés aux alentours se révèle être un atout supplémentaire (Rieley *et al.*, 1991). Plusieurs échantillonnages permettent dans ce cas de visualiser d'éventuelles variations avec le temps (Camacho *et al.*, 2001; Schanz et Stalder, 1998) et d'offrir une meilleure robustesse à l'étude géochimique.

2.3.6 Diagenèse des stéroïdes

La diagenèse des stérols est un processus complexe comme le montre l'exemple des stanols et Δ^5 -stérols de la Figure 1.16.

L'étude des transformations diagénétiques précoces s'est faite par le biais d'incubations de standards ou de produits marqués au deutérium, tritium ou ^{14}C (*p. ex.* Mermoud, 1982). Des simulations en laboratoire ont également été menées par chauffage des biomarqueurs dans une matrice minérale ou acide (*p. ex.* Kirk *et* Shaw, 1975; Peakman *et al.*, 1988; Sieskind *et al.*, 1979) afin de reproduire en des temps très courts les transformations subies lors de la diagenèse avancée nécessitant des durées atteignant plusieurs millions d'années. Ces expériences apportent des informations qui se complètent naturellement par la mécanique quantique (*p. ex.* de Leeuw *et al.*, 1989; Schüpfer *et* Gülaçar, 2000). Les transformations diagénétiques postulées reposent

sur l'analyse de profils de biomarqueurs de carottes sédimentaires de maturités croissantes (*p. ex.* Brassell *et al.*, 1984).

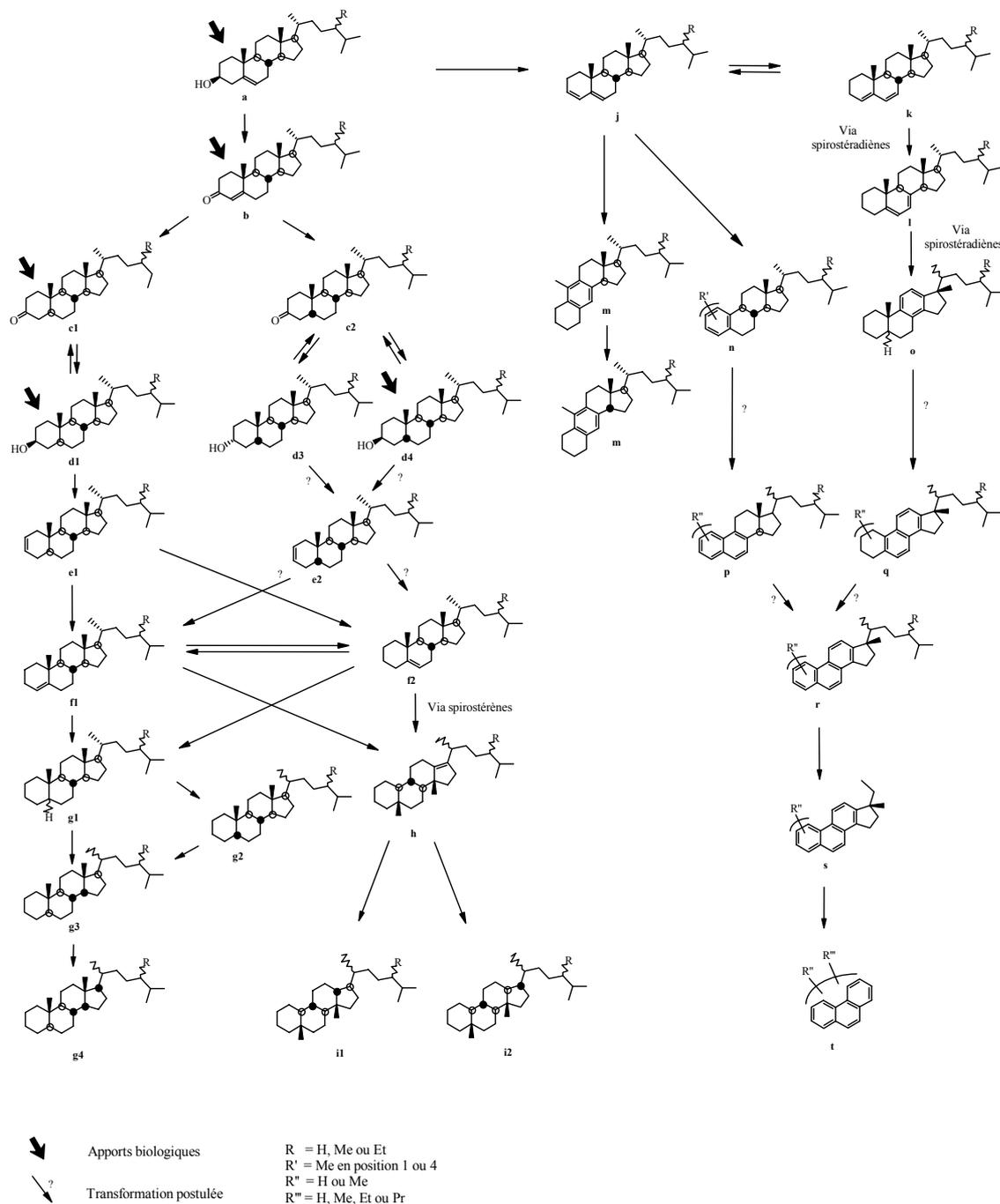


Figure 1.16: Diagramme condensé de la diagenèse des stanols et Δ^5 -stérols d'après MacKenzie *et al.* (1982); Peakman *et al.* (1988) et Schüpfer P. Y.(2000).

Le mécanisme de diagenèse précoce transformant les Δ^5 -stérols en stanols via le cholest-4-én-3-one a été suggéré grâce à l'incubation de cholestérol marqué au ^{14}C (Edmunds *et al.*, 1980; Gaskell et Eglinton, 1975). Les incubations de cholestérol, de cholest-4-én-3-one et de sitostérol (Nishimura, 1978; Nishimura et Koyama, 1977) réalisées dans le lac eutrophique Suwa (Japon) ont permis de confirmer ce mécanisme réactionnel. L'incubation de cholestérol marqué au deutérium dans un petit lac anoxique du nom de Voua de la Motte (France) (Wünsche, 1987) a permis de clarifier parfaitement le mécanisme de réduction des stérols en stanols écartant la possibilité d'un mécanisme alternatif d'hydrogénation directe proposé au départ par Gagosian *et al.* (1980). Ces études ont également démontré la réversibilité de la transformation stanone \leftrightarrow stanol. Le schéma de la Figure 1.16 n'inclut pas le mécanisme de formation des stéradènes/stératriènes via l'hydroxylation suivie de déshydratation des stérols (Gagosian et Farrington, 1978), ce mécanisme n'ayant pas été soutenu par une littérature complémentaire. Par ailleurs, la formation de stérènes est un processus à considérer non seulement dans le sédiment mais également dans la colonne d'eau. Lors de l'analyse de fines particules ($< 2 \mu\text{m}$) contenues dans de l'eau pompée à la frontière du minimum d'oxygène (100-800 m) de l'océan Pacifique Equatorial à proximité de Mexico, le 5α -cholest-2-ène, le cholesta-3,5-diène ainsi que leurs homologues en C_{28} et C_{29} et d'autres stéradènes, stératriènes et stératétraènes ont été détectés (Wakeham *et al.*, 1984). Par ailleurs, l'isomérisation des stérènes a particulièrement été étudiée (Peakman et Maxwell, 1988a; Peakman *et al.*, 1988) tandis que la formation des composés monoaromatiques a été récemment complétée (Schüpfer *et al.*, 2000 et références incluses).

Les diagrammes diagénétiques analogues à celui de la Figure 1.16 ont également été obtenus dans le cas des Δ^7 -stérols (De Leeuw *et al.*, 1989; Peakman *et al.*, 1989; Peakman et Maxwell, 1988b) et des 4α -méthylstérols (Peakman *et al.*, 1992; Rechka *et al.*, 1992).

Le nombre croissant d'études sur les stéroïdes organosoufrés liés par pont mono- (Kok *et al.*, 2000; Richnow *et al.*, 1993; Schouten *et al.*, 1993a) et polysulfures (Adam *et al.*, 2000; Kohnen *et al.*, 1993; Schaeffer *et al.*, 1995) identifiés dans les sédiments montre que ces composés interviennent dans la diagenèse des biomarqueurs stéroïdiens, notamment dans les milieux de déposition euxiniques.

Des réactions de simulations de l'incorporation du soufre par la matière organique ont été conduites afin d'élucider le mécanisme de formation des composés organosoufrés (De Graaf *et al.*, 1992; Schouten *et al.*, 1993b; Schouten *et al.*, 1994). En ce qui concerne les stéroïdes, Schouten *et al.* (1993b) ont proposé un mécanisme basé sur un intermédiaire cétonique provenant de l'oxydation des alcools. Kohnen *et al.* (1991) ont observé des stéroïdes liés à la position C(2) et C(3) par ponts polysulfures à des macromolécules de haut poids moléculaires.

Ils en ont déduit que les précurseurs doivent être les ster-2-ènes. Adam *et al.* (2000) nuancent ces propos. Ils soutiennent que les ster-2-ènes sont effectivement les précurseurs potentiels dans des sédiments anciens. Néanmoins, dans le cas de sédiments plus récents, les auteurs n'ont observé que des stéroïdes liés par ponts polysulphures au niveau de la position C(3). Ils mettent en avant un autre mécanisme ayant comme point de départ les ster-3-ones. Les auteurs expliquent l'observation de stéroïdes liés par ponts polysulphures (SPPS) avec ou sans double liaison en position C(2) par un mécanisme divisé en trois étapes. La première étape décrite sur la Figure 1.17(a) explique la formation des SPPS. La seconde étape est représentée sur la Figure 1.17(b) et montre la libération des SPPS par HS⁻ et la formation des thiocétones correspondantes. Ces thiocétones seront successivement transformées en thiols ou SPPS saturés suivant le mécanisme décrit sur la troisième étape de la Figure 1.18 (Schneckenburger *et al.*, 1998). Un mécanisme simplifié proposé par Kok *et al.* (2000) est présenté sur la Figure 1.19 pour expliquer la formation des composés liés par ponts mono- et polysulphures dans les sédiments de surface du lac Ace situé en Antarctique.

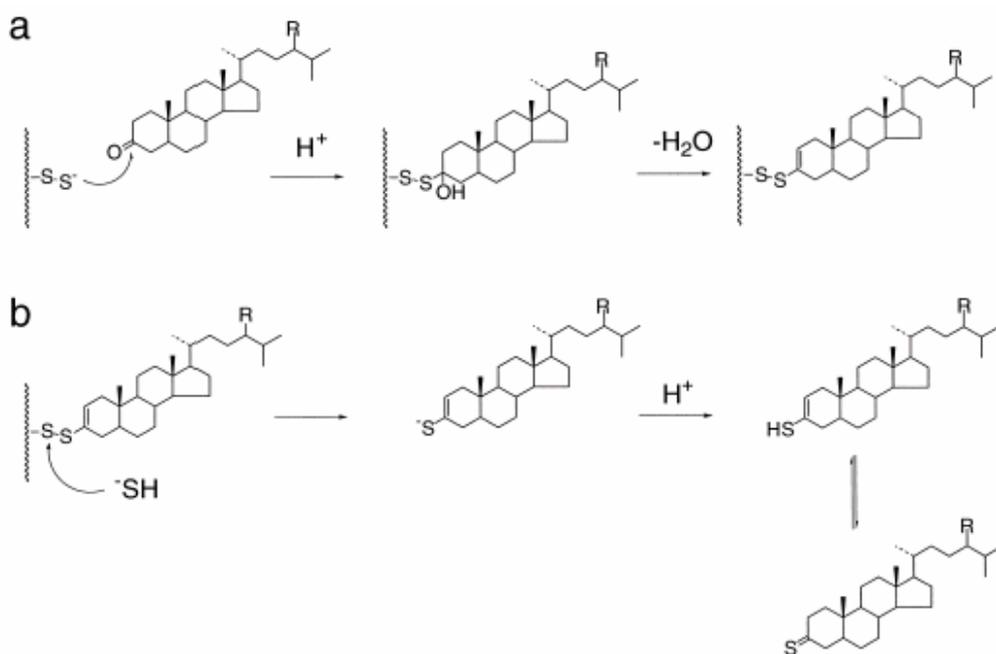


Figure 1.17: Mécanisme d'incorporation des cétones stéroïdiennes (a) et de libération des composés liés par ponts polysulphures par réaction avec l'ion disulphure (b) (d'après Adam *et al.*, 2000).

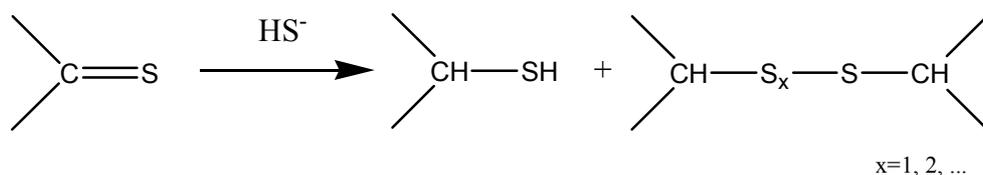


Figure 1.18: Réaction des cétones stéroïdiennes avec une solution aqueuse d'ions disulphures (d'après Adam *et al.*, 2000).

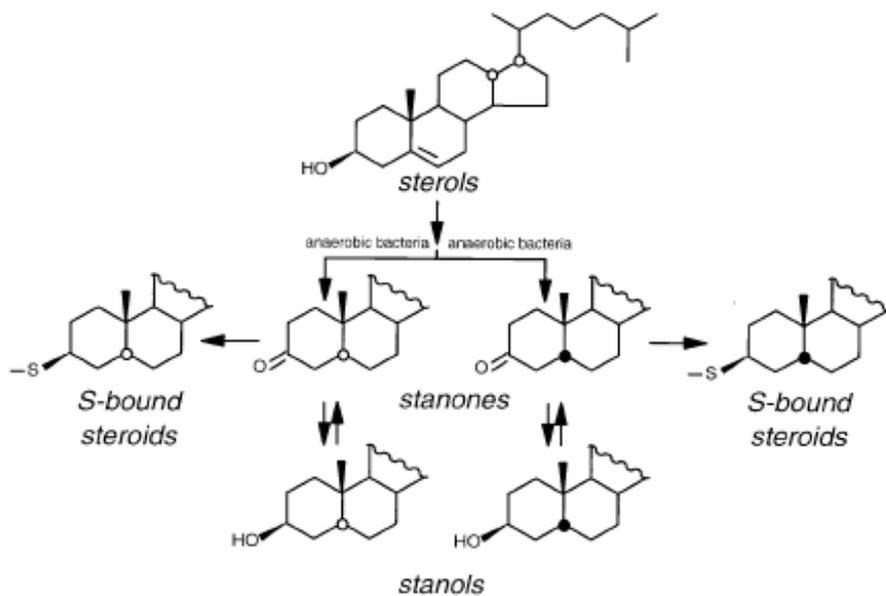


Figure 1.19: Formation des stéroïdes soufrés à partir de leur stérol précurseur (d'après Kok *et al.*, 2000).

2.3.7 Indicateurs de maturité thermique

En raison de l'isomérisation de la position 20R en 20S des $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -stéranes, le rapport $20S/(20R+20S)$ pourra être utilisé pour suivre l'augmentation de maturité d'un sédiment jusqu'au pic de génération des hydrocarbures liquides (pic de génération d'huile). Ce rapport évoluera de la valeur nulle (stéranes avec la configuration biologique) à la valeur à l'équilibre qui est environ 0.55 (MacKenzie *et al.*, 1980). L'isomérisation des positions C(14) et C(17) rend également possible l'usage de l'indicateur défini par le rapport $(14\beta17\beta)/(14\beta17\beta + 14\alpha17\alpha)$. Ce dernier, non nul pour des sédiments immatures atteint une valeur d'environ 0.70 au pic de génération d'huile (Peters et Moldowan, 1993). Le rapport entre la quantité de stéroïdes triaromatiques à 28 carbones divisée par celle des stéroïdes triaromatiques et des monoaromatiques C à 28 et 29 carbones respectivement permet également de suivre la maturation du sédiment jusqu'au pic de génération des hydrocarbures liquides (Requejo, 1992). Toutefois ce dernier rapport peut être affecté par le phénomène de migration des pétroles (Marzi et Rullkötter, 1992). Enfin le rapport de la quantité du stéroïde triaromatique en C₂₀ (s Figure 1.16) divisé par celle des stéroïdes triaromatiques en C₂₀ et C₂₈ (s + r, Figure 1.16) constitue un autre type d'indicateur de maturité qui atteint la valeur de l'unité juste après le pic de génération d'huile.

3 Le lac de Cadagno

3.1 Présentation générale

Le lac de Cadagno est un lac alpin situé dans le sud de la Suisse dans le Val Piora (canton du Tessin) (Figure 1.20) à une altitude de 1923 mètres (longitude ouest: 08°43'; latitude nord: 46°33'). D'une longueur de 842 mètres et de 423 mètres de largeur, sa surface atteint 26.1 hectares. Sa profondeur maximale est de 21 mètres avec 9.27 mètres en moyenne et son volume est de $2.42 \cdot 10^6 \text{ m}^3$. Ce lac constituant un des réservoirs de l'usine hydro-électrique de Piotta, son niveau peut diminuer de 3 à 4 mètres en hiver correspondant à une perte de volume de 30% par rapport à la situation en été.

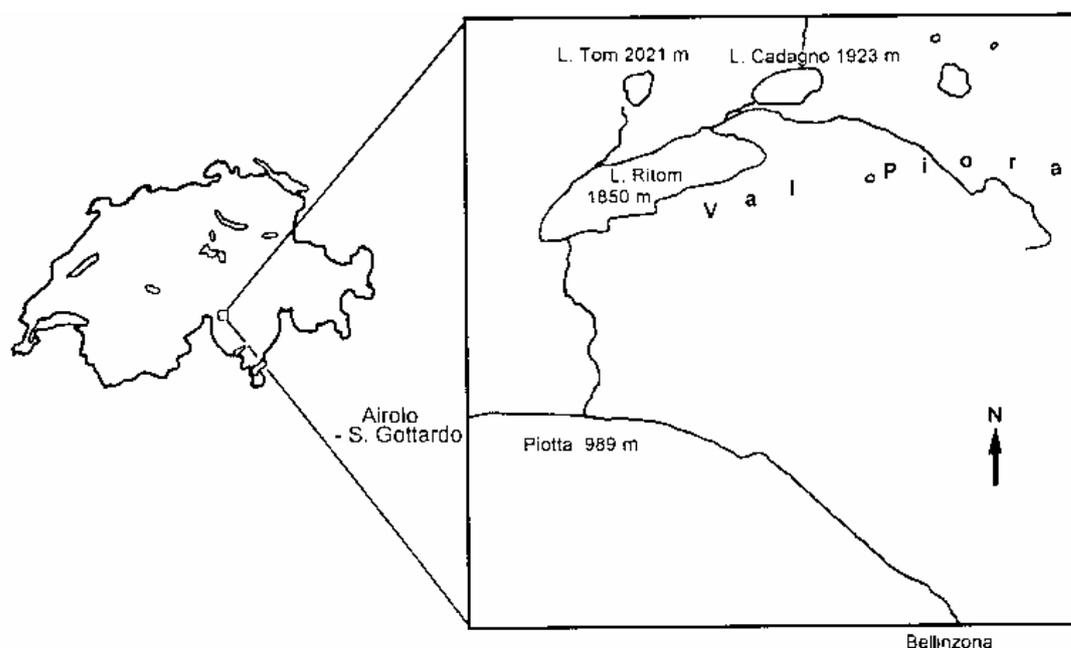


Figure 1.20: Le lac Cadagno situé dans le massif du Gothard (Peduzzi *et al.*, 1998).

3.2 Données physico-chimiques

Le lac a été formé durant la dernière période glaciaire il y a approximativement 8000 ans (Del Don *et al.*, 2001). Les avalanches, glissements de terrain et l'accumulation de sable dolomitique ont constitué les apports clastiques majeurs du lac. Les eaux profondes alimentant en partie le lac se chargent de minéraux en circulant à travers la roche constituée de grauwacke et de dolomite mêlée de gypse présente en fond de vallée. Le fond du lac reçoit en conséquence une

eau riche en ions Mg^{2+} , Ca^{2+} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} et, en plus faibles quantités, Fe^{2+} et Mn^{2+} (Peduzzi *et al.*, 1998). Des eaux faiblement minéralisées, ayant été en contact avec les roches siliceuses situées en amont, s'écoulent également dans le lac, soit directement soit via des marécages. L'augmentation de la salinité de l'eau du lac avec la profondeur est reflétée par le profil de densité de la colonne d'eau. Ce dernier permet de déterminer la frontière entre mixo- et monimolimnion, zones pauvres et riches en minéraux respectivement, située à 14 mètres en hiver et 12.5 mètres en été.

La surface du lac se trouve gelée de décembre à mai et se couvre d'une épaisseur de neige allant jusqu'à 2 mètres (Del Don *et al.*, 2001). Pendant l'été la température crée une stratification avec un hypolimnion bien défini sous 12 mètres. La profondeur du thermocline est localisée entre 7 à 8 mètres. En hiver, en dessous de 2 mètres sous la glace, la température reste comprise entre 2 et 4°C.

La concentration en O_2 chute à une valeur nulle à 11 et 12 m en hiver et en été respectivement. Le pH de l'eau est stabilisé à 7. Néanmoins le pH du mixolimnion peut atteindre en été des valeurs de 8.5 à 9 en raison de la production d' O_2 par photosynthèse (Del Don *et al.*, 1998). Pendant l'hiver le pH de l'eau de surface peut également descendre à une valeur de 5. La concentration en sulfates augmente sensiblement en dessous de 12 mètres. Sous cette profondeur une hausse brusque de la concentration en carbonates, Fe^{2+} , Mn^{2+} et Ca^{2+} est observée la plupart des mois de l'année (Tonolla *et al.*, 1998).

La concentration totale en H_2S , HS^- et S^{2-} augmente brusquement en dessous de 11.5 m en été et 15.5 m en hiver. La concentration en sulfure d'hydrogène dissous (espèces H_2S , HS^- et S^{2-}) dans le monimolimnion est notamment régulée d'une part par précipitation avec les ions métalliques présents et d'autre part par les apports de sulfates des eaux profondes alimentant le lac. Une accumulation significative de soufre dans le sédiment, essentiellement sous forme de sulfures métalliques (*p. ex.* pyrite) est observée (Hanselmann et Hutter, 1998).

3.3 Phytoplancton et zooplancton

(Camacho *et al.*, 2001) ont montré que la composition de la population phytoplanctonique fluctue peu au cours de l'année. Ainsi de 0 à 9 mètres le phytoplancton est dominé par le chlorophyte *Echinocoleum* accompagné principalement d'une diatomée (*Cyclotella radiosia*) et de picocyanobactéries. En dessous de 9 mètres, diverses espèces de diatomées (*Fragilari capucina*, *Fragilari ulna*, *Cyclotella comensis*) et de Cryptophyta (*Cryptomonas erosa*, *Cryptomonas phaseolus*) sont présentes. Schanz et Stalder (1998) ont montré toutefois une

domination phytoplanctonique des diatomées (possédant une grande diversité dans le lac de Cadagno (Güttinger et Straub, 1998)) entre 0 et 10 mètres de juillet à mi-août. Pendant une seconde période, de mi-août à septembre, les Chlorophyta, majoritaires, sont par ailleurs accompagnés par des quantités significatives de Cryptophyta et Dinophyta. Les Chrysophyta apparaissent de manière générale en quantités mineures. Bertoni *et al.* (1998) ont également reporté entre la surface et 2 mètres de profondeur, une population importante de diatomées et des quantités significatives de Cryptophyta de juin à juillet puis de Cyanobactéries et Chlorophyta en août et de Chrysophyta en octobre.

Parmi le zooplancton, les familles des *Cladocera* (*Daphnia gr. longispina* et *Bosmina longirostris* représentant 40% du zooplancton) et *Rotifers* (espèces *Conochilus*, *Asplanchna priodonta*, et le copépode *Acanthodiptomus denticornis*, représentant 35, 10 et 9.5% respectivement du zooplancton) sont largement majoritaires (Demarta *et al.*, 1998).

3.4 Colonies bactériennes

Le chemocline est occupé essentiellement par la famille des *Proteobacteria* qui sont représentées à 33% par les bactéries violettes phototrophes oxydantes du soufre (*Chromatium okenii* et *Amoebobacter purpureus* renommée *Lamprocytis roseopersicina* dominant en début et fin d'été respectivement) (Camacho *et al.*, 2001). Tonolla *et al.* (2003) ont mis en évidence la présence d'autres bactéries vertes phototrophes oxydantes du soufre (dont la *Chlorobium phaebacteroides*) qui peuvent dominer les bactéries précédemment citées.

La majorité des bactéries rencontrées dans le monimolimnion appartiennent également à la famille des *Proteobacteria*. Parmi celles-ci figurent notamment les bactéries sulfatoréductrices mais également des espèces méthylophiles (*p. ex. Méthylococcus, Méthylobacter*). Dans des proportions plus réduites, sont également présentes les familles des *Flexibacter*, des *Spirochetes* et les bactéries Gram positives (*p. ex. Clostridium aminobutyricum*) (Demarta *et al.*, 1998).

L'analyse des mares à proximité du lac a montré la présence de colonies bactériennes stratifiées. Les quatre strates successives se composent de cyanobactéries associées à des diatomées en surface, puis de cyanobactéries, de bactéries violettes productrices de soufre (*Rhodospirillum molischianum* et *fulvum*, *Rhodoplana roseus* et *Rhodoferrax fermentans*, *Thiocyxtis violacea* et *Chromatium pkenii*) et enfin de bactéries sulfatoréductrices (Wiggli *et al.*, 1998).

3.5 Composition de la matière organique en suspension et des sédiments de surface

La matière organique non recyclée atteignant le fond a été recueillie par une trappe placée à 13.5 m (Schanz et Stalder, 1998). Les bactéries occupent une large part de la matière récupérée (25-65%) de juillet à septembre. Les Chrysophyta et diatomées apparaissent en quantités significatives de juillet à mi-août tandis que les Chlorophyta sont plus abondants dans la période de mi-août à septembre. Les Cryptophyta et Dinophyta représentent une partie mineure de la masse sédimentaire tandis que les Cyanobactéries en sont absentes. La masse de matière organique piégée de juillet à mi-août ($14 \text{ mg/dm}^2/\text{jour}$) est environ trois fois supérieure à celle de mi-août à septembre. Un taux de sédimentation moyen de 4 mm/an a pu être estimé (Putschew *et al.*, 1995).

Deux analyses géochimiques ont également été menées sur des sédiments de surface anoxiques (Putschew *et al.*, 1995; Putschew *et al.*, 1996). Elles ont montré que la matière organique est dérivée majoritairement du phytoplancton et des colonies bactériennes présentes, l'apport terrestre étant très réduit. Parmi les biomarqueurs libres identifiés figurent notamment les acides gras, les *n*-alcanes, *n*-alcools, les hopanoïdes, le phytane, les stérènes et stérols. Les composés organo-sulphurés libres sont en revanche quasi-absents. Toutefois des biomarqueurs liés par pont soufre (phytane, squalane, hydrocarbures stéroïdiens) ont été mis en évidence en quantités significatives.

4 Conclusion

D'après la littérature et de par sa situation géographique, le lac de Cadagno reçoit des quantités mineures de matière organique allochtone. Il constitue ainsi, par opposition à d'autres systèmes lacustres plus complexes, un écosystème simplifié gouverné par un nombre de variables plus restreint. De plus, de nombreuses études bio-, géo- et physico-chimiques ont déjà été entreprises sur ce lac dans le passé. Enfin, l'identification simultanée des stérènes et stérols s'est révélée positive dans les sédiments de ce lac. Pour ces diverses raisons, ce dernier constitue donc un site remarquable pour étudier la cinétique de déshydratation des stérols dans des sédiments récents. Par ailleurs, le sondage de la littérature effectué dans cette première partie a également permis de rassembler de nouvelles données bibliographiques relatives aux biomarqueurs utilisés dans le cadre de ce travail. Ces informations couplées aux études géochimiques antérieures donneront l'occasion d'affiner les connaissances déjà existantes sur le lac de Cadagno et permettront ainsi de mieux aborder l'étude cinétique précédemment évoquée. La connaissance des procédures expérimentales développées dans la seconde partie constitue toutefois une étape indispensable avant l'interprétation des résultats entreprise dans la troisième partie.

5 Références

- Adam P., Schneckenburger P., Schaeffer P. et Albrecht P. (2000) Clues to early diagenetic sulfurization processes from mild chemical cleavage of labile sulfur-rich geomacromolecules. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 3485-3503.
- Albaiges J., Algaba J. et Grimalt J. O. (1984) Extractable and bound neutral lipids in some lacustrine sediments. *Organic Geochemistry* **6**, 223-236.
- Ballantine J. A., Lavis A. et Morris R. J. (1979) Marine Sterols. 10. Sterols of the Phytoplankton - Effects of Illumination and Growth Stage. *Phytochemistry* **18**, 1459-1466.
- Banthorpe D. V. *Natural Products, Their Chemistry And Biological Significance*. Ed. Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V. & Harborne, J. B., Longman Scientific & Technical (1994). Chap. 5: Terpenoids. 289-359.
- Bertoni R., Callieri C. et Pugnetti A. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Organic carbon dynamics in Lake Cadagno and microbial activities in the mixolimnion. 105-120.
- Bieger T., Abrajano T. A. et Hellou J. (1997) Generation of biogenic hydrocarbons during a spring bloom in Newfoundland coastal (NW Atlantic) waters. *Organic Geochemistry* **26**, 207-218.
- Bird C. W., Lynch J. M., Pirt F. J., Reid W. W., Brooks C. J. W. et Middleditch B. S. (1971) Steroids and Squalene in *Methylococcus capsulatus* grown on Methane. *Nature* **230**, 473-474.
- Bouvier P., Rohmer M., Benveniste P. et Ourisson G. (1976) $\Delta^{8(14)}$ -Steroids in *Bacterium Methylococcus-Capsulatus*. *Biochemical Journal* **159**, 267-271.
- Brassell S. C. *Isopentenoids and Other Natural Products*. Ed. Nes, W. D., ACS Symposium Series 562 (1994). Chap. 1: Isopentenoids and Geochemistry. 2-30.
- Brassell S. C., Comet P. A., Eglinton G., Isaacson P. J., McEvoy J., Maxwell J. R., Thomson I. D., Tibbetts P. J. C. et Volkman J. K. *Init. Rep. D.S.D.P. VL- LVI, LVII IS*. (1980). Preliminary lipid analyses of sections 440A-7-6, 440B-3-5, 440B- 8-4, 440B-68-2, and 436-11-4: legs 56 and 57, Deep Sea Drilling Project. 1367-1390.
- Brassell S. C., McEvoy J., Hoffmann C. F., Lamb N. A., Peakman T. M. et Maxwell J. R. (1984) Isomerization, rearrangement and aromatization of steroids in distinguishing early stages of diagenesis. *Organic Geochemistry* **6**, 11-23.
- Brooks C. J. W. (1979) Some aspects of mass spectrometry in research on steroids. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A*. **293**, 53-67.
- Brown G. D. (1998) The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports* **15**, 653-696.
- Budzikiewicz H., Djerassi C. et Williams D. H. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Volume II: Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes*. Holden-Day, Inc. (1964).

- Camacho A., Erez J., Chicote A., Florin M., Squires M. M., Lehmann C. et Bachofen R. (2001) Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. *Aquatic Sciences* **63**, 91-106.
- Dastillung M. & Albrecht P. (1977) Δ^2 -Sterenes As Diagenetic Intermediates in Sediments. *Nature* **269**, 678-679.
- De Graaf W., Sinninghe Damsté J. et De Leeuw J. W. (1992) Laboratory simulation of natural sulphurization: I. Formation of monomeric and oligomeric isoprenoid polysulphides by low-temperature reactions of inorganic polysulphides with phytol and phytadienes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **56**, 4321-4328.
- De Leeuw J. W., Cox H. C., Van Graas G., Van de Meer F. W., Peakman T. M., Baas J. M. A. et Van de Graaf B. (1989) Limited double bond isomerisation and selective hydrogenation of sterenes during early diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **53**, 903-909.
- Del Don C., Hanselmann K., Peduzzi R. et Bachofen R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Orographical and geological description of the meromictic Alpine Lake Cadagno. 5-9.
- Del Don C., Hanselmann K. W., Peduzzi R. et Bachofen R. (2001) The meromictic alpine lake Cadagno: Orographical and biogeochemical description. *Aquatic Sciences* **63**, 70-90.
- Demarta A., Tonolla M., Caminada A. P., Ruggeri N. et Peduzzi R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Phylogenetic diversity of the bacterial community from the anoxic layer of the meromictic Lake Cadagno. 19-30.
- Deming J. W. & Baross J. A. *Organic Geochemistry, Principles and Applications*. Ed. Engel, M. H. & Macko, S. A., Plenum (1993). Chap. 5: The Early Diagenesis of Organic Matter: Bacterial Activity. 119-144.
- Djerassi C. (1970) Applications of Mass Spectrometry in the Steroid Field. *Pure and Applied Chemistry* **21**, 205-225.
- Edmunds K. L. H., Brassell S. C. et Eglinton G. *Advances in organic geochemistry 1979*. Ed. Douglas, A. G. & Maxwell, J. R. (1980). The short-term diagenetic fate of 5α -cholestan- 3β -ol: in situ radiolabelled incubations in algal mats. 427-434.
- Farrimond P., Fox P. A., Innes H. E., Miskin I. P. et Head I. M. (1998) Bacterial sources of hopanoids in recent sediments: improving our understanding of ancient hopane biomarkers. *Ancient Biomolecules* **2**, 147-166.
- Gagosian R. B. & Farrington J. W. (1978) Sterenes in surface sediments from the southwest African shelf and slope. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**, 1091-1101.
- Gagosian R. B., Smith S. O., Lee C., Farrington J. W. et Nelson M. F. *Advances in Organic Geochemistry 1979*. Ed. Douglas, A. G. & Maxwell, J. R. (1980). Steroid transformations in Recent marine sediments. 407-419.

Gallegos E. J. & Moldowan J. M. *Biological Markers in Sediments and Petroleum*. Ed. Moldowan, J. M., Albrecht, P. & Philp, R. P., Prentice-Hall, Inc. (1992). Chap. 9: The Effect of Injection Hold Time on GC Resolution and the Effect of Collision Gas on Mass Spectra in Geochemical "Biomarkers" Research. 156-181.

Gaskell S. J. & Eglinton G. (1975) Rapid hydrogenation of sterols in a contemporary lacustrine sediment. *Nature* **254**, 209-211.

Gerst N., Ruan B. F., Pang J. H., Wilson W. K. et Schroepfer G. J. (1997) An updated look at the analysis of unsaturated C₂₇ sterols by gas chromatography and mass spectrometry. *J Lipid Res* **38**, 1685-1701.

Giger W. & Schaffner C. (1981) Unsaturated Steroid Hydrocarbons as Indicators of Diagenesis in Immature Monterey Shales. *Naturwissenschaften* **68**, 37-38.

Grossi V., Hirschler A., Raphel D., Rontani J. F., De Leeuw J. W. et Bertrand J. C. (1998) Biotransformation pathways of phytol in recent anoxic sediments. *Organic Geochemistry* **29**, 845-861.

Güttinger W. & Straub F. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Diatoms of Lake Cadagno. 57-64.

Hanselmann K. & Hutter R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Geomicrobiological coupling of sulfur and iron cycling in anoxic sediments of a meromictic lake: sulfate reduction and sulfide sources and sinks in Lake Cadagno. 85-98.

Homberg E. (1977) Zusammenhänge zwischen der Struktur pflanzlicher Sterine und ihrem gaschromatographischen Verhalten auf verschiedenen stationären Phasen. *Journal of Chromatography* **139**, 77-84.

Ikekawa N., Watanuki K., Tsuda K. et Sakai K. (1968) Correlation between Molecular Structure of Sterols and Retention Time in Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* **40**, 1139-1141.

Kannenbergh E. L. & Poralla K. (1999) Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* **86**, 168-176.

Killops S. D. & Killops V. J. *An introduction to organic geochemistry*. Gill, R. C. O., Longmann Scientific & Technical (1993).

Kirk D. N. & Shaw P. M. (1975) Backbone rearrangements of steroidal 5-enes. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1* , 2284-2294.

Kohnen M. E. L., Sinninghe Damsté J., Baas M., Kock Van Dalen A. C. et De Leeuw J. W. (1993) Sulphur-bound steroid and phytane carbon skeleton in geomacromolecules: Implications for the mechanism of incorporation of sulphur into organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 2515-2528.

Kohnen M. E. L., Sinninghe Damsté J., Kock Van Dalen A. C. et De Leeuw J. W. (1991) Di- or polysulfide-bound biomarkers in sulfur-rich geomacromolecules as revealed by selective chemolysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **55**, 1375-1394.

- Kok M. D., Rijpstra W. I. C., Robertson L., Volkman J. K. et Sinninghe Damsté J. (2000) Early steroid sulfurisation in surface sediments of a permanently stratified lake (Ace Lake, Antarctica). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 1425-1436.
- Leeming R., Ball A., Ashbolt N. et Nichols P. (1996) Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research* **30**, 2893-2900.
- MacKenzie A. S., Brassell S. C., Eglinton G. et Maxwell J. R. (1982) Chemical Fossils: The Geological Fate of Steroids. *Science of the Total Environment* **217**, 491-504.
- MacKenzie A. S., Patience R. L., Maxwell J. R., Vandembroucke M. et Durand B. (1980) Molecular parameters of maturation in the Toarcian shales, Paris Basin, France-I. Changes in the configurations of acyclic isoprenoid alkanes, steranes and triterpanes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **44**, 1709-1721.
- Mahato S. B. & Sen S. (1997) Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry* **44**, 1185-1236.
- Mansour M. P., Volkman J. K., Jackson A. E. et Blackburn S. I. (1999) The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *Journal of Phycology* **35**, 710-720.
- Marzi R. & Rullkötter J. Ed. Moldowan, J. M., Albrecht, P. & Philp, R. P., Prentice-Hall (1992). Chap. 2: Qualitative and Quantitative Evolution and Kinetics of Biological Marker Transformation - Laboratory Experiments and Application to the Michigan Basin. 18-41.
- Matsumoto G., Torii T. et Hanya T. (1982) High Abundance of Algal 24-Ethylcholesterol in Antarctic Lake Sediment. *Nature* **299**, 52-54.
- Mermoud F. (1982) Géochimie des stérols et des acides gras dans les sédiments du lac Léman et du Voua de la Motte. Thèse, Université de Genève.
- Montgomery H. J., Monreal C. M., Young J. C. et Seifert K. A. (2000) Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology & Biochemistry* **32**, 1207-1217.
- Nes W. D. (1987) Biosynthesis and Requirement for Sterols in the Growth and Reproduction of Oomycetes. *ACS Symposium Series* **325**, 304-328.
- Nes W. D. & Venkatramesh M. *Isopentenoids and Other Natural Products, Evolution and Function*. Ed. Nes, W. D., ACS Symposium Series 502 (1994). Chap. 4: Molecular Assymetry and Sterol Evolution. 55-89.
- Nes W. D. & McKean M. L. *Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids*. Nes, W. David and McKean, M. L., University Park Press (1977).
- Nishimura M. (1978) Geochemical characteristics of the high reduction zone of stenols in Suwa sediments and the environmental factors controlling the conversion of stenols into stanols. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**, 349-357.
- Nishimura M. & Koyama T. (1977) The occurrence of stanols in various living organisms and the behavior of sterols in contemporary sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**, 379-385.
- Ourisson G. & Albrecht P. (1992) Hopanoids. 1. Geohopanoids - The Most Abundant Natural Products on Earth? *Accounts of Chemical Research* **25**, 398-402.

- Patterson G. W. (1971) Relation between Structure and Retention Time of Sterols in Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* **43**, 1165-1170.
- Patterson G. W. *Isopentenoids and other natural products, Evolution and Function*. Ed. Nes, W. D., 205 (1993). The Phylogenetic Distribution of Sterols. 90-108.
- Patterson G. W., Gladu P. K., Wikfors G. H. et Lusby W. R. (1992) Unusual Tetraene Sterols in Some Phytoplankton. *Lipids* **27**, 154-156.
- Patterson G. W. & Van Valkenburg S. D. (1990) Sterol of *Dictyocha fibula* (Chrysophyceae) and *Olisthodiscus luteus* (Raphidophyceae). *Journal of Phycology* **26**, 484-489.
- Peakman T. M. & Maxwell J. R. (1988a) Early Diagenetic Pathways of Steroid Alkenes. *Organic Geochemistry* **13**, 583-592.
- Peakman T. M., Ten Haven H. L., Rechka J. R., De Leeuw J. W. et Maxwell J. R. (1989) Occurrence of (20R)- and (20S)- $\Delta^{8(14)}$ and Δ^{14} 5 α (H)-sterenes and the origin of 5 α (H),14 β (H),17 β (H)-steranes in an immature sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **53**, 2001-2009.
- Peakman T. M., Ellis K. et Maxwell J. R. (1988) Acid-catalysed rearrangements of steroid alkenes. Part 2. A reinvestigation of the backbone rearrangement of cholest-5-ene. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1* , 1071-1075.
- Peakman T. M., Jervoise A., Wolff G. A. et Maxwell J. R. *Biological markers in sediments and petroleum*. Ed. Moldowan, J. M., Albrecht, P. & Philp, R. P. (1992). Chap. 4: Acid-catalyzed rearrangements of steroid alkenes. Part 4. An initial reinvestigation of the backbone rearrangement of 4-methylcholest-4-ene. 58-74.
- Peakman T. M. & Maxwell J. R. (1988b) Acid-catalysed rearrangements of steroid alkenes. Part 1. Rearrangement of 5 α -cholest-7-ene. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1* , 1065-1070.
- Peduzzi R., Demarta A. et Tonolla M. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). The meromictic Lake Cadagno: an overview. 1-4.
- Peters K. E. & Moldowan J. M. *The Biomarker Guide. Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments*. Peters, K. E. and Moldowan, J. M. (1993).
- Philp R. P. *Methods in Geochemistry and Geophysics. Fossil Fuel Biomarkers. Applications and Spectra*. Elsevier (1985).
- Piretti M. V., Pagliuca G., Boni L., Pistocchi R., Diamante M. et Gazzotti T. (1997) Investigation of 4-methyl sterols from cultured dinoflagellate algal strains. *Journal of Phycology* **33**, 61-67.
- Putschew A., Scholz-Böttcher B. M. et Rullkötter J. *Geochemical transformations of sedimentary sulfur*. Ed. Vairavamurthy, M. A. & Schoonen, M. A. A. (1995). Chap. 4: Organic geochemistry of sulfur-rich surface sediments of meromictic Lake Cadagno, Swiss Alps. 59-79.
- Putschew A., Scholz-Böttcher B. M. et Rullkötter J. (1996) Early diagenesis of organic matter and related sulphur incorporation in surface sediments of meromictic Lake Cadagno in the Swiss Alps. *Organic Geochemistry* **25**, 379-390.

Rechka J. A., Cox H. C., Peakman T. M., De Leeuw J. W. et Maxwell J. R. *Biological markers in sediments and petroleum*. Ed. Moldowan, J. M., Albrecht, P. & Philp, R. P., Prentice Hall (1992). Chap. 3: A reinvestigation of aspects of the early diagenetic pathways of 4-methylsterenes based on molecular mechanics calculations and the acid catalyzed isomerization of 4-methylcholest-4-ene. 42-57.

Requejo A. G. *Biological Markers in Sediments and Petroleum*. Ed. Moldowan, J. M., Albrecht, P. & Philp, R. P., Prentice-Hall (1992). Chap. 12: Quantitative analysis of triterpane and sterane biomarkers: Methodology and applications in molecular maturity studies. 223-240.

Richnow H. H., Jenisch A. et Michaelis W. (1993) The chemical structure of macromolecular fractions of a sulfur-rich oil. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 2767-2780.

Rieley G., Collier R. J., Jones D. M. et Eglinton G. (1991) The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K. - I. Source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. *Organic Geochemistry* **17**, 901-912.

Rieley G., Raven A. M., Lawson A., Evershed R. P., Parkes R. J. et Maxwell J. R. (1998) Laboratory studies on sedimentary lipid preservation: different preservation potentials inferred for leaf and algal lipids. *Ancient Biomolecules* **2**, 177-183.

Riolo J., Corbet B., Albrecht P., Tissier M. J., Boussuge C. et Saliot A. *Géochimie organique des sédiments marins et profonds. Orgon IV. Golfe d'Aden, Mer d'Oman*. (1978). Hydrocarbures et acides des sédiments et des eaux interstitielles. 483-501.

Robinson N., Cranwell P. A., Eglinton G. et Jaworski G. H. M. (1987) Lipids of Four Species of Fresh-Water Dinoflagellates. *Phytochemistry* **26**, 411-421.

Rohmer M. (1993) The biosynthesis of triterpenoids of the hopane series in the eubacteria: a mine of new enzyme reactions. *Pure and Applied Chemistry* **65**, 1293-1298.

Rontani J. F. & Volkman J. K. (2003) Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Organic Geochemistry* **34**, 1-35.

Salt T. A., Xu S. H., Patterson G. W. et Adler J. H. (1991) Diversity of Sterol Biosynthetic Capacity in the Caryophyllidae. *Lipids* **26**, 604-613.

Schaeffer P., Reiss C. et Albrecht P. (1995) Geochemical study of macromolecular organic matter from sulfur-rich sediments of evaporitic origin (messinian of sicily) by chemical degradations. *Organic Geochemistry* **23**, 567-581.

Schanz F. & Stalder S. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Phytoplankton summer dynamics and sedimentation in the thermally stratified Lake Cadagno. 71-76.

Schneckenburger P., Adam P. et Albrecht P. (1998) Thioketones as key intermediates in the reduction of ketones to thiols by HS⁻ in natural environments. *Tetrahedron Letters* **39**, 447-450.

Schouten S., Bowman J. P., Rijpstra W. I. C. et Sinninghe Damsté J. (2000a) Sterols in a psychrophilic methanotroph, *Methylosphaera hansonii*. *FEMS Microbiol.Lett.* **186**, 193-195.

Schouten S., De Graaf W., Sinninghe Damsté J., Vandriel G. B. et De Leeuw J. W. (1994) Laboratory simulation of natural sulphurization. 2.Reaction of multi-functionalized lipids with inorganic polysulphides at low temperatures. *Organic Geochemistry* **22**, 825-834.

- Schouten S., Hoefs M. J. L. et Sinninghe Damsté J. (2000b) A molecular and stable carbon isotopic study of lipids in late Quaternary sediments from the Arabian Sea. *Organic Geochemistry* **31**, 509-521.
- Schouten S., Pavlovic D., Sinninghe Damsté J. et De Leeuw J. W. (1993a) Nickel boride: an improved desulphurizing agent for sulphur-rich geomacromolecules in polar and asphaltene fractions. *Organic Geochemistry* **20**, 901-909.
- Schouten S., Van Driel G. B., Sinninghe Damsté J. et De Leeuw J. W. (1993b) Natural sulphurization of ketones and aldehydes: A key reaction in the formation of organic sulphur compounds. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 5111-5116.
- Schüpfer P. Y. (2000) Diagenèse des hydrocarbures stéroïdiques insaturés. Etude par simulation au laboratoire Thèse, Université de Genève.
- Schüpfer P. Y. & Gülaçar F. O. (2000) Relative stabilities of cholestadienes calculated by molecular mechanics and semi-empirical methods: application to the acid-catalyzed rearrangement reactions of cholesta-3,5-diene. *Organic Geochemistry* **31**, 1589-1596.
- Sieskind O., Joly G. et Albrecht P. (1979) Simulation of the geochemical transformation of sterols: superacid effect of clay minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **43**, 1675-1679.
- Simoneit B. R. T. (2002) Molecular indicators (biomarkers) of past life. *Anatomical Record* **268**, 186-195.
- Tissot B. P. & Welte D. H. *Petroleum Formation and Occurrence*. Springer-Verlag Second Edition (1984).
- Tonolla M., Demarta A. et Peduzzi R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). The chemistry of Lake Cadagno. 11-17.
- Tonolla M., Peduzzi S., Hahn D. et Peduzzi R. (2003) Spatio-temporal distribution of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 89-98.
- Treibs A. (1934) Chlorophyll-und Hämin-derivate in bituminösen Gesteine, Erdölen, Erdwachsen und Asphalten. *Liebigs Ann.Chemie* **510**, 42-62.
- Venkatesan M. I. & Santiago C. A. (1989) Sterols in ocean sediments: novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinnipedsm, penguins and humans. *Marine Biology* **102**, 431-437.
- Volkman J. K. (1986) A Review of Sterol Markers for Marine and Terrigenous Organic- Matter. *Organic Geochemistry* **9**, 83-99.
- Volkman J. K. (2003) Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 495-506.
- Volkman J. K., Barrett S. M. et Blackburn S. I. (1999) Eustigmatophyte microalgae are potential sources of C₂₉ sterols, C₂₂-C₂₈ n-alcohols and C₂₈-C₃₂ n-alkyl diols in freshwater environments. *Organic Geochemistry* **30**, 307-318.

- Volkman J. K., Barrett S. M., Dunstan G. A. et Jeffrey S. W. (1992) C₃₀-C₃₂ Alkyl Diols and Unsaturated Alcohols in Microalgae of the Class Eustigmatophyceae. *Organic Geochemistry* **18**, 131-138.
- Volkman J. K., Kearney P. et Jeffrey S. W. (1990) A New Source of 4-Methyl Sterols and 5 α (H)-Stanols in Sediments - Prymnesiophyte Microalgae of the Genus Pavlova. *Organic Geochemistry* **15**, 489-497.
- Volkman J. K., Barrett S. M., Blackburn S. I., Mansour M. P., Sikes E. L. et Gelin F. (1998) Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Organic Geochemistry* **29**, 1163-1179.
- Volkman J. K., Barrett S. M., Dunstan G. A. et Jeffrey S. W. (1993) Geochemical significance of the occurrence of dinosterol and other 4-methyl sterols in a marine diatom. *Organic Geochemistry* **20**, 7-15.
- Wakeham S. G., Gagosian R. B., Farrington J. W. et Canuel E. A. (1984) Sterenes in suspended particulate matter in the eastern tropical North Pacific. *Nature* **308**, 840-843.
- Wang Z. D., Fingas M. et Li K. (1994) Fractionation of a light crude oil and identification and quantitation of aliphatic, aromatic, and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS. Part 2. *Journal of Chromatographic Science* **32**, 367-382.
- Wiggli M., Schenk A., Horath T., Stettler R., Lüthy L., Grüter D., Buchs U., Smallcombe A. et Bachofen R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Chemical, physiological and molecular-biological investigations in the microbial mats West of Cadagno in the Piora Valley. 127-136.
- Withers N. *The Biology of dinoflagellates*. Ed. Taylor, F. J. R. (1987). Dinoflagellate sterols. 839-845.
- Wünsche L. (1987) Géochimie des lipides neutres et diagénèse précoce des stérols dans des sédiments du bassin lémanique. Thèse, Université de Genève.
- Wünsche L., Mendoza Y. A. et Gülaçar F. O. (1988) Lipid geochemistry of a post-glacial lacustrine sediment. *Organic Geochemistry* **13**, 1131-1143.
- Xu S., Norton R. A., Crumley F. G. et Nes W. D. (1988) Comparison of the chromatographic properties of sterols, select additional steroids and triterpenoids: gravity-flow column liquid chromatography, thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **452**, 377-398.
- Yeagle P. L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim.Biophys.Acta.* **822**, 267-287.
- Zaretskii Z. V. *Mass Spectrometry of steroids*. John Wiley & Sons (1976).

Deuxième partie:

Partie expérimentale

1 Introduction

Dans cette seconde partie sont exposés les modes opératoires employés du carottage à l'analyse quantitative des biomarqueurs et du carbone organique total des sédiments. Certaines procédures expérimentales ont fait l'objet d'une optimisation. Les résultats des tests de ces nouvelles procédures sont également détaillés dans cette deuxième partie.

2 Carottage

Une carotte de 70 cm de longueur a été prélevée le 11 juillet 2000 en zone anoxique à une profondeur de 21 m 40 au moyen d'un carottier par gravité. Le prélèvement du sédiment de surface a été effectué au même endroit sur une épaisseur d'environ 25 cm à l'aide d'une benne "Ekman". Le 17 juillet 2002, un second carottage a été réalisé à l'aide d'un carottier pneumatique de type *Jenkins* qui a permis le prélèvement d'une carotte de 270 cm. Tous les échantillons récoltés ont été congelés sur place puis conservés à une température de -30 °C jusqu'à l'analyse.

3 Développement d'une procédure d'extraction et de fractionnement d'un sédiment lacustre récent

3.1 Vue d'ensemble de la procédure d'extraction et de fractionnement adoptée

La procédure de séparation est schématisée succinctement sur la Figure 2.1. Les étapes sont décrites en détail ci-dessous.

3.2 Lyophilisation et broyage du sédiment

Le sédiment congelé est lyophilisé jusqu'à poids constant. Le sédiment sec obtenu est broyé manuellement dans un mortier jusqu'à obtention d'une fine poudre homogène.

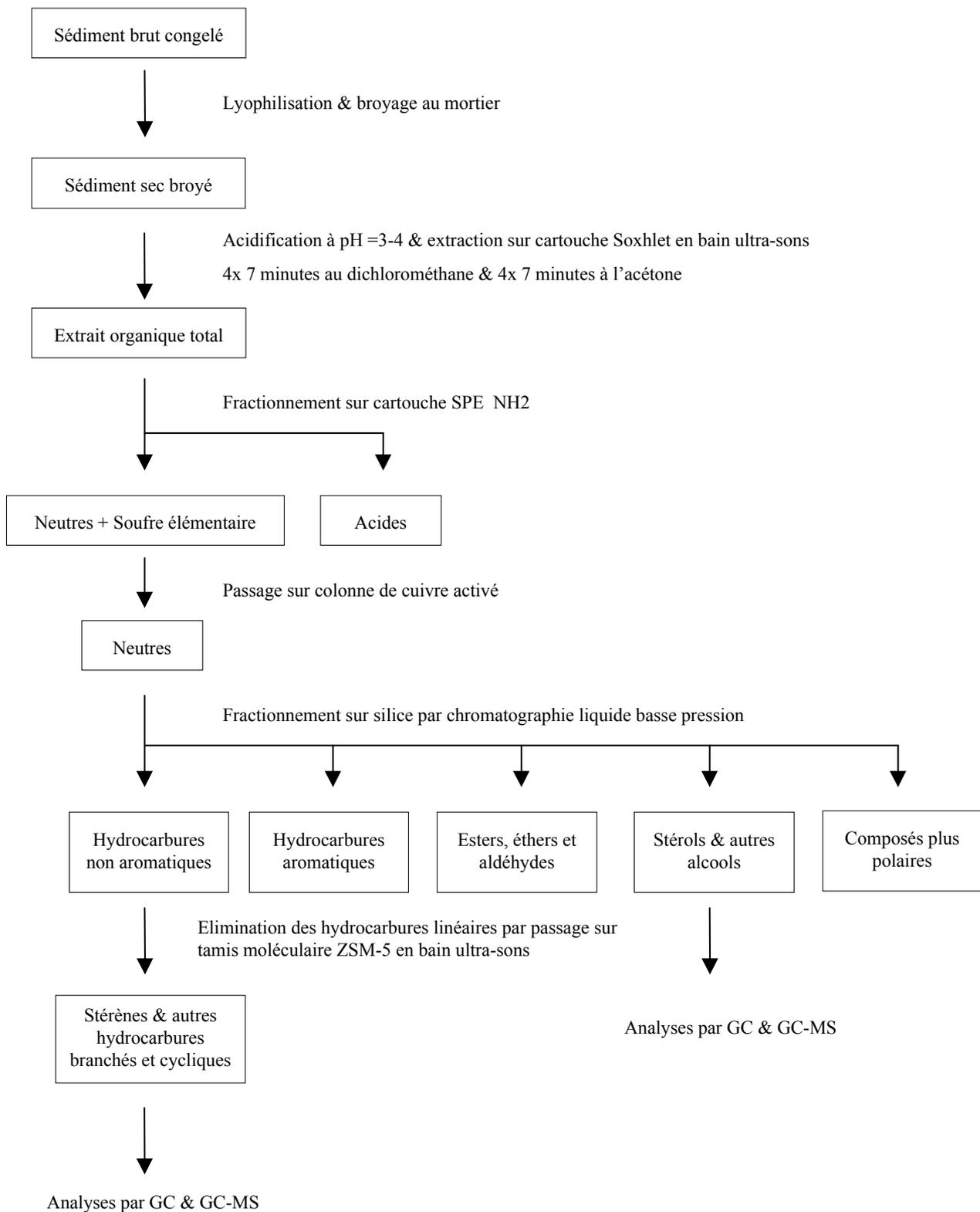


Figure 2.1: Procédure d'extraction et de fractionnement appliquée aux sédiments récents du lac de Cadagno

3.3 Extraction

3.3.1 *Evaluation de la technique d'extraction par micro-ondes*

3.3.1.1 Données bibliographiques

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique innovante utilisée pour un nombre grandissant de composés naturels (Kaufmann et Christen, 2002). Ce procédé d'extraction a l'avantage de consommer peu de solvant (10 à 30 ml) et de nécessiter une durée d'extraction faible. De plus, il conduit à une meilleure reproductibilité que les autres méthodes d'extraction et permet d'effectuer plusieurs extractions de manière simultanée. Cette technique a donc été testée en vue de l'extraction de nos échantillons de sédiments.

Pour la majorité des extractions assistées par micro-ondes, la durée d'extraction varie de 3 à 10 minutes (Letellier et Budzinski, 1999). Une température d'extraction élevée conduit généralement à des rendements élevés - pour des composés extraits thermorésistants. L'utilisation d'instruments permettant une irradiation de l'échantillon dans un récipient étanche permet d'atteindre des températures plus élevées que le point d'ébullition des solvants utilisés. Toutefois, au-dessus d'une certaine température, le rendement n'augmente plus comme le montre l'exemple de l'extraction des PAHs par un mélange hexane:acétone 1:1 au-dessus de 115 °C (Lopez-Avila *et al.*, 1994). Une puissance élevée appliquée permet de diminuer sensiblement la durée de l'extraction. Néanmoins pour un échantillon irradié en réceptacle étanche, il faut veiller à ne pas dépasser les limites de pression préconisées par le constructeur.

En ce qui concerne la proportion solvant/analyte, il est recommandé de ne pas dépasser des valeurs de 30-34% (poids/volume) pour un rendement optimal (Sparr Eskilsson et Bjorklund, 2000). Le solvant est choisi en fonction de plusieurs critères. Il doit permettre une bonne solubilisation de l'analyte. Il doit également être capable d'absorber les micro-ondes. La capacité d'absorption des micro-ondes du solvant dépend de sa constante diélectrique. La capacité d'un solvant à restituer à son entourage sous forme de chaleur les micro-ondes absorbées est reliée au facteur de dissipation. Le Tableau 2.1 donne quelques constantes physiques pour les solvants utilisés couramment pour des extractions par micro-ondes. Il peut y être observé que le méthanol possède un facteur de dissipation plus important que celui de l'eau. Pour une même irradiation l'eau chauffera donc moins le milieu que le méthanol. Par ailleurs, les solvants cités dans le Tableau 2.1 ont des points d'ébullition supérieurs à 60 °C. Ainsi lorsque l'extraction est réalisée

dans des récipients résistant à la pression, des températures d'extraction élevées peuvent être atteintes garantant d'une durée plus courte ou d'une meilleure efficacité d'extraction.

Solvant d'ébullition	Constante	Moment	Facteur de	Point d'ébullition	Point
	diélectrique ^a	dipolaire ^b	dissipation ($\times 10^{-4}$)	sous 101.3 kPa (°C)	sous 1207 kPa (°C)
Acétone	20.7			56	164
Acétonitrile	37.5			82	194
Ethanol	24.3	1.96	2500	78	164
Hexane	1.89			69	166 ^c
Chloroforme	4.81			62	157 ^c
Dichlorométhane	9.08			40	121 ^c
Méthanol	32.6	2.87	6400	65	151
2-Propanol	19.9	1.66	6700	82	145
Eau	78.3	2.3	1570	100	179 ^c

^a déterminée à 20 °C; ^b déterminé à 25 °C; ^c estimé par la loi de Clausius-Clapeyron.

Tableau 2.1 Constantes physiques et facteurs de dissipation de quelques solvants courants (Sparr Eskilsson et Bjorklund, 2000; Weast *et al.*, 1988).

3.3.1.2 Partie expérimentale

3.3.1.2.1 Appareillage

Les extractions micro-ondes décrites ci-après ont été effectuées sur l'instrument ETHOS SEL contrôlé par le terminal 800 muni du logiciel Easy Wave version 3.54. Cet appareil fabriqué par MLS (Mikrowellen LaborSysteme, Allemagne) est équipé de 6 récipients en téflon de 270 ml soumis à une agitation et munis de soupapes résistant à une pression de 10 Bars. Les récipients contenant les échantillons sont placés sur un plateau tournant pendant le chauffage. Une sonde de température permet d'adapter la puissance du magnétron en fonction du programme de température choisi. L'évolution de la puissance peut être également suivie pendant la phase de chauffage. Ceci permet notamment de connaître l'énergie d'irradiation que reçoit l'échantillon à tout instant. Un capteur permet de couper automatiquement le chauffage en cas de fuite de gaz éventuelle dans le four.

3.3.1.2.2 Choix du mélange de solvants

Des tests préliminaires ont été effectués pour choisir un mélange de solvants adapté à l'extraction des stérènes et stéroïdes d'un sédiment. Ces deux types d'analytes appartenant respectivement à la famille des hydrocarbures et des alcools, possèdent des polarités très différentes. L'utilisation

d'un mélange de solvants de polarité sensiblement différente plutôt qu'un ou différents solvants purs utilisés successivement apparaît dès lors plus adaptée pour l'extraction des analytes.

Il est également important que la puissance d'irradiation développée par l'instrument pendant la phase de chauffage soit la plus élevée possible afin de diminuer la durée de l'extraction. Cependant, cette puissance est sensiblement abaissée une fois la température d'extraction atteinte. En effet l'utilisation de récipients en téflon résistant à des pressions élevées réduit considérablement les échanges de chaleur avec l'extérieur. Une fois à la bonne température, ces récipients refroidissent très lentement. L'irradiation par micro-ondes n'est alors pratiquement plus nécessaire pour maintenir la température constante d'extraction. Ceci pose le problème de l'efficacité des micro-ondes alors presque exclusivement sollicitées pendant la phase permettant de passer de la température ambiante à la température d'extraction. Or cette phase dure généralement moins de 5% de la totalité du temps d'extraction. Pour parer ce problème, il faudra éviter d'utiliser des solvants possédant une constante de dissipation très élevée ou les utiliser en proportions réduites. En effet ces solvants, tels que le méthanol chauffent très rapidement le milieu à partir d'une irradiation très courte. L'irradiation pendant la phase d'extraction à température constante devient alors très faible.

La Figure 2.2 montre les variations de la puissance moyenne d'irradiation pendant la phase d'extraction isotherme à 100 °C en utilisant 100 ml de différents solvants. Le programme de température consiste en une phase de chauffe de la température ambiante jusqu'à 100 °C en 3 minutes puis une isotherme de 10 minutes. Il faut noter que l'utilisation d'hexane pur ne permet pas de chauffer le milieu et de suivre le programme de température enregistré. Ce solvant est en effet transparent aux micro-ondes. L'utilisation de bécher, de cartouche Soxhlet et d'agitateur magnétique en plus d'hexane ne conduit pas à une élévation de température significative.

L'utilisation de méthanol ajouté à l'hexane dans des proportions 10:90 permet le chauffage des échantillons conformément au programme de température avec une valeur d'irradiation moyenne de 104 W. La diminution de la proportion de méthanol permet d'atteindre une valeur de 206 W comme prévu par la diminution de la proportion d'un solvant à facteur de dissipation élevé. Le mélange eau:hexane 10:90 conduit effectivement à une valeur d'irradiation plus basse (94 W) que le mélange méthanol:hexane 10:90 conformément à une plus faible valeur du facteur de dissipation.

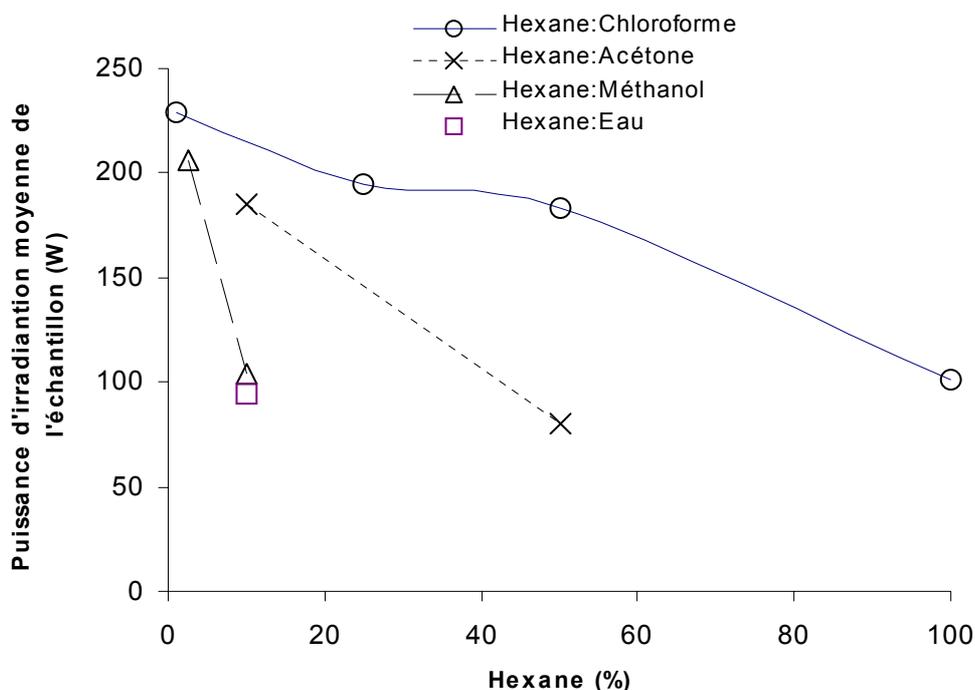


Figure 2.2: Variation de la puissance moyenne d'irradiation de l'échantillon par micro-ondes pendant la phase d'extraction isotherme à 100 °C en utilisant 100 ml d'un mélange binaire de solvants.

L'usage de mélanges acétone:hexane permet d'atteindre des valeurs d'irradiation moyennes proches des mélanges méthanol:hexane mais en utilisant des quantités plus grandes d'acétone. Des valeurs d'irradiation encore plus élevées sont atteintes en utilisant le chloroforme à la place du méthanol. Pour un mélange chloroforme:hexane 50:50, l'irradiation moyenne atteint 183 W. L'irradiation moyenne conséquente pendant la phase d'extraction à température constante ainsi que la proportion significative de deux solvants de polarité différente apparaissent intéressantes pour l'extraction des stérènes et stérols. L'ajout d'une faible proportion d'un solvant possédant un groupe hydroxy (*p. ex.* méthanol) mérite également d'être testé. En effet les liaisons hydrogène établies entre le solvant possédant une fonction hydroxy et les stérols pourraient permettre d'augmenter l'efficacité d'extraction de ces derniers analytes. Des tests complémentaires ont donc été effectués avec un mélange ternaire de solvants.

La Figure 2.3 montre que l'usage d'un mélange hexane:chloroforme:méthanol avec 10% de méthanol et un pourcentage de chloroforme variant de 0 à 50% donne des valeurs d'irradiation moyennes de 105 W. Lorsque le pourcentage de chloroforme augmente au-delà de 50%, l'irradiation diminue jusqu'à 75 W. L'usage d'un mélange hexane:chloroforme:méthanol 30:50:20 donne une valeur similaire d'irradiation comme prévu par l'augmentation de la proportion du méthanol, solvant à facteur de dissipation élevé. De la même façon, lorsque le

pourcentage de méthanol passe de 10 à 30% dans le chloroforme, l'irradiation chute de 75 à 58 W. Ainsi, d'après ces résultats, le mélange de solvants apparaissant le mieux adapté à l'extraction des stérols et stérènes est l'hexane:chloroforme:méthanol avec 10% de méthanol garantissant une irradiation moyenne supérieure à 100 W. De plus cette proportion significative de méthanol permet une bonne solubilisation des stérols. La proportion chloroforme:hexane est choisie à 40:50 afin d'assurer également la bonne solubilisation des stérènes tout en conservant la miscibilité du mélange. Le choix du méthanol comme solvant polaire apparaît également intéressant d'un autre point de vue. Utilisé comme solvant, il sera présent en quantités largement supérieures aux stérols. Ainsi il est possible que ce solvant puisse se substituer aux stérols fortement adsorbés sur les sites polaires de la matrice de l'échantillon. Ceci pourrait contribuer dans ce cas à une augmentation significative du rendement d'extraction.

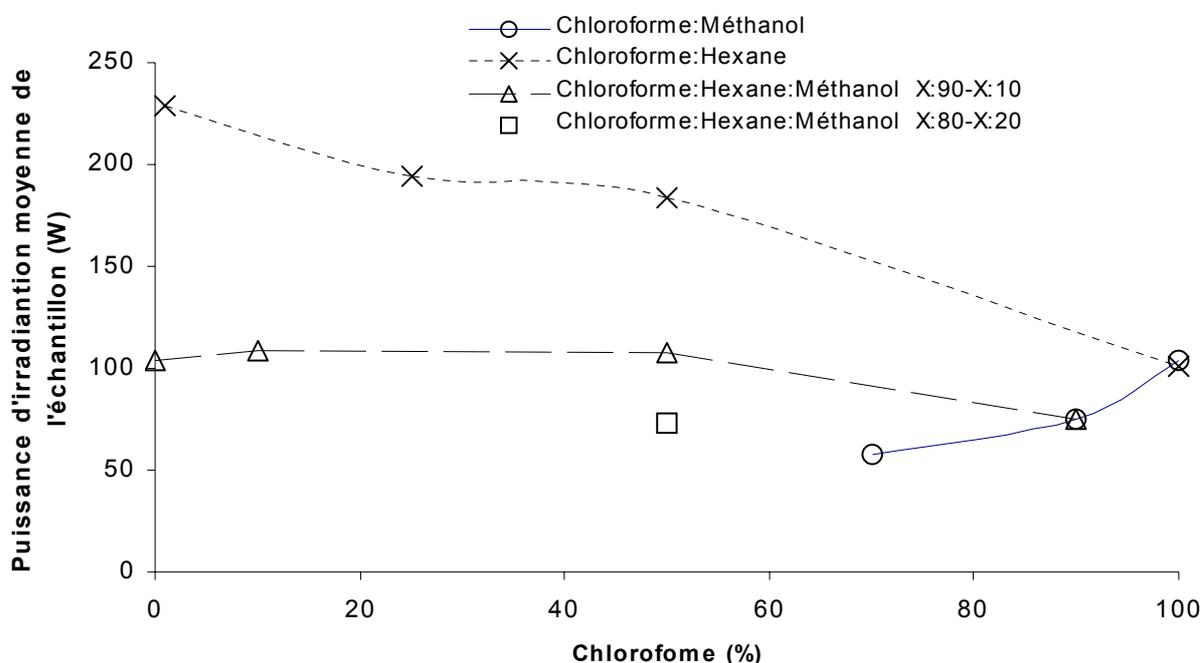


Figure 2.3: Variation de la puissance moyenne d'irradiation de l'échantillon par micro-ondes pendant la phase d'extraction isotherme à 100 °C en utilisant 100 ml d'un mélange ternaire de solvants.

Un second mélange ternaire de solvants a également été testé. Le méthanol a été remplacé par l'eau. Ce solvant conduit à une irradiation équivalente au méthanol comme le montre la Figure 2.2. En plus de sa faculté de créer des liaisons hydrogène, l'eau est un solvant nettement plus polaire que le méthanol. Sa proportion a été réduite à 1% dans ce mélange (contre 10% de méthanol pour le mélange précédent). L'hexane a été remplacé par l'acétone, solvant largement

utilisé en extraction micro-ondes (Sparr Eskilsson et Bjorklund, 2000). La proportion du chloroforme est restée du même ordre de grandeur que pour le mélange de solvant précédent, passant de 40 à 49%.

3.3.1.2.3 Extraction menée sur un échantillon synthétique

3.3.1.2.3.1 Mode opératoire

L'efficacité de l'extraction par micro-ondes a été testée avec 10 grammes de silice 230-400 mesh ajoutés de 50 µl d'un mélange de standards stéroïdiens. Ce mélange est composé de 5 α -androstane (Sigma), de 5 α -androstan-3 β -ol (Sigma), de cholestérol (Sigma), d'ergostérol (Fluka) et de stigmastérol (Fluka) à 4 µg/µl chacun dans le chloroforme. L'échantillon synthétique est placé dans une cartouche Soxhlet puis tous deux introduits dans le récipient en téflon étanche. 150 ml du mélange de solvants hexane:chloroforme:méthanol 50:40:10 sont ajoutés dans et autour de la cartouche. Le programme de température appliqué consiste en un chauffage de la température ambiante jusqu'à 100 °C en 3 minutes puis une isotherme à cette température pendant 10 minutes. Après un refroidissement jusque 35 °C environ, le solvant est récupéré. La cartouche et le récipient sont rincés avec 75 ml de solvant qui sont rassemblés avec l'extrait précédent. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite puis l'extrait est redissous dans un volume précis de solvant avant dérivatisation et ajout de standards externes.

L'analyse est menée sur le chromatographe en phase gazeuse Carlo Erba HP 5990 series équipé d'une colonne DB-5 (J&W, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) avec une pression de tête d'hélium de 140 kPa. Le programme de température est de 150 °C pendant une minute puis un gradient de 20 °C par minute jusque 300 °C, température maintenue pendant 10 minutes. L'injecteur et le détecteur (FID; détecteur à ionisation de flamme) sont fixés à une température de 320 °C. La courbe de calibration est réalisée en utilisant les standards externes que sont le 5 α -androstan-3-one (Stérols) et le 5 α -cholestan-3 β -ol (Sigma). Ces derniers sont mélangés à des quantités variables d'un mélange de 5 α -androstane, de 5 α -androstan-3 β -ol, de cholestérol, d'ergostérol et de stigmastérol (domaine de concentrations 0.025-0.75 µg/µl). Les standards obtenus sont ensuite dérivatisés à l'aide d'un volume égal de BSTFA + 1% de TCS (N,O-Bis(triméthylsilyl)-trifluoracetamide + 1% de Triméthylchlorosilane, Fluka) dans une ampoule scellée pendant une heure à 80 °C. Les courbes de calibration, basées sur les surfaces des pics, sont représentées sur la Figure 2.4 indiquant dans tous les cas des coefficients de corrélation au carré supérieurs à 0.99.

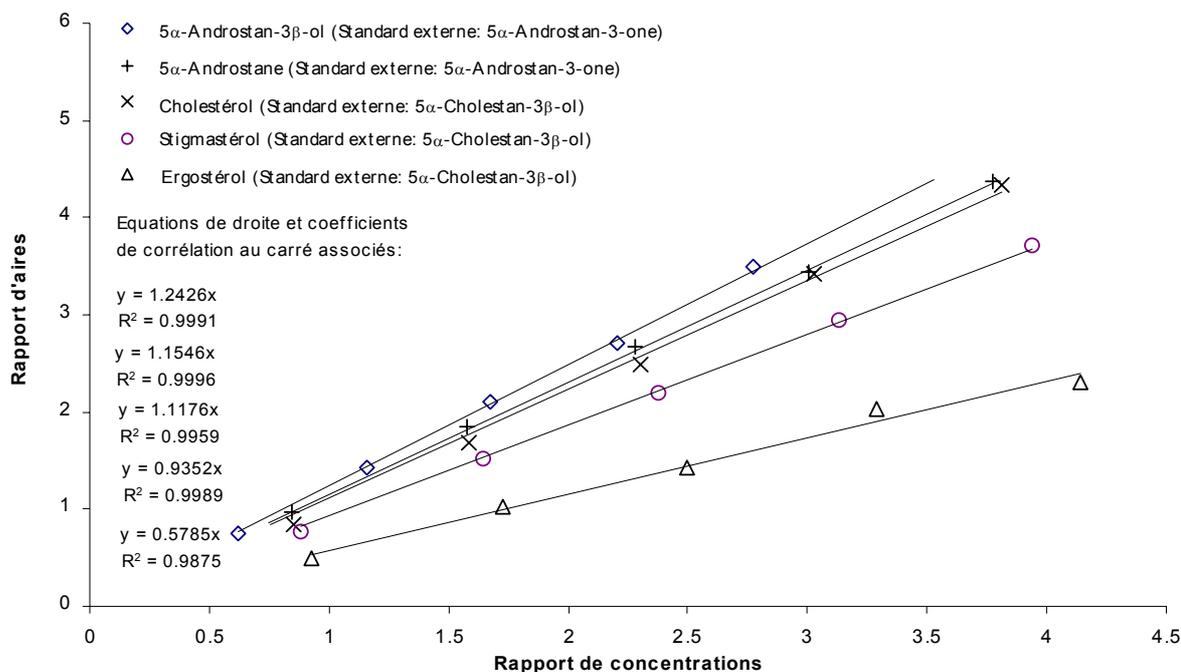


Figure 2.4: Droites de calibration du 5 α -androstane, du 5 α -androstan-3 β -ol, du cholestérol, de l'ergostérol et du stigmasterol en utilisant le 5 α -androstan-3-one et le 5 α -cholestan-3 β -ol comme standards externes.

3.3.1.2.3.2 Résultats

Avant toute interprétation, il faut préciser que bien que l'extraction ne dure que 13 minutes, le refroidissement dans le four à micro-ondes ventilé dure 1 heure et 35 minutes pour atteindre la température de 35 °C. L'usage de glace pour accélérer le refroidissement permet de diminuer au mieux cette période à 35-40 minutes. En effet les parois des récipients en téflon d'une épaisseur de 10 mm sont très isolantes.

Les rendements d'extraction de l'échantillon synthétique de silice pour différents stéroïdes sont rassemblés sur la Figure 2.5. Le rendement d'extraction global est compris entre 73 et 90% après la seconde extraction et 74 et 92% après la troisième extraction. La dernière extraction apporte au plus un gain de 2 à 3% sur le rendement et s'avère donc peu productive. Le rendement d'extraction peut être considéré comme satisfaisant pour le 5 α -androstane (92%) après trois extractions. Cependant en ce qui concerne le 5 α -androstan-3 β -ol et le stigmasterol, ce rendement égal à 87 et 85% respectivement fait apparaître jusqu'à 15 % de pertes. Le cholestérol et l'ergostérol ont des rendements significativement plus bas de 75 et 76%. Le nombre d'insaturations semble conduire à une diminution du rendement. Néanmoins cette hypothèse n'est pas soutenue par le stigmasterol ($\Delta^{5,22}$) qui possède deux insaturations et conduit à un

rendement plus élevé que le cholestérol (Δ^5) qui n'en possède qu'une. Par ailleurs, la Figure 2.5 montre qu'il n'y a pas de corrélation notable entre taille de la molécule et rendement.

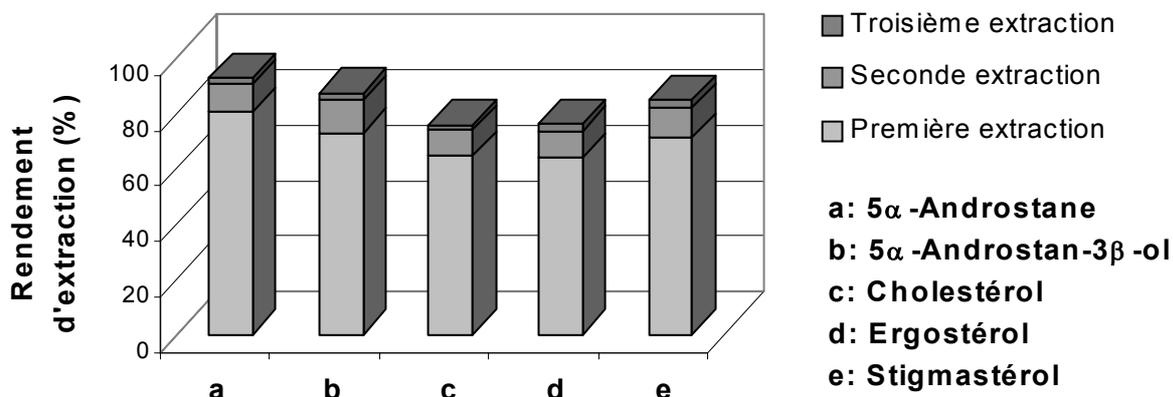


Figure 2.5: Evolution du rendement d'extraction par micro-ondes d'un échantillon synthétique de silice (230-400 mesh) contenant des standards stéroïdiens après une, deux et trois extractions à l'aide d'un mélange d'hexane:chloroforme:méthanol 40:50:10 à 100 °C pendant 10 minutes.

La Figure 2.6 permet de constater une augmentation significative du rendement d'extraction pour le 5 α -androstan-3 β -ol, le cholestérol et le stigmastérol atteignant des valeurs de 97, 92 et 96% respectivement lorsque le mélange d'hexane:chloroforme:méthanol 40:50:10 est remplacé par le mélange chloroforme:acétone:eau 49:50:1. Par contre le 5 α -androstane et l'ergostérol voient leur rendement baisser de 89 à 87% et de 73 à 61 % respectivement.

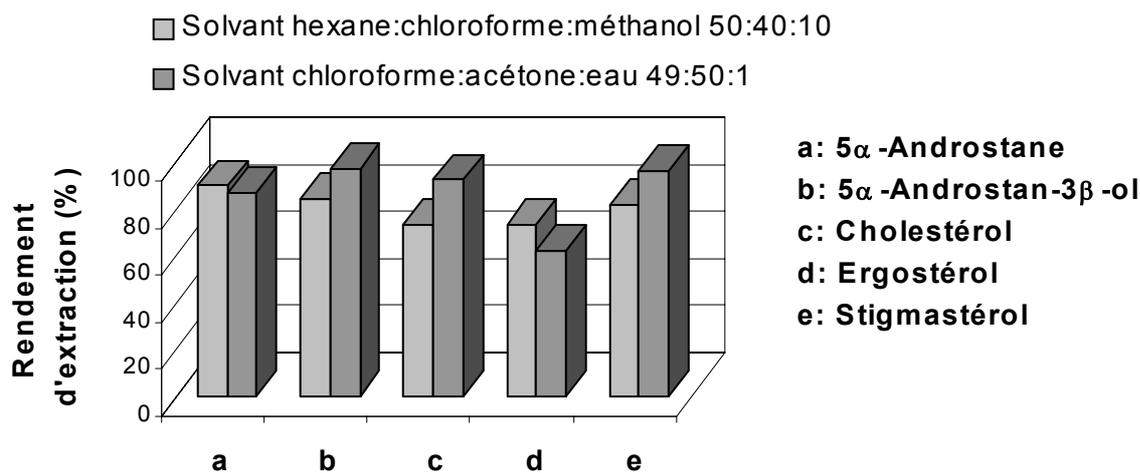


Figure 2.6: Comparaison du rendement d'extraction par micro-ondes d'un échantillon synthétique de silice (230-400 mesh) contenant des standards stéroïdiens après deux extractions à l'aide d'un mélange d'hexane:chloroforme:méthanol 40:50:10 et de chloroforme:acétone:eau 49:50:1 à 100 °C pendant 10 minutes.

La diminution du rendement d'extraction du 5 α -androstane peut être expliquée par l'absence de solvant apolaire tel que l'hexane dans le second mélange de solvant testé. La meilleure interaction du mélange chloroforme:acétone:eau 49:50:1 avec les analytes peut être responsable de la hausse des rendements pour le 5 α -androstane-3 β -ol, le cholestérol et le stigmastérol. En effet, le groupe carbonyle de l'acétone peut être à l'origine d'interactions significatives avec les groupes hydroxyles et les doubles liaisons des stérols.

3.3.1.2.3.3 Conclusion

Les résultats obtenus montrent des rendements d'extraction particulièrement bas suivant la nature des stéroïdes. Les pertes atteignent en effet jusqu'à un tiers des quantités initiales de standards ajoutés avant extraction. De plus la durée totale d'une extraction, qui est de 50-55 minutes en moyenne, reste longue en raison du temps de refroidissement des solvants. Par ailleurs, si trois extractions sont effectuées dans les conditions décrites, l'échantillon se trouve soumis à une température de 100 °C durant 30 minutes. En présence d'une matrice minérale, et plus particulièrement des minéraux d'argile, les analytes à extraire pourraient subir des réactions secondaires significatives dans ces conditions. Par conséquent l'extraction assistée par les micro-ondes n'a pas été choisie en vue de l'extraction des sédiments. La procédure d'extraction classique par ultra-sons, à température ambiante et plus rapide, lui a été préférée.

3.3.2 ***Procédure choisie: Extraction par ultra-sons***

Déjà éprouvée pour l'extraction des lipides sédimentaires (Blum, 1999; Klink, 1994; Wünsche, 1987), cette technique d'extraction comporte l'avantage d'être effectuée à température ambiante. Le sédiment sec, pesé précisément (typiquement 10 g) est repris dans l'eau bidistillé (20 à 30 ml). Quelques gouttes de HCl 6N sont ajoutées afin d'atteindre un pH compris entre 3 et 4 et d'éliminer les carbonates présents. Le mélange est ensuite transféré dans une cartouche Soxhlet (48 x 145 mm) placée dans un bécher de 200 ml. Cette opération est réalisée en utilisant un minimum d'eau bidistillée. 150 ml d'acétone environ sont ajoutés dans la cartouche assurant ainsi le remplissage de celle-ci et du bécher à 75%. L'ensemble est placé dans un bain ultra-sons pendant une durée de 7 minutes. L'extrait recueilli autour de la cartouche est récupéré. Le solvant restant dans la cartouche est récupéré en tirant celle-ci sous un léger vide. Une tulipe de la même taille que la cartouche est utilisée à cet effet. L'extraction à l'aide de 150 ml d'acétone est renouvelée de cette façon trois fois et les extraits d'acétone sont rassemblés. L'extraction à l'aide de 150 ml de dichlorométhane est ensuite menée quatre fois dans les mêmes conditions et

les extraits de dichlorométhane sont rassemblés. Les standards internes sont alors ajoutés aux extraits d'acétone. Typiquement 50 et 200 µl de solutions de 5α-androstane (50.0 ng/µl) et de 5α-androstan-3β-ol (1.00 µg/µl) respectivement sont ajoutés pour 10 g de sédiment sec. Après évaporation des extraits d'acétone sous pression réduite, la phase aqueuse résiduelle est extraite 4 fois à l'aide de 150 ml de dichlorométhane environ. Dans certains cas une quantité supplémentaire de dichlorométhane est nécessaire pour casser l'émulsion. La totalité des extraits de dichlorométhane sont finalement rassemblés et évaporés à sec donnant l'extrait organique total (EOT).

3.4 Séparation des acides et des neutres

3.4.1 *Données bibliographiques*

La séparation des acides et des neutres peut être réalisée par chromatographie en phase liquide en utilisant la procédure bien connue de McCarthy et Duthie (1962). L'utilisation de cartouches jetables munies de phases stationnaires très diverses (cartouches SPE: Solid Phase Extraction) est venue simplifier la phase de préparation des échantillons (Giacometti *et al.*, 2002; Hennion, 1999). Dans le domaine de la géochimie, la séparation des acides et des neutres par SPE a déjà été proposée par Blum (1999) en utilisant des cartouches Amino de 1g .

3.4.2 *Partie expérimentale*

La procédure de Blum (1999) a été adaptée à des cartouches Amino 2 g (Isolute, 6 ml) pour permettre une séparation d'une quantité plus conséquente d'échantillon. La cartouche est alors conditionnée à l'aide de 50 ml de chloroforme:méthanol 80:20. Cette opération permet d'obtenir une phase stationnaire à l'aspect parfaitement homogène. L'extrait organique total est déposé à l'aide de 5 ml de chloroforme:méthanol 80:20. La cartouche est élué avec 5 ml de solvant supplémentaire. 20 ml de solvant sont enfin nécessaires pour éluer complètement les neutres. La fraction acide est ensuite élue à l'aide de 30 ml d'un mélange d'acide acétique:éther 96:4.

Le taux de récupération des stérols lors de cette séparation est de 99%. En effet, les proportions d'androstane-3β-ol (standard interne) et de sitostérol (sédimentaire) récupérés lors d'une élution subséquente de la cartouche (après élution avec les 30 premiers ml de chloroforme:méthanol 80:20) avec 25 ml de chloroforme:méthanol 60:40 et 25 ml de méthanol pur représentent 0.1%

et 1% respectivement des quantités totales. La capacité de la cartouche Amino 2 g a également été évaluée. L'acide oléique a été déposé sur la cartouche par quantités de 25 mg avant chaque rinçage. La chromatographie sur couche mince révèle que les fractions neutres récupérées ne contiennent pas d'acide oléique tant que sa quantité ne dépasse pas 100 mg soit 5% de la masse de la phase stationnaire.

3.5 Elimination du soufre élémentaire

3.5.1 *Données bibliographiques*

Le soufre élémentaire est souvent contenu dans les sédiments en quantités très supérieures par rapport aux biomarqueurs présents. S'il n'est pas éliminé de l'échantillon, il pourra gêner voire empêcher l'identification et la quantification des analytes apolaires ou de faible polarité. Les hydrocarbures stéroïdiens sont concernés par ce problème et rendent indispensable l'étape d'élimination préalable du soufre élémentaire avant analyse. Cette opération est réalisée en exposant l'extrait organique à du cuivre activé soit directement pendant l'extraction (Grice *et al.*, 1996; Grice *et al.*, 1998; Grossi *et al.*, 1998; Innes *et al.*, 1998) soit en éluant l'extrait à travers une colonne (Kenig *et al.*, 1995b; Leif et Simoneit, 2000; Simoneit *et al.*, 1996; Summons *et al.*, 2002). Une alternative consiste à mettre en présence le sédiment avec de l'hydroxyde de tétrabutyl ammonium (Kodba et Marsel, 1999).

3.5.2 *Partie expérimentale*

La procédure décrite par Wünsche (1987) a été testée en utilisant une colonne courte (1.5 cm x 12 cm) remplie de 50 g de poudre de cuivre (Fluka; purum, purité > 99%) et pouvant être tirée sous vide. La colonne est activée avec 15 ml de HCl 6 N puis rincée avec 100 ml d'eau bidistillée. 30 ml d'acétone et 30 ml de dichlorométhane sont successivement ajoutés pour éliminer l'eau résiduelle. La colonne a été testée avec 200 ml d'une solution de soufre à 0.25 mg/ml passés à un débit de 1 à 2 gouttes par seconde. La colonne a ensuite été rincée avec 25 ml de dichlorométhane. L'analyse par GC-MS de l'éluat, évaporé sous pression réduite et redissous dans 100 µl de chloroforme, n'a révélé aucune présence de soufre élémentaire par GC-MS.

La procédure a ensuite été testée avec l'extrait organique total (100 mg dilué dans 5 ml de chloroforme) provenant d'un sédiment de surface du lac de Cadagno. Lors des premiers essais, un bouchage de la colonne empêchait de poursuivre la procédure. Ce n'est qu'en diluant l'extrait

(100 mg dilué dans 60 ml de chloroforme) qu'il fût possible d'éluer totalement celui-ci à travers la colonne. L'analyse par GC-MS de l'extrait obtenu a confirmé l'efficacité du procédé pour l'élimination du soufre.

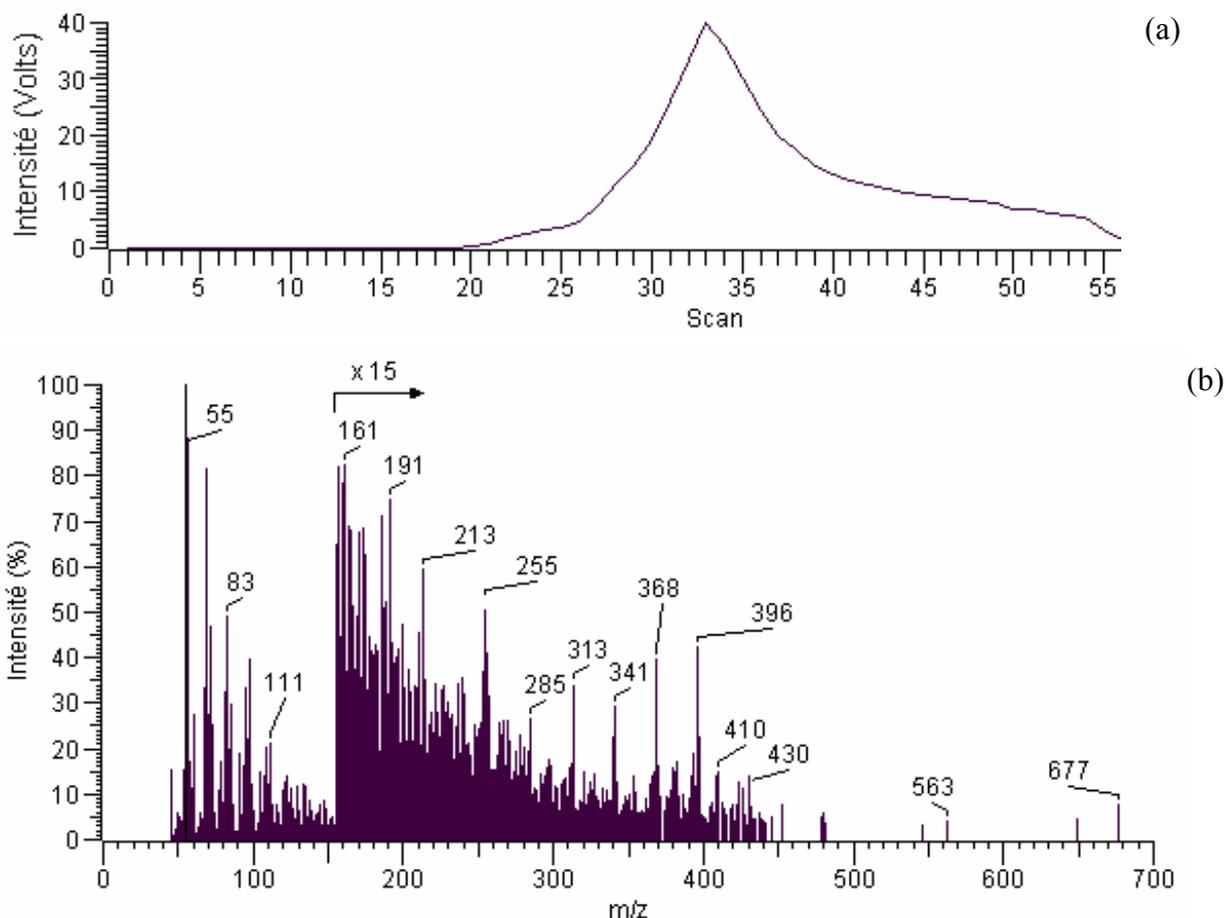


Figure 2.7: Courant ionique total (a) et spectre de masse par impact électronique moyenné (scans 30-37) (b) obtenus par introduction directe de la poudre de cuivre après passage de l'extrait organique total et rinçage avec du dichlorométhane (Instrument VG7070E; Energie d'ionisation : 70 eV; chauffage de l'échantillon 5 °C/s; Masses balayées: 45-800 amu; Vitesse de balayage: 2 s/scan; Interscan: 1 s).

Afin de vérifier si des lipides stéroïdiens n'ont pas été retenus sur le cuivre, ce dernier a été examiné par spectrométrie de masse en impact électronique par introduction directe (Figure 2.7). Le spectre de masse par impact électronique à partir de la poudre de cuivre vierge (Figure 2.8) provenant directement du flacon commercial (Fluka, purum) a également été obtenu. L'intensité du courant ionique obtenu pour ce dernier spectre est de 4% par rapport au spectre de la Figure 2.7. La comparaison des spectres et des courants ioniques montre que les ions observés dans le spectre de masse de la Figure 2.7 proviennent des composés retenus sur le cuivre lors du passage de l'EOT. La distinction de pics caractéristiques est rendue difficile par la superposition d'une multitude de spectres. Toutefois la Figure 2.7 montre que le soufre élémentaire (S_8 , m/z 256,

192, 160, 128, 64) apparaît accompagné d'une large proportion de composés organiques restés adsorbés sur le cuivre. En effet les pics régulièrement espacés de 14 amu à partir de 55 amu semblent indiquer la présence de composés linéaires. L'ion intense à m/z 191 pourrait être révélateur de triterpénoïdes pentacycliques. Enfin, les pics à m/z 255 et 213, caractéristiques de la perte de la chaîne latérale puis du cycle D des stérols, peuvent suggérer la présence de composés stéroïdiens.

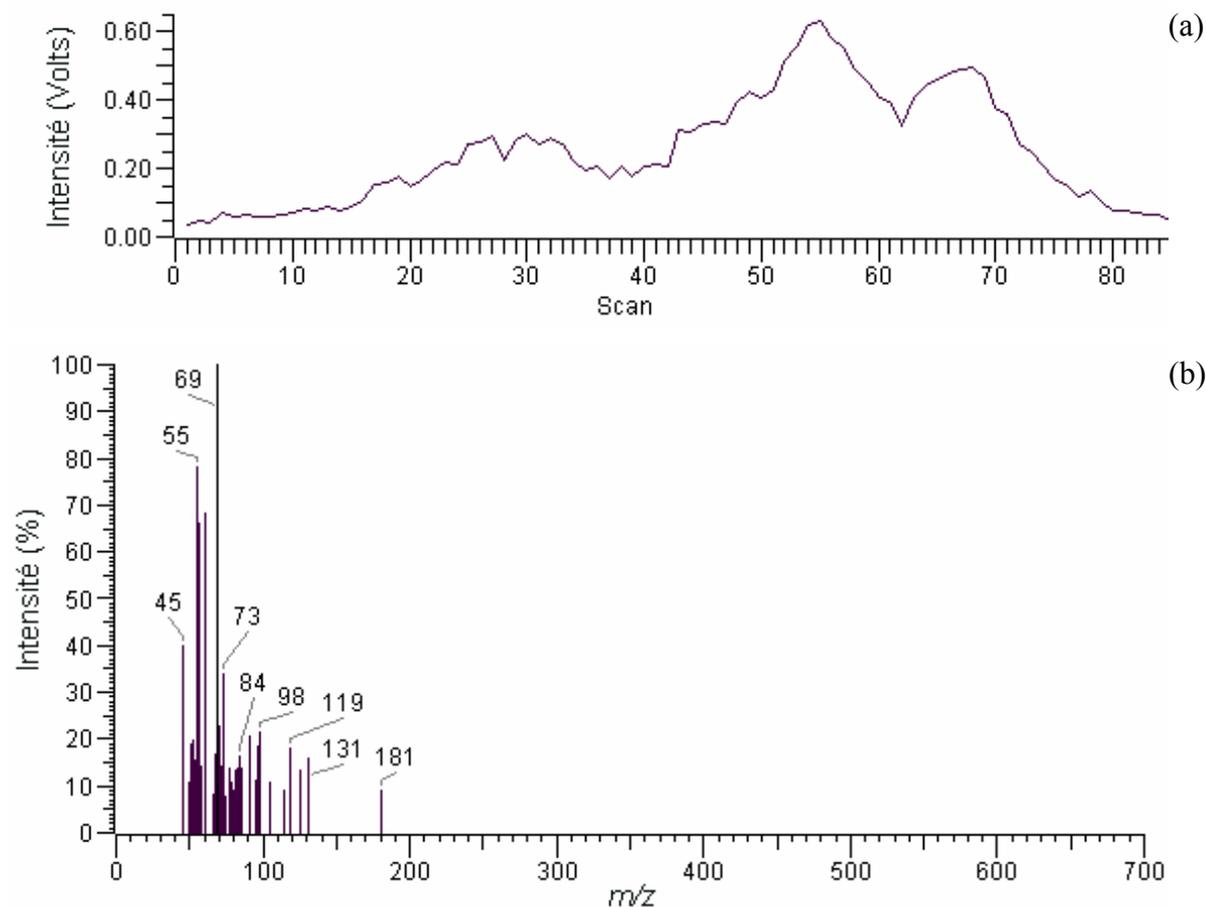


Figure 2.8: Courant ionique total (a) et spectre de masse par impact électronique moyenné (scans 50-60) (b) obtenus par introduction directe de poudre de cuivre vierge (Fluka) (Instrument VG7070E; chauffage de l'échantillon 2 °C/s; autres conditions identiques à la Figure 2.7):

L'ensemble de ces observations laisse supposer qu'une proportion significative de composés organiques a été retenue sur le cuivre. Il n'est pas exclu qu'une partie de ces composés soient des biomarqueurs nécessitant d'être quantifiés dans le cadre de ce travail.

Afin d'éviter que des composés organiques ne soient retenus par le cuivre lors de l'élimination du soufre élémentaire, le dichlorométhane utilisé lors de la procédure a été remplacé par un mélange de chloroforme:méthanol 80:20. La Figure 2.9 montre le spectre de masse obtenu par impact électronique de la poudre de cuivre après passage d'un extrait organique neutre dissous dans du chloroforme:méthanol 80:20 et rinçage avec le même solvant. Le courant ionique total

de ce spectre, peu élevé, est du même ordre que celui de la poudre de cuivre vierge (Figure 2.8). La présence de composés organiques est de plus considérablement réduite par rapport à un rinçage au dichlorométhane.

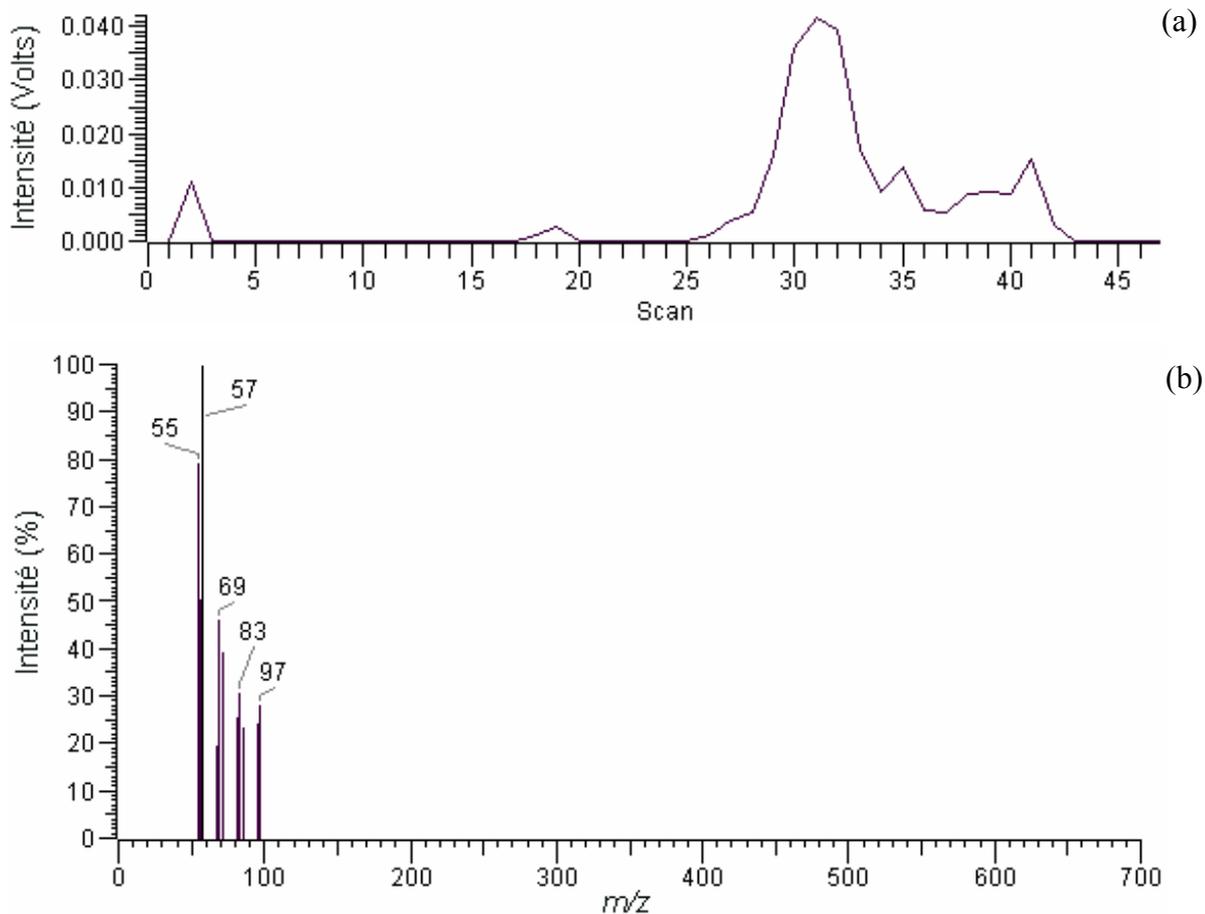


Figure 2.9: Courant ionique total (a) et spectre de masse par impact électronique moyenné (scans 29-33) (b) obtenus par introduction directe de poudre de cuivre après passage de l'extrait organique total et rinçage avec le mélange chloroforme:méthanol 80:20 (Instrument VG7070E; Energie d'ionisation : 70 eV; chauffage de l'échantillon 2 °C/s; Masses balayées: 45-990 amu; Vitesse de balayage: 3 s/scan; Interscan: 1 s):

Enfin les pics du spectre de la Figure 2.9, peu nombreux, ne correspondent pas à des ions caractéristiques des biomarqueurs stéroïdiens, à des hopanoïdes ou à des *n*-alcane. Il s'avère donc nécessaire d'effectuer l'élimination du soufre élémentaire en présence d'un solvant polaire tel que le chloroforme:méthanol 80:20. Si cette opération est effectuée à l'aide de dichlorométhane (Leif et Simoneit, 2000) ou de chloroforme (Simoneit *et al.*, 1996), elle pourrait conduire à des pertes significatives de biomarqueurs. De même, si du cuivre est ajouté à un solvant apolaire tel que le dichlorométhane pendant la phase d'extraction, comme reporté

dans certaines études (Bechtel *et al.*, 1996; Mastalerz *et al.*, 1999; Sachsenhofer *et al.*, 1995), une partie des biomarqueurs pourrait être perdue par adsorption sur le métal.

Notons qu'avec un seul passage sur la colonne de cuivre, la présence d'une faible quantité de soufre dans les fractions hydrocarbures a été constatée lors de l'analyse par GC-MS de quelques échantillons de sédiment. Suite à cette observation, deux passages de l'extrait sur colonne de cuivre ont donc été réalisés systématiquement pour éliminer le soufre résiduel.

Une dernière modification a été apportée à la procédure d'élimination du soufre élémentaire de l'extrait organique. Lorsque 100 ml d'eau bidistillée sont utilisés pour rincer la colonne, la poudre de cuivre brunit au lieu de garder sa couleur orangée. La présence d'oxygène dissous dans l'eau utilisée est responsable de l'oxydation du métal et conduit à une diminution d'efficacité de la colonne pour fixer le soufre élémentaire. Pour éviter la réoxydation du cuivre activé, l'eau bidistillée est dégazée par barbotage avec de l'azote pendant une dizaine de minutes. Le brunissement du cuivre n'est alors plus observé.

3.5.3 Procédure adoptée

Une colonne courte (1.5 cm x 12 cm) pouvant être tirée sous vide est bouchée de laine de verre. Elle est ensuite remplie de 50 g de cuivre puis recouverte d'un second bouchon de laine de verre. La colonne est activée avec 15 ml de HCl 6N puis rincée avec 100 ml d'eau bidistillée dégazée à l'aide d'azote. 30 ml d'acétone et un même volume de dichlorométhane sont successivement ajoutés pour éliminer l'eau restante. L'extrait organique neutre, correspondant typiquement à 10 g de sédiment lyophilisé, est dissous dans un volume de 50 ml de chloroforme:méthanol 80:20. Ce mélange est passé à travers la colonne à un débit de 2 gouttes par seconde. 10 ml de chloroforme:méthanol 80:20 sont utilisés pour rincer la colonne. Un second passage de l'extrait est effectué à un débit de 4-5 gouttes par seconde. 35 ml de chloroforme:méthanol 80:20 sont utilisés pour rincer une dernière fois la colonne.

3.6 Fractionnement des neutres par Flash Chro

3.6.1 Données bibliographiques

Les neutres peuvent être séparés en plusieurs fractions de polarité croissante afin de réduire la complexité des chromatogrammes obtenus par GC-MS. Un fractionnement classique permet d'obtenir une première fraction dominée par les hydrocarbures non aromatiques, une seconde

fraction composée des hydrocarbures aromatiques, une troisième fraction comportant des composés de polarités intermédiaires tels que les éthers et certains esters et cétones. La quatrième fraction contient les composés polaires tels que les alcools et la cinquième et dernière fraction, des produits fortement polaires tels que des composés polyhydroxylés. Cette séparation peut être effectuée par chromatographie en phase liquide basse pression (Klink, 1994; Riffé, 1994) pouvant être suivie de chromatographie sur couche mince (Adam *et al.*, 2000; Grice *et al.*, 1996; Schaeffer *et al.*, 1995) ou de chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Hopfgartner, 1991). La procédure de fractionnement des neutres sur cartouche SPE Silice a également été appliquée par Blum (1999). Cette dernière réduit sensiblement la durée de la séparation comparée à la chromatographie liquide basse pression. Elle a en outre l'avantage de limiter les pertes occasionnées en chromatographie sur couche mince lors de l'étape d'extraction de la phase stationnaire. Toutefois cette procédure ne permet pas la séparation des hydrocarbures non aromatiques et aromatiques.

3.6.2 Partie expérimentale

Un mélange de cholesta-3,5-diène (20 mg), de phénanthrène (5 mg), de cholestérol hydrocinnamate (5 mg), de cholest-4-én-3-one (5 mg) et de 7-déhydrocholestérol (5 mg) dissous dans 2.5 ml de dichlorométhane:hexane 1:1 a été utilisé pour tester la procédure de (Blum, 1999) et, si possible l'adapter à la séparation des hydrocarbures aromatiques et non aromatiques. Les tentatives pour obtenir cette dernière séparation sur cartouche SPE Silice (Supelco, Si-1g) sont restées infructueuses. L'utilisation du décane à la place de l'hexane ou d'une seconde cartouche SPE Silice pour affiner la séparation n'empêche pas le chevauchement des fractions. Il en est de même si une cartouche avec une phase stationnaire inverse C₁₈ (Supelco, C18-1g) est utilisée. La limitation de la SPE peut être notamment expliquée par la résolution insuffisante obtenue sur ce type de support compact. En effet la chromatographie en phase liquide, pratiquée sur des colonnes de ≥ 20 cm, permet d'obtenir des séparations beaucoup plus affinées. La séparation sur SPE a donc été écartée au profit de la chromatographie liquide basse pression.

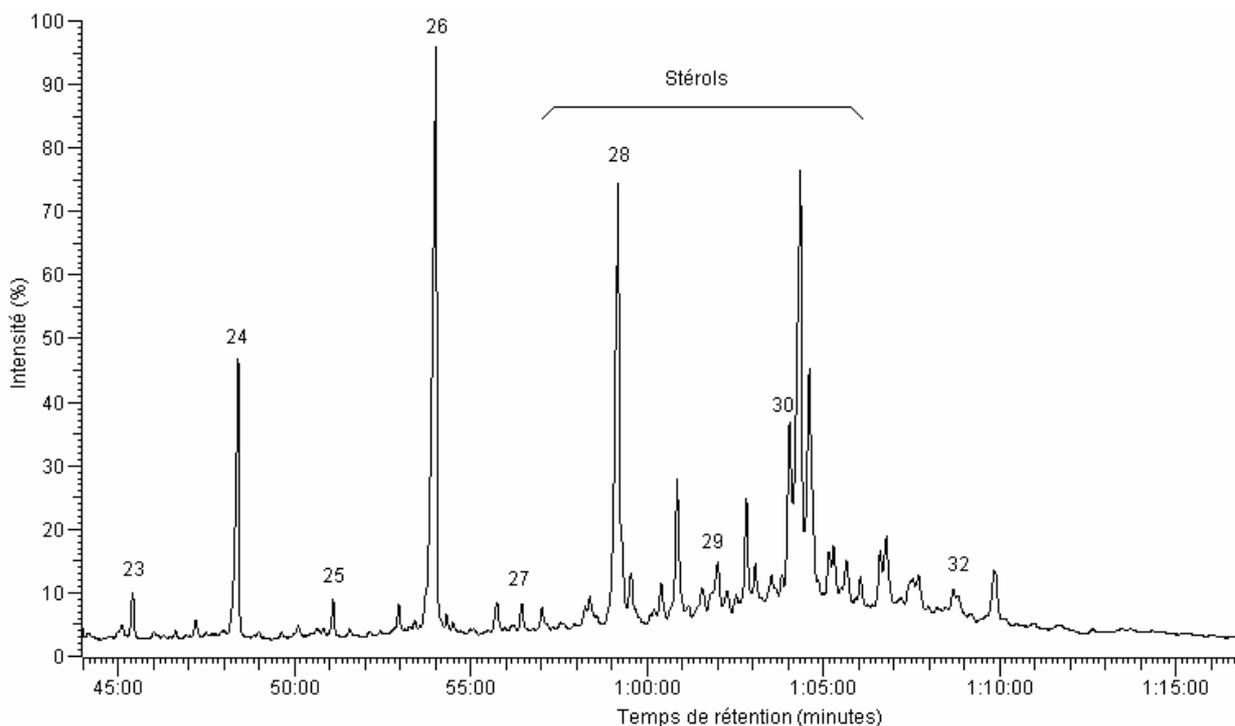


Figure 2.10: Courant ionique total obtenu après triméthylsilylation de la fraction alcool #4 de la tranche 30-36 cm de la carotte sédimentaire obtenue par chromatographie liquide basse pression en utilisant une phase mobile pour la fraction #3 hexane:chloroforme 40:60 et pour la fraction #4 chloroforme:méthanol 90:10 (Conditions d'analyses GC-MS: Colonne: DB-5, J&W, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m; Programme de température: 80 °C (1 min.) jusqu'à 150 °C à 15 °C/min. puis 2.5 °C/min. jusqu'à 300 °C (20 min.)). Signification des abréviations: x: nombre de carbones de l'alcool linéaire primaire correspondant.

La procédure de Wünsche (1987) de chromatographie liquide basse pression a été adaptée à une colonne de 6 mm de diamètre contenant 3 g de silice. Afin d'obtenir une bonne séparation des fractions aromatiques et non aromatiques la quantité de dichlorométhane utilisée pour déposer l'échantillon en tête de colonne est déterminante et ne doit pas dépasser 200 μ l. Pour faciliter le transfert de l'échantillon sur la colonne dans un volume minimum de solvant, il est également important que l'échantillon ne soit pas séché complètement mais conserve des traces de solvant. L'utilisation de standards (cholesta-3,5-diène, 2.5 mg; phénanthrène, 10 mg; linoléate de méthyle, 15 mg; 5 α -androstane-3 β -ol, 5 mg) transférés avec 2.5 ml d'hexane et 200 μ l de dichlorométhane a permis de connaître les volumes de solutions nécessaires pour éluer chacune des fractions. Ainsi 25 ml d'hexane sont nécessaires pour éluer la fraction des hydrocarbures non aromatiques. 20 ml d'hexane:toluène 6:4 sont utilisés pour éluer les hydrocarbures aromatiques, 35 ml d'hexane:dichlorométhane 1:1 sont employés pour la troisième fraction, 20 ml d'hexane:acétate d'éthyle 60:40 pour la fraction des alcools et 20 ml d'acétate d'éthyle pur pour la

dernière fraction des composés fortement polaires. Cette procédure a été testée avec un extrait neutre provenant d'un sédiment de surface du lac de Cadagno. L'analyse par GC-MS des fractions #1-5 et d'une sixième fraction éluée avec 30 ml de méthanol pur a montré que les fractions #5-6 contiennent une faible proportion de stérols (4 à 5% sur la base de quantitation du stigmasterol et du cholestérol respectivement). Le remplacement de l'éluant hexane:acétate d'éthyle 60:40 par du chloroforme:méthanol 90:10 fait disparaître ces pertes.

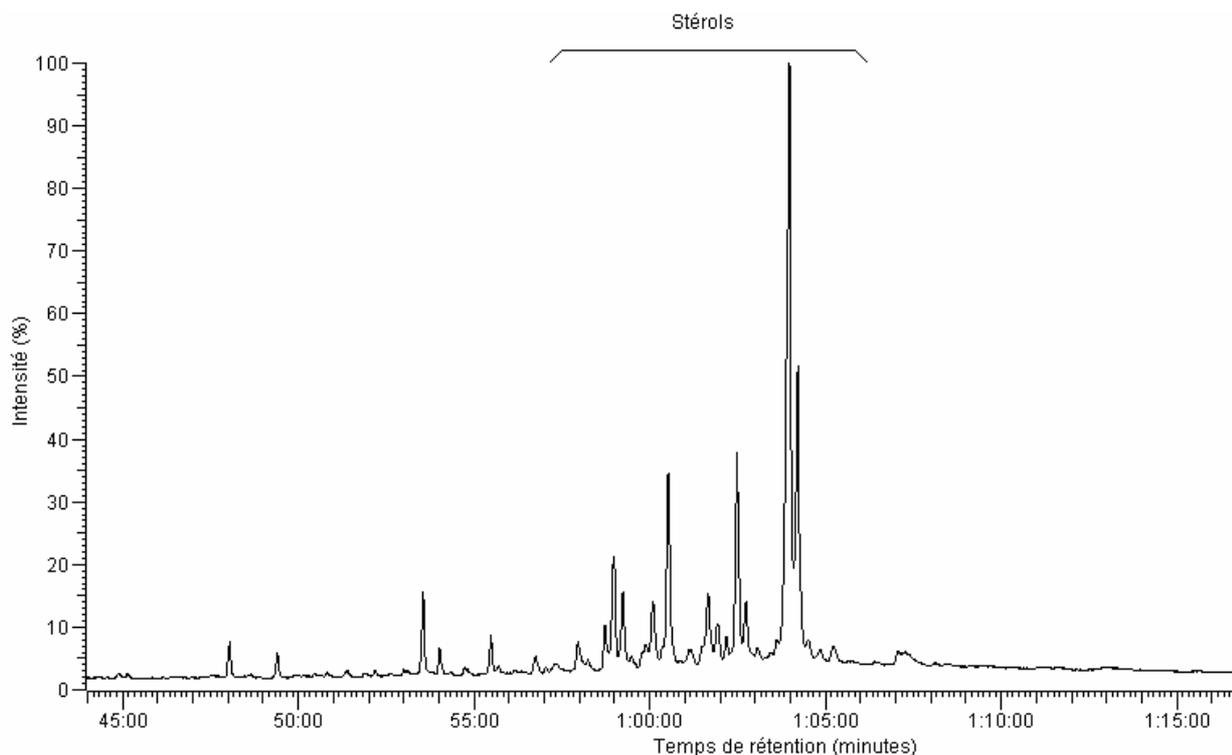


Figure 2.11: Courant ionique total obtenu après dérivatisation de la fraction alcool #4 de la tranche 30-36 cm de la carotte sédimentaire obtenue par chromatographie liquide basse pression en utilisant pour la fraction #3 et #4 des portions successives de 30 ml hexane:acétone:méthanol 93:5:2 (autres conditions GC-MS identiques à celles données pour la Figure 2.10.).

Le chloroforme a été choisi plutôt que le dichlorométhane car ce dernier provoque facilement des craquelures dans la phase stationnaire de la colonne. Toutefois la séparation s'avère moins bonne en raison de la présence des alcools linéaires en plus des stérols dans la fraction #4 comme le montre la Figure 2.10 (tranche 30-36 cm de la carotte sédimentaire). La contribution des alcools linéaires dans cette fraction peut être sensiblement réduite en utilisant deux portions successives d'un mélange ternaire hexane:acétone:méthanol 93:5:2 pour éluer les fractions #3 et #4. L'analyse par GC-MS montre qu'avec cette procédure les stérols sont encore récupérés dans la fraction #4 avec des rendements $\geq 95\%$ en se basant sur les pics du cholestérol, du sitostérol et

du stigmasterol. Par contre les alcools linéaires ne sont présents qu'à l'état de traces (Figure 2.11).

3.6.3 Procédure adoptée

La procédure adoptée utilise donc 3 g de silice 240-400 mesh (Fluka). La silice est conservée dans une étuve à 120 °C (au moins durant 24 heures) et sortie juste avant usage. Une fois à température ambiante, elle est introduite dans une colonne de 20 cm de longueur et 6 mm de diamètre interne muni d'un bouchon de laine de verre recouvert de 1 cm de sable de quartz. Après avoir bien tassé la silice en tapotant la colonne à l'aide d'un tuyau en caoutchouc, du sable de quartz est rajouté en tête de colonne sur 1 cm d'épaisseur. La colonne, placée sous chapelle, est ensuite enveloppée de papier absorbant imbibé d'éther ou de dichlorométhane. Cette opération permet de refroidir la colonne et évite les risques de craquelure de la phase stationnaire dus à l'application de pression en tête de colonne. 20 ml d'hexane sont utilisés pour le conditionnement. Le débit est ajusté à une goutte par seconde en appliquant la pression en tête de colonne à l'aide d'une poirette aspirante. 2.5 ml d'hexane ainsi que 2 fois 100 µl de dichlorométhane sont utilisés pour déposer l'échantillon. De la laine de verre est ensuite placée sur l'échantillon à l'aide d'une fine baguette en verre. Cette dernière est rincée avec 2.5 ml d'hexane. 20 ml d'hexane sont utilisés pour l'élution de la fraction hydrocarbures non aromatiques. 20 ml d'hexane:toluène 6:4 sont employés pour éluer les hydrocarbures aromatiques. 30 ml hexane:acétone:méthanol 93:5:2 sont utilisés successivement pour éluer la fraction #3 de polarité intermédiaire et la fraction #4 des stérols. La fraction des composés plus polaires est récupérée à l'aide de 25 ml de chloroforme:méthanol 80:20.

3.7 Elimination des hydrocarbures linéaires par inclusion dans un tamis moléculaire

3.7.1 Utilisation de tamis moléculaire composé de proportions alumine:silice 1:1

3.7.1.1 Données bibliographiques

L'utilisation en géochimie de tamis moléculaires 5 Å pour éliminer les hydrocarbures linéaires de la fraction hydrocarbures non aromatiques est courante (Adam *et al.*, 1992; Kenig *et al.*,

1995a; Schaeffer *et al.*, 1995; Van Kaam Peters *et al.*, 1997). Ainsi l'analyse des hydrocarbures branchés/cycliques peut se faire sans l'interférence des hydrocarbures linéaires, composants généralement majeurs dans les sédiments récents. La procédure employée habituellement consiste à dissoudre la fraction contenant les hydrocarbures dans du toluène ou de l'isooctane en présence du tamis, puis de chauffer à reflux pendant 12 heures (Wollrab et Streibl, 1969). La procédure testée sur nos échantillons est celle proposée par Corniolet (1988) qui, en remplaçant le reflux par le bain ultra-sons, raccourcit la durée de l'opération à 2 heures.

3.7.1.2 Partie expérimentale

La procédure de Corniolet (1988) a été utilisée sur la fraction des hydrocarbures non aromatiques de la tranche 42-48 cm du sédiment du lac de Cadagno. La comparaison des chromatogrammes GC-MS avant et après inclusion dans 1 g de tamis 5 Å (Supelco) a révélée la perte totale des stérènes polyinsaturés majeurs tels que le cholesta-3,5-diène, le 24-methylcholesta-3,5-diène, le 24-méthylcholesta-3,5,22-triène et le 24-ethylcholesta-3,5,22-triène. La procédure a alors été testée par GC en quantifiant le 5 α -androstane et le cholest-5-ène avant et après passage sur tamis en utilisant l'acétate de 5 α -androstan-3 β -ol comme standard externe. Les quantités de 5 α -androstane et de cholest-5-ène initialement déposées sur le tamis étaient de 0.2 mg par composé dissous dans un volume d'isooctane de 200 μ l. Trois hydrocarbures linéaires ont également été ajoutés au mélange initial en quantités 10 fois supérieures au 5 α -androstane et au cholest-5-ène. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 2.2. Ces résultats montrent qu'après un passage sur tamis de 30 ou 90 minutes dans l'isooctane, il ne reste plus que des traces d'hydrocarbures linéaires. Le 5 α -androstane est récupéré quantitativement. Cependant la quantité de cholest-5-ène récupérée représente moins de 5% de sa quantité initiale après 30 minutes et 1% après 90 minutes d'ultra-sonication. Ceci supporte l'hypothèse que les stérènes sont retenus par le tamis contrairement aux stérènes. Comme il ne peut s'agir d'une inclusion mais plutôt d'une adsorption, le toluène, solvant légèrement plus polaire que l'hexane a été utilisé pour rincer le tamis et éventuellement désorber le cholest-5-ène. Le Tableau 2.2 montre que cette opération ne permet pas de récupérer le cholest-5-ène.

Composé	Taux de récupération après passage sur tamis (%)		
	30 min. dans l'isooctane	90 min. dans l'isooctane	Rinçage avec Toluene
Quantification par rapport à l'acétate de 5 α -androstane-3 β -ol (Standard Externe)			
5 α -Androstane	100.8	113.7	1.1
Cholest-5-ène	4.4	0.6	0
Hydrocarbure linéaire <i>n</i> - C18*	0.02	0.02	0.02
Hydrocarbure linéaire <i>n</i> - C24*	0.01	0.01	0.02
Hydrocarbure linéaire <i>n</i> - C25*	0.03	0.13	0.13
Taux de récupération après passage sur tamis par rapport au 5 α -androstane (%)			
Cholest-5-ène	4.3	0.5	0

Remarques: les taux de récupération sont calculés à partir du rapport des masses mesurées par GC avant et après inclusion dans le tamis moléculaire.

* Taux de récupération évalué à partir de la masse déterminée par GC après inclusion dans le tamis et de la masse initiale pesée avant inclusion dans le tamis.

Tableau 2.2: Quantités de 5 α -androstane, de cholest-5-ène et d'hydrocarbures linéaires récupérées après inclusion dans un tamis moléculaire 5 Å (Supelco) en bain ultra-sons pendant 30 et 90 minutes et par rinçage du tamis avec le toluène après 90 minutes.

Ces résultats montrent que les tamis moléculaires 5 Å doivent être utilisés avec précaution. En effet, ils peuvent adsorber de grandes proportions de stérènes rendant leur quantification totalement erronée. Dès lors, l'utilisation de tamis moléculaires classiques a été écartée au profit d'un tamis plus spécifique (West *et al.*, 1990), le tamis ZSM-5 Å (Zeolyst International).

3.7.2 Utilisation du tamis moléculaire ZSM-5 composé de proportions silice:alumine 280:1

Le tamis ZSM-5 Å (Zeolyst International) possède deux tailles de pores, l'un circulaire de 6 Å de diamètre, l'autre elliptique de 5.1-5.7 Å (West *et al.*, 1990). Il a en outre la particularité de posséder un rapport silice:alumine très élevé (280:1) par rapport aux tamis classiques (1:~1). Les phénomènes d'adsorption seront donc similaires à la silice utilisée en chromatographie liquide basse pression. L'usage de ce tamis pour l'inclusion des hydrocarbures linéaires s'est très vite répandu dans la littérature (Armanios *et al.*, 1995; Audino *et al.*, 2001; Audino *et al.*, 2002; Fazeelat *et al.*, 1995; Warton *et al.*, 1997). 1 gramme de ce tamis a donc été testé dans des conditions similaires à celles décrites au paragraphe 3.7.1.2 pour le tamis classique. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 2.3.

Composé	Taux de récupération du composé après passage sur tamis (%)			
	30 min. dans du pentane	30 min. dans de l'isooctane	90 min. dans de l'isooctane	Rinçage au dioxane du tamis traités 90 min. avec de l'isooctane
Quantification par rapport à l'acétate de 5 α -androstan-3 β -ol (Standard Externe)				
5 α -Androstane	84.4	82.9	81.4	1.1
Cholest-5-ène	89.6	92.6	87.2	0.0
Hydrocarbure linéaire <i>n</i> - C18*	22.7	17.1	10.0	17.3
Hydrocarbure linéaire <i>n</i> - C24*	8.5	5.8	1.8	12.2
Hydrocarbure linéaire <i>n</i> - C28*	3.4	1.7	0.3	4.4
Taux de récupération après passage sur tamis par rapport au 5 α -androstane (%)				
Cholest-5-ène	106.1	111.7	107.1	0.0

Remarques: les taux de récupération sont calculés à partir du rapport des masses mesurées par GC avant et après inclusion dans le tamis moléculaire.

* Taux de récupération évalué à partir de la masse déterminée par GC après inclusion dans le tamis et de la masse initiale pesée avant inclusion dans le tamis.

Tableau 2.3: Quantités de 5 α -androstane, de cholest-5-ène et d'hydrocarbures linéaires récupérés après inclusion dans le tamis moléculaire 5 Å ZSM-5 (Zeolyst) en bain ultra-sons pendant 30 minutes dans du pentane et de l'isooctane, pendant 90 minutes dans de l'isooctane et après rinçage avec du dioxane.

L'usage de pentane préconisé par West *et al.* (1990) a été comparé à l'isooctane. Il s'avère que le tamis conduit à une meilleure rétention des hydrocarbures linéaires à chaîne longue lorsque l'isooctane est employé pendant 30 minutes plutôt que le pentane. Les taux de récupération relativement satisfaisant du 5 α -androstane et du cholest-5-ène sont proches entre eux et révèlent peu d'effets discriminatoires. L'ultra-sonication pendant 90 minutes permet de diminuer dans des proportions significatives la quantité des hydrocarbures linéaires. Bien que l'hydrocarbure linéaire en C₁₈ ne soit retenu qu'à 90%, son homologue en C₂₈ est retenu à 99.7 % sur le tamis. Ces résultats apparaissent satisfaisants dans la mesure où les stérènes éluent en GC après l'hydrocarbure linéaire en C₂₇. Le passage de 30 minutes à 90 minutes d'ultrasonication du tamis induit une faible perte des hydrocarbures stéroïdiens qui reste toutefois acceptable.

Les résultats précédents furent encourageants pour tester la séparation des hydrocarbures linéaires/ramifiés & cycliques sur la fraction hydrocarbures non aromatiques provenant d'un sédiment du lac de Cadagno. Les Figures 2.12 et 2.13 montrent les chromatogrammes GC-MS de la fraction hydrocarbures non aromatique de la tranche 42-48 cm de la carotte sédimentaire avant et après inclusion dans le tamis ZSM-5 Å des hydrocarbures linéaires respectivement.

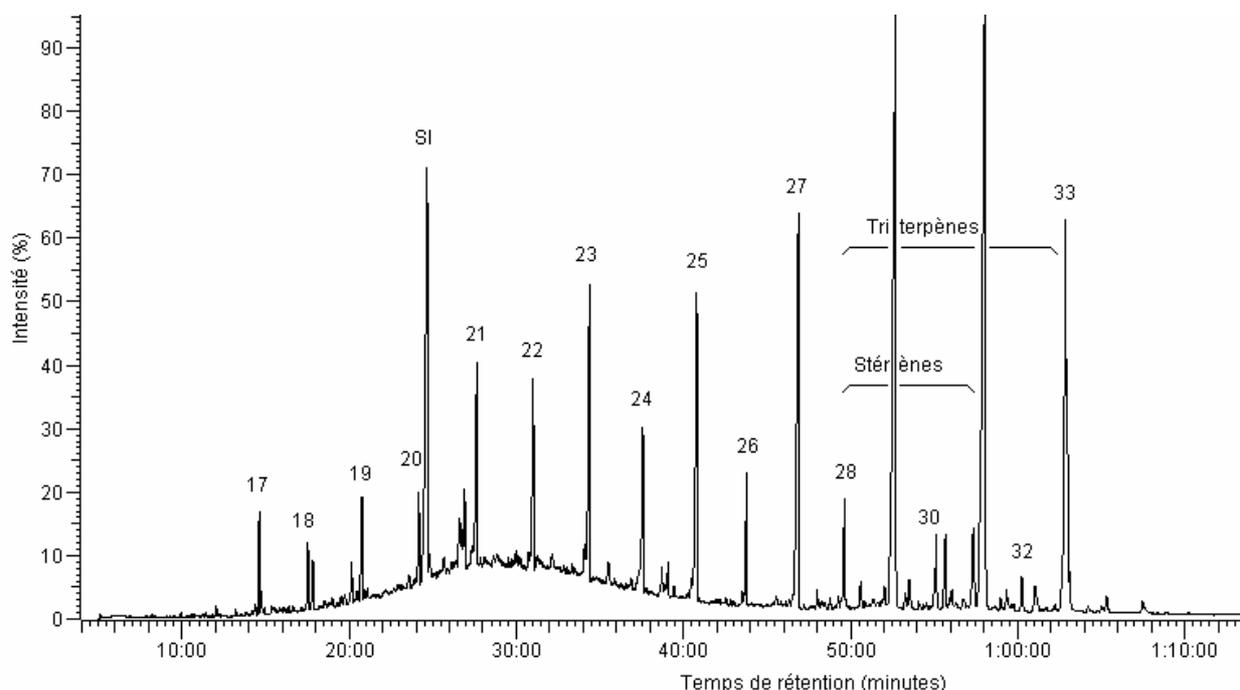


Figure 2.12: Courant ionique total obtenu après injection de la fraction hydrocarbures non aromatiques avant passage sur tamis. (Conditions d'analyses GC-MS: Colonne: DB-5, J&W, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m; Programme de température: 80 °C(1 min.) jusqu'à 150 °C à 15 °C/min. puis 2.5 °C/min. jusqu'à 300 °C (20 min.)). Signification des abréviations: x: nombre de carbones de l'alcane linéaire correspondant; SI: standard interne (5α -androstane).

Le chromatogramme GC-MS de la Figure 2.12 rend compte qu'une quantification des stérènes est soit impossible soit peu précise en présence des hydrocarbures linéaires. Le chromatogramme GC-MS de la Figure 2.13 montre qu'après inclusion des alcanes linéaires dans le tamis, une quantification précise des stérènes par l'aire des pics est rendue possible. Le Tableau 2.4 liste le taux de récupération de stérènes après inclusion sur tamis. La difficulté d'intégration des stérènes avant inclusion dans le tamis en raison de la présence majoritaire des hydrocarbures linéaires (Figure 2.12) conduit à une erreur non négligeable. Ceci explique des variations de proportions pouvant être supérieures à 100% mais pourrait également expliquer des valeurs relativement basses telles que celles du 23,24-diméthylcholesta-3,5,22E-triène. De manière générale la séparation est jugée satisfaisante avec des effets discriminatoires peu marqués entre stérènes contrairement à l'usage d'un tamis classique.

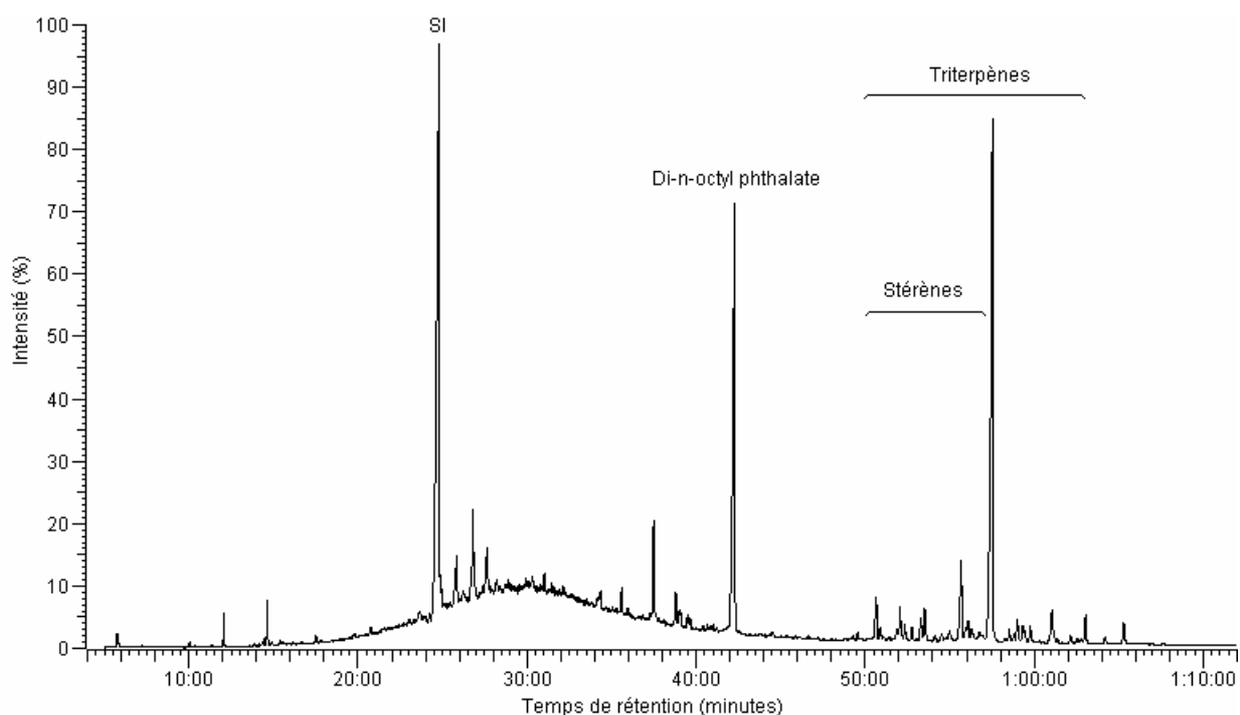


Figure 2.13 Courant ionique total obtenu après injection de la fraction hydrocarbures non aromatiques après inclusion dans le tamis ZSM-5 Å (Zeolyst) pendant 90 minutes dans de l'isooctane (autres conditions d'analyses GC-MS identiques à celles de la Figure 2.12). Remarque: le di-*n*-octylphthalate est un contaminant.

Composé	Taux de récupération de stérènes/anes après inclusion dans le tamis moléculaire pendant 90 minutes en utilisant l'isooctane comme solvant (%)	
	Composé de référence	
	5 α -Androstane	5 α -Cholest-2-ène
5 α -Androstane	100	106
5 α -Cholest-2-ène (N4)	95	100
5 α -Cholest-3-ène (N7)	107	113
24-Méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène? (N15)	109	115
Cholesta-3,5-diène (N16)	92	97
24-Méthylcholesta-3,5,22E-triène (N22)	85	89
23,24-Diméthylcholesta-3,5,22E-triène? (N39)	83	87

Tableau 2.4: Taux de récupération de stérènes après passage de la fraction hydrocarbures non aromatiques de la tranche 48-54 cm de la carotte du lac de Cadagno sur tamis moléculaires 5 Å ZSM-5 Å (Zeolyst) en bain ultra-sons pendant 90 minutes en utilisant l'isooctane comme solvant. Remarque: l'identification des stérènes est détaillée dans la Troisième partie du manuscrit.

3.7.2.1 Procédure adoptée

Le tamis broyé au mortier est tout d'abord activé à 400 °C pendant une nuit puis conservé dans un récipient étanche. 2 grammes sont transférés dans un tube à centrifugation de 20 ml et 2.5 cm

de diamètre. Le tamis est mouillé à l'aide d'isooctane. La fraction non aromatique est ensuite transférée avec un minimum d'isooctane sur le tamis. De l'isooctane est encore ajouté de manière à recouvrir d'une fine pellicule de solvant le tamis. Le tube est bouché avec une feuille d'aluminium puis du parafilm avant d'être placé dans le bain ultra-sons pour 90 minutes. 15 ml de chloroforme sont ajoutés puis le mélange est centrifugé pendant 2 minutes à 4000 tours/min. Le surnageant est filtré sous vide (pompe à eau) sur une colonne courte munie d'un fritté de téflon (diamètre des pores: 5 μm) et de laine de verre placée par dessus. L'opération "ajout de chloroforme/centrifugation/ filtration" est répétée 3 fois. La laine de verre et le fritté sont rincés avec 25 ml de chloroforme. Les filtrats sont rassemblés et concentrés sous pression réduite.

4 Réactions menées sur le sédiment

4.1 Réaction de saponification

Après l'extraction de la matière organique comme décrite dans le paragraphe 3.3.2, le sédiment résiduel est soumis à une saponification afin de libérer les lipides liés aux macromolécules insolubles par des liaisons esters. Pour ce faire, le sédiment résiduel est introduit dans un ballon contenant 200 g de méthanol et 10 grammes d'hydroxide de potassium. Le mélange est porté à reflux à 80 °C pendant une nuit. Le méthanol est évaporé puis le mélange est acidifié à pH 3-4. L'extraction des lipides liés est alors conduite de manière classique comme dans le paragraphe 3.3.2.

4.2 Réaction de désulfuration par $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$

4.2.1 *Données bibliographiques*

La coupure des liaisons mono- et polysulfures inter- ou intramoléculaire peut être effectuée par divers traitements chimiques.

Les traitements utilisant H_2/Ni Raney (Schouten *et al.*, 1995), $\text{NiCl}_2/\text{NaBH}_4$ (Schouten *et al.*, 1993), Nickelocene/ LiAlH_4 (Richnow *et al.*, 1993) ou Li/EtNH_2 (Hofmann *et al.*, 1992) conduisent à des alcènes ou des alcanes via coupure de la liaison C-S accompagnée de remplacement par un atome d'hydrogène. Ces traitements chimiques aboutissent donc à la perte

de l'information quant à la position du pont soufré (à moins d'utiliser des réactifs deutérés) et à certaines modifications structurales (réduction des double liaisons conjuguées).

La littérature fait également état d'autres inconvénients. Il a été reporté que le traitement H₂/Ni Raney aboutit à des rendements variables compris entre 31 et 85% pour un thiolane (Prahl *et al.*, 1996). Lors d'un traitement par NiCl₂/NaBH₄, la chlorophylle et le phytol conduisent au phytène et au phytane respectivement dans des rendements supérieurs à 60% (Hartgers *et al.*, 1996). La dégradation de la chlorophylle a également été observée par Putschew *et al.* (1996). La désulfuration par le réactif Nickelocène/LiAlH₄ de standards sulfurés donne des rendements s'abaissant jusqu'à 44% (Richnow *et al.*, 1993). Concernant le réactif Li/EtNH₂, Hofmann *et al.* (1992) ont pu constater la dégradation des éthers (*p. ex.* le dialkyléther phytényl-O-_nC_{16:0} est converti en un mélange 1:1 de phytène et phytane).

Aucune de ces méthodes n'est donc suffisamment spécifique pour ne couper que les liaisons sulfures sans altérer la structure des biomarqueurs. Les procédures utilisant les réactifs Nickelocène/LiAlH₄ et LiEtNH₂ et nécessitant 48 et 8 heures de réaction respectivement ont été écartées. La procédure utilisant le Li/EtNH₂ nécessite de plus un temps de préparation supplémentaire pour la purification préalable du lithium. Le réactif H₂/Ni Raney a lui aussi été écarté car il fait intervenir une réaction entre un solide, un gaz et l'analyte aboutissant à des rendements peu élevés (Schouten *et al.*, 1993). La désulfuration par NiCl₂/NaBH₄ permettant d'effectuer la réaction en une heure seulement a donc été choisie pour notre travail.

4.2.2 Désulfuration d'un mélange de stérols à l'aide de NaBD₄/NiCl₂

4.2.2.1 Introduction

Afin de vérifier l'effet du réactif de désulfuration NaBH₄/NiCl₂ sur les stérols saturés et insaturés, la réaction décrite par Schouten *et al.* (1993) a été menée sur un mélange de 5 α -androstane-3 β -ol, de cholestérol et de stigmastérol. Le réactif deutéré a été utilisé afin d'obtenir des informations supplémentaires.

4.2.2.2 Partie expérimentale

4.2.2.2.1 Analyses

Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 couplé à un spectromètre de masse VG Masslab Trio 2. L'injection des échantillons s'est faite en

mode splitless avec l'injecteur à une température de 315 °C. La colonne utilisée est une DB-5 (J&W, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm). Le programme de température du four est 80 °C pendant une minute puis 15 °C/min. jusqu'à 150 °C et enfin 5 °C/min. jusqu'à 300 °C. L'isotherme à 300 °C est maintenue pendant 15 minutes.

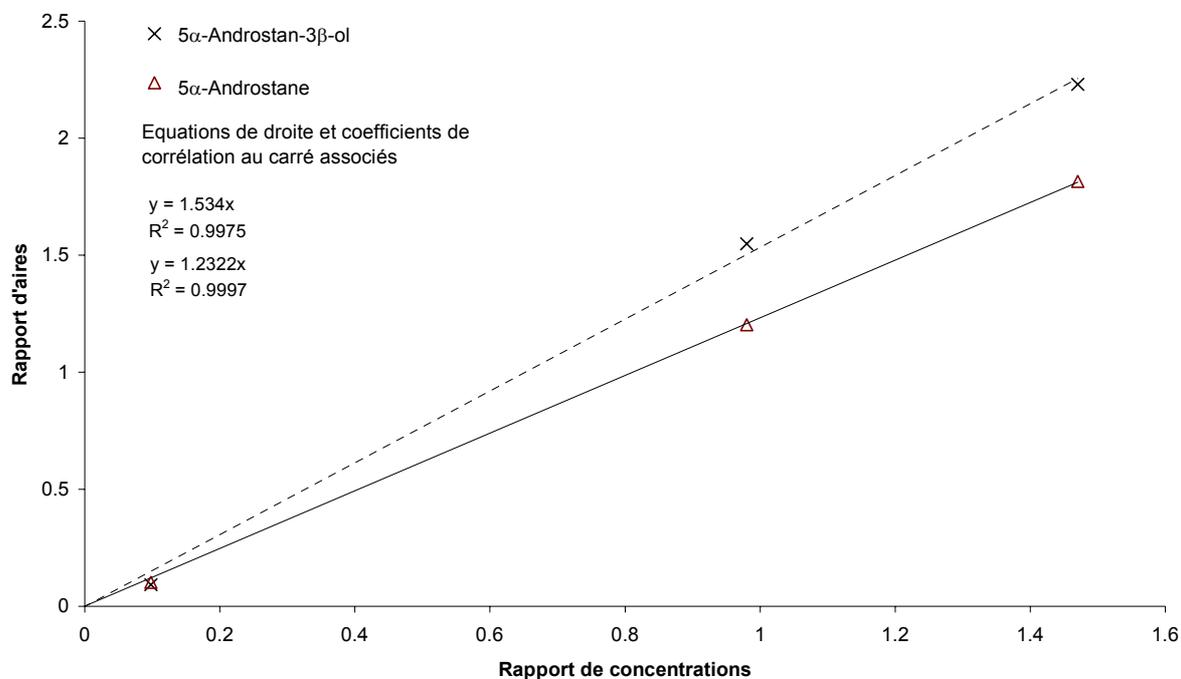


Figure 2.14: Droites de calibration du 5α-androstane et du 5α-androstan-3β-ol par rapport à l'acétate d'androstan-3β-ol (standard externe) obtenues par GC-MS

La quantification est réalisée avec trois solutions standards contenant différentes concentrations de 5α-androstane et de 5α-androstan-3β-ol (0.0125, 0.125, 0.1875 mg/ml) en plus d'une concentration constante d'acétate de 5α-androstan-3β-ol (standard externe, 0.125 mg/ml). Les droites de calibration obtenues à partir des surfaces des pics du chromatogramme du courant ionique total (TIC) et correspondant à l'injection de 1 µl de solution standard sont représentées sur la Figure 2.14. Le 5α-androstan-3β-ol a été utilisé comme standard interne afin de se soustraire des pertes par transfert. Le taux de récupération du 5α-androstan-3β-ol est de 84% après la réaction de désulfuration par NaBD₄/NiCl₂ (contre 85% pour le 5α-androstane).

4.2.2.2 Procédure de désulfuration à l'aide de NaBD₄/NiCl₂

La réaction de désulfuration a été conduite en suivant les indications de Schouten et al (1993). Une solution contenant 15 mg de 5α-androstane (Stérols), 15 mg de 5α-androstan-3β-ol

(Steraloids), 15 mg de cholestérol (Sigma) et 15 mg de stigmastérol (Fluka) dans 5 ml de chloroforme a été préparée. 200 µl de cette solution ont été prélevés pour servir de blanc. Le reste de la solution est transféré dans un ballon bicol et évaporé sous un faible courant d'azote. Le résidu est redissous dans 10 ml d'un mélange 1:1 de CD₃OD:tétrahydrofuranne. En conservant un faible courant d'azote dans le ballon, 400 mg de NiCl₂ sont ajoutés, puis, lentement, 400 mg de NaBD₄. La solution est ensuite portée à reflux à 80 °C et maintenue pendant une heure durant sous N₂.

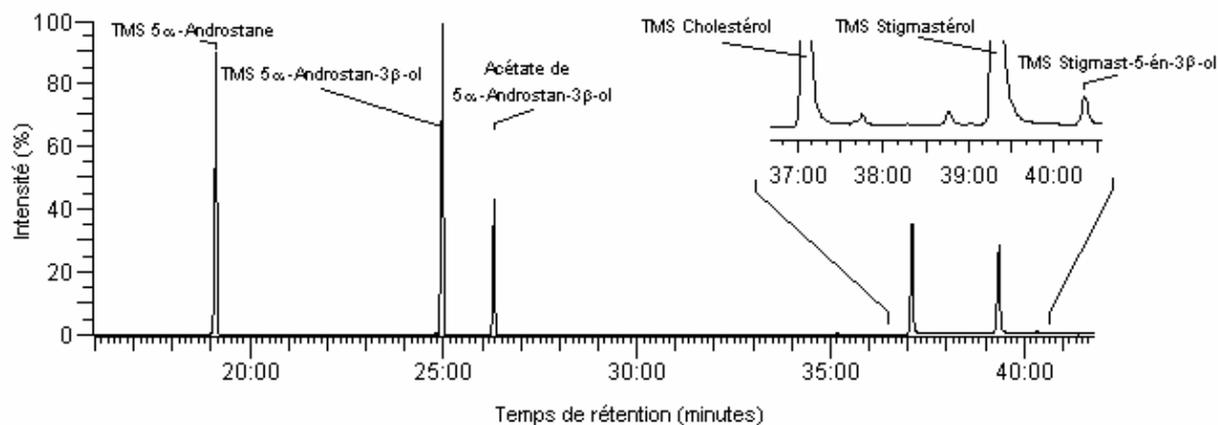
La solution noire obtenue est ensuite transférée dans une cartouche Soxhlet à l'aide de dichlorométhane et d'acétone. La cartouche est extraite pendant 5 minutes 3 fois avec 100 ml d'acétone et 3 fois avec 100 ml de dichlorométhane. Les extraits sont rassemblés, filtrés puis évaporés à sec. Le résidu est transféré à l'aide de 100 ml de dichlorométhane et 50 ml d'eau saturée en NaCl dans une ampoule à décanter. La phase organique est récupérée. La phase aqueuse restante est extraite 2 fois avec 100 ml de dichlorométhane. Les extraits sont rassemblés et évaporés à sec. Le résidu est redissout dans 3 ml de chloroforme bidistillé. 100 µl de cette solution sont ajoutés à un même volume de BSTFA contenant 1% de TMCS (Fluka). Le mélange est ensuite chauffé à 80 °C pendant une heure. Une solution de standard externe (acétate de 5α-androstan-3β-ol) est ensuite ajoutée avant analyse par GC-MS. Les 200 µl de la solution initiale (blanc) sont triméthylsilylés avant ajout du standard externe de manière analogue avant analyse.

4.2.2.3 Résultats et discussion

La désulfurisation, qui réduit à plus de 95% les double liaisons terminales des hydrocarbures linéaires (Schouten *et al.*, 1993) réduit seulement partiellement les doubles liaisons des stérols testés à savoir le cholestérol et le stigmastérol. Comme le montre la Figure 2.15, le cholestérol et le stigmastérol subsistent largement après la réaction de désulfurisation.

L'analyse quantitative montre que 92% du cholestérol conserve sa double liaison en position 5 tandis que 8% de 5α-cholestan-3β-ol est formé. Dans le cas du stigmastérol, 5% de stigmast-22E-én-3β-ol et 8% de stigmast-5-en-3β-ol sont formés (en plus de 3% en tant qu'impureté dans le stigmastérol, Fluka). Il est à noter que le stigmastan-3β-ol qui possède un pic caractéristique à *m/z* 305 & 306 (309 & 310 pour le composé tétradeutééré) n'a pas été détecté. Les résultats montrent également que le réactif est suffisamment spécifique pour ne pas réduire les stérols en stérènes/stéranes correspondants.

(i)



(ii)

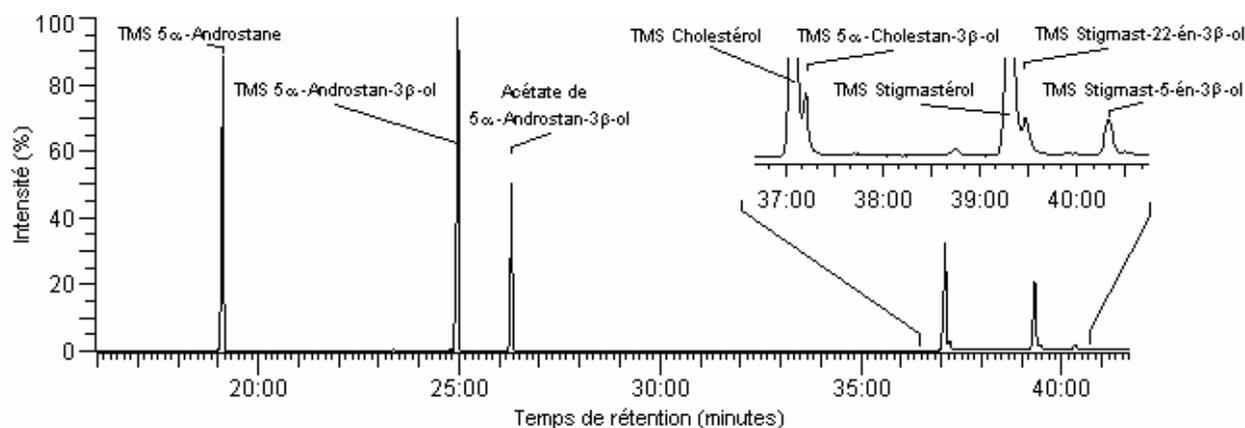


Figure 2.15: Courant ionique total du mélange avant (i) et après (ii) désulfuration à l'aide de $\text{NaBD}_4/\text{NiCl}_2$ (Conditions d'analyses GC-MS décrites dans le paragraphe 4.2.2.2.1).

La Figure 2.16 montre les spectres de masse des stérols récupérés après traitement par $\text{NaBD}_4/\text{NiCl}_2$. Sur le spectre du 5α -cholestan- 3β -ol, le pic intense à m/z 215 correspondant à la perte de la chaîne latérale, du cycle D et de triméthylsilanol (TMSOH) est remplacé par des pics intenses à 217 et 218 et 219. De même le pic à m/z 230, provenant de la fragmentation du cycle D (clivage des liaisons C(13)-C(17) et C(15)-C(16) et perte de TMSOH) est remplacé par des pics à 232, 233 et 234. En plus de deux atomes de deutérium additionnés au niveau de la double liaison, il y a donc un troisième atome de deutérium incorporé dans le cycle A, B ou C. Le mécanisme de cette incorporation est certainement un échange des hydrogènes allyliques du cholestérol avant l'hydrogénation de la double liaison. En effet un examen attentif de la distribution des pics isotopiques des ions moléculaires des composés montre qu'excepté le 5α -androstane- 3β -ol, ces stérols ont tous incorporé de 1 à 4 atomes de deutérium. L'intégration des pics m/z M, M+1, M+2 et M+3 permet de calculer les proportions des espèces avec différents nombres d'atomes de deutérium comme reporté dans la Figure 2.17.

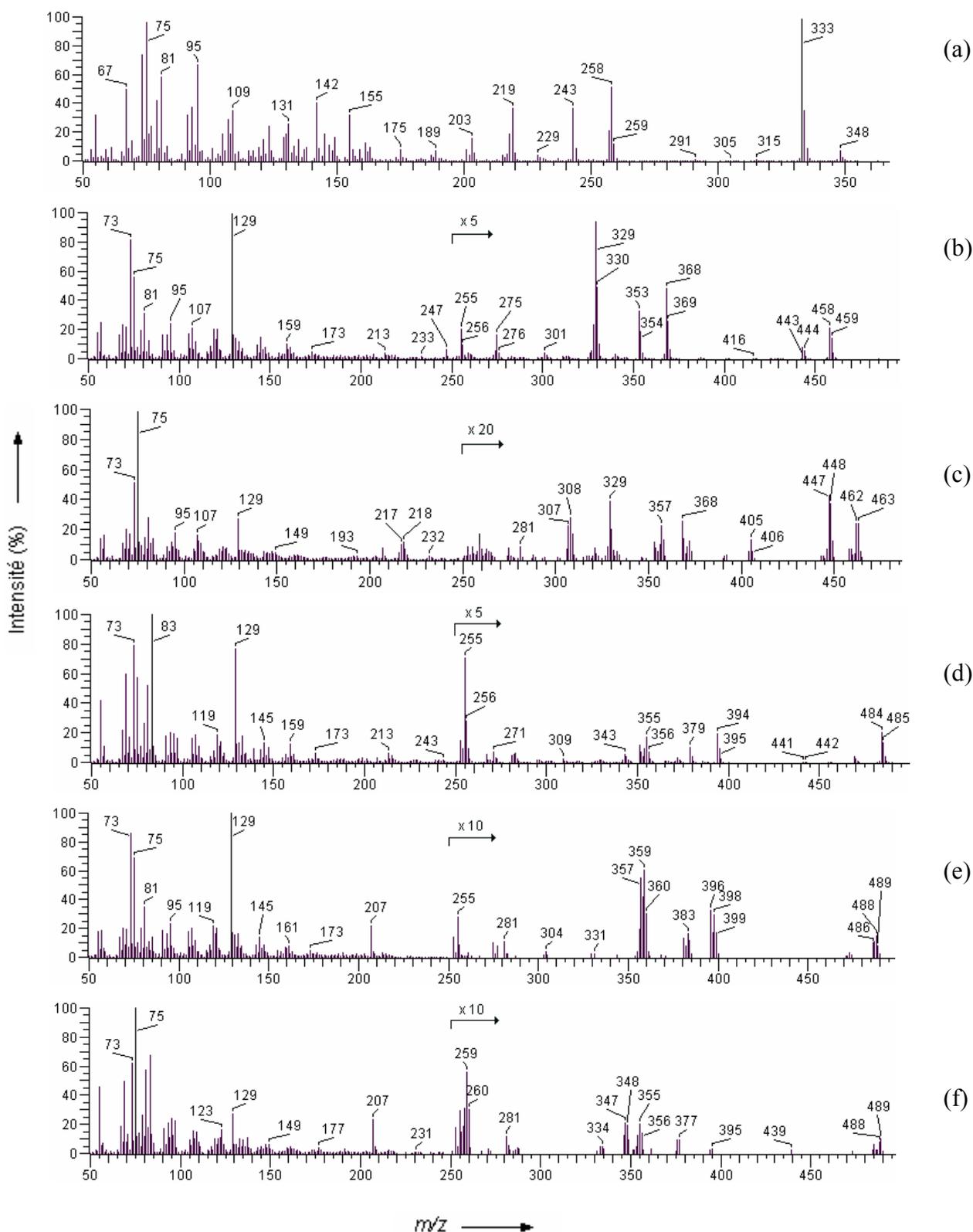


Figure 2.16: Spectres de masse par impact électronique du 5 α -androstan-3 β -ol (a), du cholestérol (b), du 5 α -cholestan-3 β -ol (c), du stigmastérol (d), du stigmast-22E-én-3 β -ol (e), du stigmast-5-én-3 β -ol (f) triméthylsilylés après traitement avec NaBD₄/NiCl₂.

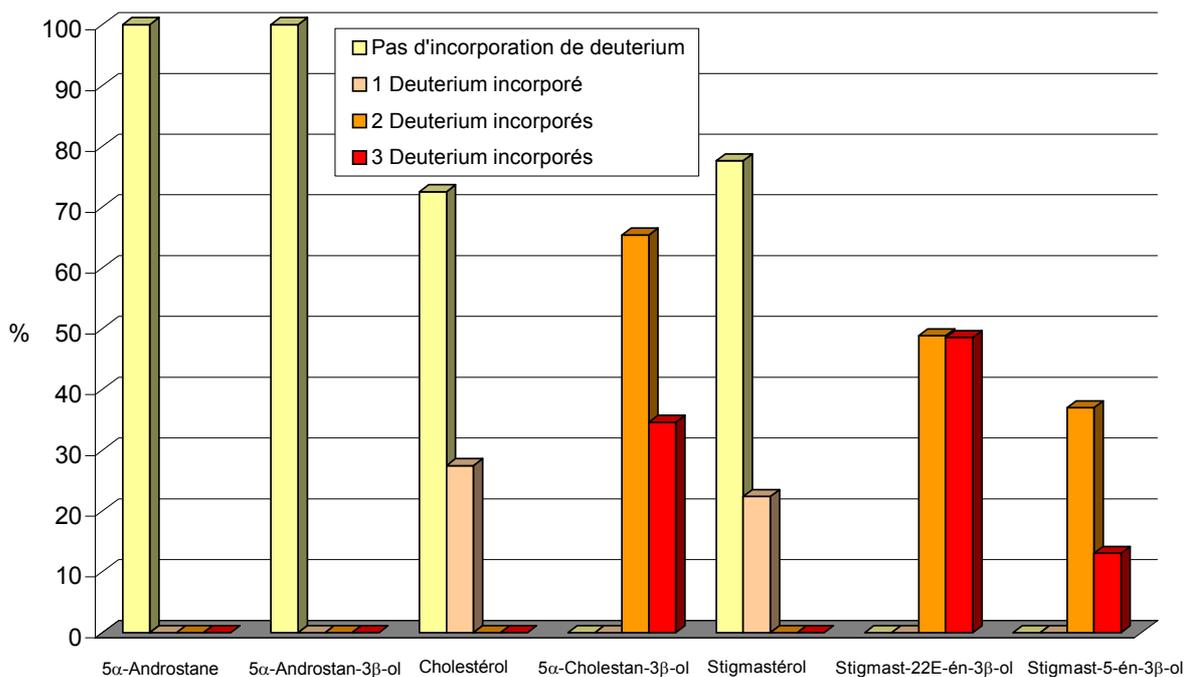


Figure 2.17: Distribution des stéroïdes deutérés et non deutérés après réaction avec NaBD₄/NiCl₂. Il est à noter que du stigmast-5-én-3β-ol non deutéré, déjà présent à 3% dans le mélange initial avant réaction, n'est pas reporté sur ce graphique.

La Figure 2.17 montre que 25% en moyenne du cholestérol et du stigmastérol possèdent un atome de deutérium après la réaction de désulfurisation. Cette réaction d'échange d'un hydrogène par un atome de deutérium n'a pas lieu pour le 5α-androstane et le 5α-androstan-3β-ol, preuve que la double liaison en position 5 dans le cholestérol et le stigmastérol est responsable de la réaction d'échange. La présence des espèces trideutérées du 5α-cholestan-3β-ol, stigmast-5-én-3β-ol et du stigmast-22E-én-3β-ol en est la conséquence. Toutefois les résultats montrent que la réaction d'échange a lieu dans des proportions variables avant l'hydrogénation de la double liaison. En effet, la proportion du composé trideutééré par rapport à son homologue bideutééré varie de 13 à 48% en passant du stigmast-22E-én-3β-ol au stigmast-5-én-3β-ol.

Ces résultats montrent ainsi que le traitement par NaBD₄/NiCl₂ réduit les double liaisons des stéroïdes insaturés dans des proportions variables. Appliqué à un échantillon sédimentaire, il ne sera pas possible d'obtenir une information quantitative sur un stérène issu d'un précurseur sulfuré déterminé. En prenant l'exemple d'un mélange de 3 stérènes en C₂₇, le Δ⁵-, Δ⁷- et Δ²²-stérène, tous reliés par un pont sulfure au niveau de la position C(3), la réaction de désulfurisation conduirait à un mélange de composés saturé et insaturés. Le composé saturé sera

la somme de quantités variables de Δ^5 -, Δ^7 - et Δ^{22} -stérènes ayant subi une hydrogénation. Ainsi il ne sera pas possible de connaître la quantité exacte et totale de chacun de ces stérènes. La situation devient encore plus complexe avec des échantillons contenant des stéroïdes avec un pont soufre intra- ou intermoléculaire au niveau de ses doubles liaisons plutôt qu'en position C(3) (Barakat et Rullkötter, 1995; Behrens *et al.*, 1997; Schmid, 1986; Sinninghe Damsté *et al.*, 1987; Sinninghe Damsté *et al.*, 1999). Toutefois il est possible d'effectuer une quantification pour une famille de composés. Dans ce cas il faut comparer la quantité totale de composés de la famille (tels que les stérènes en C_{27}) avant et après désulfuration.

Par ailleurs, les réactions d'échange d'hydrogènes allyliques mises en évidence dans le présent travail montrent qu'il serait délicat d'affirmer que la présence de composés mono- ou trideutérés après désulfuration d'un échantillon rend compte de la présence de composés liés par 1 ou 3 ponts sulfures comme ceci a été proposé par Schaeffer *et al.* (1995) et Schouten *et al.* (1993).

4.2.2.4 Conclusion

La réaction de désulfuration à l'aide de $\text{NaBD}_4/\text{NiCl}_2$ sur un mélange de stéroïdes démontre que ce produit réduit partiellement les double liaisons. Ce réactif n'est donc pas indiqué pour la quantification d'une forme sulfurée d'un composé déterminé mais plutôt d'une famille de composés (*p. ex.* stérènes en C_{27}). Il n'est donc pas possible d'établir une relation quantitative "stérol précurseur-stérène dérivé soufré" par l'utilisation de ce procédé.

4.3 Réaction de désulfuration douce

4.3.1 **Données bibliographiques**

Divers traitements chimiques ont été reportés pour rompre exclusivement les liaisons polysulfures. Ces traitements, qualifiés de "doux", n'affectent pas les ponts monosulfures.

Le traitement par LiAlH_4 (Adam *et al.*, 1991) coupe les ponts polysulfures pour donner les thiols correspondants. Toutefois les composés sulfurés peuvent subir des réactions de réduction parasites au cours de la réaction (Adam *et al.*, 2000). De plus les thiols donnent des spectres de masse moins explicites comparés au thioéthers correspondants en raison de l'élimination de H_2S par impact électronique de manière analogue à l'élimination d'eau dans les alcools (Kohnen *et al.*, 1991). Le réactif MeLi/MeI (Schouten *et al.*, 1995) conduit à des méthylthioéthers, plus faciles à analyser par GC-MS, mais ces thioéthers peuvent voir leur structure originale modifiée

en raison de réductions parasites pendant la réaction de désulfurisation (Adam *et al.*, 2000). La désulfurisation par NaSEt/MeI permet d'obtenir des méthylthioéthers, accompagnés parfois de faibles proportions de thiols correspondants. Ce problème est contre-carré par une méthylation supplémentaire par NaOMe/MeI (Adam *et al.*, 2000).

Sur la base de ces données, le réactif NaSEt/MeI a été choisi pour effectuer une désulfurisation douce du sédiment car il ne modifie pas la structure des biomarqueurs libérés.

4.3.2 Partie expérimentale

Le traitement par NaOMe/MeI (Adam *et al.*, 2000) a été utilisé pour convertir 60 mg de thiocholestérol (Fluka) en méthylthiocholestérol.

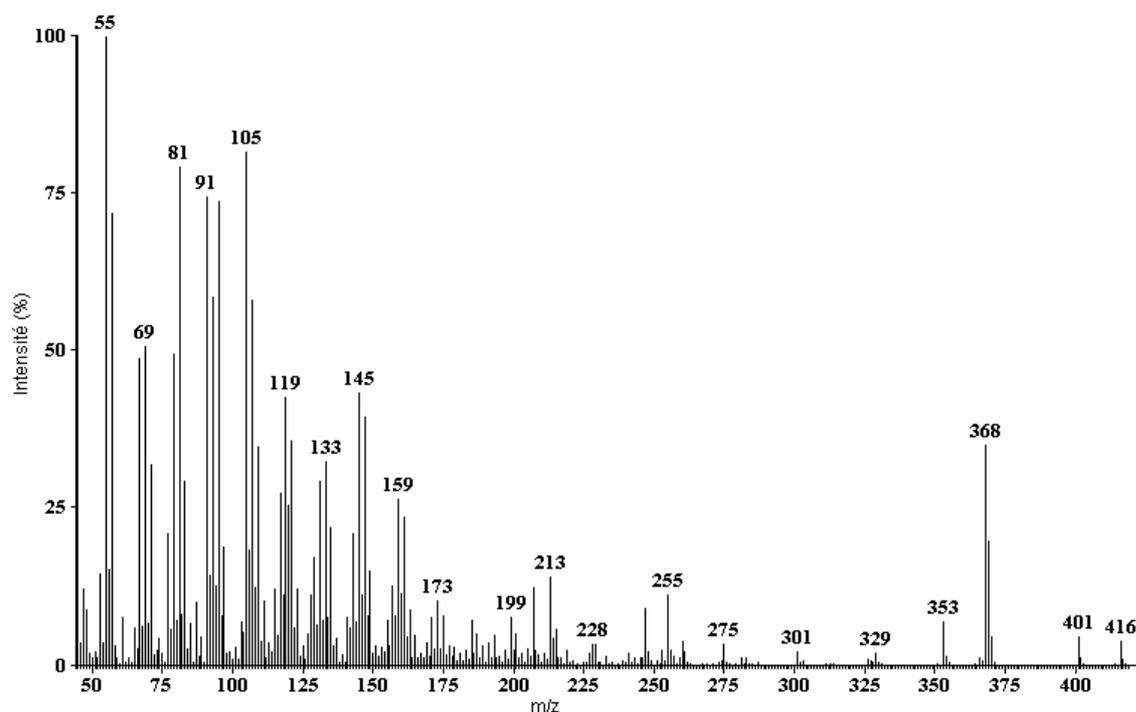


Figure 2.18: Spectre de masse par impact électronique du 3 β -méthylthiocholestérol

Le spectre de masse du 3 β -méthylthiocholestérol obtenu est représenté sur la Figure 2.18. L'élution de ce composé sur colonne chromatographique basse pression (préparation et conditionnement de la même manière que dans le paragraphe 3.6.3) a ensuite pu être testé. Le méthylthioéther, non détecté dans la première fraction de 25 ml d'hexane, est élué à 100% dans la fraction de 20 ml d'hexane:toluène 60:40 et de 25 ml d'hexane chloroforme 40:60. Le composé est absent de la fraction #4 chloroforme:méthanol 90:10.

4.3.3 Procédure adoptée

La désulfurisation douce est réalisée suivant la procédure d'Adam *et al.* (2000). Quelques modifications ont été apportées par rapport à l'extraction, c'est pourquoi la procédure est reprise ici. Typiquement 30 ml d'éther:méthanol 1:1 sont utilisés pour dissoudre 200 mg d'extrait organique total (EOT). 400 mg d'éthane thiol et 600 mg de méthylate de sodium sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité pendant 3 heures sous azote. 5 ml de CH₃I sont ensuite ajoutés et la réaction est menée 45 minutes de plus. Les solvants sont évaporés sous chapelle puis 30 ml d'éther:méthanol 1:1 sont ajoutés en plus de 600 mg de méthylate de sodium et 5 ml de CH₃I. La réaction est poursuivie 45 minutes sous azote. Cette dernière opération est effectuée pour transformer les éventuels thiols résiduels en thioéthers. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé sous chapelle puis extrait 2 fois avec 15 ml de méthanol:dichlorométhane 1:3 et 2 fois avec 15 ml de dichlorométhane. Après centrifugation à 4000 tours/min. pendant 2 minutes, les surnageants sont évaporés sous pression réduite et le résidu est fractionné sur colonne chromatographique basse pression (préparation et conditionnement similaire au paragraphe 3.6.3). La première fraction de 25 ml d'hexane est écartée. La seconde fraction de 25 ml d'hexane:chloroforme 40:60 qui contient les méthylthioéthers est évaporée sous pression réduite avant l'analyse par GC-MS.

5 Analyse quantitative

5.1 Quantification des stérols et des stérènes

5.1.1 Standards internes

Afin de quantifier les stérols et stérènes, le 5 α -androstane et le 5 α -androstan-3 β -ol ont été utilisés comme standards internes. L'extraction d'un sédiment de surface du lac de Cadagno a confirmé l'absence de ces composés synthétiques. Ajoutés au début de l'extraction du sédiment à la phase acétone, ces deux standards permettent de se soustraire des pertes éventuelles au cours des différentes procédures de séparation.

5.1.2 **Standard externe**

Pour calculer le rendement global de la procédure de séparation, un standard externe, l'acétate de 5 α -androstane-3 β -ol, est ajouté juste avant injection sur GC. Une courbe de calibration a été établie au début de chaque journée d'analyses à partir de standards contenant des quantités croissantes de 5 α -androstane et de 5 α -androstane-3 β -ol et une quantité constante d'acétate de 5 α -androstane-3 β -ol. Ainsi le rendement moyen pour la procédure de séparation est de 59 % (déviations standard: 15%) pour le 5 α -androstane et de 87 % (déviations standard: 13%) pour le 5 α -androstane-3 β -ol. Le rendement des hydrocarbures stéroïdiens est inférieur à celui des stérols en raison de l'étape supplémentaire d'inclusion sur tamis moléculaire. Il faut remarquer que même si ces valeurs de rendements sont peu élevées, la précision des quantifications est garantie par l'utilisation des standards internes.

5.1.3 **Quantification par GC-FID**

Dans le cas des stérènes la quantification a été réalisée en calculant le rapport entre le stérène et le 5 α -androstane. Ce rapport, multiplié par la quantité de 5 α -androstane initialement ajoutée, permet de connaître à un facteur $Rf_{\text{Stérènes}}$ près (Facteur de réponse) la quantité du stérène correspondant. De manière générale, le $Rf_{A \rightarrow B}$ correspond à la constante que multiplie la pente de la droite de régression de la courbe de calibration d'un composé B pour donner la pente correspondante au composé A. Si le $Rf_{A \rightarrow B}$ est égal à 1, les droites de régression des deux composés seront les mêmes. Dans ce travail, les quantifications ont été faites sur la base des surfaces des pics chromatographiques enregistrés avec un détecteur à ionisation de flamme (FID). La réponse du détecteur FID est proportionnelle au nombre de carbones présents dans la molécule et à la quantité de celle-ci. La quantification par GC-FID de composés d'une même famille tels que les stérènes avec un nombre de carbones variant peu (C₂₇ à C₂₉) donne des pentes des droites de régression des courbes de calibration pratiquement égales. Pour cette raison il est courant d'approximer le Rf à 1 entre ces composés. Par contre, le $Rf_{\text{Stérènes}}$ permettant de passer du 5 α -androstane en C₂₁ à un stérène en C₂₇ à C₃₀ doit être déterminé. Le 5 α -cholestane, produit commercial répandu et peu coûteux, a été choisi pour calculer le $Rf_{\text{Stérènes}}$. Le calcul du facteur $Rf_{\text{Stérènes}}$ a été effectué au début de chaque journée d'analyses en injectant un mélange de 5 α -androstane et de 5 α -cholestane en quantités connues. Le $Rf_{\text{Stérènes}}$ a été calculé par le rapport de l'aire du 5 α -androstane sur sa concentration divisé par le rapport de l'aire du pic du 5 α -cholestane sur sa concentration à partir d'une seule injection de standards. Cette détermination conserve une précision élevée comparée au calcul par le rapport des pentes des droites de

calibration du 5 α -androstane et du 5 α -cholestane. En effet, l'injection simultanées de ces deux composés aboutit à un rapport des aires variant de moins de 5% d'une injection à l'autre.

Ce qui précède pour les stérènes est transposable aux stérols. Le cholestérol a été utilisé pour calculer le $R_{f\text{Stérols}}$ par rapport au 5 α -androstane-3 β -ol.

5.1.4 Quantification par GC-MS

La quantification de certains composés n'a pas été possible par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) en raison de coélution. Dans ce cas, une quantification approximative a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les composés concernés ont été reportés avec la mention (GC-MS) dans les tableaux et figures correspondantes. Ils ont été quantifiés par rapport à un de leur composé homologue également présent dans la fraction. Ce dernier, défini en tant que composé de référence, possède la propriété d'être parfaitement séparé et quantifié précisément par GC-FID. Un ou plusieurs ions spécifiques à la série homologue ont été utilisés pour obtenir les fragmentogrammes correspondant au composé de référence et au composé coéluant. Pour les Δ^2 -stérènes par exemple, les ions intenses à m/z 316, 330 et 344 caractéristiques de la double liaison en position 2 du 5 α -cholest-2-ène, du 24-méthyl- et du 24-éthyl-5 α -cholest-2-ène respectivement ont été utilisés pour quantifier ces deux derniers stérènes par rapport au 5 α -cholest-2-ène. Ainsi, connaissant l'aire du pic du composé de référence A_r (correspondant au fragmentogramme m/z 316 dans le cas des Δ^2 -stérènes) ainsi que sa quantité C_r (obtenu par GC-FID) et l'aire du pic du composé homologue coéluant A_h (correspondant au fragmentogramme m/z 330 ou 344 pour le 24-méthyl- ou le 24-éthyl-5 α -cholest-2-ène respectivement), la quantité de ce dernier C_h a pu être calculée par $C_r/A_r * A_h * R_f$. Dans ce calcul, le facteur de réponse R_f (précédemment décrit, cf. § 5.1.3) a été approximé à 1 entre homologues d'une série.

La quantité du second composé coéluant peut être enfin obtenue par différence connaissant la quantité totale et précise correspondant au pic GC-FID des deux composés coéluant et la quantité de l'un des composés coéluant calculée précédemment par GC-MS.

La méthode de quantification par GC-MS est détaillée pour chaque composé concerné dans le Tableau 2.5.

Composé quantifié par GC-MS	Composé de référence/Composé coéluant	Méthode utilisée
24-méthylcholest-5-én-3β-ol (O12)	cholest-5-én-3β-ol (O4)	<i>m/z</i> M, M-15
24-éthylcholest-5-én-3β-ol (O20)	cholest-5-én-3β-ol (O4)	<i>m/z</i> M, M-15
24-méthyl-5α-cholestan-3α-ol? (O7)	5α-cholestan-3β-ol (O5)	<i>m/z</i> M
24-méthyl-5α-cholestan-3β-ol (O13)	5α-cholestan-3β-ol (O5)	<i>m/z</i> M
23,24-diméthyl-5α-cholestan-3β-ol (O21)	5α-cholestan-3β-ol (O5)	<i>m/z</i> M, M-15
24-éthyl-5α-cholestan-3β-ol (O22)	5α-cholestan-3β-ol (O5)	<i>m/z</i> M, M-15
24-méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol	24-méthyl-5α-cholestan-3α-ol? (O7)	Différence
23,24-diméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (O16)	24-méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol? (O8)	<i>m/z</i> M
24-éthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (O17)	24-méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol? (O8)	<i>m/z</i> M
24-éthylcholesta-5,22E-diène-3β-ol (O15)	23,24-diméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (O16)	Différence
24-méthyl-5α-cholest-2-ène (N24)	5α-cholest-2-ène (N4)	<i>m/z</i> 316, 330
24-éthyl-5α-cholest-2-ène (N44)	5α-cholest-2-ène (N4)	<i>m/z</i> 316, 344
5α-cholest-3-ène (N7)	24-éthyl-5α-cholest-3-ène? (N47)	<i>m/z</i> M
24-méthylcholesta-3,5-diène (N37)	cholesta-3,5-diène (N16)	<i>m/z</i> M, M-15
24-éthylcholesta-3,5-diène (N48)	cholesta-3,5-diène (N16)	<i>m/z</i> M, M-15
Hop-17(21)-ène (T5)	24-éthylcholesta-3,5-diène (N48)	Différence

Tableau 2.5: Méthode de quantification par GC-MS employée pour les composés concernés. La colonne intitulée "Composé de référence/ Composé coéluant" indique le composé de référence utilisé lorsque les ions sont précisés dans la colonne intitulée "Méthode utilisée". Dans le cas contraire, elle indique le premier composé coéluant qui a été utilisé pour quantifier par différence le second composé coéluant précisé dans la colonne intitulée "Composé quantifié par GC-MS". Remarque: l'identification des composés est détaillée dans la Troisième Partie.

5.2 Quantification des composés différents des stérols et stéranes

La quantification d'autres composés tels que les hydrocarbures acycliques ou les triterpénoïdes a été effectuée directement à partir des standards internes que sont le 5α-androstane ou le 5α-androstan-3β-ol. La quantification est donc effectuée à un facteur R_f près. Dans le cas des hopanoïdes, le R_f_{hopanoïdes} a été approximé au R_f_{stéroïdes} quasi identique. Dans le cas où aucun standard interne n'est présent dans la fraction analysée, le standard externe est utilisé pour obtenir une quantification approchée en combinaison avec le rendement obtenu pour la fraction des stérols.

5.3 Dérivatisation

Les stérols sont dérivatisés en triméthylsilyle éthers avant injection sur GC ou GC-MS au moyen d'un réactif prêt à l'emploi BSTFA + 1% TCS (N,O-Bis(triméthylsilyl)-trifluoracetamide + 1% de Triméthylchlorosilane) disponible chez Fluka. Un volume égal de ce mélange (50 µl) et des stérols dissous dans du chloroforme sont placés dans une ampoule scellée. La réaction est menée à 80 °C pendant une heure. En raison de la très grande volatilité du réactif BSTFA, il est très difficile de sceller les ampoules classiques au bec Bunsen sans aboutir à des pertes considérables. Pour parer ce problème la plus grosse ouverture d'une pipette pasteur est bouchée dans la flamme d'un bec Bunsen. La seconde ouverture se trouve alors suffisamment éloignée de la base de l'ampoule obtenue pour que celle-ci puisse être scellée sans aucune perte. L'acétate de 5 α -androstane-3 β -ol (Steraloids) utilisé comme standard externe est ajouté après dérivatisation. Le coefficient de corrélation des droites de calibration obtenues pour le 5 α -androstane-3 β -ol (Stérols) dépasse 0.995. Il est à noter que la 5 α -androstane-3-one choisie dans des essais préliminaires comme standard externe a finalement été rejetée. La température élevée de l'injecteur (315 °C) ainsi que l'équilibre céto-énolique conduisant au 5 α -androst-2-én-3 β -ol et au 5 α -androst-3-én-3 β -ol ont été responsables de la formation en faibles quantités des éthers triméthylsilylés correspondants.

5.4 Conditions d'analyses

5.4.1 *Importance des dimensions des colonnes GC employées*

Les dimensions de la colonne utilisée en chromatographie en phase gaz ont leur importance pour obtenir une bonne corrélation entre les chromatogrammes GC et GC-MS. En raison du haut vide régnant à la sortie de la colonne, une colonne de diamètre intérieur 0.32 mm n'a pas pu être couplée au spectromètre de masse VG Masslab Trio 2. En effet la vitesse linéaire du gaz porteur dans la colonne installée sur l'instrument est trop élevée par rapport à celle mesurée sur une colonne identique installée sur un chromatographe en phase gaz, ceci malgré l'augmentation consécutive de la pression de tête. Une colonne de diamètre intérieur 0.25 mm a permis d'obtenir une vitesse linéaire du gaz porteur identique (0.35 m/s) en GC et GC-MS pour une pression de tête de 140 et 85 kPa respectivement. Dans ces conditions les chromatogrammes obtenus sur les deux instruments sont superposables.

5.4.2 Conditions d'analyses

Les analyses qualitatives des sédiments ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 couplé à un spectromètre de masse VG Masslab Trio 2 balayant les masses de 45 à 700 amu avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Le gaz vecteur est l'hélium (85 kPa). Les températures de l'injecteur, de la ligne de transfert et de la source ont été fixées à 315, 300 et 200 °C respectivement. La colonne utilisée est une DB-5 (J&W, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm). L'injection des échantillons est effectuée en mode splitless. Les purges du septum et de l'injecteur sont réglées à 3 et 10 ml par minute respectivement. Le programme de température du four est de 80 °C pendant une minute suivi par un chauffage de 15 °C/min jusqu'à 150 °C et de 2.5 °C/min jusqu'à 300 °C. Cette dernière température est finalement maintenue pendant 35 minutes.

Les analyses quantitatives ont été effectuées avec un chromatographe Trace GC 2000 Series (Thermo Quest, CE Instruments) muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'instrument utilise les mêmes conditions d'analyses que ci-dessus excepté pour les paramètres qui suivent. La pression de tête de l'hélium est de 140 kPa. Le détecteur à la température de 315 °C est alimenté par de l'hydrogène à 50 kPa et de l'air à 150 kPa.

6 Analyse du TOC

6.1 Principe

La détermination de la teneur en carbone organique est réalisée à l'aide d'un instrument qui mesure la quantité de CO₂ dégagée lors de la combustion de l'échantillon. L'instrument est muni d'un détecteur Infra-Rouge pour la mesure du CO₂. La combustion de l'échantillon est effectuée en présence d'oxygène ultra pur (> 99.999%). Les gaz de combustion sont passés à travers un catalyseur de combustion à base d'oxyde de cobalt, de platine et d'alumine. L'analyse du carbone total (TC) est réalisée par combustion entre 900 et 980 °C. L'analyse du carbone minéral total (TIC) (CO₃²⁻, HCO³⁻, CO₂, CO, CN⁻, OCN⁻, SCN⁻, C₂²⁻, C⁴⁻, carbone élémentaire) est effectuée en présence d'un acide concentré (H₃PO₄ 85%) entre 200 et 250 °C. Le carbone organique total (TOC) peut dès lors être calculé de deux manières. Il peut être mesuré après élimination du carbone minéral total en passant l'échantillon à 200-250 °C au four en présence d'acide concentré

puis en mesurant le CO₂ libéré à haute température (900-980 °C). Une autre méthode consiste à mesurer le TIC puis le TC et obtenir le TOC par différence c'est à dire $TOC = TC - TIC$.

6.2 Mise au point de la méthode d'analyses

L'appareil utilisé pour les analyses de TOC est le SSM-5000A couplé au TOC-5000A fabriqués par Shimadzu. Les sédiments à analyser ont tous été préalablement lyophilisés puis broyés au mortier. Les courbes de calibration ont été élaborées à l'aide d'acide oxalique dihydrate (Fluka) pour l'analyse du TC et de carbonate de sodium anhydre (Nacalai Tesque, Japon) pour le TIC. Les creusets dans lesquels sont effectués les combustions des échantillons ont été préalablement calcinés à 900 °C pendant 2 heures puis stockés dans un récipient en verre fermé préalablement lavé avec HCl 1 M. Les pincettes utilisées pour manipuler les creusets ont été chauffées dans la flamme d'un bec Bunsen avant utilisation.

L'analyse directe du TIC d'un sédiment de surface de 50 mg à l'aide de 0.4 ml d'acide phosphorique à 85% (Shimadzu, recommandé par le fabricant) n'a pas conduit à un pic franc permettant une quantification. La méthode différentielle de mesure du TOC ($TOC=TC-TIC$) a donc été abandonnée. La méthode directe a dès lors été adoptée. Le sédiment a été soumis dans un premier temps à un chauffage à 200-250 °C en présence d'acide phosphorique concentré afin d'éliminer le carbone minéral. Dans un second temps, ce même échantillon a été placé dans le four à la température de 900-980 °C afin de mesurer la teneur en carbone organique total. Toutefois l'acide phosphorique porté à près de 1000 °C se transforme en une mousse débordant en partie du creuset contenant l'échantillon. La réduction du volume d'acide phosphorique à 85% ou sa dilution n'a pas permis de résoudre ce problème. L'utilisation de fibres céramiques inertes pour empêcher ce débordement n'a pas été concluant. De plus, après un certain nombre de mesures, l'utilisation d'acide phosphorique à haute température a provoqué l'empoisonnement partiel du catalyseur conduisant à des mesures de moins en moins précises. L'usage d'acide phosphorique a donc été abandonné au profit de l'acide chlorhydrique qui est sans effet sur le catalyseur. Ce dernier a été remplacé au même moment.

6.3 Procédure adoptée

La procédure adoptée utilise trois standards d'acide oxalique dihydrate de masse 5, 10 et 15 mg. La courbe de calibration obtenue possède un coefficient de corrélation supérieur à 0.99. 10 à 100

mg de sédiment lyophilisé et broyé sont mouillés à l'aide de 0.4 ml d'HCl 6N puis passés au four à 200-250 °C sous un courant d'oxygène. Le creuset contenant l'échantillon est ensuite passé à 900-980 °C pour analyse du TOC.

7 Conclusion

Cette deuxième partie a permis de passer en revue chaque étape de la procédure expérimentale depuis le carottage jusqu'à la quantification finale d'un biomarqueur précis. Cette connaissance du mode opératoire, indispensable avant toute interprétation des résultats de la troisième partie, permet de mieux cerner certains inconvénients liés à une procédure expérimentale spécifique. La réaction de désulphurisation par $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$, qui conduit à différentes réactions parasites, peut être citée à titre d'exemple. L'élimination des hydrocarbures linéaires par inclusion sur un nouveau type de tamis moléculaire rend également compte des effets discriminatoires associés avec d'anciens tamis. Les problèmes de pertes engendrés par l'élimination du soufre élémentaire, problème résolu dans cette seconde partie, est un autres exemple illustrant les faiblesses inhérentes à certaines procédures expérimentales.

8 Références

Adam P., Mycke B., Schmid J. C., Connan J. et Albrecht P. (1992) Steroid moieties attached to macromolecular petroleum fraction via di- or polysulfide bridges. *Energy & Fuels* **6**, 553-559.

Adam P., Schneckenburger P., Schaeffer P. et Albrecht P. (2000) Clues to early diagenetic sulfurization processes from mild chemical cleavage of labile sulfur-rich geomacromolecules. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 3485-3503.

Adam P., Schmid J. C., Albrecht P. et Connan J. (1991) 2 α - and 3 β -steroid thiols from reductive cleavage of macromolecular petroleum fraction. *Tetrahedron Letters* **32**, 2955-2958.

Armanios C., Alexander R., Kagi R. I., Skelton B. W. et White A. H. (1995) Occurrence of 28-nor-18 α -oleanane in the hydrous pyrolysate of a lignite. *Organic Geochemistry* **23**, 21-27.

Audino M., Grice K., Alexander R. et Kagi R. I. (2001) Macrocyclic-alkanes: a new class of biomarker. *Organic Geochemistry* **32**, 759-763.

Audino M., Grice K., Alexander R. et Kagi R. I. (2002) Macrocyclic alkanes in crude oils from the algaenan of *Botryococcus braunii*. *Organic Geochemistry* **33**, 979-984.

Barakat A. O. & Rullkötter J. (1995) The distribution of free organic sulfur compounds in sediments from the Noerdlinger Ries, southern Germany. *ACS Symp. Ser.* **612**, 311-331.

Bechtel A., Shieh Y. N., Pervaz M. et Puttmann W. (1996) Biodegradation of hydrocarbons and biogeochemical sulfur cycling in the salt dome environment: inferences from sulfur isotope and organic geochemical investigations of the Bahloul formation at the Bou Grine Zn/Pb ore deposit, Tunisia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 2833-2855.

Behrens A., Schaeffer P. et Albrecht P. (1997) 14 β ,22R-epithiosteranes, a novel series of fossil steroids widespread in sediments. *Tetrahedron Letters* **38**, 4921-4924.

Blum O. (1999) Etude de la diagenèse des acides gras dans des milieux sédimentaires. Potentiel des acides gras hydroxylés et des acides gras insaturés comme indicateurs moléculaires paléoenvironnementaux. Thèse, Université de Genève.

Corniolet Y. A. (1988) Géochimie des hydrocarbures dans des sédiments anciens du bassin lémanique Thèse, Université de Genève.

Fazeelat T., Alexander R. et Kagi R. I. (1995) Molecular structures of sedimentary 8,14-secohopanes inferred from their gas chromatographic retention behaviour. *Organic Geochemistry* **23**, 641-646.

Giacometti J., Milosevic A. et Milin C. (2002) Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography, A* **976**, 47-54.

Grice K., Schaeffer P., Schwark L. et Maxwell J. R. (1996) Molecular indicators of palaeoenvironmental conditions in an immature Permian shale (Kupferschiefer, Lower Rhine Basin, north- west Germany) from free and S-bound lipids. *Organic Geochemistry* **25**, 131-147.

Grice K., Schouten S., Nissenbaum A., Charrach J. et Sinninghe Damsté J. (1998) A remarkable paradox: Sulfurised freshwater algal (*Botryococcus braunii*) lipids in an ancient hypersaline euxinic ecosystem. *Organic Geochemistry* **28**, 195-216.

Grossi V., Hirschler A., Raphel D., Rontani J. F., De Leeuw J. W. et Bertrand J. C. (1998) Biotransformation pathways of phytol in recent anoxic sediments. *Organic Geochemistry* **29**, 845-861.

Hartgers W. A., Lopez J. F., De Las Heras F. X. C. et Grimalt J. O. (1996) Sulphur-binding in recent environments.1. Lipid by-products from Ni₂B desulphurization. *Organic Geochemistry* **25**, 353-365.

Hennion M. C. (1999) Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* **856**, 3-54.

Hofmann I. C., Hutchison J., Robson J. N., Chicarelli M. I. et Maxwell J. R. (1992) Evidence for sulphide links in a crude oil asphaltene and kerogens from reductive cleavage by lithium in ethylamine. *Organic Geochemistry* **19**, 371-387.

Hopfgartner G. (1991) Géochimie organique: Recherches sur l'extraction de la matière organique des sédiments par des fluides supercritiques. Etude de marqueurs biologiques dans des sédiments Jurassiques du Toarcien et du Kimmeridgien. Thèse, Université de Genève.

Innes H. E., Bishop A. N., Fox P. A., Head I. M. et Farrimond P. (1998) Early diagenesis of bacteriohopanoids in recent sediments of Lake Pollen, Norway. *Organic Geochemistry* **29**, 1285-1295.

Kaufmann B. & Christen P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical Analysis* **13**, 105-113.

Kenig F., Sinninghe Damsté J., Dalen A. C. K., Rijpstra W. I. C., Huc A. Y. et De Leeuw J. W. (1995a) Occurrence and origin of mono-, di-, and trimethylalkanes in modern and holocene cyanobacterial mats from Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 2999-3015.

Kenig F., Sinninghe Damsté J., Frewin N. L., Hayes J. M. et De Leeuw J. W. (1995b) Molecular indicators for palaeoenvironmental change in a messinian evaporitic sequence (Vena Del Gesso, Italy). 2. High-resolution variations in abundances and ¹³C contents of free and sulphur-bound carbon skeletons in a single marl bed. *Organic Geochemistry* **23**, 485-526.

Klink G. (1994) Analyse des lipides de plantes aquatiques et recherche de l'origine des 4-méthyl-stérols. Application de l'extraction en phase supercritique aux stérols et aux acides gras. Thèse, Université de Genève.

Kodba Z. C. & Marsel J. (1999) Microwave assisted extraction and sonication of polychlorobiphenyls from river sediments and risk assessment by toxic equivalency factors. *Chromatographia* **49**, 21-27.

Kohnen M. E. L., Sinninghe Damsté J., Kock Van Dalen A. C. et De Leeuw J. W. (1991) Di- or polysulfide-bound biomarkers in sulfur-rich geomacromolecules as revealed by selective chemolysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **55**, 1375-1394.

- Leif R. N. & Simoneit B. R. T. (2000) The role of alkenes produced during hydrous pyrolysis of a shale. *Organic Geochemistry* **31**, 1189-1208.
- Letellier M. & Budzinski H. (1999) Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* **27**, 259-271.
- Lopez-Avila V., Young R. et Beckert W. F. (1994) Microwave-Assisted Extraction of Organic Compounds from Standard Reference Soils and Sediments. *Analytical Chemistry* **66**, 1097-1106.
- Mastalerz M., Kvale E. P., Stankiewicz B. A. et Portle K. (1999) Organic geochemistry in Pennsylvanian tidally influenced sediments from SW Indiana. *Organic Geochemistry* **30**, 57-73.
- McCarthy R. D. & Duthie A. H. (1962) A rapid quantitative method for the separation of free fatty acids from other lipids. *J.Lipid Research* **3**, 117-119.
- Prahl F. G., Pinto L. A. et Sparrow M. A. (1996) Phytane from chemolytic analysis of modern marine sediments: a product of desulfurization or not? *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 1065-1073.
- Putschew A., Scholz-Böttcher B. M. et Rullkötter J. (1996) Early diagenesis of organic matter and related sulphur incorporation in surface sediments of meromictic lake Cadagno in the Swiss Alps. *Organic Geochemistry* **25**, 379-390.
- Richnow H. H., Jenisch A. et Michaelis W. (1993) The chemical structure of macromolecular fractions of a sulfur-rich oil. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 2767-2780.
- Riffé C. (1994) Biodégradabilité de polluants organiques dans les sols. Suivi de produits issus de boues de curages. Thèse, Université de Poitiers.
- Sachsenhofer R. F., Curry D. J., Horsfield B., Rantitsch G. et Wilkes H. (1995) Characterization of organic matter in late cretaceous black shales of the eastern alps (Kainach Gosau group, Austria). *Organic Geochemistry* **23**, 915-929.
- Schaeffer P., Reiss C. et Albrecht P. (1995) Geochemical study of macromolecular organic matter from sulfur-rich sediments of evaporitic origin (messinian of Sicily) by chemical degradations. *Organic Geochemistry* **23**, 567-581.
- Schmid J. C. (1986) Marqueurs biologiques soufrés dans les petroles Thèse, PhD thesis.
- Schouten S., Pavlovic D., Sinninghe Damsté J. et De Leeuw J. W. (1993) Nickel boride: an improved desulphurizing agent for sulphur-rich geomacromolecules in polar and asphaltene fractions. *Organic Geochemistry* **20**, 901-909.
- Schouten S., Sinninghe Damsté J., Baas M., Kock Van Dalen A. C., Kohnen M. E. L. et De Leeuw J. W. (1995) Quantitative assessment of mono- and polysulphide-linked carbon skeletons in sulphur-rich macromolecular aggregates present in bitumens and oils. *Organic Geochemistry* **23**, 765-775.
- Simoneit B. R. T., Leif R. N. et Ishiwatari R. (1996) Phenols in hydrothermal petroleums and sediment bitumen from Guaymas basin, gulf of California. *Organic Geochemistry* **24**, 377-388.

Sinninghe Damsté J., De Leeuw J. W., Kock Van Dalen A. C., De Zeeuw M., De Lange F., Rijpstra W. I. C. et Schenck P. A. (1987) The occurrence and identification of series of organic sulfur compounds in oils and sediment extracts. I. A study of Rozel Point Oil (U.S.A.). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **51**, 2369-2391.

Sinninghe Damsté J., Schouten S., De Leeuw J. W., Vanduin A. C. T. et Geenevasen J. A. J. (1999) Identification of novel sulfur-containing steroids in sediments and petroleum: Probable incorporation of sulfur into $\Delta^{5,7}$ -sterols during early diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 31-38.

Sparr Eskilsson C. & Bjorklund E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography, A* **902**, 227-250.

Summons R. E., Metzger P., Largeau C., Murray A. P. et Hope J. M. (2002) Polymethylsqualanes from *Botryococcus braunii* in lacustrine sediments and crude oils. *Organic Geochemistry* **33**, 99-109.

Van Kaam Peters H. M. E., Schouten S., De Leeuw J. W. et Sinninghe Damsté J. (1997) A molecular and carbon isotope biogeochemical study of biomarkers and kerogen pyrolysates of the Kimmeridge clay facies: palaeoenvironmental implications. *Organic Geochemistry* **27**, 399-422.

Warton B., Alexander R. et Kagi R. I. (1997) Identification of some single branched alkanes in crude oils. *Organic Geochemistry* **27**, 465-476.

Weast R. C., Astle M. J. et Berger W. H. *Handbook of Chemistry and Physics*. Weast, R. C., Astle, M. J., and Berger, W. H., CRC Press, Inc. (1988).

West N., Alexander R. et Kagi R. I. (1990) The use of silicalite for rapid isolation of branched and cyclic alkane fractions of petroleum. *Organic Geochemistry* **15**, 499-501.

Wollrab V. & Streibl M. *Organic Geochemistry. Methods and Results*. Ed. Eglinton, G. & Murphy, M. T. J., Springer-Verlag (1969). Earth waxes, Peat, Montan Wax and Other Organic Brown Coal Constituents. 576-598.

Wünsche L. (1987) Géochimie des lipides neutres et diagénèse précoce des stérols dans des sédiments du bassin lémanique. Thèse, Université de Genève.

Troisième partie:
Analyse géochimique
des sédiments du lac de Cadagno
&
Étude de la cinétique
de déshydratation des stérols

1 Introduction

Dans cette troisième partie l'interprétation géochimique des résultats expérimentaux ainsi qu'une étude cinétique de la transformation des stérènes en stérols sont traitées.

Après avoir exposé le profil du carbone organique total de la carotte sédimentaire, les résultats d'un examen en microscopie optique de quelques niveaux caractéristiques de la carotte sédimentaire sont discutés. Les résultats d'analyses des hydrocarbures linéaires, du pristane et du phytane, des triterpénoïdes pentacycliques et des stéroïdes sont présentés et leur variation le long de la carotte sont interprétées en termes de modifications des conditions de déposition. Les résultats d'analyses de certains de ces lipides sont également reportés pour les algues macroscopiques *Chara* proliférant dans le lac de Cadagno ainsi que pour un mélange de plantes herbacées collecté à ses abords.

Le second but de ce travail consiste en l'étude de la diagenèse précoce des stérols, et plus particulièrement de la cinétique de leur déshydratation. Les variations des rapports "stérène/stérol" en fonction de la profondeur sont ainsi discutées à la suite de l'analyse géochimique précédente.

2 Carbone organique total (TOC) le long de la carotte sédimentaire

Les variations de la teneur en Carbone Organique Total (TOC) le long de la carotte sédimentaire sont représentées sur la Figure 3.1. En 1995, Putschew *et al.* (1995) ont reporté la variation du TOC d'une carotte anoxique de 36 cm de longueur également prélevée à une profondeur de 21 mètres dans le lac de Cadagno. Cependant, bien que les teneurs en TOC soient du même ordre de grandeur que celles obtenues dans ce travail, le profil de variation est sensiblement différent. Ce dernier est difficilement superposable à celui de la Figure 3.1 même si le décalage séparant les dates de prélèvement des deux carottes est pris en compte. Par contre, il est tout de même possible de distinguer un minimum global à 19 cm. L'emplacement exact et la nature meuble du sédiment peuvent expliquer, au moins en partie, les différences de position du minimum global de TOC dans la carotte de Putschew *et al.* (1995) et dans celle analysée dans le cadre de cette étude.

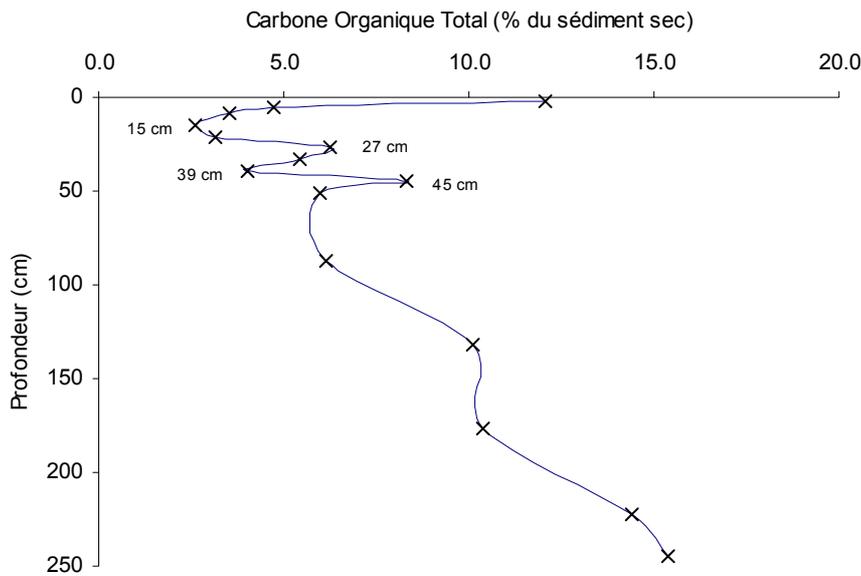


Figure 3.1: Variation de la teneur en carbone organique total de la carotte sédimentaire avec la profondeur.

La diminution du TOC dans les 15 premiers cm du sédiment est suivie par des variations brusques jusqu'à 51 cm puis par une augmentation plus ou moins régulière jusqu'à 245 cm. Parmi les hypothèses expliquant ces variations, et plus particulièrement celles entre 15 et 51 cm, peut être envisagé un changement du taux de sédimentation. Ce dernier est notamment influencé par les apports clastiques de matières minérales. Or le lac est entouré de hautes montagnes (>2600 m d'altitude) avec des parois abruptes conduisant à de très fortes avalanches de neige. Une avalanche dévastatrice a notamment été signalée par les habitants de la vallée en 1951. Elle atteignit le lac après avoir détruit une vingtaine de bâtisses en pierre situées sur la pente Nord-Nord-Ouest. Les apports clastiques conséquents liés à ce type d'avalanches sont à même de modifier significativement le taux de sédimentation. Ce dernier peut également être influencé par des crues de torrents, voire des glissements de terrain qui auraient été plus fréquents lors de la déposition des sédiments entre 15 et 51 cm.

Des examens en microscopie optique de plusieurs niveaux de la carotte ont été réalisés pour étayer cette hypothèse. Des frottis de sédiments ont permis d'étudier au microscope les constituants sédimentaires. Dans une deuxième phase, une attaque à l'HF à 70% suivie de lavage et de séparation à la liqueur lourde ($ZnCl_2$) a permis de concentrer la matière organique de chaque niveau pour son observation en microscopie optique (préparation palynologique, Steffen et Gorin, 1993).

3 Examen au microscope optique de la carotte sédimentaire

3.1 Résultats

Les vues caractéristiques au microscope optique des niveaux 6-12, 12-18, 18-24, 24-30, 129-135 et 260-270 cm de la carotte sédimentaire sont exposées sur les Figures 3.2 et 3.3.

La tranche 6-12 cm révèle un sédiment contenant une matière minérale constituée en grande majorité par les diatomées. Des cristaux de silicates présents en faibles quantités peuvent également être mis en évidence. Ceci témoigne d'un apport terrestre faible comparé à l'apport autochtone.

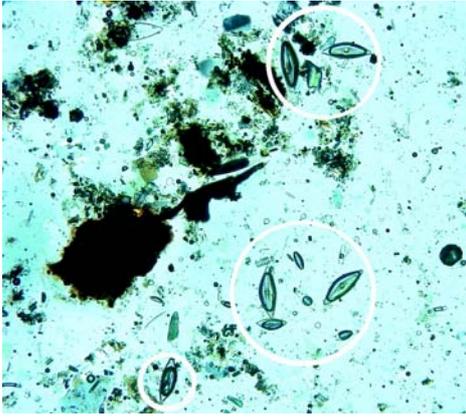
Le niveau 12-18 cm est par opposition riche en matière minérale constituée notamment de silicates. Les diatomées ne représentent qu'une faible fraction de l'échantillon indiquant une contribution limitée des apports autochtones. Des amas de cuticules, des débris grossiers de lignine et des pollens sont la preuve d'apports de plantes supérieures peu dégradées par les bactéries.

Le tranche 18-24 cm s'apparente à la précédente. Néanmoins la proportion des diatomées est légèrement plus importante que dans la tranche 12-18 cm.

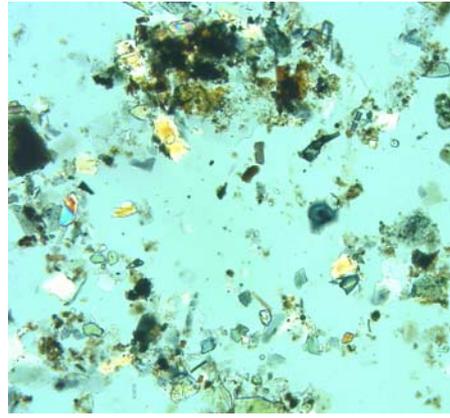
La tranche 24-30 cm possède des similitudes avec la tranche 6-12 cm. Elle contient essentiellement des diatomées, preuve d'une forte contribution autochtone. Des silicates en faibles quantités peuvent être identifiés. Quelques débris ligneux et pollens sont également observés témoignant de faibles apports allochtones. La matière organique amorphe pyritisée est représentative d'une activité bactérienne conséquente.

La tranche 129-135 cm se distingue par l'absence de diatomées mais la présence de dinoflagellés lacustres. L'apport autochtone apparaît donc différent des niveaux décrits ci-dessus. Des cuticules et fragments ligneux sont représentatifs d'un apport allochtone conséquent. La présence de quantités significatives de pyrite indique l'activité conséquente des bactéries sulfatoréductrices.

Enfin la tranche 260-270 cm contient elle aussi une proportion significative de dinoflagellés lacustres. Des débris ligneux ainsi que des pollens de conifères ont également été identifiés témoignant d'apports allochtones. La matière organique amorphe et pyritisée est représentative d'un remaniement bactérien important. Ce dernier est plus intense que pour la tranche 129-135 cm.



(a) Tranche 6-12 cm: Matière organique en présence de diatomées (cercles).



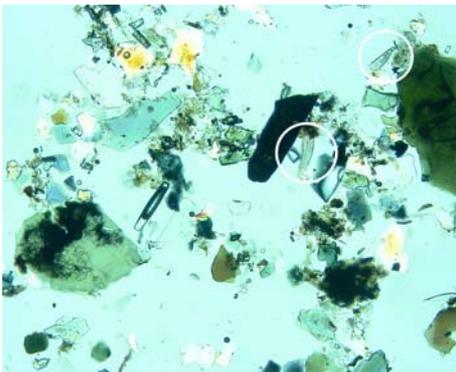
(b) Tranche 12-18 cm: Cristaux de silicates accompagnés de matière organique (matière de couleur sombre)



(c) Tranche 12-18 cm, résidu palynologique: Débris de cuticule préservée.



(d) Tranche 12-18 cm, résidu palynologique: Pollen (cercle) accolé à un débris de lignine préservée (matière de couleur sombre)



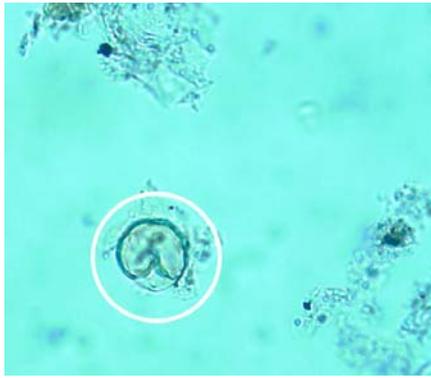
(e) Tranche 18-24 cm: Cristaux de silicates accompagnés de diatomées (cercles) et de matière organique.



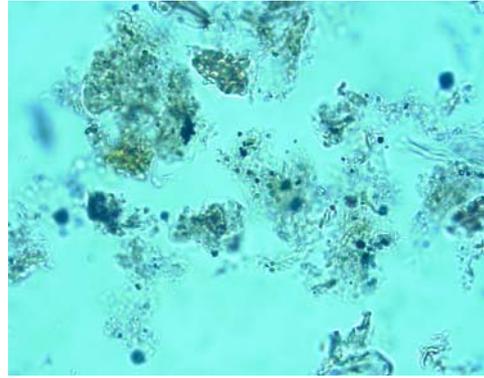
(f) Tranche 24-30 cm: Matière organique en présence de diatomées (cercles)

Remarques: le traitement palynologique consiste en une exposition pendant 24 heures à l'acide fluorhydrique et séparation à la liqueur lourde (ZnCl₂) (Steffen et Gorin, 1993); le grossissement utilisé varie entre 10 et 63 X selon les échantillons.

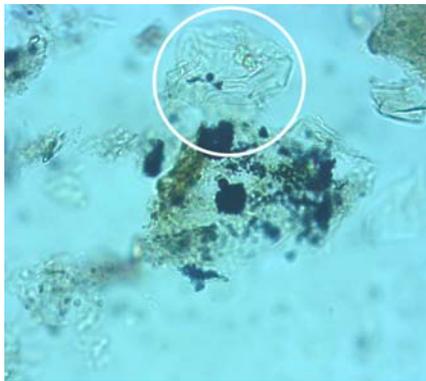
Figure 3.2: Vues au microscope optique des tranches 6-12, 12-18, 18-24 et 24-30 cm, frottis sédimentaires et lames palynologiques.



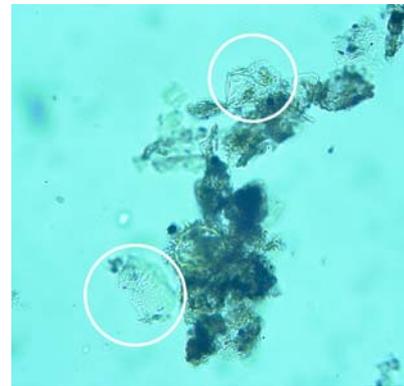
(a) Tranche 24-30 cm, résidu palynologique: Pollen (cercle).



(b) Tranche 24-30 cm, résidu palynologique: Matière organique amorphe pyritisée (les points noirs correspondent à la pyrite).



(c) Tranche 129-135 cm, résidu palynologique: Dinoflagellé (cercle) accolé à un amas de matière organique amorphe (zones plus sombres) pyritisée (points noirs).



(d) Tranche 260-270 cm, résidu palynologique: Pollen de conifère (cercle du bas), dinoflagellés (cercle du haut) et matière organique amorphe (zones sombres) pyritisée (zones noires).

Remarques: le traitement palynologique consiste en une exposition pendant 24 heures à l'acide fluorhydrique et séparation à la liqueur lourde ($ZnCl_2$) (Steffen et Gorin, 1993); le grossissement utilisé varie entre 10 et 63 X selon les échantillons.

Figure 3.3: Vues au microscope optique des tranches 24-30, 129-135 et 260-270 cm, lames palynologiques.

3.2 Interprétation des résultats

Ces résultats peuvent être confrontés avec le profil du TOC.

La tranche 12-18 cm contient des proportions majeures de matière minérale. Cette dernière dilue la matière organique et explique la faible valeur du TOC. Les tranches 6-12 cm et 18-24 cm encadrant la tranche 12-18 cm possèdent des proportions de matière minérale plus faibles et par conséquent des valeurs de TOC plus élevées. L'apport autochtone est également plus important pour ces deux niveaux qui contiennent plus de diatomées. Ces résultats suggèrent que des

apports clastiques dus, par exemple, aux avalanches, aux glissements de terrain (Del Don *et al.*, 2001) ou aux torrents en crue, soient responsables de la dilution de la matière organique du niveau 12-18 cm et de manière moindre des niveaux 6-12 cm et 18-24 cm. Cette dilution, résultat d'un taux de sédimentation beaucoup plus élevé, peut donc expliquer le minimum observé pour la tranche 12-18 cm.

Par opposition le niveau 24-30 cm possède une valeur de TOC élevée. Ceci est compatible avec l'apport autochtone majoritaire de matière organique et les faibles quantités de silicates observés. Cette tranche de la carotte apparaît donc ne pas avoir été perturbée significativement par des apports allochtones clastiques importants.

Les niveaux 129-135 cm et 260-270 cm (tranches dont l'âge est estimé à environ 300 et 600 ans respectivement si l'on se base sur le taux de sédimentation de 4-5 mm donné par Putschew *et al* (1995) pour les premiers 36 cm de la carotte) témoignent d'apports de matière organique mixtes autochtones et allochtones. La valeur de TOC correspondant est élevée. Contrairement à la tranche 12-18 cm, une dilution de la matière organique des niveaux 129-135 cm et 260-270 cm par des apports allochtones de matière minérale clastique grossière n'est pas observée. Ainsi une sédimentation beaucoup plus "calme" non perturbée par de fortes avalanches ou de fortes crues, et un taux de sédimentation plus faible expliquent les valeurs de TOC élevées. Par ailleurs, l'abondance des dinoflagellés lacustres et l'absence de diatomées dans les niveaux 129-135 cm et 260-270 dénotent un changement de la population phytoplanktonique.

Il est également intéressant de noter la présence de pollens de conifères dans la section 260-270 cm. Actuellement il n'y a aucune couverture forestière dans le bassin du lac. Il faut toutefois mentionner la présence de conifères au sud du lac Ritom (Stapfer, 1991). Situés environ 75 mètres en contrebas et à 2 à 3 km de distance du lac de Cadagno, ces pollens sont à des distances compatibles avec un transport éolien. Par ailleurs, une origine de ces pollens du fond de la vallée de Leventina peut également être envisagée (Birch *et al.*, 1996). Néanmoins, l'analyse pollinique d'une carotte provenant d'une tourbière se trouvant en bordure sud du lac a montré que la végétation autour du lac Cadagno s'est modifiée les 500 dernières années (Stapfer, 1991). Les arbres et buissons occupent actuellement 22% des pollens analysés, alors qu'ils représentaient 55% de ces derniers il y a approximativement 500 ans. Ainsi, bien qu'un transport éolien des pollens de conifères ne peut pas être entièrement exclu, l'analyse pollinique suggère fortement que la couverture forestière était plus proche du lac de Cadagno dans le passé voire montait jusqu'en amont.

L'activité des bactéries sulfatoréductrices semble globalement s'intensifier avec la profondeur, parallèlement à la teneur en TOC, si l'abondance de la pyrite dans les niveaux étudiés est

considérée. Ceci est cohérent avec le fait que la production de pyrite peut être influencée par la quantité de matière organique disponible (Berner, 1984).

4 Datation de la carotte

La datation de la carotte anoxique au moyen des deux isotopes radioactifs ^{137}Cs et ^{210}Pb a été tentée par Dr J.-L. Loizeau (Institut F.-A. Forel, Section des Sciences de la Terre, Université de Genève). En ce qui concerne le ^{137}Cs , les pics d'activité correspondant aux années 1963 (essais des armes nucléaires) et 1986 (désastre de Tchernobyl) n'ont pas pu être clairement observés. La diffusion du ^{137}Cs ou une perturbation du sédiment (*p. ex.* brassage) peuvent expliquer ces résultats. Dans le cas du ^{210}Pb , la décroissance dans les 40 premiers cm n'est pas exponentiellement inverse comme attendue, mais irrégulière suggérant à nouveau une perturbation du sédiment.

Une seconde datation en employant les mêmes méthodes que pour la carotte anoxique précédente a été tentée sur une carotte oxiq ue prélevée à 12 mètres de profondeur du côté Nord-Ouest du lac. Cette tentative de datation a également échoué pour les mêmes raisons que celles citées pour la carotte anoxique.

Les échecs de datation sont donc dus à une perturbation des 40 premiers cm de la carotte. Ceci est en accord avec l'interprétation du profil du TOC (*cf.* § 2) et les observations au microscope optique (*cf.* § 3).

La datation d'une carotte anoxique de 50 cm prélevée en 1991 à 21 m a également été reportée par Birch *et al* (1996). Les auteurs ont utilisé les isotopes radioactifs ^{137}Cs et ^{210}Pb pour évaluer l'âge de la carotte. Ils ont estimé, sur la base du ^{137}Cs , le taux de sédimentation à 6 mm/an. Toutefois le pic d'activité correspondant à l'année 1963 apparaît diffus et peu distinct sur le profil d'activité du ^{137}Cs fourni par Birch *et al* (1996). En se basant sur le ^{210}Pb , le taux de sédimentation a été évalué à 4 mm/an malgré le fait que la décroissance exponentielle inverse attendue ait été remplacée par une décroissance linéaire. Les auteurs ont également identifié une turbidite entre 22 et 30 cm en examinant le profil de porosité et de teneur en eau. En prenant pour référence la date de 1951 (correspondant à l'avalanche dévastatrice ayant détruit une vingtaine de maisons en pierre), ils ont pu calculer un taux de sédimentation de 5 mm/an. Ce dernier est jugé par les auteurs comme relativement élevé pour un lac alpin.

Par ailleurs, Putschew *et al.* (1995) cite dans sa publication le taux de sédimentation approximatif de 4 mm/an établi par les travaux de Züllig (1985).

Ces données bibliographiques dénotent une incertitude sur la datation des carottes sédimentaires du lac de Cadagno. En outre, elles appuient l'idée d'une perturbation du sédiment déjà formulée lors de l'interprétation du TOC et des observations au microscope. Pour ces raisons et vu les échecs des tentatives de datation effectuées sur les carottes prélevées dans le cadre de ce travail, il a été préféré de parler en terme de profondeur (cm) plutôt que d'âge de la carotte dans la suite de ce manuscrit. En conséquence, les constantes de vitesse reportées dans le paragraphe 7.5 seront données en cm^{-1} plutôt qu'en année^{-1} .

5 Hydrocarbures acycliques

5.1 Hydrocarbures linéaires saturés

5.1.1 Analyse de plantes herbacées aux abords du lac

L'analyse en lipides d'un mélange de plantes herbacées collecté en juillet 2002 sur le versant Nord-Nord-Ouest du bassin du lac de Cadagno a été menée. Ces plantes supérieures constituent pratiquement la seule source terrestre pour la matière organique du lac. En effet, actuellement aucun arbre, ni bosquet d'arbrisseaux n'est présent sur les pourtours du lac. La distribution des *n*-alcanes présents dans l'échantillon de plantes herbacées est présentée sur la Figure 3.4 (chromatogramme GC-MS associé: Figure 3.5). Elle possède un maximum en C_{29} suivi d'une forte proportion du *n*-alcane en C_{31} et de proportions significatives de C_{23} , C_{25} , C_{27} et C_{33} . Cette distribution des *n*-alcanes avec un nombre de carbones impair axée autour de C_{27} et C_{29} est caractéristique des plantes supérieures (Cranwell, 1982; Meyers, 1997).

Meyers et Ishiwatari (1993) ont montré que les plantes supérieures aquatiques sont caractérisées par une prédominance des *n*-alcanes en C_{21} , C_{23} et C_{25} tandis que les plantes herbacées ont leur maximum en *n*- C_{31} . La distribution des hydrocarbures linéaires saturés dans les feuilles d'arbres s'étalant de C_{27} à C_{31} dépend, par contre, fortement des espèces (Rieley *et al.*, 1991). Le maximum en *n*- C_{29} doit être lié à la végétation d'altitude propre à ce milieu. L'Indice de Carbone Préférentiel (CPI) élevé de 12.2 est compatible avec celui observé pour les plantes supérieures (4-10) (Duan, 2000 et références incluses). Le rapport $(\text{C}_{27}+\text{C}_{29}+\text{C}_{31})/(\text{C}_{17}+\text{C}_{19}+\text{C}_{21})$ très élevé (57) en raison des quantités mineures des hydrocarbures en C_{15} , C_{17} et C_{19} est caractéristique des plantes supérieures (Silliman *et Schelske*, 2003 et références incluses).

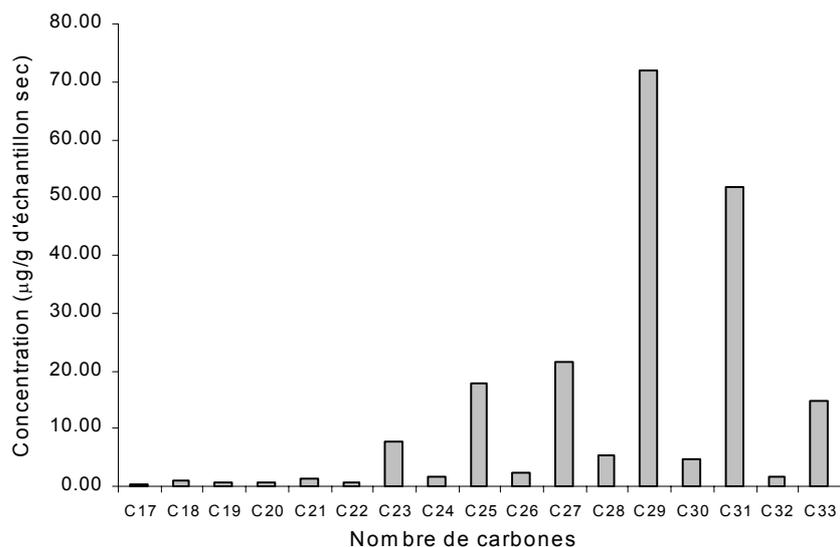


Figure 3.4: Distribution des alcanes linéaires saturés libres de plantes herbacées prélevées sur le versant Nord-Nord-Ouest du bassin du lac de Cadagno.

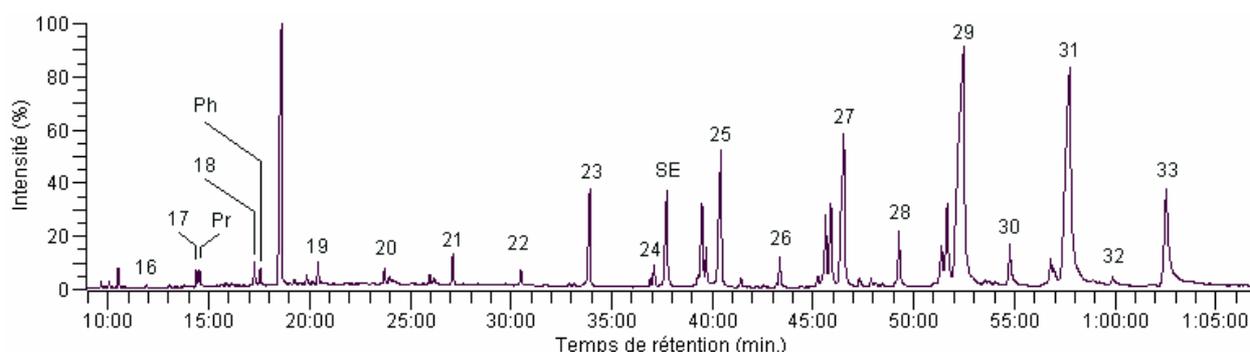


Figure 3.5: Courant ionique total de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" des plantes herbacées prélevées sur le versant Nord-Nord-Ouest du bassin du lac de Cadagno. Conditions d'analyses GC-MS; Colonne: DB-5, J&W, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm; Programme de température: 80°C (1 min.) jusqu'à 150°C à 15°C/min. puis 2.5°C/min. jusqu'à 300°C (20 min.). Signification des abréviations: x: nombre de carbonnes de l'alcane linéaire; Pr: Pristane; Ph: Phytane; SE: Standard Externe (Acétate de 5α-androstan-3β-ol).

5.1.2 Analyse des algues *Chara*

Un échantillon d'algues d'eau douce proliférant dans les zones oxiques du lac de Cadagno a été prélevé en juillet 2002 pour l'analyse en lipides. Ces algues dénommées *Chara* appartiennent à la classe des *Charophyceae*, à l'ordre *Charales* et à la famille des *Characeae*. Elles abondent dans toutes les parties du lac où la profondeur n'excède pas 11 m. Elles constituent donc une

source potentielle importante de la matière organique des sédiments. La distribution des alcanes linéaires saturés d'un échantillon d'algues *Chara* est présentée sur la Figure 3.6 (chromatogramme GC-MS associé: Figure 3.7).

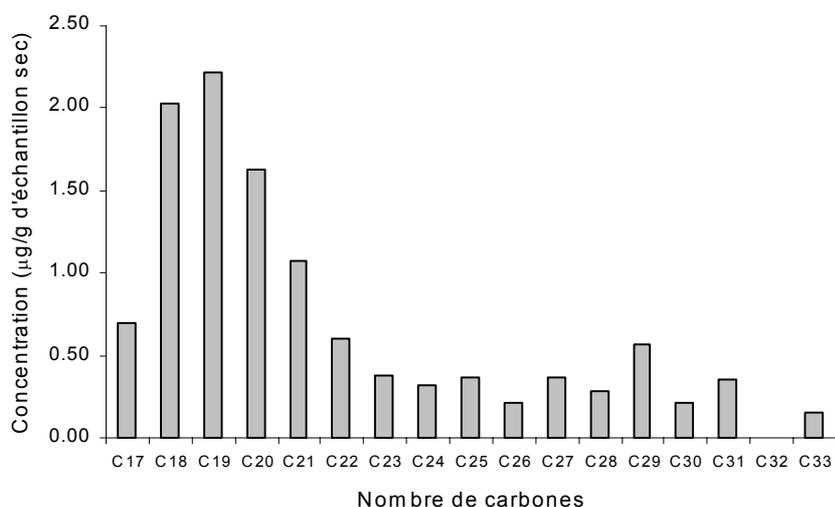


Figure 3.6: Distribution des *n*-alcanes linéaires saturés libres dans les algues *Chara* prélevées dans le lac de Cadagno.

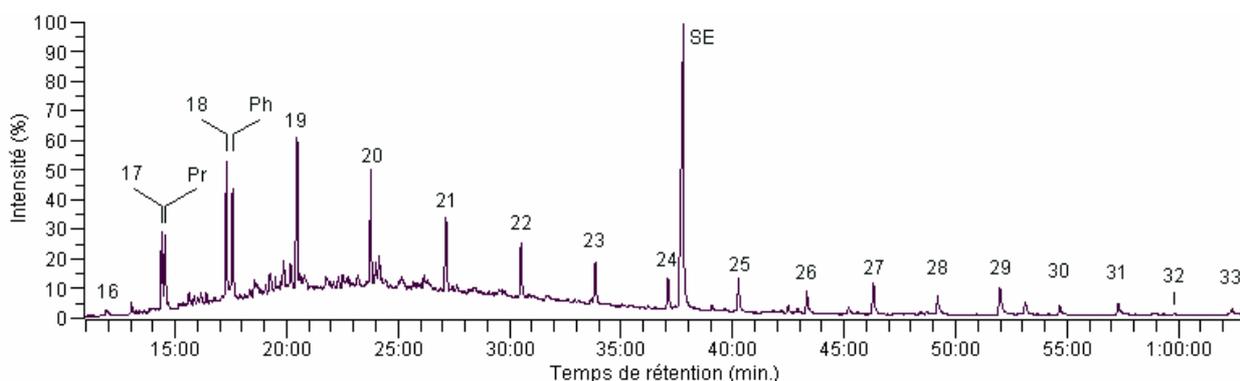


Figure 3.7: Courant ionique total de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" des algues *Chara* prélevées dans le lac de Cadagno. Conditions d'analyses GC-MS et signification des abréviations identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5.

La distribution des *n*-alcanes, bien que bimodale avec des maxima en *n*-C₁₉ et *n*-C₂₉, est dominée par le premier mode (rapport $(C_{27}+C_{29}+C_{31})/(C_{17}+C_{19}+C_{21}) = 0.32$). La teneur en *n*-alcanes des algues est 40 fois moins importante que celle des plantes supérieures par gramme d'échantillon sec. Cette observation est cohérente avec le fait que les plantes supérieures utilisent de manière extensive les *n*-alcanes comme cires protectrices (Killops et Killops, 1993). Le CPI de 2.1 traduit la légère prédominance des *n*-alcanes à nombre de carbone impair observée sur la Figure 3.6.

5.1.3 Analyse des n-alcane libres de la carotte sédimentaire

Les distributions des *n*-alcane dans les sections analysées sont reportées sur la Figure 3.8. Le chromatogramme GC-MS de la tranche 12-18 cm de la carotte sédimentaire est présenté à titre d'exemple sur la Figure 3.9. Les variations en fonction de la profondeur des teneurs en hydrocarbures en C₁₇, C₁₉, C₂₁, C₂₅, C₂₇, C₂₉ et C₃₁, du CPI et du rapport $(C_{27}+C_{29}+C_{31})/(C_{17}+C_{19}+C_{21})$ sont décrites sur la Figure 3.10.

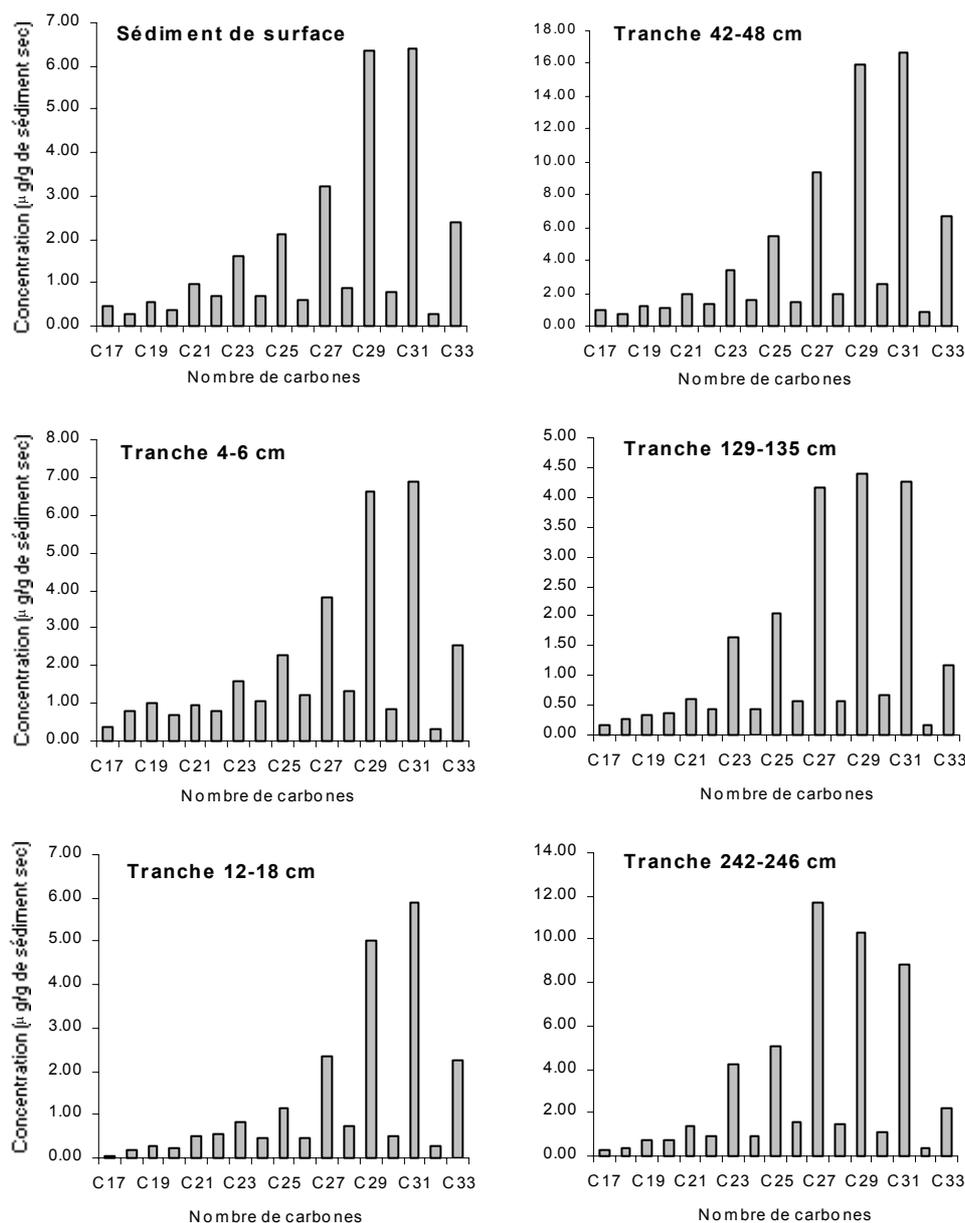


Figure 3.8: Distributions des alcanes linéaires saturés libres dans le sédiment de surface ainsi qu'à cinq profondeurs différentes de la carotte sédimentaire.

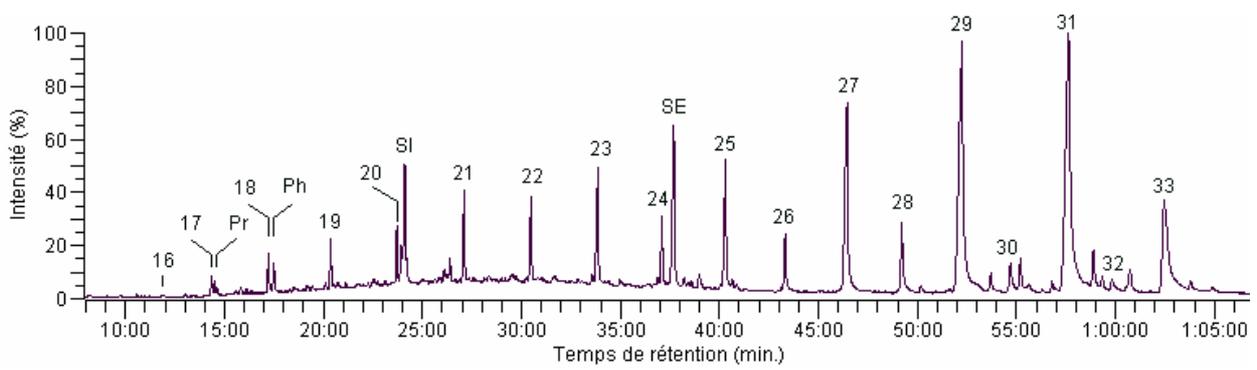


Figure 3.9: Courant ionique total de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" de la tranche 12-18 cm de la carotte sédimentaire. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5. Signification des abréviations: SI: Standard Interne (5α -androstane), autres abréviations identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5.

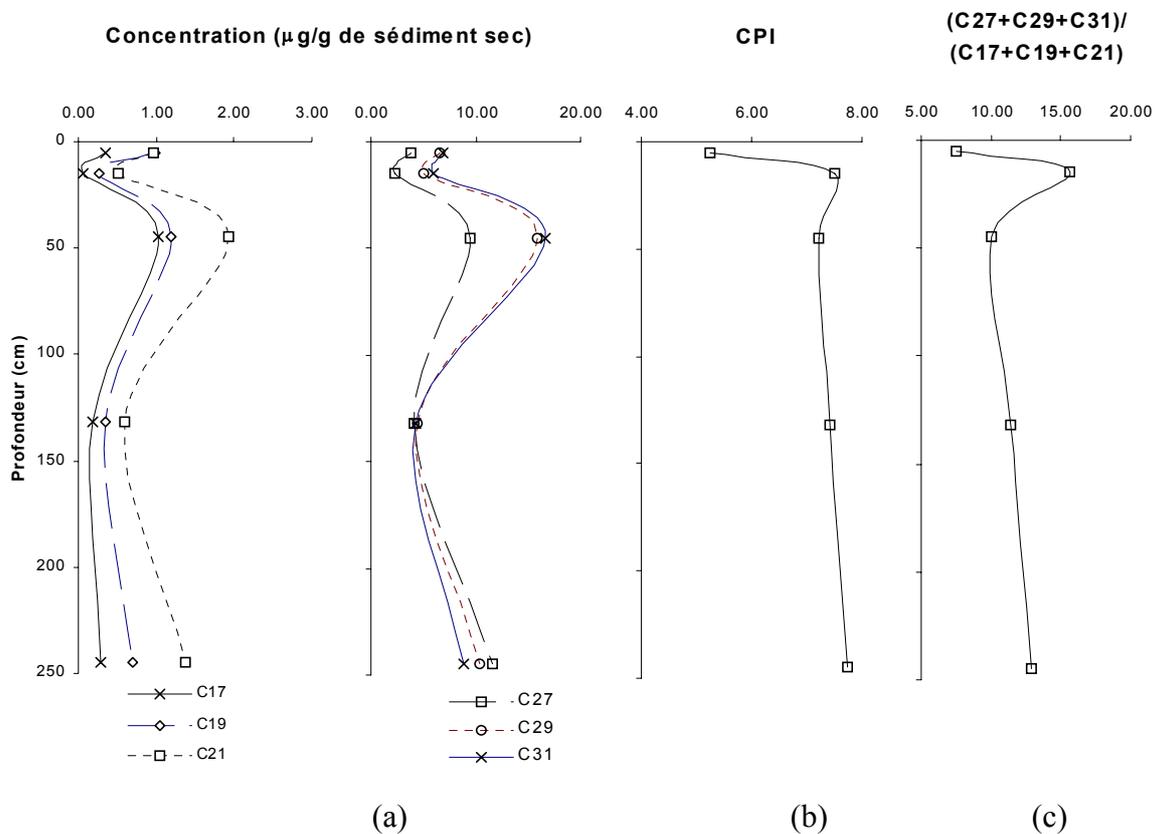


Figure 3.10: Variations de la concentration des hydrocarbures linéaires saturés libres à 17, 19, 21, 27, 29 et 31 atomes de carbones (a) de l'indice de prédominance des alcanes linéaires saturés à nombre de carbones impair (CPI) (b) et du rapport $(C_{27}+C_{29}+C_{31})/(C_{17}+C_{19}+C_{21})$ (c) avec la profondeur.

La distribution des *n*-alcanes varie peu sur les niveaux analysés de 4 à 48 cm. De plus elle ressemble fortement à celle de l'échantillon de plantes herbacées (*cf.* Figure 3.4) indicative d'une forte contribution de ces dernières (Meyers *et al.* 1998 et références incluses). Le CPI élevé

soutient cette hypothèse (Fisher *et al.*, 2003; Ishiwatari *et al.*, 1980). Cette conclusion a également été formulée par Putschew *et al.* (1995; 1996) qui ont analysé les 36 premiers cm d'un sédiment anoxique du lac de Cadagno. Aux niveaux 129-135 cm et 242-248 cm, une augmentation relative de l'alcane linéaire en C₂₇ est observée sur la Figure 3.8 modifiant sensiblement les distributions.

En se basant sur le taux de sédimentation donné par Putschew *et al.* (1996), et en admettant que ce taux soit resté constant pendant la déposition de la carotte étudiée, les sections 129-135 cm et 242-248 cm seraient âgées de 300 et 600 ans respectivement. Or, d'après les données palynologiques (Stapfer, 1991), ces périodes se caractérisent par une végétation comportant une proportion importante d'arbres et d'arbustes. Parmi les arbustes recensés, l'*Alnus viridus* (espèce rattachée aux aulnes) a notamment été répertorié en proportions significatives. Or Rieley *et al.* (1991) ont montré que la distribution des *n*-alcanes des feuilles de l'aulne commun comportait essentiellement deux pics d'intensité similaire pour C₂₇ et C₃₁. Ainsi, il est possible qu'il y a 300 à 600 ans, des apports allochtones constitués en grande partie de débris de feuilles d'arbustes de l'espèce *Alnus viridus* soient responsables, au moins en partie, des proportions plus élevées de *n*-C₂₇.

Les proportions peu élevées de *n*-alcanes de C₁₇ à C₂₂ et la faible prédominance des hydrocarbures à nombre de carbones impair reflètent un apport autochtone significatif pour le niveau 4-6 cm (Cranwell, 1984b). Leur proportion encore plus faible dans les sections plus profondes sont en accord avec une dégradation plus rapide de la matière organique d'origine planctonique par rapport à celle de plantes supérieures (Wünsche *et al.*, 1988). En effet les lipides des plantes supérieures subissent une attaque microbiologique avant et pendant leur transfert vers le milieu de sédimentation devenant donc plus réfractaires aux attaques ultérieures (Meyers, 1997). La dégradation plus rapide des lipides aquatiques peut également expliquer la variation du CPI. En effet pour la tranche 4-6 cm la présence des hydrocarbures d'origine aquatique avec un faible CPI abaissent le CPI global. Suite à la dégradation préférentielle des hydrocarbures d'origine aquatique, le CPI atteint à de plus fortes profondeurs des valeurs élevées caractéristiques des plantes supérieures (Figure 3.4) (Cranwell, 1982).

La dégradation préférentielle des hydrocarbures d'origine aquatique devrait également conduire à une augmentation du rapport $(C_{27}+C_{29}+C_{31})/(C_{17}+C_{19}+C_{21})$ ce qui est également le cas si la section 12-18 cm est exclue. La valeur maximum pour le niveau 12-18 cm correspondant à un maximum du CPI et un minimum du TOC, pourrait s'expliquer par des apports clastiques anormalement élevés (avalanches, glissements de terrain ou crues torrentielles; *cf.* § 3.2) de matière organique allochtone.

5.2 Pristane et phytane

Le rapport pristane/phytane varie peu avec la profondeur et reste inférieur à l'unité comme le montre la Figure 3.11. Ceci suggère des conditions anoxiques de déposition globalement constantes le long de la carotte.

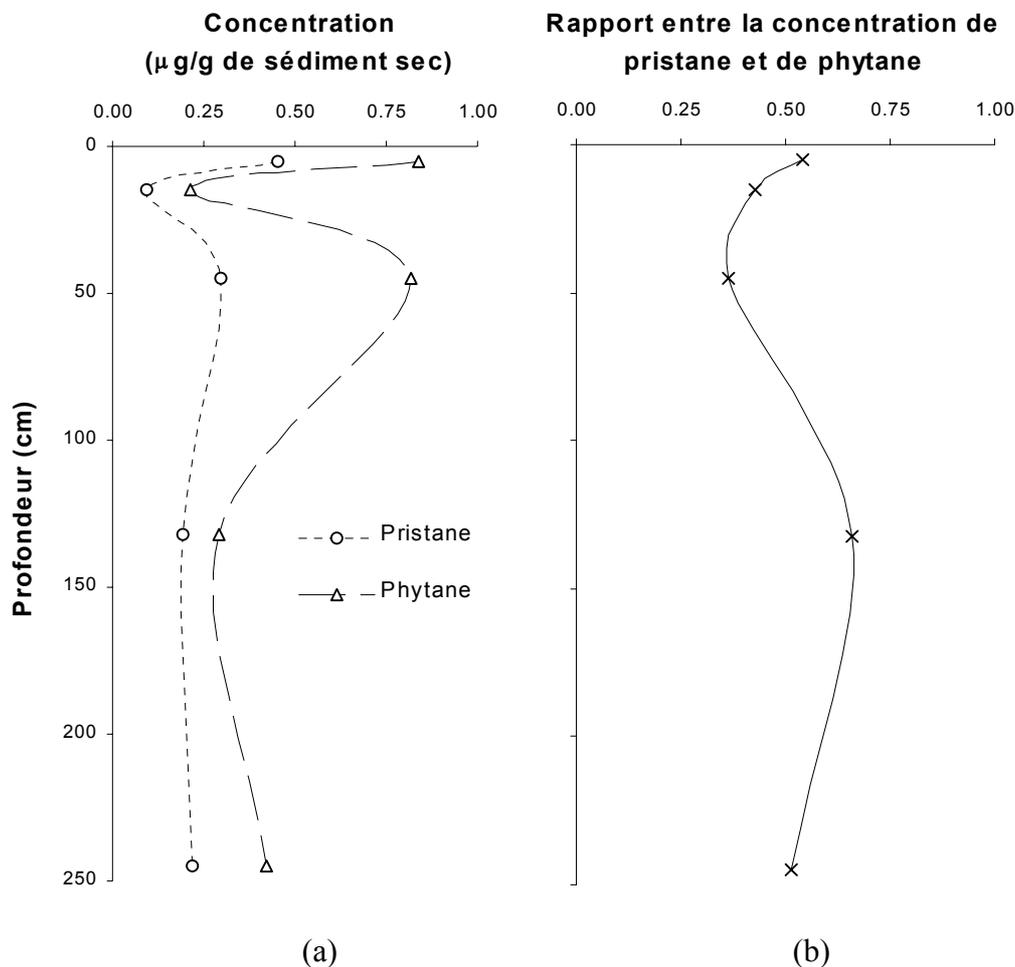


Figure 3.11: Variations de la concentration du pristane et du phytane (a) ainsi que du rapport pristane/phytane (b).

L'anoxité du milieu de déposition est en accord avec le profil actuel de concentration de l'oxygène dissous de la colonne d'eau du lac de Cadagno (Del Don *et al.*, 2001). Toutefois cette conclusion doit être énoncée avec prudence en raison des nombreux chemins diagénetiques (bactériens, catalyse sur argile, autooxydation, photooxydation, sulphurisation) opérant sur le phytol précurseur du pristane et du phytane. Si la formation de pristène et de phytène a pu être mise en évidence dans le cadre de réactions d'incubations, ces dernières n'ont pas permis de démontrer de manière non équivoque la formation de pristane et phytane (Rontani *et Volkman* 2003 et références incluses). Putschew *et al.* (1995; 1996) ont également reporté la présence du

phytane ainsi que du phytol dans les sédiments de Cadagno. Toutefois la présence du pristane n'a pas été signalée alors que sa concentration est proche de celle du phytane. Ces auteurs ont mentionné la présence de phytane lié par ponts mono- ou polysulphures tandis qu'Adam *et al.* (2000) ont détecté du phytane lié par ponts polysulphures. Putschew *et al.* (1996) ont suggéré, en se basant sur des mesures isotopiques, que les plantes supérieures et les bactéries étaient à l'origine de ce composé. Ceci est en accord avec des apports allochtones significatifs mentionnés dans les paragraphes précédents (*cf.* § 3.2 et 5.1.3).

6 Terpénoïdes autres que les stéroïdes

6.1 Origines

Le Tableau 1 présente les différents triterpénoïdes pentacycliques détectés dans la carotte sédimentaire. Le chromatogramme associé à la tranche 18-24 cm est donné à titre d'exemple sur la Figure 3.12. Ces composés sont essentiellement des hopanoïdes. Aussi dénommés géohopanoïdes, leur précurseur sont supposés être les nombreux dérivés du bactériohopanetétrol présents dans les bactéries (Ourisson et Rohmer, 1992). Toutefois divers hopanoïdes en C₃₀ ont également été identifiés dans certaines mousses et fougères (Ageta *et al.*, 1975; Ageta et Arai, 1983; Marsili et Morelli, 1970; Pandey et Mitra, 1967). La détection des géohopanoïdes dans les sédiments est habituellement attribuée à une activité bactérienne (Duan et Ma, 2001; Freeman *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 1997; Schouten *et al.*, 2000; Schouten *et al.*, 2001). Ceci est certainement le cas des sédiments de Cadagno étant donné la forte activité bactérienne dans ce lac (Demarta *et al.*, 1998; Nakane *et al.*, 2002).

Ces propos doivent toutefois être nuancés en raison de la non détection des hopanoïdes pour un nombre significatif d'espèces de bactéries. Ainsi, Farrimond *et al.* (1998) en inspectant la littérature ont montré que seulement 50% des bactéries contiennent des hopanoïdes. Dans le cas du lac de Cadagno, l'analyse des populations bactériennes (*cf.* Première Partie, § 3.4, Demarta *et al.*, 1998, Tonalla *et al.*, 2000 et Tonalla *et al.* 2003) a montré que les bactéries phototrophes *Chromatium okenii* et *Amoebacter purpureus* (bactéries violettes phototrophes oxydantes du soufre), *Chlorobium phaeobacteriodes* (bactéries vertes phototrophes oxydantes du soufre), *Desulfovibrionaceae*, *Desulfobacteriaceae* et *Desulfocapsa thiozymogenes* (bactéries sulfatoréductrices) et *Clostridium aminobutyricum* (bactéries anaérobies chemoorganotrophiques) sont présentes en quantités significatives. Or l'analyse des lipides des

espèces voisines à savoir *Amoebacter roseus*, *Chromatium vinosum*, *Chlorobium limicolane*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium paraputrificum* a révélé que ces bactéries ne contiennent pas d'hopanoïdes (Farrimond *et al.*, 1998 et références incluses). Toutefois les espèces *Méthylomonas*, *Methylococcus*, *Methylobacter* (bactéries anaérobiques méthylophiles) ont également été identifiées dans le lac de Cadagno (Demarta *et al.*, 1998) en plus des bactéries *Rhodospirillum molischianum* et *Rhodospirillum fulvum* (bactéries phototrophes oxydantes du soufre) détectées dans les tourbières à proximité (Wiggli *et al.*, 1998). L'analyse des lipides des espèces voisines *Methylomona methanica* et *albus*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Methylococcus capsulatus* et *Rhodospirillum rubrum* a montré que ces bactéries contiennent bien des hopanoïdes (Farrimond *et al.*, 1998 et références incluses). Ces données démontrent que si la présence des hopanoïdes peut être reliée à l'activité de certaines colonies bactériennes spécifiques dans le lac de Cadagno, elle ne saurait être rattachée à l'activité bactérienne globale du lac de Cadagno.

Par ailleurs, l'analyse des algues *Chara* provenant du lac n'a révélé que le hop-17(21)-ène, le 17 α ,21 β -hopane et un triterpénoïde inconnu (T11; masse molaire 410 g/mol; Spectre A.2 disponible dans l'annexe) à des concentrations de 0.43, 0.04 et 0.11 μ g/g d'échantillon sec respectivement accompagnés de traces d'hop-22(29)-ène et de 17 α -30-nor-29-éthylhopane. Ces quantités de hopanoïdes relativement faibles dans l'ensemble sont certainement dues à la présence de communautés bactériennes résiduelles sur la surface des algues et non pas à la présence des hopanoïdes dans les algues elles-mêmes.

L'analyse de l'échantillon de plantes supérieures n'a révélé que des traces de 17 α ,21 β -hopane confirmant que les hopanoïdes sédimentaires sont essentiellement issus de sources bactériennes autochtones.

Le fern-7-ène a également été détecté dans les sédiments du lac de Cadagno. Ce triterpène est répandu dans les mousses et fougères (Ageta et Arai, 1984; Marsili et Morelli, 1970; Nakane *et al.*, 2002). Toutefois Schouten *et al.* (2001) qui ont relevé une forte abondance de fern-7-ène dans les sédiments du lac Ace en Antarctique, ont attribué une origine bactérienne à ce composé. Freeman *et al.* (1994) ont également postulé une origine bactérienne pour ce composé. Il est fort probable qu'il en est de même pour le lac de Cadagno d'autant plus que les fougères sont absentes des alentours du lac et aucun fernène n'a pu être détecté dans l'échantillon de plantes herbacées.

Triterpénoïde non stéroïdien	Désignation	Mm	Concentration ($\mu\text{g/g}$ de sédiment sec)													
			Sédiment	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)												
			de surface	4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248
22,29,30-Trisnorhop-17(21)-ène	T1	368	0.10	0.35	1.00	0.07	0.08	0.11	0.16	0.22	0.27	0.09	0.32	0.36	0.68	0.82
17 β -22,29,30-Trisnorhopane	T2	370	S	Tr	Tr	-	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	-	Tr	Tr	
Triterpénoïde inconnu	T3	410	Tr	Tr	S	S	S	-	Tr	-	Tr	Tr	-	-	-	
30-Norhop-17(21)-ène	T4	410	S	Tr	S	Tr	S	-	Tr	S	Tr	-	-	Tr	Tr	
Hop-17(21)-ène (GC-MS)	T5	410	0.94	2.97	0.96	0.52	0.90	3.19	2.17	4.55	2.17	4.39	1.62	1.67	1.17	1.26
17 β ,21 α -30-Norhopane	T6	398	Tr	-	-	-	S	-	-	-	-	Tr	-	Tr	-	
17 α ,21 β -Hopane	T7	412	S	Tr	Tr	Tr	Tr	S	Tr	Tr	Tr	Tr	-	Tr	Tr	
Hop-13(18)-ène	T8	410	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Tr	Tr	Tr	
Hop-22(29)-ène	T9	410	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	Tr	
17 β ,21 β -30-Norhopane	T10	398	S	S	S	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	
Triterpénoïde inconnu	T11	410	0.31	0.88	0.15	0.07	0.21	0.30	0.52	0.56	0.23	0.36	0.52	0.30	0.65	0.51
Hop-12-ène	T12	410	S	S	S	Tr	-	S	S	S	S	-	-	-	-	
Fern-7-ène	T13	410	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
17 α -30-Nor-29-éthylhopane	T14	426	Tr	-	Tr	-	-	Tr	Tr	Tr	-	-	-	Tr	Tr	
17 β ,21 β -Hopane	T15	412	0.09	0.12	0.05	0.02	0.04	0.13	0.10	0.15	0.11	0.09	0.15	0.13	0.09	0.11
Hop-21-ène	T16	410	-	Tr	-	S	Tr	-	-	-	-	Tr	-	-	-	
Triterpénoïde inconnu	T17	424	Tr	Tr	S	S	S	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	
17 β ,21 β -Homohopane	T18	426	0.20	0.28	0.08	0.03	0.09	0.28	0.22	0.36	0.26	0.10	0.20	0.29	0.21	0.23

Tableau 3.1: Concentrations des triterpénoïdes autres que stéroïdiens dans la carotte sédimentaire. Signification des abréviations: Mm: masse molaire (g/mol); S: quantités significatives de composé; Tr: traces de composé; "-": composé non détecté.

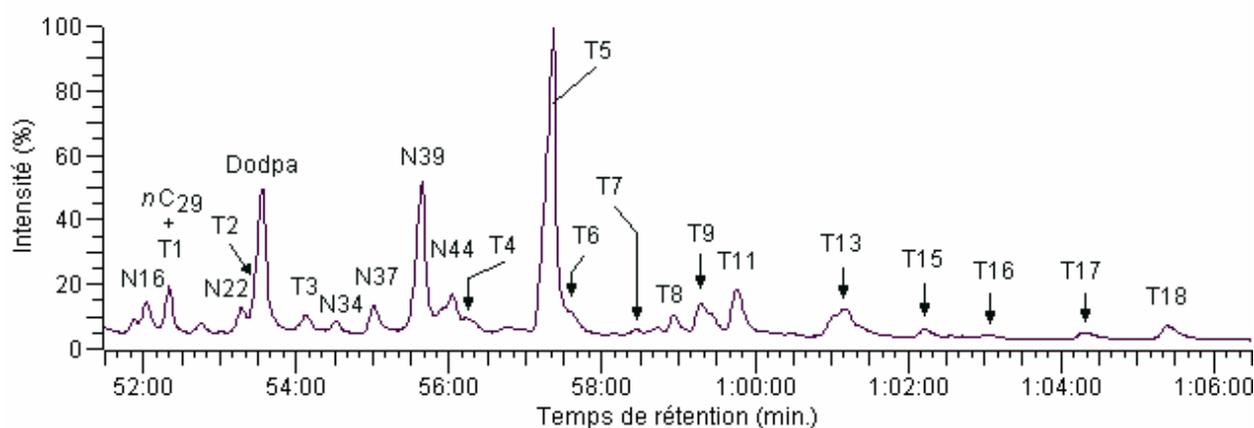


Figure 3.12: Partie du courant ionique total de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" concernant les triterpénoïdes pentacycliques de la tranche 18-24 cm de la carotte sédimentaire. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5. Signification des abréviations: Tx: triterpénoïdes définis dans le Tableau 3.1; Nx: stérènes dont les abréviations sont disponibles dans le Tableau A.6 de l'annexe; nC29: hydrocarbure linéaire saturé à 29 atomes de carbones; Dodpa: Dioclyldiphénylamine (contaminant).

6.2 Variations en fonction de la profondeur

Les variations des hopanoïdes quantifiés le long de la carotte sont représentées sur la Figure 3.13. Les profils du 17 β ,21 β -homohopane et du 17 β ,21 β -hopane s'apparentent à celui du TOC. Les variations du hop-17(21)-ène s'écartent par certains points des deux hopanes précédents. Le profil du 22,29,30-trisnorhop-17(21)-ène laisse peu apparaître les maxima dans les tranches 24-

30 et 42-48 cm observés pour les autres profils. Les fortes fluctuations dans les 50 premiers centimètres sont certainement liées aux variations du taux de sédimentation résultant des apports clastiques épisodiques, déjà mentionnées dans le § 3.2.

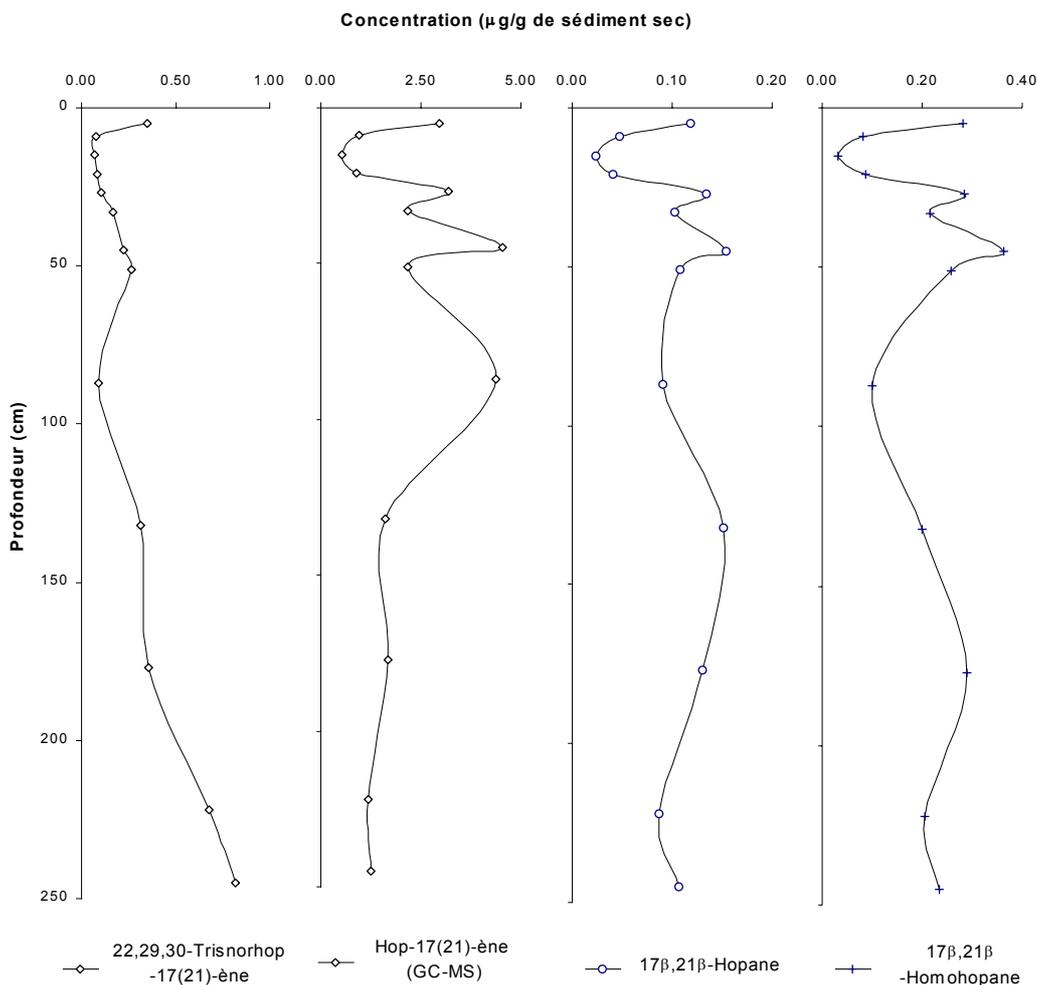


Figure 3.13: Variations de la concentration du 22,29,30-trisnorhop-17(21)-ène, du hop-17(21)-ène, du 17 β ,21 β -hopane et du 17 β ,21 β -homohopane avec la profondeur.

7 Stéroïdes

7.1 Identification des stéroïdes

7.1.1 Identification des stérols

L'identification de stérols par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est rendue possible par le grand nombre de spectres de masse publiés dans la littérature. Toutefois les coélutions d'isomères subsistent malgré la haute résolution obtenue par

l'usage des colonnes capillaires. De plus le chevauchement de certains stérols avec différents nombres d'atomes de carbones constitue une seconde difficulté dans l'identification des stérols. Afin d'élucider avec certitude les stérols, l'identification des structures est basée sur l'examen du spectre de masse ainsi que les temps de rétention chromatographiques. Dans la littérature, les temps de rétention des stérols sont exprimés en minutes, en "indice de Kovats" ou encore en "temps de rétention relatif à un composé de référence" (généralement le cholestérol). Dans tous les cas, les valeurs reportées sont fortement dépendantes, non seulement de la phase stationnaire utilisée, mais aussi des conditions opératoires, et notamment, du programme de température du four du chromatographe. Pour nos analyses, nous utilisons une échelle basée sur les temps de rétention de trois stérols de référence, à savoir le cholestérol, le stigmastérol et le sitostérol. A ces trois composés (généralement présents dans pratiquement tous les échantillons biologiques ou sédimentaires) sont associés les indices de rétention de 1000, 1200 et 1300. Les indices de rétention des autres stérols sont déterminés dans cette échelle par la règle de trois, en fonction de leur position d'élution. Les indices de rétention ainsi obtenus se révèlent non seulement pratiquement indépendants du programme de température du four, mais reproductibles aussi bien pour les dérivés triméthylsilylés que pour les dérivés acétates et les stérols non dérivatisés. La littérature a permis la création de tables de RI pour un grand nombre de stérols facilitant ainsi grandement l'identification. Les stérols identifiés dans le cadre de ce travail ainsi que leur RI correspondant sont reportés dans le Tableau A.3 de l'annexe.

La structure de certains composés n'a toutefois pas pu être élucidée complètement.

Ainsi un composé détecté dans les sédiments et éluant à un indice de rétention de 1051 (Spectre A.4 disponible dans l'annexe) possède les ions caractéristiques m/z 215, 230, 276, 305, 306, 369, 384, 459 et 474 du 24-méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol. Les intensités des ions de ce dernier sont de plus en accord avec celles du composé inconnu. Toutefois le RI est nettement inférieur à celui attendu pour le 24-méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol (RI = 1166). L'ion à m/z 369 étant supérieur à celui à m/z 384, les 24-méthyl-5 β -cholestan-3 α -ol et 24-méthyl-5 β -cholestan-3 α -ol sont écartés en raison de la très forte intensité de l'ion m/z 384 par rapport à celle de l'ion m/z 369 (Smith *et al.*, 1982). Toutefois la structure du 24-méthyl-5 α -cholestan-3 α -ol pourrait être envisagée pour ce stérol inconnu. En l'absence de composé de référence, ce stérol a été reporté avec un point d'interrogation.

Le composé précédent, 24-méthyl-5 α -cholestan-3 α -ol, coélue avec un second composé présent en faibles quantités. Ce composé possède les ions m/z 229, 257, 345, 359, 374 et 472 (visibles sur le Spectre A.4 disponible en annexe) caractéristiques du 24-méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol (RI=1074) avec des intensités similaires. Le 24-méthyl-5 α -cholest-22Z-én-3 β -ol pourrait être

envisagé pour ce composé inconnu. Toutefois en l'absence de composé de référence, la structure de ce composé a été reporté avec un point d'interrogation.

Un second composé détecté dans les plantes herbacées et éluant à l'indice de rétention 1361 a été reporté avec la dénomination 24-éthylcholesta-5,24(28)E-dién-3 β -ol? en raison de sa similitude avec le spectre de masse du fucostérol. En effet il possède les ions caractéristiques m/z 257, 281, 296, 343, 355, 371, 379, 386, 394, 469 et 484 (Spectre A.5 de l'annexe) du 24-éthylcholesta-5,24(28)E-dién-3 β -ol. Toutefois l'intensité de l'ion m/z 343 diffère fortement de celle publiée par Artaud *et al.* (1984) c'est pourquoi ce composé a été reporté avec un point d'interrogation.

7.1.2 Identification des stérènes et stéranes

L'identification des stérènes par GC-MS se révèle complexe en raison de l'absence de la littérature de spectres de masse de nombreux isomères notamment dans les séries en C₂₈ et C₂₉. La coélution des isomères ainsi que le chevauchement des séries compliquent également l'identification. Enfin les quantités nettement plus faibles des stérènes par rapport aux stérols donnent lieu à des spectres de masse où le rapport signal sur bruit est moins élevé rendant leur interprétation plus délicate.

De manière analogue au paragraphe 7.1.1 concernant les stérols, les indices de rétention des stérènes et stéranes ont été utilisés en plus des spectres de masse permettant l'identification rigoureuse des composés. L'échelle des indices de rétention est néanmoins basée sur les valeurs de 1000, 1150 et 1300 correspondant aux 5 α -cholest-2-ène, 24-méthyl-5 α -cholest-2-ène et au 24-éthyl-5 α -cholest-2-ène respectivement, composés présent tout le long de la carotte sédimentaire. Il faut remarquer que cette échelle a été également employée pour calculer les indices de rétention des hopanoïdes.

L'ensemble des stérènes et stéranes identifiés dans le cadre de cette étude ainsi que leur indice de rétention sont reportés dans le Tableau A.6 de l'annexe en plus des spectres de masse correspondants. Certains composés sont reportés avec un point d'interrogation. Ceci indique que soit leur spectre de masse n'a pas été publié dans la littérature, soit le spectre de masse reporté dans l'annexe ne permet pas d'identifier avec certitude le composé.

L'identification a été facilité pour une partie des stéranes et stérènes en C₂₇ disponibles commercialement. Ces derniers dont les RI sont rappelés dans le Tableau 3.2 ont pu être identifiés sans ambiguïté lorsqu'ils étaient présents dans les sédiments.

Stérane/stérène	Indice de rétention (RI)
5 β -Cholest-3-ène	920
5 β -Cholestane	950
5 β -Cholest-2-ène	961
Cholest-4-ène	989
5 α -Cholest-2-ène	1000
5 α -Cholestane	1007
Cholest-5-ène	1008
5 α -Cholest-3-ène	1015
Cholesta-3,5-diène	1073
24-Méthyl-5 α -cholest-2-ène	1150
24-Ethyl-5 α -cholest-2-ène	1300

Tableau 3.2: Indices de rétention de stérènes et stéranes disponibles commercialement.

Ainsi le 5 α -cholest-2-ène se distingue par un ion intense à m/z 316 (330 et 344 pour les homologues en C₂₈ et C₂₉ respectivement). Le cholest-4-ène et ses homologues en C₂₈ et C₂₉ possèdent un spectre similaire à celui du 5 α -cholest-3-ène et ses homologues en C₂₈ et C₂₉ mais se distinguent par la présence d'un ion intense à m/z 108. Les 5 α/β -cholestane et leurs homologues en C₂₈ et C₂₉ se différencient des stérènes par l'ion intense et caractéristique à m/z 217. Les 5 α -stéranes possèdent en outre l'ion m/z 149 plus intense que l'ion m/z 151 tandis que le contraire est observé pour les 5 β -stéranes. En se basant sur l'ordre d'élution et les différences de RI du Tableau 3.2 en plus des spectres de masse éventuellement disponibles dans la littérature, les 5 α/β -stéranes, les Δ^4 -, 5 α - Δ^2 -, Δ^5 -, 5 α - Δ^3 - et $\Delta^{3,5}$ -stérènes en C₂₈ et C₂₉ peuvent être identifiés. L'ordre d'élution des 23,24-diméthyle- avant les 24-éthyle-C₂₉-stérols dérivatisés sous la forme d'éthers triméthylsilylés est utilisé par analogie pour déduire l'ordre d'élution des stérènes correspondants. Les composés dont le spectre n'a pas été publié dans la littérature ou dont le spectre n'a pas permis d'établir avec certitude leur identification ont été mentionnés avec un point d'interrogation.

Les 5 α - Δ^{22E} -stérènes ont été notamment identifiés grâce à la présence de l'ion intense et caractéristique à m/z 286. Les spectres de masse éventuellement disponibles dans la littérature, l'ordre d'élution et les différences de RI du Tableau 3.2 ont également été employés dans le cas des $\Delta^{4,22E}$ -, 5 α - $\Delta^{2,22E}$ -, $\Delta^{5,22E}$ - et $\Delta^{3,5,22E}$ -stérènes en C₂₈ et C₂₉ qui possèdent en outre un ion intense à m/z 284 ou 282 dans le cas des stéradiènes et stératriènes respectivement. L'ordre d'élution des 23,24-diméthyle- avant les 24-éthyle-C₂₉-stérènes permet de distinguer les deux types de substitution de la chaîne latérale. Les composés dont le spectre n'a pas été publié dans la littérature ou dont le spectre n'a pas permis d'établir avec certitude leur identification ont été mentionnés avec un point d'interrogation.

Une série de stérènes possédant des spectres de masse très similaires à la série des 24-méthyle- Δ^{22E} -, $\Delta^{4,22E}$ -, $\Delta^{2,22E}$ -, $\Delta^{5,22E}$ - et $\Delta^{3,5,22E}$ -stérènes a également été identifiée à des indices de rétention plus faibles. D'après la similitude des spectres de masse, il est raisonnable d'envisager une isomérisation 22Z. Il faut remarquer que dans le cas des stérols, la structure du 24-méthyl-5 α -cholest-22Z-én-3 β -ol a été envisagée (cf. § 7.1.1). En l'absence de composé de référence pour cette série de stérènes, leur structure ont été mentionnées avec un point d'interrogation.

L'identification du 27-nor-24-méthyl-5 α -cholesta-3,22E-diène reporté parmi les stérènes sédimentaires est basée sur son spectre de masse et son RI. La double liaison en position 22 est déduite du pic à m/z 284. La position 2 plutôt que 3 de la seconde double liaison a été déduite de la présence de l'ion à m/z 314 caractéristique des 5 α - $\Delta^{2,22E}$ -stéradiènes. La chaîne latérale a été assignée à 27-nor-24-méthyle compte tenu de son RI. De plus le stérol précurseur, le 27-nor-24-méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol a été détecté dans la fraction stérol libre.

Deux stéradiènes inconnus en C₂₈ avec des indices de rétention de 1062 et 1135 reportés dans les produits de désulphurisation par NaBH₄/NiCl₂ n'ont pu être identifiés. Absents dans les fractions hydrocarbures libres, ils peuvent donc correspondre à des composés issus de la réduction partielle des stératriènes libres. Leur spectre de masse se distinguent néanmoins des autres 24-méthylstéradiènes déjà identifiés et ne correspondent à aucun spectre disponibles dans la littérature.

7.2 Origines des biomarqueurs stéroïdiens présents dans les sédiments du lac de Cadagno

7.2.1 Origines des stérols présents dans les sédiments

7.2.1.1 Stérols présents dans l'échantillon de plantes herbacées prélevées aux abords du lac de Cadagno

La composition en stérols de l'échantillon de plantes herbacées prélevées sur le versant Nord-Nord-Ouest du bassin du lac de Cadagno est donnée dans le Tableau 3.3 (Chromatogramme associé: Figure 3.14).

Stérol	Désignation	Concentration ($\mu\text{g/g}$ d'échantillon sec)	Pourcentage
Cholest-5-én-3 β -ol	O4	22	1.0
24-Méthylcholest-5-én-3 β -ol	O12	243	10.5
24-Ethylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol	O15	137	5.9
24-Ethylcholest-5-én-3 β -ol	O20	1741	75.0
24-Ethylcholesta-5,24(28)Z-dién-3 β -ol	O23	75	3.2
24-Ethylcholesta-5,24(28)E-dién-3-ol?	O25	18	0.8
24-Ethyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol	O27	49	2.1
24-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(28)Z-dién-3 β -ol	O28	35	1.5

Tableau 3.3: Concentrations et pourcentages des stérols libres dans l'échantillon de plantes herbacées prélevées sur le versant Nord-Nord-Ouest du bassin du lac de Cadagno.

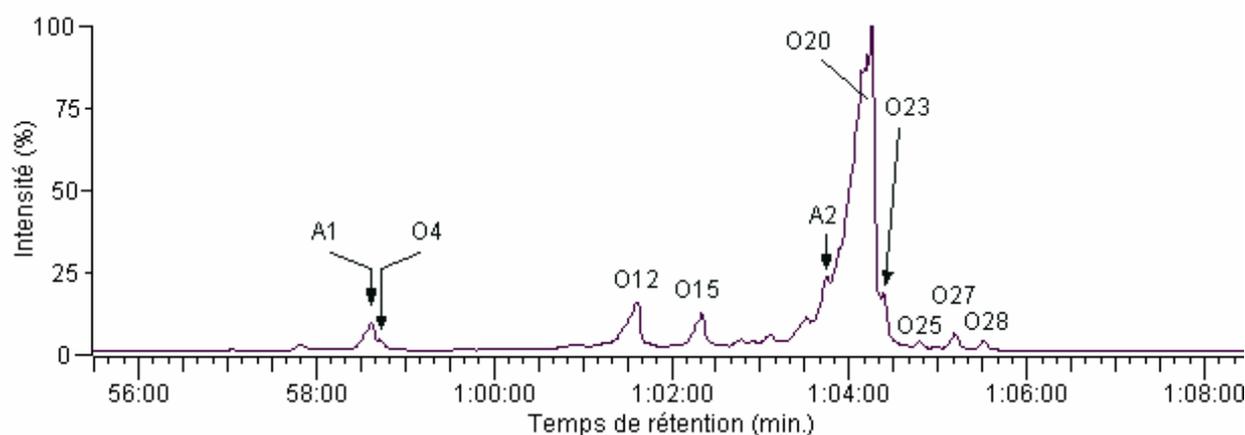


Figure 3.14: Courant ionique total obtenu après injection de la fraction "alcools" de l'échantillon de plantes herbacées prélevé sur le versant Nord-Nord-Ouest du bassin du lac de Cadagno. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5. Signification des abréviations: Ox: stérols définis dans le Tableau 3.3; A1 et A2: alcools linéaires à 28 et 30 atomes de carbone respectivement.

Les résultats du Tableau 3.3 montrent la prédominance du sitostérol avec des proportions significatives de 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol et de stigmastérol, connus comme stérols majeurs des plantes terrestres (Patterson, 1993). Le cholestérol est également présent en faibles quantités comme dans de nombreuses espèces de plantes (Volkman, 1986). La présence de l'isofucostérol, du 24-éthyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol et du 24-éthyl-5 α -cholesta-7,24(28)Z-dién-3 β -ol a été reportée dans les *Carophyllidae*. Le 24-éthyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol est présent à 55% dans l'espèce d'*Anisomeria coriacca* de la famille des *Phytolaccaceae* et à plus de 15% dans la sous famille des *Amaranthoideae*. Le 24-éthyl-5 α -cholesta-7,24(28)Z-dién-3 β -ol est présent à 45% dans l'espèce *A. hymenolytra* et en quantités significatives dans un certains nombre d'espèces de la sous famille de *Chenopodioideae*. L'isofucostérol est également présent dans cette famille avec un pourcentage maximum de 25% pour l'espèce *A. watsonii*.

7.2.1.2 Stérols présents dans les algues *Chara* du lac de Cadagno

La composition en stérols de l'extrait organique provenant de l'échantillon d'algues *Chara* répandues dans le lac de Cadagno est présentée dans le Tableau 3.4 (chromatogramme associée: Figure 3.15).

Stérol	Désignation	Concentration ($\mu\text{g/g}$ d'échantillon sec)	Pourcentage
Cholest-5-én-3 β -ol	O4	17.0	3.9
5 α -Cholestan-3 β -ol	O5	2.4	0.5
24-Méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol	O9	6.2	1.4
24-Méthylcholesta-5,24(28)-dién-3 β -ol	O11	3.5	0.8
24-Méthylcholest-5-én-3 β -ol	O12	4.1	0.9
24-Ethylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol	O15	2.8	0.6
24-Ethylcholesta-5,25-dién-3 β -ol	O19	108.9	24.8
24-Ethylcholest-5-én-3 β -ol	O20	113.6	25.9
24-Ethylcholesta-5,24(28)Z-dién-3 β -ol	O23	180.7	41.1

Tableau 3.4: Concentrations et pourcentages des stérols libres dans l'échantillon d'algues *Chara* prélevées dans le lac de Cadagno.

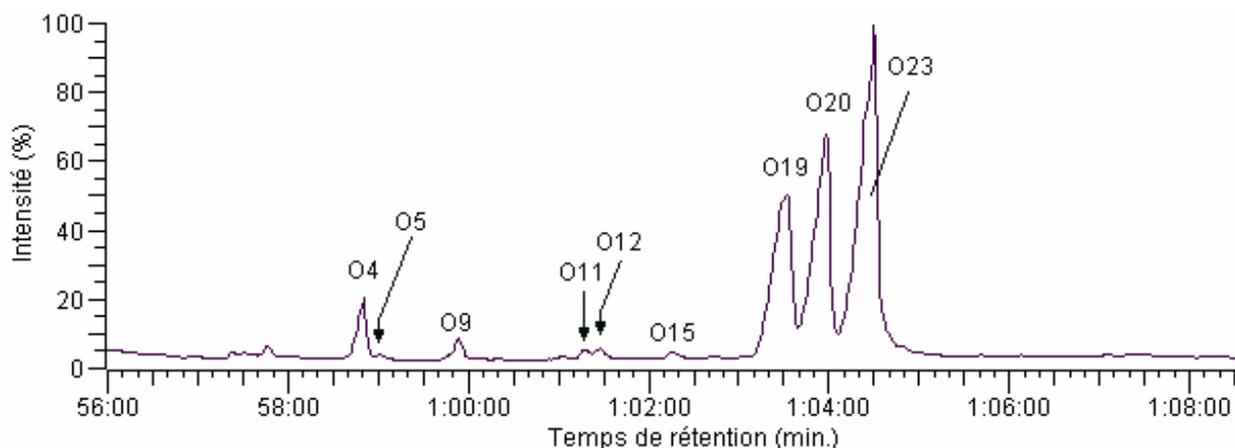


Figure 3.15: Courant ionique total obtenu après injection de la fraction "alcools" de l'échantillon d'algues *Chara*. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5. Signification des abréviations: Ox: stérols définis dans le Tableau 3.4.

Le sitostérol, l'isofucostérol ainsi que le 24-éthylcholesta-5,25-dién-3 β -ol constituent plus de 90% de la composition en stérols des algues *Chara*. Patterson *et al.* (1991) ont trouvé que le sitostérol et l'isofucostérol représentaient les deux stérols majeurs de l'espèce *Chara vulgaris* (39 et 54% respectivement). Pour les espèces *Chara australis* et *Chara buckelii*, le sitostérol représente 84 et 33% respectivement de la composition en stérols. L'isofucostérol n'est détecté qu'à l'état de traces pour l'espèce *Chara australis* et présent à seulement 6% pour l'algue *Chara buckelii*. Il faut noter toutefois que 54% de la composition en stérols n'a pas été identifié pour cette dernière espèce. Bankova *et al.* (2001) ont analysé la composition des stérols majeurs de

Chara globularis. Cette espèce contient principalement du sitostérol (86%) et se rapproche donc de l'espèce *Chara australis* considérée précédemment.

Les résultats de Patterson *et al.* (1991) montrent que le cholestérol, le 24-méthylcholesta-5,24(28)-dién-3 β -ol et le stigmastérol présents en quantités mineures dans les espèces *Chara australis* et *Chara buckelii* se retrouvent dans les échantillons des algues *Chara* du lac de Cadagno. Le 24-méthylcholesta-5,24(28)-dién-3 β -ol n'a pas été détecté dans l'espèce *Chara globularis* (Bankova *et al.*, 2001). Toutefois cette espèce contient le 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol et le 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol également identifiés dans les algues *Chara* de Cadagno. Dans ces dernières, seul la présence mineure de 5 α -cholestan-3 β -ol n'a pas été reportée dans la littérature.

Ainsi, les résultats des analyses se rapprochent de ceux déjà publiés dans la littérature. La composition en stérols des algues *Chara* du lac de Cadagno se révèle largement dominée par les stérols en C₂₉, accompagnés d'une minorité de stérols en C₂₇ et C₂₈ (7.5%).

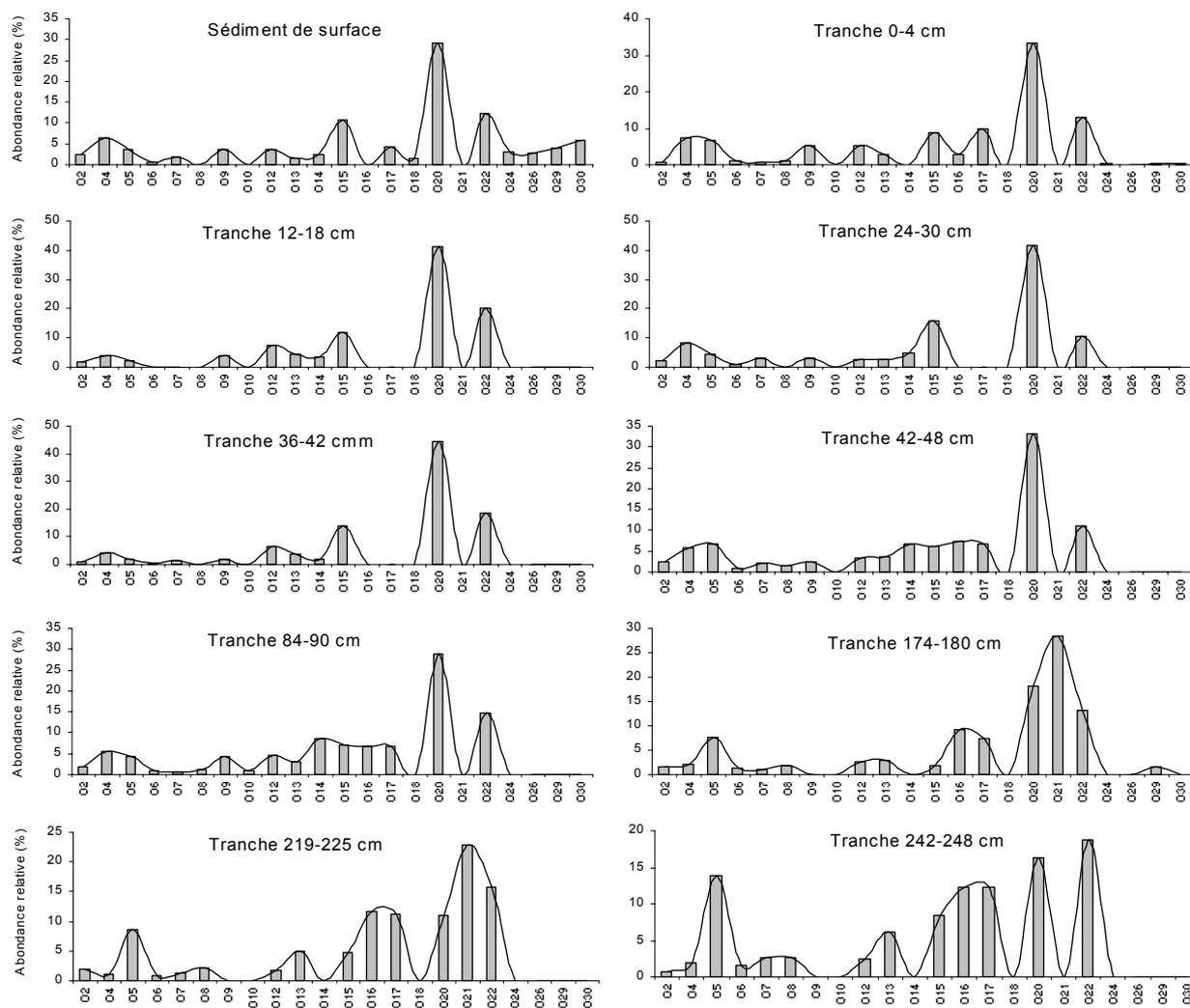
7.2.1.3 Origines des stérols libres présents dans les sédiments du lac de Cadagno

La composition et distribution des différents stérols libres à différents niveaux de la carotte sédimentaire est donnée sur la Figure 3.16. Le chromatogramme GC-MS de la fraction "alcool" de la tranche 18-24 cm de la carotte est représenté à titre d'exemple sur la Figure 3.17.

Le sitostérol est le stérol majeur à tous les niveaux de la carotte. Celui-ci se retrouve en proportions importantes dans les plantes herbacées (75% de la composition en stérols) aux abords du lac mais également dans les algues benthiques *Chara* (26%). La plupart des microalgues présentes dans le lac (chlorophytes et diatomées en quantités majeures; chryptophytes en quantités significatives) (Camacho *et al.*, 2001; Schanz et Stalder, 1998) contiennent également une proportion majoritaire de ce stérol (Volkman, 2003). Le sitostérol ne permet donc pas de juger des apports spécifiques d'un des groupes d'organismes cités précédemment. Matsumoto *et al.* (1982) sont arrivés à la même conclusion après une étude de sédiments de surface de différents lacs en Antarctique où les plantes supérieures sont quasi absentes.

Le cholestérol n'apparaît qu'en quantités mineures dans la majorité des plantes supérieures (Goad, 1977). Il est présent à hauteur de 1% seulement dans l'échantillon de plantes herbacées (Tableau 3.3). Abondant dans le zooplancton (Patterson, 1993), il est également présent en quantités importantes voire majoritaires dans les chlorophytes, diatomées et dinoflagellés présents dans le lac de Cadagno (Volkman, 1986). Les algues benthiques *Chara* contiennent

toutefois qu'une faible quantité de cholestérol (3.9%) (Tableau 3.4). Ce dernier qui représente 1.1 à 8.3% des stérols dans les sédiments de Cadagno est donc principalement dû aux apports de la faune planctonique du lac de manière générale (Volkman, 2003).



Stérol	Désignation	Stérol	Désignation
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dié-3 β -ol	O2	24-Ethylcholesta-5,22E-dié-3 β -ol (GC-MS)	O15
Cholest-5-én-3 β -ol	O4	23,24-Diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol (GC-MS)	O16
5 α -Cholestan-3 β -ol	O5	24-Ethyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol (GC-MS)	O17
27-Nor-24-méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O6	24-Méthyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol	O18
24-Méthyl-5 α -cholestan-3 α -ol? (GC-MS)	O7	24-Ethylcholest-5-én-3 β -ol (GC-MS)	O20
24-Méthyl-5 α -cholest-22Z-én-3 β -ol? (GC-MS)	O8	23,24-Diméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol (GC-MS)	O21
24-Méthylcholesta-5,22E-dié-3 β -ol	O9	24-Ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol (GC-MS)	O22
24-Méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol	O10	4 α ,23,24-Triméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol	O24
24-Méthylcholest-5-én-3 β -ol (GC-MS)	O12	24-Ethyl-4 α -Méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol	O26
24-Méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol (GC-MS)	O13	4 α ,23,24-Triméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O29
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-dié-3 β -ol	O14	24-Ethyl-4 α -méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O30

Figure 3.16: Distributions des stérols libres dans les différentes tranches de la carotte sédimentaire du lac de Cadagno.

Le stigmastérol et le 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol sont présents en quantités significatives dans l'échantillon de plantes herbacées (5.9 et 10.5% respectivement; Tableau 3.3) et dans les différents algues du phytoplancton à savoir les chlorophytes, les diatomées, les dinoflagellés,

toutes présentes dans le lac. Ces algues contiennent en effet des quantités de ces deux stérols d'une part très variables et d'autres part pouvant être majoritaires suivant les espèces (Volkman, 1986). L'utilisation du 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol et du stigmastérol en tant que biomarqueurs spécifiques d'apports phytoplanctoniques (*p. ex.* Dachs *et al.*, 1999) et d'apports allochtones de plantes supérieures respectivement (*p. ex.* Hudson *et al.*, 2001) serait donc délicate dans le cas du lac de Cadagno.

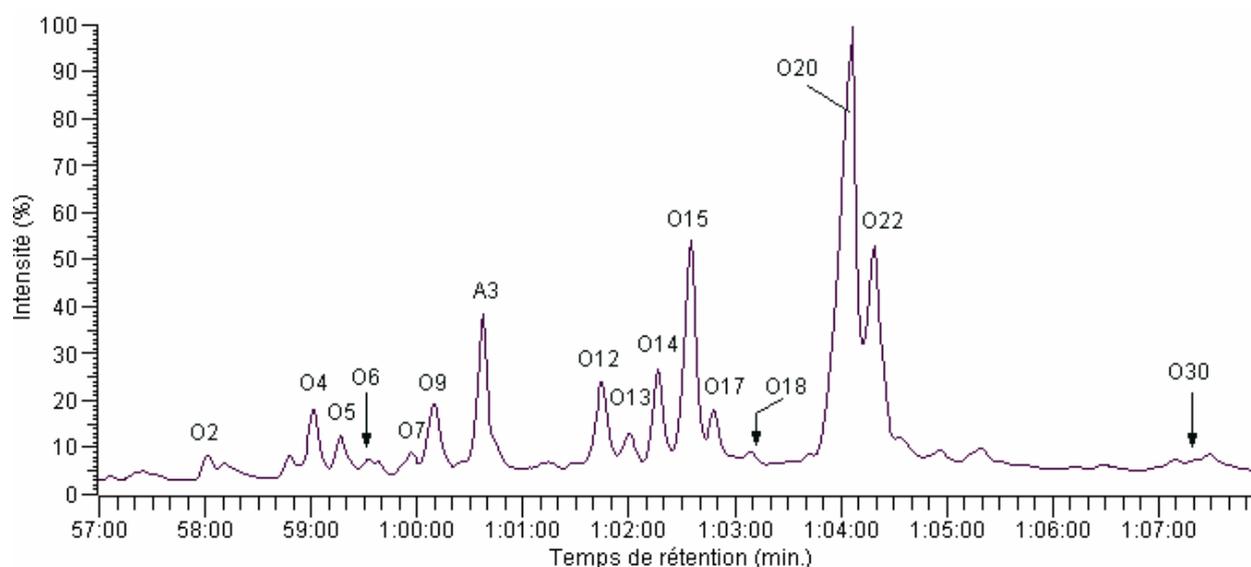


Figure 3.17: Courant ionique total de la fraction "alcools" de la tranche 18-24 cm de la carotte sédimentaire. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5. Signification des abréviations: Ox: stérols définis dans la légende de la Figure 3.16; A3: diol.

Le 24-méthylcholesta-5,22E-dié-3 β -ol (brassicastérol), représentant jusqu'à 5.5% des stérols dans la carotte, n'a pas été détecté dans l'échantillon de plantes herbacées. Ce stérol n'apparaît qu'en proportions mineures dans les plantes vasculaires (Patterson, 1993; Salt *et al.*, 1991). Il est cependant présent dans des proportions importantes dans les diatomées, les dinoflagellés, les chrysophytes et les chryptophytes (Volkman, 1986) répertoriés dans le lac de Cadagno (Schanz et Stalder, 1998). Ce stérol est également présent en quantités mineures dans les algues *Chara* (1.4%, Tableau 3.4). Le 24-méthylcholesta-5,22E-dié-3 β -ol est donc un biomarqueur essentiellement phytoplanctonique (*p. ex.* Canuel et Martens, 1993)

Le 23,24-diméthylcholesta-5,22E-dié-3 β -ol, représentant jusqu'à 8.6% des stérols dans la carotte, a été reporté dans certains dinoflagellés en quantités significatives (jusqu'à 35%; Volkman *et al.*, 1999) et en plus faibles quantités dans les diatomées (*p. ex.* Volkman *et al.*, 1993). Ce stérol également identifié dans la Mer Noire et la Mer Baltique (Pearce *et al.*, 1998) semble donc posséder une origine phytoplanctonique.

Le 27-nor-24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol représente 0.7 à 2.7% des stérols de la carotte. Il a été reporté aussi bien dans des sédiments lacustres (Cranwell *et al.*, 1987; Robinson *et al.*, 1984) que marins (Conte *et al.*, 1994; Muhlebach et Weber, 1998). La présence de ce stérol dans les rotifères (*Kerazella cochlearis*, *K. quadrata*, espèces *Polyarthra* principalement *vulgaris*, *Anuraeopsis fissa*) et son absence dans les autres organismes phytoplanctoniques du lac de Priest Pot suggèrent une origine zooplanctonique pour ce composé (Robinson *et al.*, 1984).

Le 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol représente jusqu'à 12.4% des stérols de la carotte. Ce stérol a été reporté dans des sédiments lacustres et marins (Cranwell *et al.*, 1987; Pearce *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1986). Bien qu'il ait été identifié dans les concombres de mer (Stonik *et al.*, 1998) et dans les haptophytes (Volkman *et al.*, 1990). Cranwell (1984a) a expliqué son origine par une hydrogénation partielle des $\Delta^{5,22}$ -stérols. Dans le cas du lac de Cadagno cette origine diagénétique pourrait être appuyée par l'absence des haptophytes des populations phytoplanctoniques (Schanz et Stalder, 1998) et par la présence de 24-méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol et de 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol qui possèdent tous deux leur $\Delta^{5,22}$ -stérol précurseur correspondant. Toutefois l'analyse des profils de concentration des stérols le long de la carotte (*cf.* § 7.3.1) montrera que la transformation diagénétique du stigmastérol en 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol est un processus peu probable dans les sédiments du lac de Cadagno.

Le 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol représentant jusqu'à 12.4% des stérols de la carotte n'a été identifié en quantités significatives que dans un dinoflagellé (13% pour l'espèce *Prorocentrum micans*, Volkman *et al.*, 1999). Toutefois la réduction de son $\Delta^{5,22}$ -homologue est également une source possible pour ce stérol (Cranwell, 1984a). En conséquence, le 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol apparaît donc comme un biomarqueur phytoplanctonique.

Le 4 α ,23,24-triméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol (dinostérol) représente jusqu'à 9.5% du total des stérols de la carotte sédimentaire. Il se rencontre chez les dinoflagellés (Volkman *et al.*, 1999) mais également en faibles quantités chez les diatomées (Volkman *et al.*, 1993) ce qui est cohérent avec la faune phytoplanctonique présente à Cadagno (Schanz et Stalder, 1998).

La présence du 24-éthyl-4 α -méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol identifié comme un stérol majeur des haptophytes (Volkman *et al.*, 1990) est surprenante. En effet aucune espèce de cette famille n'a été reportée parmi la population phytoplanctonique de Cadagno (Schanz et Stalder, 1998) bien que 3 à 6% environ des organismes entre 0 et 11 mètres n'aient pas été identifiés.

Les stanols présents dans les sédiments du lac de Cadagno proviennent très certainement de la réduction bactérienne des stérols correspondant comme ce fut proposé par Gagosian *et al.* (1979) et Gaskell *et* Eglinton (1975) puis confirmé par Mermoud (1982) et Wünsche (1987). Une contribution des organismes planctoniques ou d'apports allochtones a également été proposée

(Nishimura et Koyama, 1977). Toutefois l'analyse de sédiments de surface, de plancton et d'échantillons de plantes terrestres recueillies à proximité des sites d'études (Mermoud *et al.*, 1981; Mermoud, 1982; Nishimura, 1978; Nishimura et Koyama, 1977; Volkman *et al.*, 1981) ont montré que l'abondance relative des stanols peut être multipliée par un facteur allant jusqu'à 10 lors de l'incorporation des stérols dans le sédiment de surface. Ainsi l'origine de la majorité des stanols dans un sédiment anoxique est expliqué essentiellement par une transformation bactérienne des stérols en leur homologue stanol correspondant (Wünsche, 1987). Dans les sédiments oxiques, l'augmentation de la proportion des stanols peut être due à une dégradation sélective des stérols par rapport aux stanols d'une part et d'autre part à l'incorporation des stérols sous forme liée (Mermoud, 1982). Tandis que Mermoud (1982) et Wünsche (1987) ont mis en évidence par des incubations les réductions des Δ^5 -stérols en stanols correspondants, Cranwell (1984a) a montré que la transformation des $\Delta^{5,22}$ -stérols en Δ^{22} -stérols pouvait également être effective dans les sédiments. Ceci constituerait une seconde origine pour les Δ^{22} -stérols.

7.2.1.4 Origine des stérols liés présents dans les sédiments du lac de Cadagno

Le Tableau 3.5 liste les stérols liés identifiés dans le sédiment de surface et dans la tranche 242-248 cm (chromatogramme correspondant au sédiment de surface représenté sur la Figure 3.18). L'origine des principaux stérols liés, à savoir le cholestérol, le 5α -cholestan- 3β -ol, le 24-méthylcholesta-5,22E-dié- 3β -ol, le 24-méthylcholest-5-én- 3β -ol, le 24-éthylcholesta-5,22E-dié- 3β -ol, le sitostérol et le stigmastanol a été discutée précédemment (*cf.* § 7.2.1.3). Il est intéressant de constater que le 24-méthylcholesta-5,24(28)-dié- 3β -ol et le 24-éthylcholesta-5,25-dié- 3β -ol détectés dans les algues *Chara* se retrouvent parmi les stérols liés. Il faut noter que ces deux stérols, dont le 24-éthylcholesta-5,25-dié- 3β -ol représente près 25% de la composition en stérols des algues *Chara*, ne sont pas observés dans les stérols libres.

Le 24-éthyl- 5α -cholest-7-én- 3β -ol, absent de la fraction des stérols libres, est présent en faibles quantités dans la fraction des liés. Ce stérol apparaît à des concentrations peu élevées dans l'échantillon de plantes supérieures ce qui n'est pas le cas du 24-méthyl- 5α -cholest-7-én- 3β -ol. Ces deux stérols ont été également identifiés dans des chlorophytes (Cranwell *et al.*, 1990) présents dans le lac de Cadagno (Bertoni *et al.*, 1998).

Stérol	Désignation	Concentration ($\mu\text{g/g}$ de sédiment sec)		Pourcentage	
		Sédiment de surface	Tranche 242-248 cm	Sédiment de surface	Tranche 242-248 cm
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22Z-dièn-3 β -ol	O1	0.8	0.3	1.7	0.8
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol	O2	2.8	1.3	6.2	3.5
27-Nor-24-méthyl-5 α -cholest-22E-èn-3 β -ol	O3	0.4	0.6	0.8	1.7
Cholest-5-èn-3 β -ol	O4	9.6	6.3	21.1	17.2
5 α -Cholestan-3 β -ol	O5	1.5	3.4	3.3	9.3
24-Méthylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol	O9	6.0	1.7	13.0	4.8
24-Méthyl-5 α -cholest-22-èn-3 β -ol	O10	-	Tr	-	Tr
24-Méthylcholesta-5,24(28)-dièn-3 β -ol	O11	1.1	0.5	2.3	1.4
24-Méthylcholest-5-èn-3 β -ol	O12	2.9	2.1	6.3	5.9
24-Méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O13	-	0.9	-	2.6
24-Ethylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol	O15	2.7	2.8	5.8	7.7
24-Ethyl-5 α -cholest-22E-èn-3 β -ol	O17	Tr	0.6	Tr	1.7
24-Méthyl-5 α -cholest-7-èn-3 β -ol	O18	-	0.6	-	1.6
24-Ethylcholesta-5,25-dièn-3 β -ol	O19	1.3	-	2.8	-
24-Ethylcholest-5-èn-3 β -ol	O20	15.4	12.1	33.6	33.3
24-Ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O22	1.4	2.2	3.0	6.2
24-Ethyl-5 α -cholest-7-èn-3 β -ol	O27	-	0.8	-	2.3

Tableau 3.5: Concentrations et pourcentages des stérols liés dans le sédiment de surface et dans la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire du lac de Cadagno. Signification des abréviations identique à celle du Tableau 3.1.

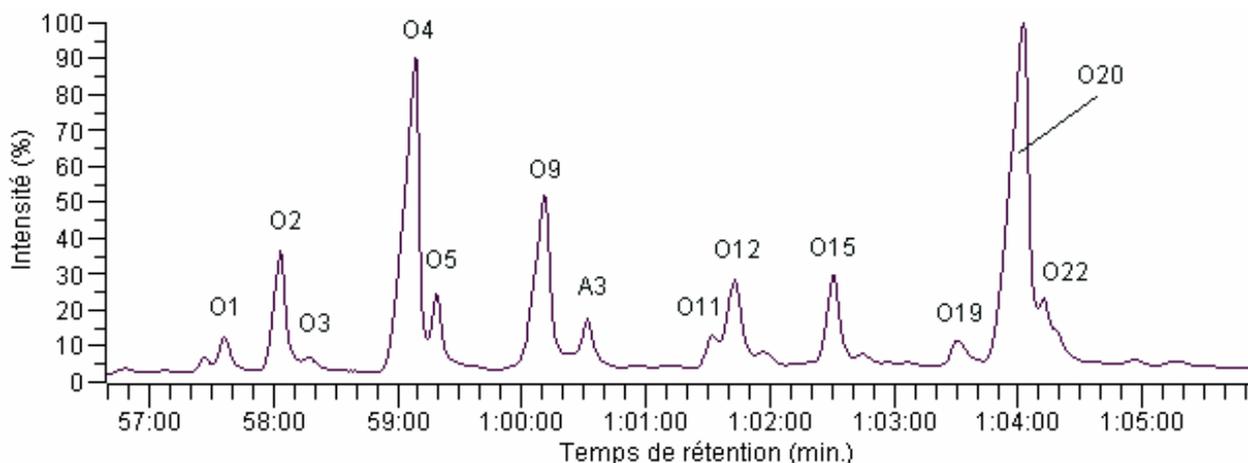
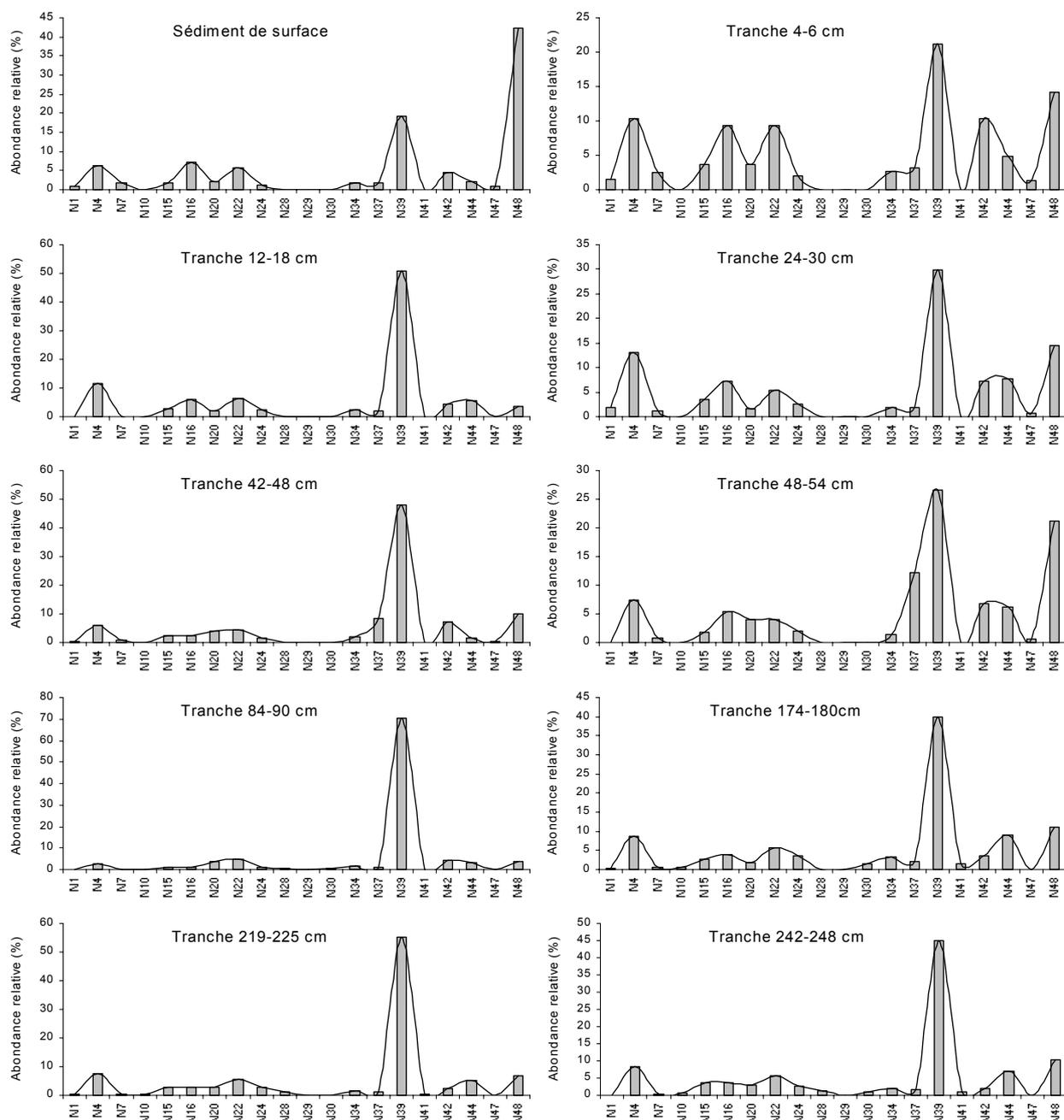


Figure 3.18: Courant ionique total de la fraction "alcools" liés du sédiment de surface. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5. Signification des abréviations: Ox: stérols définis dans le Tableau 3.5; A3: diol.

7.2.2 Origine des stérols présents dans les sédiments du lac de Cadagno

7.2.2.1 Origine des stérols libres présents dans les sédiments du lac de Cadagno

La distribution des stérols libres est représentée sur la Figure 3.19. Le chromatogramme GC-MS correspondant à la tranche 18-24 cm est donné à titre d'exemple sur la Figure 3.20.



Stérène	Désignation	Stérène	Désignation
27-Nor-24-méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N1	23,24-Diméthyl-5 α -cholesta-3,22E-diène?	N29
5 α -Cholest-2-ène	N4	24-Ethyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N30
5 α -Cholest-3-ène	N7	24-Ethyl-5 α -cholesta-3,22E-diène?	N34
24-Méthyl-5 α -cholesta-2,22Z-diène?	N10	24-Méthylcholesta-3,5-diène (GC-MS)	N37
24-Méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N15	23,24-Diméthylcholesta-3,5,22E-triène?	N39
Cholesta-3,5-diène	N16	23,24-Diméthyl-5 α -cholest-2-ène? (GC-MS)	N41
24-Méthylcholesta-3,5,22Z-triène?	N20	24-Ethylcholesta-3,5,22E-triène (GC-MS)	N42
24-Méthylcholesta-3,5,22E-triène	N22	24-Ethyl-5 α -cholest-2-ène (GC-MS)	N44
24-Méthyl-5 α -cholest-2-ène (GC-MS)	N24	24-Ethyl-5 α -cholest-3-ène? (GC-MS)	N47
23,24-Diméthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N28	24-Ethylcholesta-3,5-diène (GC-MS)	N48

Figure 3.19: Distributions des stérènes libres dans différentes tranches de la carotte sédimentaire du lac de Cadagno.

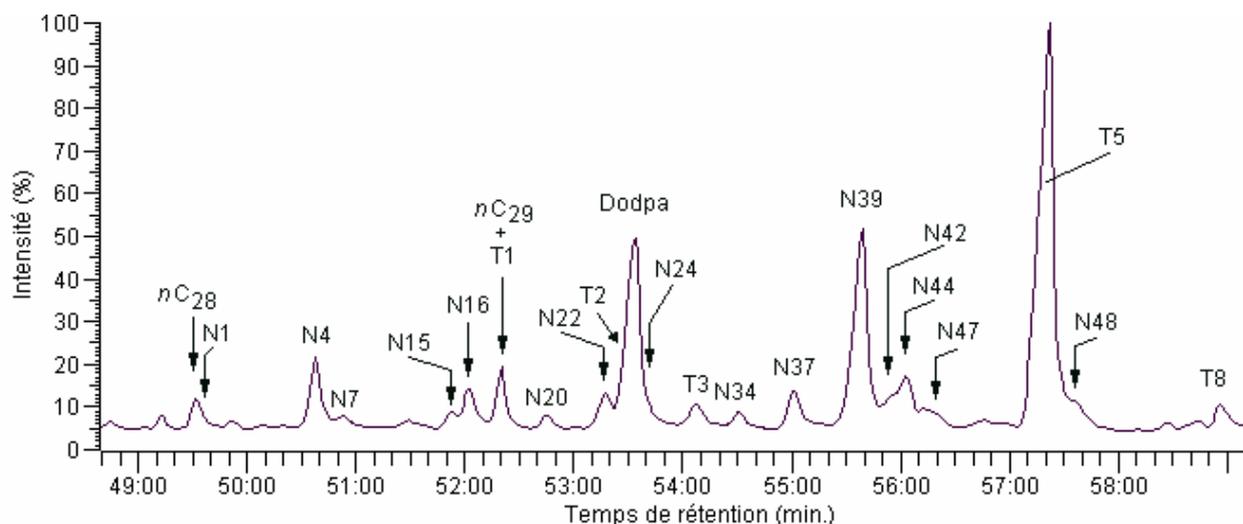


Figure 3.20: Courant ionique total de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" de la tranche 18-24 cm de la carotte sédimentaire. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées à la Figure 3.5. Signification des abréviations: Nx: stérènes définis dans la légende de la Figure 3.19; Tx: terpénoïdes définis dans le Tableau 3.1, nCx: alcanes linéaires à x carbones; Dodpa: Dioctyldiphénylamine (contaminant).

La formation des stérènes à partir des stérols correspondants dans des sédiments récents est établie depuis plusieurs années (pour une revue voir MacKenzie *et al.*, 1982) et ces composés ont été plusieurs fois reportés dans les milieux lacustres (*p. ex.* Cranwell, 1984; Cranwell *et al.*, 1987). Le processus de formation n'est pas parfaitement élucidé laissant possible un mécanisme microbiologique (Robinson *et al.*, 1984) ou une déshydratation assistée par la matrice minérale (Sieskind *et al.*, 1979). Il faut par ailleurs remarquer que la formation des stérènes n'est pas un processus opérant strictement dans le sédiment de surface. En effet Wakeham *et al.* (1984) ont pu établir que la formation des stérènes débutait déjà dans la colonne d'eau. Killops *et* Frewin (1994) ont même pu montrer que des Δ^2 - et $\Delta^{3,5}$ -stérènes étaient déjà formés sur les feuilles de mangrove.

Dans le cas des sédiments du lac de Cadagno, pratiquement tous les stérènes libres (Figure 3.19) possèdent leur stérol précurseur libre correspondant à l'exception du 24-méthylcholesta-3,5,22Z-triène ainsi que du 27-nor-24-méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène. La déshydratation des stérols sans insaturation dans les cycles peut conduire aux Δ^2 - et Δ^3 -stérènes correspondants. C'est le cas du 5 α -cholestan-3 β -ol, du stigmastanol, du 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol et du 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol. Le 24-méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol, le 24-méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol, le 24-méthyl-5 α -cholest-22Z-én-3 β -ol et le 23,24-diméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol donnent uniquement les Δ^2 -stérènes correspondants. Les Δ^5 -stérols conduisent tous aux produits

$\Delta^{3,5}$ -stérènes. C'est ainsi le cas pour les Δ^5 -stéroïls monoinsaturés et les $\Delta^{5,22}$ -stéroïls et leurs homologues en C_{28} et C_{29} correspondants.

Lorsque la composition des stéroïls liés est comparée à celle des stérènes libres, il peut être constaté que beaucoup de stérènes ne possèdent pas leur stérol précurseur parmi les stéroïls liés. Ainsi le 24-méthylcholesta-5,22Z-dién-3 β -ol, le 24-méthyl-5 α -cholest-22Z-én-3 β -ol, le 23,24-diméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol, le 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol et le 23,24-diméthylcholesta-5,22E-én-3 β -ol ne sont pas détectés dans la fraction des stéroïls liés. En revanche, cette fraction contient le précurseur du 27-nor-24-méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène, c'est à dire le 27-nor-24-méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol, absent des libres.

7.2.2.2 Stérènes et stéranes liés par ponts polysulphures présents dans les sédiments du lac de Cadagno

La fraction des hydrocarbures (non aromatiques et aromatiques), la fraction des composés neutres de polarité moyenne à forte et la fraction des acides de l'extrait libre du sédiment de surface et de la tranche 242-248 cm ont tous trois été soumis à une désulphurisation douce par EtSHNa/CH₃I (*cf.* Deuxième Partie, § 4.3). Cette opération a été effectuée afin de mettre en évidence la présence de stéroïdes liés par ponts polysulphures dans ces différentes fractions. Toutefois les analyses par GC-MS n'ont pas permis de détecter les méthylthiostéroïdes identifiés par Adam *et al.* (2000). Ces composés doivent donc être présents dans des quantités inférieures à la limite de détection de ~10 ng par gramme de sédiment sec. Ils peuvent donc être considérés largement minoritaires par rapport aux stérènes quantifiés dans le cadre de cette étude.

7.2.2.3 Stérènes et stéranes liés par ponts monosulphures présents dans les sédiments du lac de Cadagno

Les stérènes et stéranes liés par ponts mono- et polysulphures (obtenus via la désulphurisation par NaBH₄/NiCl₂) identifiés dans le sédiment de surface et la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire sont rassemblés dans le Tableau 3.6 (chromatogramme associé: Figure 3.21).

Pour évaluer la quantité de stérènes liés par ponts monosulphures, la réaction de désulphurisation par NaBH₄/NiCl₂ a été effectuée sur l'extrait organique total des libres. Les stérènes libres soumis à la réaction ont donc pu subir des réactions parasites liées au réactif à savoir des réductions (Schouten *et al.*, 1993). Ainsi dans le mélange final, seront réunis les stérènes libres et leurs formes réduites, ainsi que les stérènes liés par ponts monosulphures et

leurs formes réduites associées. Les stérènes liés par ponts polysulphures n'y contribuent pas puisqu'ils constituent une part négligeable des stérènes sulfurés (*cf.* § 7.2.2.2).

Stérane/Stérène	Désignation	Concentration (µg/g de sédiment sec)		Pourcentage	
		Sédiment de surface	Tranche 242-248 cm	Sédiment de surface	Tranche 242-248 cm
5β-Cholestane	N2	0.46	Coelution	5.9	Coelution
Cholest-4-ène	N3	0.29	0.17	3.8	2.5
5α-Cholestane	N5	1.38	0.88	17.8	13.3
Cholest-5-ène	N6	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
24-Méthyl-5β-cholest-22E-ène?	N8	0.13	-	1.7	-
24-Méthylcholesta-4,22Z-diène?	N9	0.12	0.19	1.5	2.9
24-Méthylcholesta-5,22Z-diène?	N11	0.20	0.29	2.5	4.4
24-Méthyl-5α-cholest-22Z-ène?	N12	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
24-Méthylcholesta-4,22E-diène	N13	0.12	0.09	1.6	1.3
C ₂₈ -Stéradène (RI=1062)	N14	0.09	-	1.2	-
24-Méthylcholesta-5,22E-diène?	N17	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
24-Méthyl-5α-cholest-22E-ène?	N18	0.50	0.34	6.5	5.1
24-Méthyl-5β-cholestane?	N19	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
C ₂₈ -Stéradène (RI=1135)	N21	0.22	0.19	2.8	2.8
24-Méthylcholest-4-ène?	N23	0.26	-	3.3	-
24-Méthyl-5α-cholestane	N25	0.60	0.31	7.8	4.7
24-Méthylcholest-5-ène	N26	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
23,24-Diméthylcholesta-4,22E-diène?	N27	0.46	0.87	6.0	13.2
24-Ethylcholesta-4,22E-diène?	N31	1.22	2.08	15.8	31.6
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-diène?	N32	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
23,24-Diméthyl-5α-cholest-22E-ène?	N33	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
24-Ethylcholesta-5,22E-diène	N35	0.58	0.30	7.5	4.5
24-Ethyl-5α-cholest-22E-ène	N36	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
24-Ethyl-5β-cholestane	N38	0.51	0.23	6.6	3.6
24-Ethylcholest-4-ène	N40	0.58	0.67	7.6	10.1
23,24-Diméthyl-5α-cholestane?	N43	-	Coelution	-	Coelution
24-Ethyl-5α-cholestane	N45	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution
24-Ethylcholest-5-ène?	N46	Coelution	Coelution	Coelution	Coelution

Tableau 3.6: Concentrations et pourcentages des stérènes et stéranes obtenus par désulphurisation à l'aide de NaBH₄/NiCl₂ dans le sédiment de surface et dans la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire du lac de Cadagno. Signification des abréviations identique à celle du Tableau 3.1.

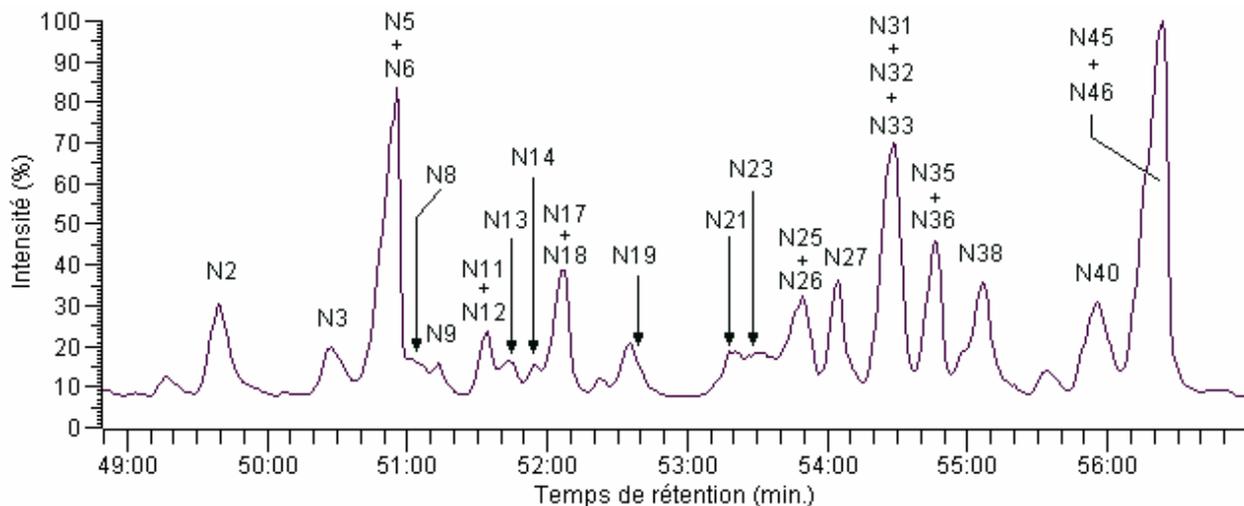


Figure 3.21: Courant ionique total de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" du sédiment de surface traité par le réactif NaBH₄/NiCl₂. Conditions d'analyses GC-MS identiques à celles mentionnées dans la légende de la Figure 3.5. Signification des abréviations: Nx: stérènes définis dans le Tableau 3.6.

Le Tableau 3.6 montre qu'aucun des stérènes détectés dans les libres (*cf.* Figure 3.19) ne se trouvent parmi les stérènes obtenus par désulphurisation. Les Δ^2 -, Δ^3 -, $\Delta^{2,22}$ -, $\Delta^{3,22}$ -, $\Delta^{3,5}$ - et les $\Delta^{3,5,22}$ -stérènes observés dans les fractions libres sont remplacés par les stéranes et les Δ^4 -, Δ^5 -, Δ^{22} -, $\Delta^{4,22}$ -, $\Delta^{5,22}$ -stérènes après désulphurisation. La formation des stéranes, des Δ^5 - et Δ^{22} -stérènes peut être expliquée au moins en partie par la réduction de la liaison en position 2 ou 3 des stérènes libres vu la disparition des Δ^2 -, Δ^3 -, $\Delta^{2,22}$ - et les $\Delta^{3,22}$ -stérènes. De la même manière, les Δ^4 - et $\Delta^{4,22}$ -stérènes pourraient en partie être issus de la réduction de $\Delta^{3,5}$ - et $\Delta^{3,5,22}$ -stérènes libres compte tenu de la disparition de ces derniers. Les Δ^5 - et $\Delta^{5,22}$ -stérènes pourraient également provenir en partie de la réduction de la double liaison en position 3 des $\Delta^{3,5}$ - et $\Delta^{3,5,22}$ -stérènes. A ce schéma, il faut ajouter des réductions successives qui peuvent transformer chaque fois en partie un stérène avec n insaturations en un stérène avec $n-1$ insaturations (*p. ex.* $\Delta^{3,5,22}$ -stérènes en $\Delta^{5,22}$ - puis en Δ^{22} -stérènes puis en $5\alpha/\beta$ -cholestane). Il ne faut pas non plus oublier les stérènes liés par ponts monosulphures qui sont transformés en stérènes correspondants puis soumis aux réductions parasites du réactif de désulphurisation. Ceci pourrait également expliquer l'origine des Δ^4 -stérènes qui seraient dans ce cas issus de Δ^4 -stérènes liés par ponts monosulphures. La présence de $5\alpha/\beta$ -cholestane peut s'expliquer par la non spécificité du réactif de désulphurisation réduisant les double liaisons en position 5 de manière non stéréospécifique.

7.3 Variations des stéroïdes le long de la carotte sédimentaire

7.3.1 Variations des stérols et stérènes libres le long de la carotte sédimentaire

Les variations des stérols libres le long de la carotte sédimentaire sont représentées sur la Figure 3.22 tandis que le Tableau 3.7 liste les stérols présents uniquement à certains niveaux. La Figure 3.22 montre une chute rapide de la concentration des stérols dès les premiers 10 cm comme cela été observé dans d'autres sédiments lacustres (Cranwell, 1984b; Mermoud, 1982; Nishimura, 1977a; Robinson *et al.*, 1986). Les Figures 3.23 et 3.24 révèlent que la forte diminution de la concentration des stérols dans les premiers centimètres de la carotte est corrélée avec celle des stérènes. D'une manière générale, le profil des courbes montre un minimum global pour la tranche 12-18 cm puis un premier maximum à 24-30 cm. Ce dernier est suivi d'un minimum à 36-42 cm, d'un second maximum à 42-48 cm et enfin d'une légère augmentation jusqu'aux niveaux les plus profonds. Ces variations sont qualitativement proches de celles du TOC (*cf.* §

2). Toutefois, sous 90 cm de profondeur, le TOC augmente plus fortement que les concentrations des stérols et stérènes dans l'ensemble.

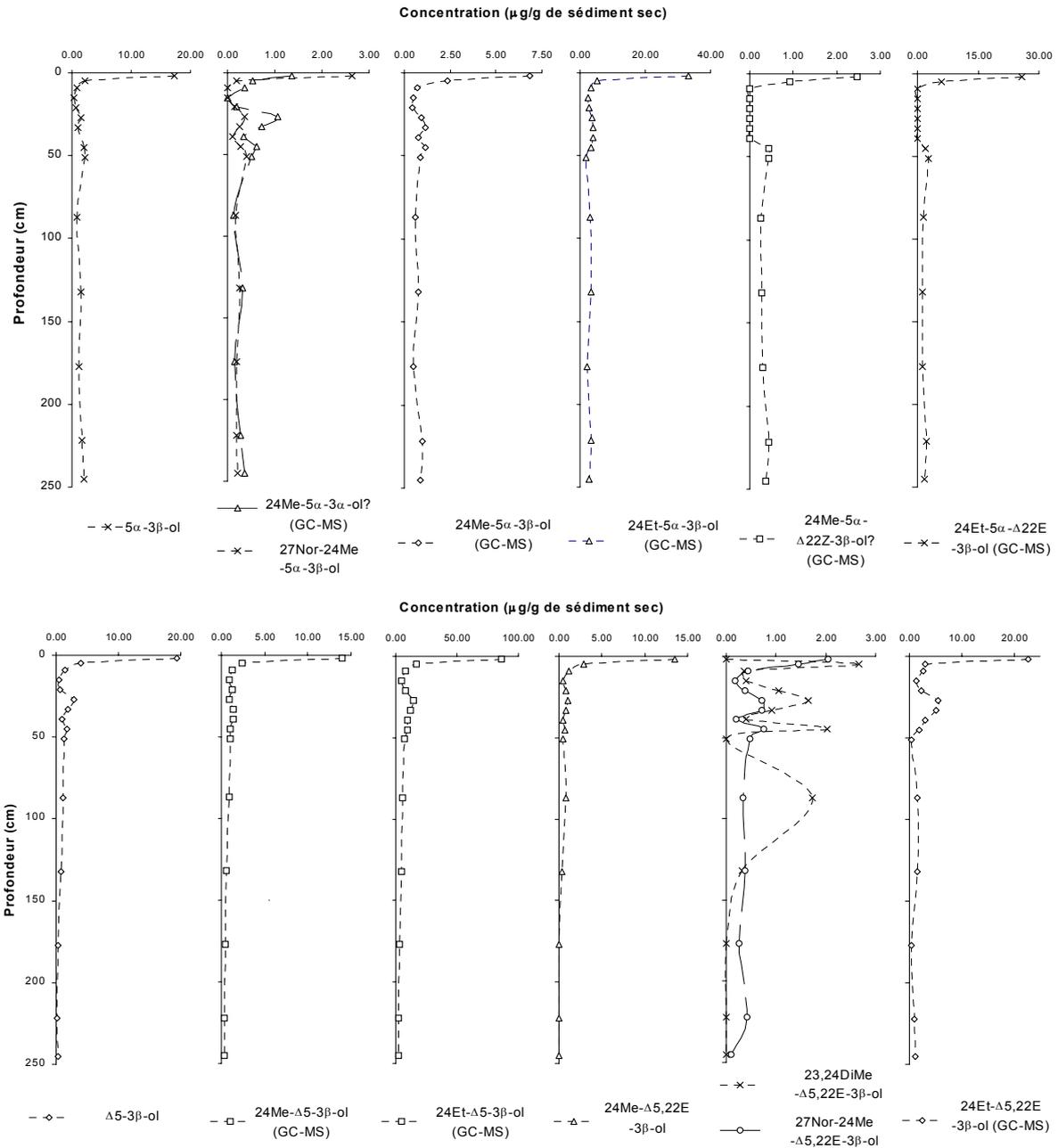


Figure 3.22: Variations de la concentration des stérols libres avec la profondeur du sédiment

Stérol	Désignation	Concentration (μg/g de sédiment sec)															
		Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)														
			0-4	4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36	36-42	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248
24-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.21	Tr	Tr	Tr	Tr
24-Méthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol	O18	0.88	-	-	Tr	Tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23,24-Diméthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.78	4.71	4.75	-	-
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O24	1.91	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.53	-	Tr	-	-
24-Ethyl-4α-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O26	1.76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholestan-3β-ol	O29	2.52	1.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.72	0.25	Tr	-	-
24-Ethyl-4α-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O30	3.75	1.33	-	-	-	Tr	-	-	-	-	-	0.88	-	Tr	-	-

Tableau 3.7: Concentrations des stérols libres apparaissant uniquement dans certaines tranches de la carotte sédimentaire prélevée dans le lac de Cadagno. Signification des abréviations identique à celle du Tableau 3.1.

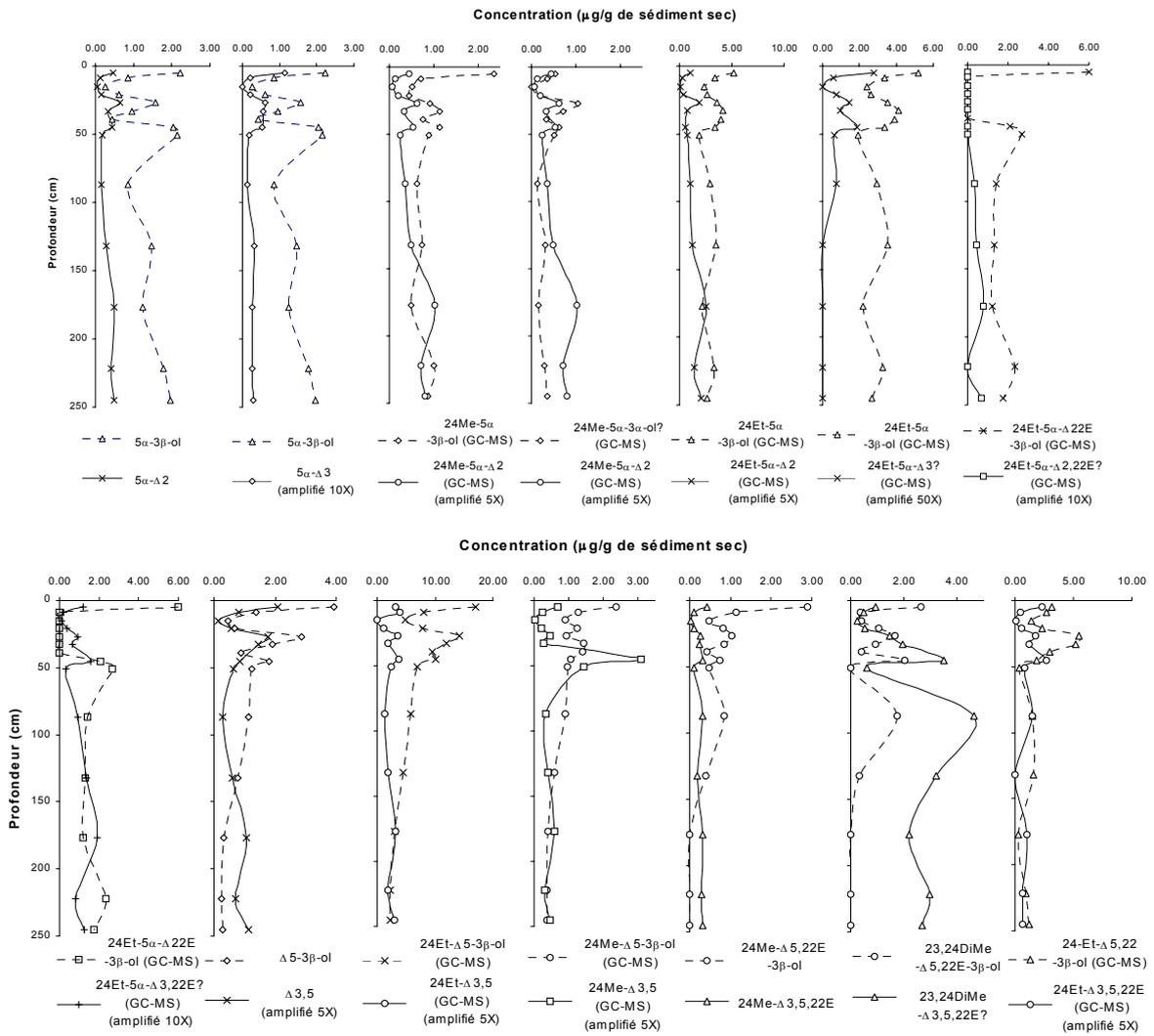


Figure 3.23: Variations de la concentration des stérols et des stérènes libres correspondant avec la profondeur du sédiment à partir de 4 cm.

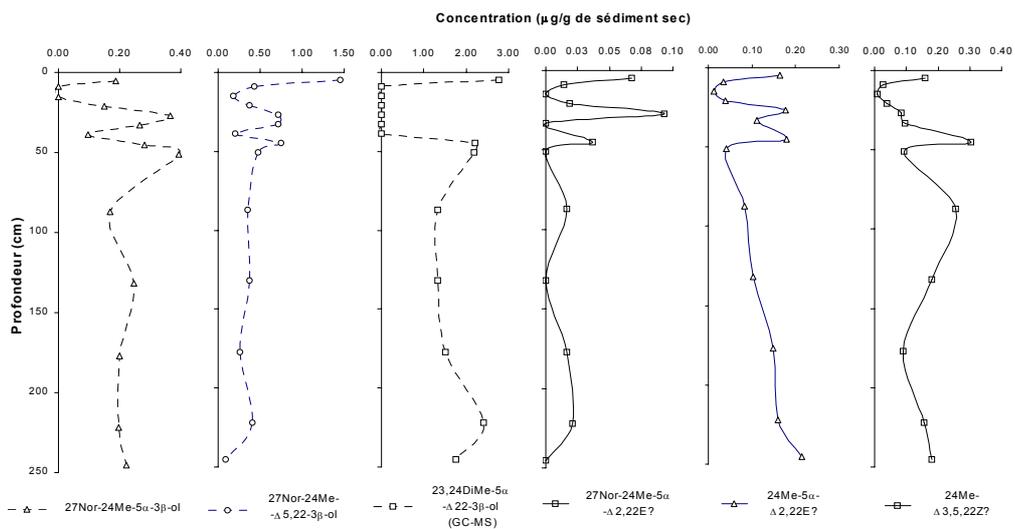


Figure 3.24: Variations de la concentration des stérols et des stérènes libres dont le produit ou le précurseur est présent en faibles quantités voire absent avec la profondeur du sédiment à partir de 4 cm.

Stérène	Désignation	Concentration ($\mu\text{g/g}$ de sédiment sec)															
		Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)														
			4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248		
24-Méthyl-5 α -cholesta-2,22Z-diène?	N10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tr	-	0.029	0.023	0.040
23,24-Diméthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.031	0.060	Tr	0.071	0.083
23,24-Diméthylcholesta-3,22E-diène?	N29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
23,24-Diméthyl-5 α -cholest-2-ène? (GC-MS)	N41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.080	0.029	0.062

Tableau 3.8: Concentrations des stérènes libres apparaissant uniquement dans certaines tranches de la carotte sédimentaire prélevée dans le lac de Cadagno. Signification des abréviations identiques à celle du Tableau 3.1

Les concentrations des stérènes sont globalement entre 5 à 10 fois inférieures à celle des stérols correspondants. Putschew *et al.* (1995) ont remarqué que ces composés sont présents dans les sédiments du lac de Cadagno à des concentrations très basses. Le 5 α -cholest-2-ène et le 24-méthylcholesta-3,5,22E-triène, parmi les plus abondants sont présents en quantités 2 à 3 fois inférieures à leur stérol précurseur. Le 23,24-méthylcholesta-3,5,22E-triène, le plus abondant, est présent en quantités proches de son précurseur. Il est surprenant de constater que ce stératriène domine la distribution des stérènes (Figure 3.19) alors que son précurseur n'est présent qu'en quantités mineures (Figure 3.16).

Il est encore plus frappant de constater que le 24-éthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol présent en quantités supérieures au 23,24-diméthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol conduit à son stérène correspondant dans des quantités largement inférieures au 23,24-diméthylcholesta-3,5,22E-triène. Ces observations suggèrent une transformation bactérienne sélective du 23,24-diméthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol en 23,24-diméthylcholesta-3,5,22E-triène dans le lac de Cadagno plutôt qu'une déshydratation assistée par une matrice minérale comme ceci a été proposé par Robinson *et al.* (1984). La forte proportion de 23,24-diméthylcholesta-3,5,22E-triène dans les sédiments de faible profondeur (moins de 12 cm de profondeur) ainsi que la présence des autres stérènes supposent que le mécanisme de formation est déjà opérant dans la colonne d'eau comme ceci a été proposé par Putschew *et al.* (1995).

Le profil des courbes du cholestérol, du 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol et du sitostérol sont sensiblement similaires à ceux des stanols correspondants. Ceci plaide en faveur d'une hydrogénation bactérienne de la liaison 5 comme exposé dans le paragraphe 7.2.1.3.

Le cholestérol, le 27-nor-24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et le 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et le 23,24-diméthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol représentatifs respectivement de la faune zooplanctonique, planctonique et phytoplanctonique (*cf.* § 7.2.1.3 et Putschew *et al.*, 1995), ont des profils semblables malgré une baisse plus importante de la concentration des deux derniers stérols avec la profondeur. Cela est cohérent avec une interdépendance du phytoplancton et du zooplancton.

Les profils du 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol et du 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol qui demeurent absents de la carotte sédimentaire de 6 à 42 cm se distinguent. La concentration en 24-éthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène conduit à un profil similaire à celui de son stérol précurseur. Dans le cas des 23,24-diméthyl-5 α -cholesta-2/3,22E-diène, la présence de traces de ces deux stérènes est elle aussi corrélée avec les maxima de concentration du stérol précurseur entre 84 et 248 cm. Une transformation bactérienne réduisant les $\Delta^{5,22}$ -stérols en leur Δ^{22} -homologue a été proposée pour expliquer en partie l'origine de ces derniers stérols (Cranwell, 1984a). Les profils du 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol et 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol ayant peu de similitudes avec les profils des $\Delta^{5,22}$ -stérols respectifs, il est peu probable que la transformation bactérienne des $\Delta^{5,22}$ -stérols en Δ^{22} -stérols soit effective dans le lac de Cadagno. La présence du 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol dans les dinoflagellés (Volkman *et al.*, 1999) suggère une origine semblable du 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol en raison de son profil similaire. De plus l'absence entre 6 et 42 cm de ces deux derniers biomarqueurs laisse supposer que les espèces produisant ces stérols ont été largement minoritaires voire absentes pendant la période de temps associée.

La formation des Δ^2 -stérènes apparaît privilégiée par rapport à celle des Δ^3 -stérènes. Le 5 α -cholest-2-ène et 24-éthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène sont produits en plus grande quantités que les Δ^3 -stérènes homologues. Les $\Delta^{3,5}$ -stérènes apparaissent également plus stables que les $\Delta^{2,5}$ -stérènes absents du sédiment. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus dans d'autres sédiments récents ((MacKenzie *et al.*, 1982 et références incluses) et peuvent être expliqués par une énergie stérique croissante pour les couples $\Delta^{3,5}$ -, $\Delta^{2,5}$ -stéradiènes et Δ^2 - et Δ^3 -stérènes (correspondant à une instabilité croissante pour des isomères; Schüpfer et Gülaçar, 2000).

Le profil général des courbes peut être expliqué par des causes multiples.

L'origine des minima pourrait provenir d'apports clastiques tels que les avalanches (Del Don *et al.*, 1998). Ceci est d'autant plus probable que la zone d'échantillonnage est située en contrebas d'un couloir d'avalanches et qu'en 1951, une avalanche a détruit 20 à 25 maisons de pierres le long de la rive Nord avant d'atteindre le lac (Birch *et al.*, 1996). Ces avalanches pourraient avoir pour conséquence de diluer la matière organique du sédiment par de la matière minérale donnant naissance aux minima observés. Une seconde conséquence des avalanches pourrait être l'augmentation temporaire de la production primaire en raison de l'excédent de nutriment minéral subitement mis à disposition (Killops et Killops, 1993). Cette augmentation corrélée par une plus forte accumulation de matière organique dans le sédiment et donc une concentration en matière organique plus élevée conduirait à un maximum suivant le minimum précédemment observé. Une fois le surplus de nutriment minéral consommé, la production primaire retrouverait un cycle

plus constant. L'accumulation et donc la concentration de matière organique dans le sédiment retrouverait alors des valeurs modérées intermédiaires entre les maxima et minima considérés précédemment.

L'activité humaine a par ailleurs pu perturber de manière permanente les conditions de déposition des sédiments. En effet la construction d'une digue et d'un chemin le long du versant escarpé du lac ont sûrement nécessité le déversement de remblais aux endroits correspondants. Ceci a pu avoir pour conséquence de perturber temporairement le cycle de production primaire et le taux de sédimentation.

Les déversements occasionnels d'excréments de bétail ainsi que les déchets d'une manufacture fromagère (Bossard *et al.*, 2001) font également partie des apports de matière organique allochtone intermittents susceptibles d'influencer fortement l'écosystème du lac. Ces apports allochtones sont à considérer avec d'autant plus d'importance étant donné leur richesse en azote et phosphore, éléments biolimitants du taux de croissance et de reproduction des organismes (Killops et Killops, 1993).

L'utilisation du lac de Cadagno comme réservoir secondaire approvisionnant une centrale hydro-électrique (Peduzzi *et al.*, 1998) est également un facteur à prendre en compte même si la quantité d'eau retirée du lac n'engendre qu'une variation d'un à deux mètres du niveau d'eau.

La résolution des profils est une autre variable qui a son importance. En effet la résolution n'est pas la même de 0 à 54 cm et de 54 cm à 248 cm. Il en découle que des variations brutales éventuelles de 54 à 248 cm de profondeur seront atténuées. Ceci peut donner la fausse impression que seules des variations brusques ont eu lieu de 0 à 54 cm de profondeur alors que ce n'est pas forcément le cas.

Enfin et dans une moindre mesure, il ne faut pas oublier l'influence du climat sur la production primaire. Cette dernière n'est pas constante au fil des saisons et des années. En effet, l'ensoleillement, le mélange du monimo- et mixolimnion par le vent (Killops et Killops, 1993), la variabilité du débit des eaux de ruissellement entre saisons et années sont tous des paramètres ayant des répercussions sur l'écosystème du lac. Ces paramètres peuvent également influencer la végétation autour du lac qui peut à son tour modifier les apports allochtones du lac. Si la datation de Putschew *et al.* (1995) est utilisée, la tranche de 0-248 cm de la carotte sédimentaire représente une période de 600 années. Or, d'après Stapfer (1991), la végétation il y a 500 années environ était constituée d'une part plus importante de buissons et d'arbres. L'auteur explique qu'un défrichement anthropogène est certainement à l'origine du changement de végétation.

7.3.2 Stérols liés

Les concentrations totales des stérols libres et liés en C₂₇, C₂₈ et C₂₉ dans le sédiment de surface et dans la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire sont présentées sur la Figure 3.25. Cette dernière montre clairement qu'il y a une diminution considérable de la quantité des stérols libres lorsque le sédiment de surface et la tranche 242-248 cm sont comparés (*p. ex.* -73% pour les stérols en C₂₇₋₂₉) tandis que les liés varient dans des proportions beaucoup plus réduites (*p. ex.* -21% pour les stérols en C₂₇₋₂₉). La Figure 3.25 montre que les stérols liés sont présents dans des proportions comparables aux stérols libres dans le sédiment de surface. Par contre dans la tranche 242-248 cm, les stérols liés deviennent prépondérants par rapport aux libres. Ces observations ont également été faites par Nishimura (1977b) dans le cas du lac Suwa et Cranwell *et al.*(1987) pour le petit lac de Priest Pot. Pour expliquer l'augmentation du rapport "stérols liés/stérols libres" avec la profondeur, Cranwell (1982) a émis l'hypothèse d'une plus grande résistance aux réactions microbiologiques des stérols liés par rapport aux libres; hypothèse qui a été vérifiée par les résultats de Jeng *et al.* (1997). Ces auteurs ont montré dans un sédiment provenant de la marge continentale au Sud-Ouest de Taïwan que les stérols liés totaux possédaient une constante de vitesse de dégradation de 36% inférieure à celle des libres.

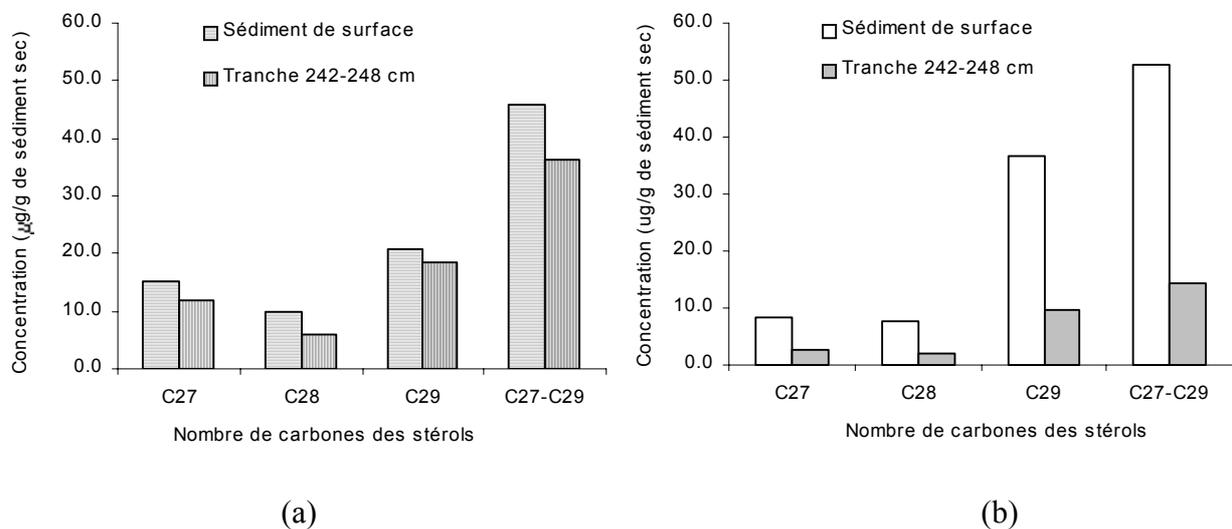
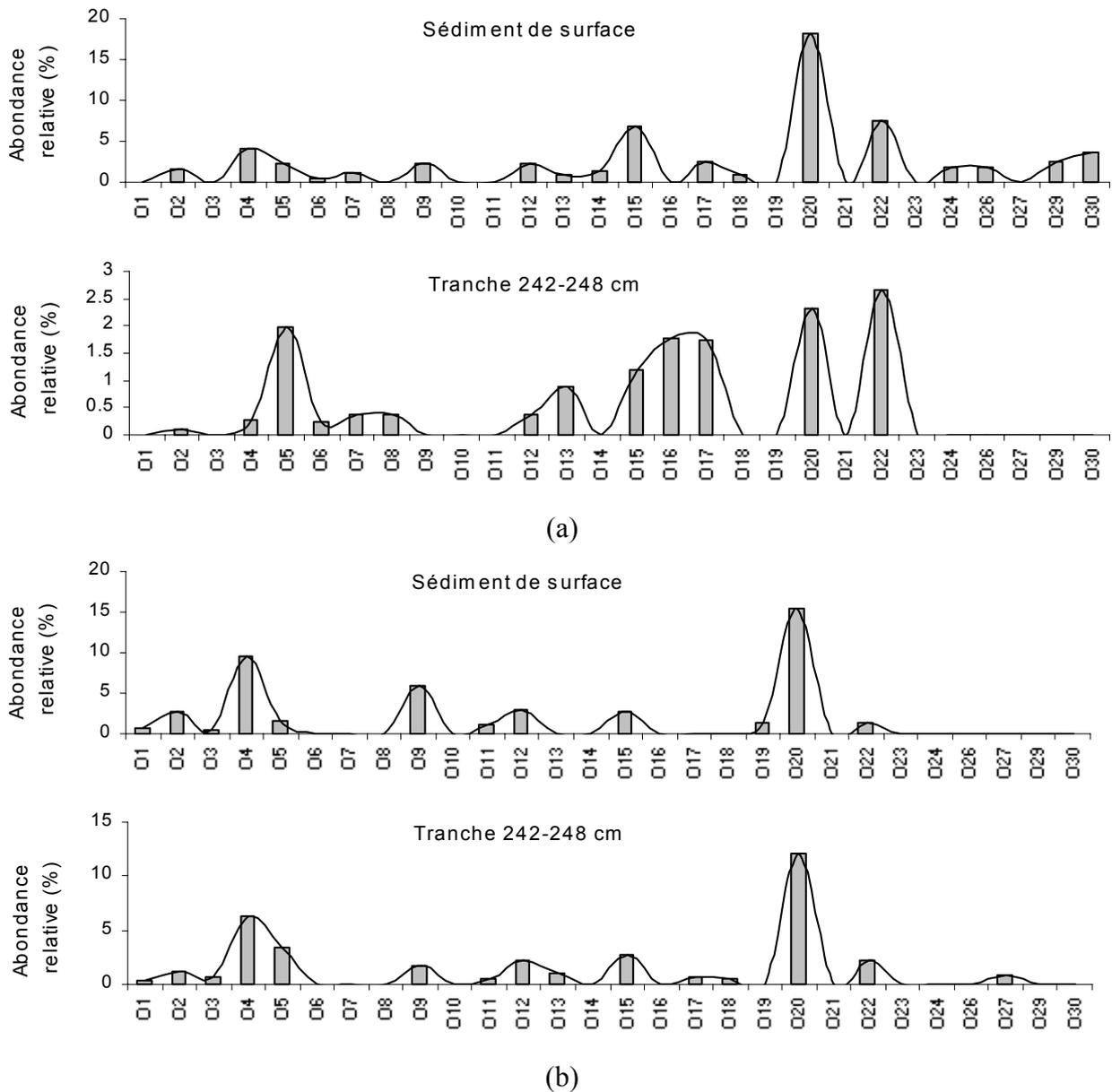


Figure 3.25: Variations de stérols liés (a) et libres (b) dans le sédiment de surface et dans la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire.

Les Figures 3.26 (a) et (b) illustrent les distributions des stérols individuels libres et liés dans le sédiment de surface et dans la section 242-248 cm.



Stérol	Désignation	Stérol	Désignation
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22Z-dièn-3 β -ol	O1	24-Ethylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol (GC-MS)	O15
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol	O2	23,24-Diméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol (GC-MS)	O16
27-Nor-24-méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol	O3	24-Ethyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol (GC-MS)	O17
Cholest-5-én-3 β -ol	O4	24-Méthyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol	O18
5 α -Cholestan-3 β -ol	O5	24-Ethylcholesta-5,25-dièn-3 β -ol?	O19
27-Nor-24-méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O6	24-Ethylcholest-5-én-3 β -ol (GC-MS)	O20
24-Méthyl-5 α -cholestan-3 α -ol? (GC-MS)	O7	23,24-Diméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol (GC-MS)	O21
24-Méthyl-5 α -cholest-22Z-én-3 β -ol? (GC-MS)	O8	24-Ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol (GC-MS)	O22
24-Méthylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol	O9	24-Ethylcholesta-5,24(28)Z-dièn-3 β -ol	O23
24-Méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol	O10	4 α ,23,24-Triméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol	O24
24-Méthylcholesta-5,24(28)-dièn-3 β -ol	O11	24-Ethyl-4 α -Méthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol	O26
24-Méthylcholest-5-én-3 β -ol (GC-MS)	O12	24-Ethyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol	O27
24-Méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol (GC-MS)	O13	4 α ,23,24-Triméthyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O29
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol	O14	24-Ethyl-4 α -méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol	O30

Figure 3.26: Distribution des stérols libres (a) et liés (b) dans le sédiment de surface et la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire du lac de Cadagno.

Les stérols liés montrent sur la Figure 3.26 une distribution assez similaire à celle des stérols libres dans le sédiment de surface. Ceci suggère une origine commune pour les libres et liés comme l'a proposé Nishimura (1977b) pour les sédiments du lac Suwa (Japon) en se basant sur des mesures isotopiques. Dans le cas du lac de Cadagno, les différences d'abondance entre stérols libres et liés pour la tranche 242-248 cm peuvent être reliées à la plus grande résistance des liés aux réactions diagenétiques (chimiques et/ou microbiologiques) (Nishimura, 1977b) au cours de l'enfouissement.

7.3.3 Stérènes désulphurés

La variation des concentrations totales des stérènes en C₂₇, C₂₈ et C₂₉ désulphurés par NiCl₂/NaBH₄ dans le sédiment de surface et dans la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire est présentée sur la Figure 3.27(a).

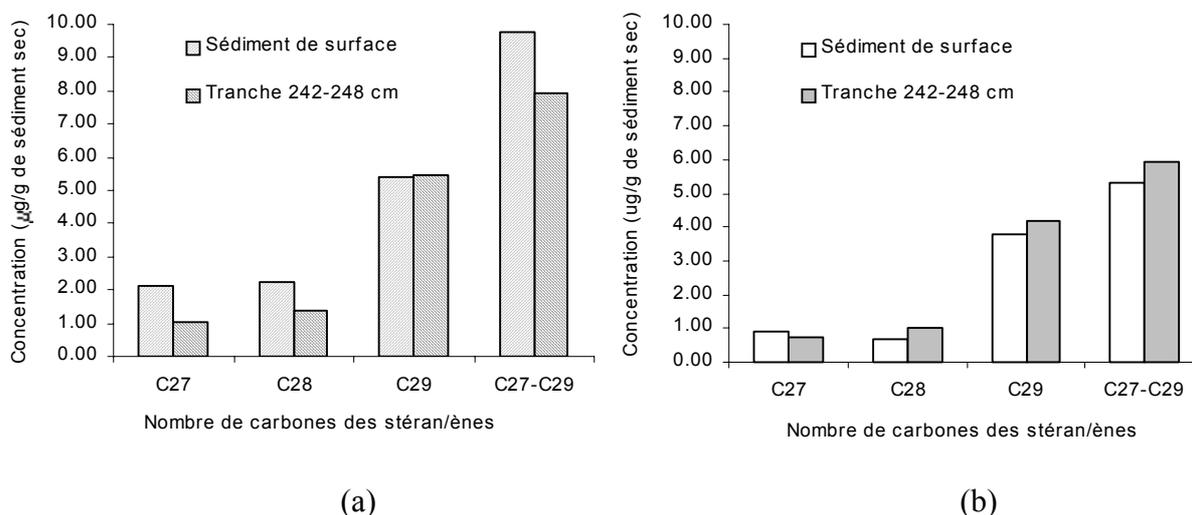


Figure 3.27: Variations de stérènes désulphurés par NiCl₂/NaBH₄ (a) et libres (b) dans le sédiment de surface et dans la tranche 242-248 cm de la carotte sédimentaire.

La Figure 3.27 montre des variations peu importantes des libres entre le sédiment de surface et la tranche 242-248 cm. Les stérènes désulphurés en C₂₇ et C₂₈ varient plus significativement que les stérènes en C₂₉. La Figure 3.27 montre également que la proportion des stérènes désulphurés par rapport aux libres est plus importante dans le sédiment de surface que dans la tranche 242-248 cm. Dans cette dernière tranche les stérènes libres et désulphurés sont présents en quantités comparables.

Il est difficile d'établir des comparaisons pour deux niveaux seulement. Toutefois les résultats obtenus par Kok *et al.* (2000) pour le lac Ace (Antarctique) montrent une proportion de stérènes libres qui devient minoritaire par rapport aux stéroïdes sulphurés sous 5 cm. Les auteurs expliquent la formation des stéroïdes sulphurés pendant l'enfouissement non pas à partir des

stérènes libres mais des stérols. Ce mécanisme de formation est compatible avec celui du lac de Cadagno étant donné la variation faible des stérènes pour les deux niveaux comparés. Toutefois une augmentation des stéroïdes sulphurés n'est pas visible pour les deux niveaux comparés soutenant l'hypothèse d'une sulphurisation très précoce ayant déjà eu lieu dans le sédiment de surface comme cela a été proposé par Adam *et al.* (2000). Ces derniers auteurs ont étudié des sédiments récents et proposé un mécanisme de formation des produits polysulphurés via la forme cétonique des alcools. Putschew *et al.* (1996) ont étudié la variation des produits sulphurés dans les 35 premiers centimètres du lac de Cadagno. Ils sont arrivés à la conclusion que la sulphurisation était un processus démarrant dans la colonne d'eau ou les premiers millimètres du sédiment. Toutefois, Werne *et al.* (2000) qui ont étudié des sédiments anciens du bassin Cariaco (Venezuela) ont proposé un mécanisme cinétique transformant le triterpène 13 β (H)-malabarica-14(27),17E,21-triène en un thiane monoinsaturé. Sur la base des deux niveaux comparés une transformation des stérènes libres en stéroïdes sulphurés n'est pas apparente pour les sédiments récents du lac de Cadagno.

7.4 Rapports stanol/sténol

La Figure 3.28 représente les variations du rapport "stanol/sténol" des stérols en C₂₇ à C₂₉ ainsi que la somme des stérols C₂₇₋₂₉. Ces rapports augmentent globalement avec la profondeur. Comme les stérols en C₂₉ sont majoritaires par rapport aux autres stérols, le rapport stanol/sténol de la somme C₂₇₋₂₉ en est fortement influencé. Toutefois les valeurs des rapports sont considérablement différentes. Pour les stérols en C₂₇, le rapport est supérieur à 1 déjà sous 48 cm de profondeur. Pour les stérols en C₂₈, il faut atteindre des profondeurs de 219 cm pour dépasser sensiblement la valeur de l'unité tandis que pour les stérols en C₂₉, le rapport reste globalement inférieur à l'unité. Nishimura (1978) avait déjà observé une transformation plus rapide des sténols en stanols par rapport aux sténols en C₂₉ dans le lac Suwa mais seulement dans les 10 premiers centimètres du sédiment de surface. Nishimura et Koyama (1976) ont montré qu'au-delà de 30 cm, le rapport stanol/sténol restait constant. L'augmentation globale du rapport "stanol/sténol" pour les stérols en C₂₇ à C₂₉ pourrait dès lors être expliquée par une activité bactérienne plus intense dans le passé. Un taux de sédimentation plus faible a été suggéré pour les tranches 84-248 cm (*cf.* § 5.1). Ceci pourrait avoir pour conséquence un remaniement bactérien plus important qui pourrait expliquer globalement la plus forte proportion de stanols par rapport aux sténols.

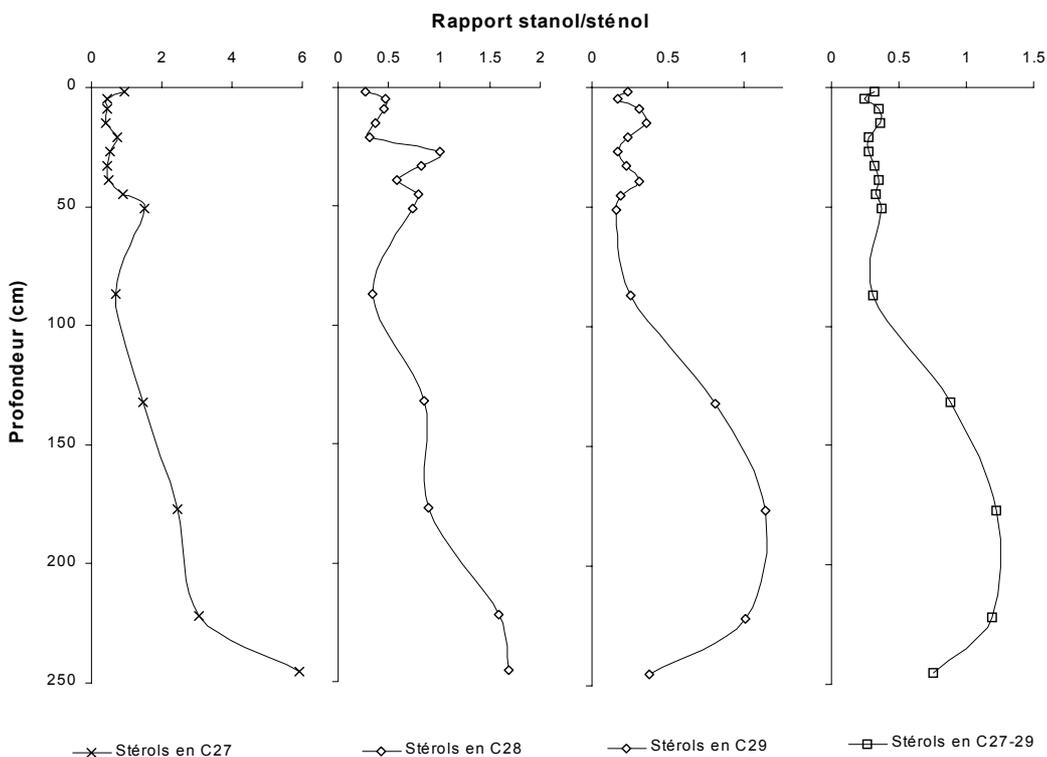


Figure 3.28: Variations du rapport stanol/stérol des stérols en C₂₇, C₂₈, C₂₉ et C₂₇₋₂₉. Remarque: Sont considérés stanols tous les stérols saturés quel que ce soit leur configuration en position 3. Les sténols regroupent tous les stérols insaturés.

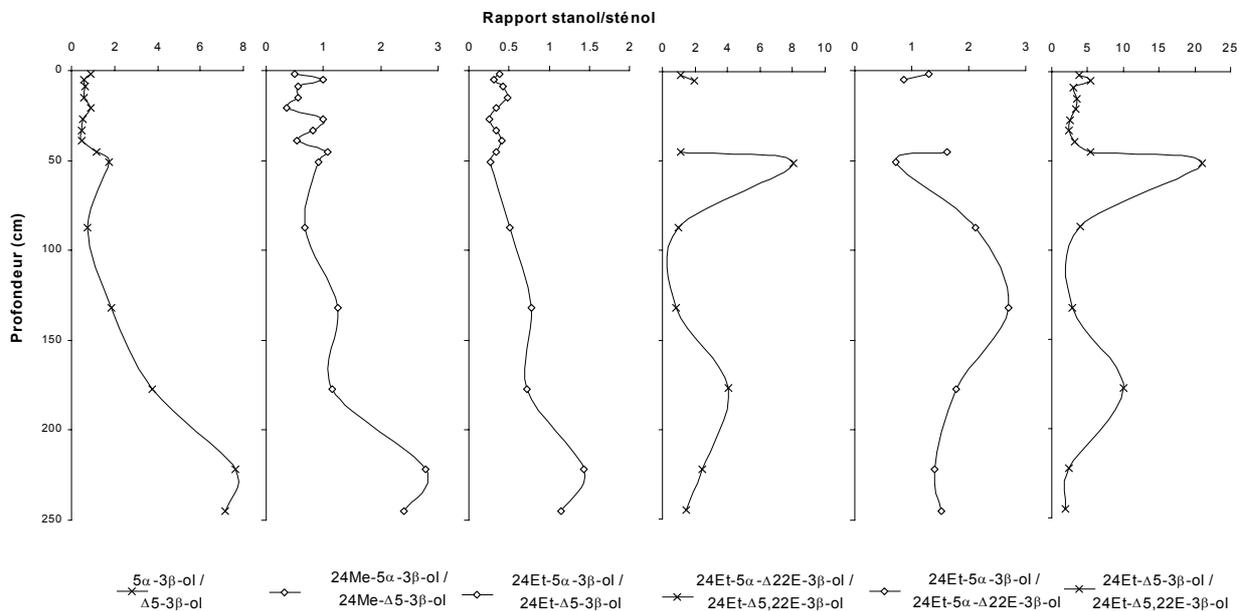


Figure 3.29: Variations du rapport stanol/stérol de stérols spécifiques.

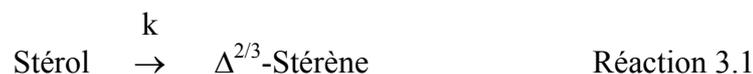
La Figure 3.29 illustre l'évolution des rapports stanol/stérol pour les couples cholestérol/5 α -cholestan-3 β -ol, 24-méthylcholest-5-én-3 β -ol/24-méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol, 24-éthylcholest-5-

én-3 β -ol/24-éthyl-5 α -cholestan-3 β -ol, 24-éthyl-5 α -cholestan-3 β -ol/24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol, 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol/24-éthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et 24-éthylcholest-5-én-3 β -ol/24-éthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol. Des variations irrégulières sont observées notamment pour les 24-éthyl-5 α -cholestan-3 β -ol/24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol, 24-éthylcholest-5-én-3 β -ol/24-éthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol/24-éthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol. Cranwell (1984a) a constaté que le rapport Δ^{22} -sténol/ $\Delta^{5,22}$ -sténol augmentait de la même manière que le rapport stanol/ Δ^5 -sténol dans les 65 cm de la carotte sédimentaire du lac d'Upton Broad. Ceci ne semble pas être le cas dans les sédiments du lac de Cadagno lorsque sont comparés les courbes 24-éthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol/24-éthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et stanol/ Δ^5 -sténol. Une hydrogénation des $\Delta^{5,22}$ -stérois en Δ^{22} -stérois ne semble donc pas être significative dans cet environnement. Toutefois une observation remarquable est la similitude du profil du rapport 24-éthyl-5 α -cholestan-3 β -ol/24-éthylcholest-5-én-3 β -ol par rapport à ses homologues en C₂₇ et C₂₈. De plus l'augmentation du rapport stanol/ Δ^5 -sténol est de plus en plus marquée de C₂₉ à C₂₇. Ceci suggère un remaniement bactérien sélectif de même type pour les Δ^5 -stérois avec une facilité augmentant de C₂₉ à C₂₇ dans le cas du lac de Cadagno. Ce phénomène pourrait également être accentué par une dégradation préférentielle des C₂₇ stérois par rapport aux C₂₉ stérois d'origine terrestre (Meyers et Ishiwatari, 1993).

7.5 Cinétique de transformation des stérois libres en stérènes

7.5.1 *Modèle théorique*

Un modèle cinétique de premier ordre sera utilisé pour modéliser la disparition des stérois libres et l'apparition des stérènes illustré par la Réaction 3.1.



La vitesse de disparition du stérol correspondant à la Réaction 3.1 se traduit dans le cas d'une réaction élémentaire par l'Equation 3.1. Cette dernière peut se réécrire sous la forme de l'Equation 3.2.

$$\begin{aligned} -d[\text{stérol}]/dt &= k[\text{stérol}] && \text{Equation 3.1} \\ \Leftrightarrow -d[\text{stérol}]/[\text{stérol}] &= kdt && \text{Equation 3.2} \end{aligned}$$

L'intégration de l'Equation 3.2 entre t_0 et t conduit à l'Equation 3.3:

$$\ln([\text{stérol}]_0 / [\text{stérol}]_t) = k(t-t_0) \quad \text{Equation 3.3}$$

En supposant qu'avec l'enfouissement la quantité totale de stérols et stérènes demeure égale à la quantité de stérol qui était initialement présente dans le sédiment de surface avant l'enfouissement, l'Equation 3.4 peut être écrite. Cette hypothèse est discutée en détail dans le paragraphe suivant.

$$[\text{stérol}]_0 = [\text{stérol}]_t + [\text{stérène}]_t \quad \text{Equation 3.4}$$

En substituant l'Equation 3.4 dans 3.3, l'Equation 3.5 est obtenue.

$$\ln(([\text{stérol}]_t + [\text{stérène}]_t) / [\text{stérol}]_t) = k(t-t_0) \quad \text{Equation 3.5}$$

L'Equation 3.5 correspond à une droite passant par l'origine si $\ln(([\text{stérène}]_t + [\text{stérol}]_t) / [\text{stérol}]_t)$ est tracé en fonction du temps avec $t_0=0$. Il faut remarquer que si la concentration est donnée par gramme de sédiment sec ou de carbone organique total, la valeur de $\ln(([\text{stérène}]_t + [\text{stérol}]_t) / [\text{stérol}]_t)$ n'en sera pas influencée.

En admettant un taux de sédimentation constant, l'échelle "temps" peut être remplacée par l'échelle "profondeur du sédiment". L'application de l'Equation 3.5 donnera alors une constante de vitesse k en cm^{-1} .

7.5.2 Interprétation des graphiques obtenus

Les variations de $\ln(([\text{stérène}]_t + [\text{stérol}]_t) / [\text{stérol}]_t)$ pour différents couples précurseur-produit stérol-stérène sont représentées sur la Figures 3.30. Globalement, on peut y distinguer trois types de graphiques.

Le premier type de graphique se caractérise par l'absence de corrélation entre $\ln(([\text{stérène}]_t + [\text{stérol}]_t) / [\text{stérol}]_t)$ et la profondeur. Il concerne le couple 5α -cholestan- 3β -ol et les Δ^2 - et Δ^3 -stérènes correspondants, le 24-éthyl- 5α -cholestan- 3β -ol et le Δ^3 -stérène associé, le 24-éthyl- 5α -cholest-22E-én- 3β -ol / 24-éthyl- 5α -cholesta-3,22E-diène et le 24-éthylcholesta-5,22E-dién- 3β -ol / 24-éthylcholesta-3,5,22E-triène.

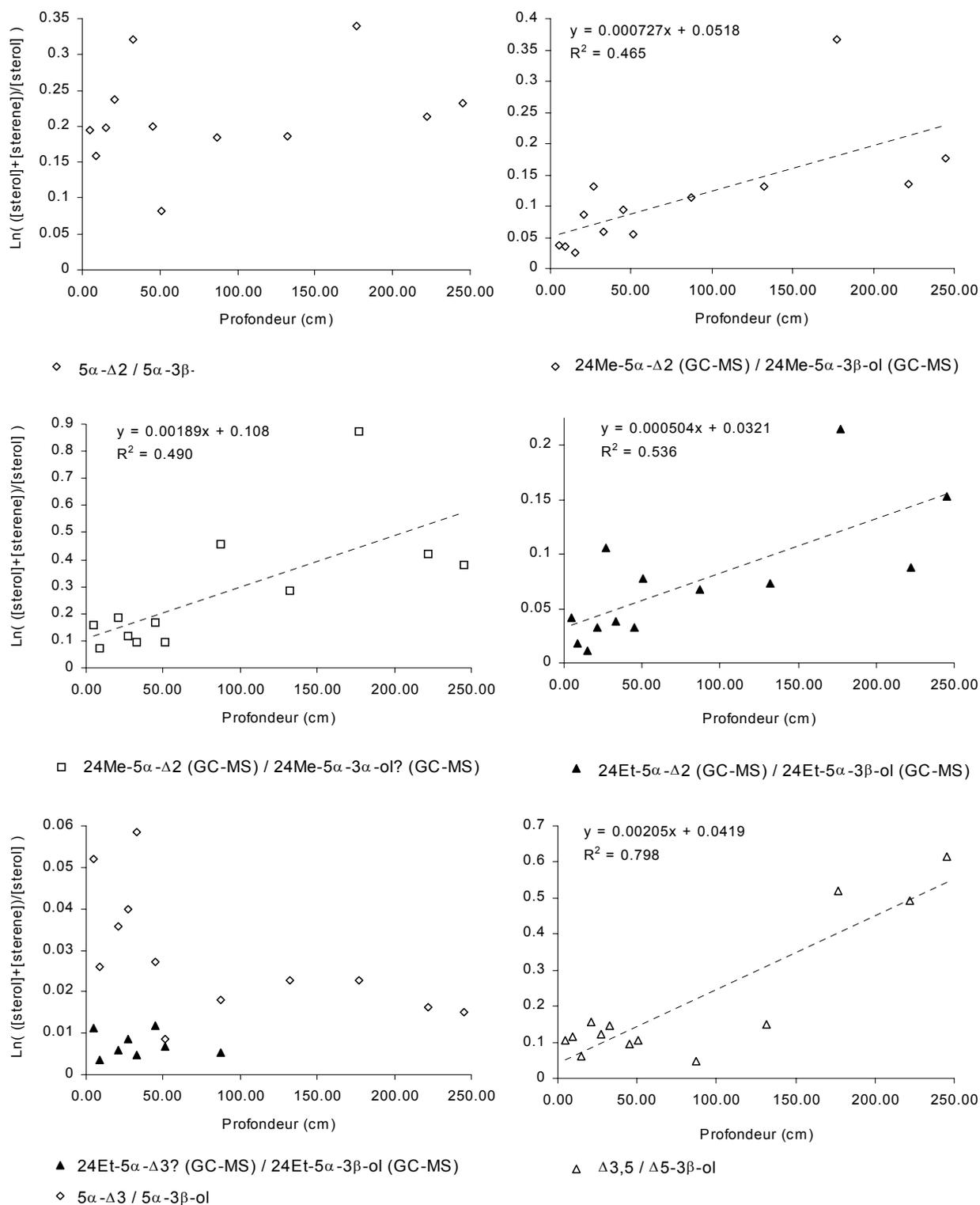
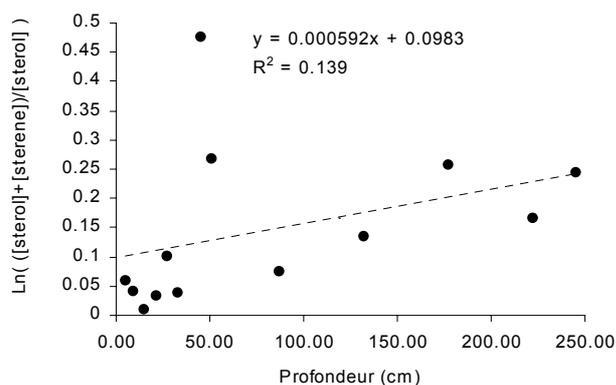
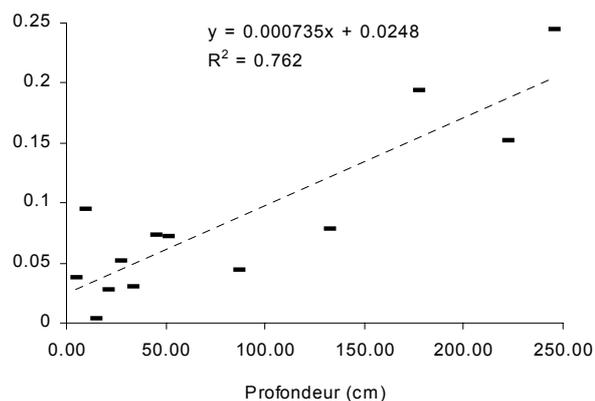


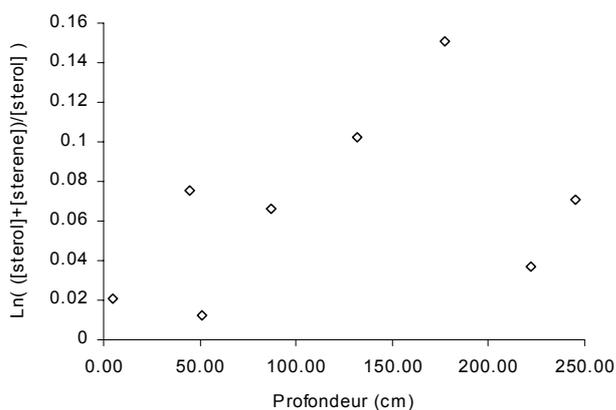
Figure 3.30: Variations de $\ln\left(\frac{[\text{stérène}] + [\text{stérol}]}{[\text{stérol}]}\right)$ pour différents couples précurseur-produit stérol-stérène.



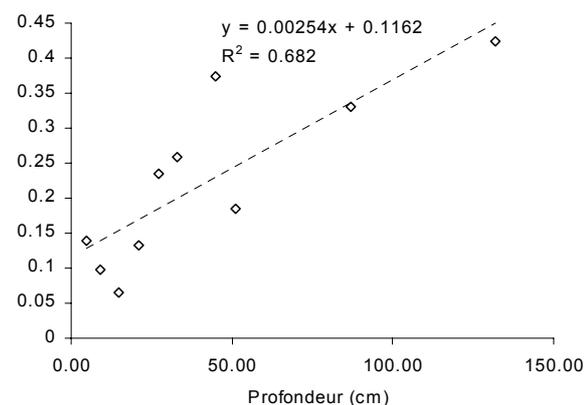
● 24Me- Δ 3,5 (GC-MS) / 24Me- Δ 5-3 β -ol (GC-MS)



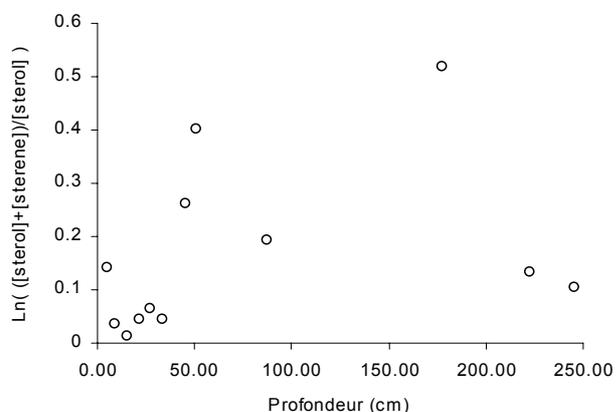
■ 24Et- Δ 3,5 (GC-MS) / 24Et- Δ 5-3 β -ol (GC-MS)



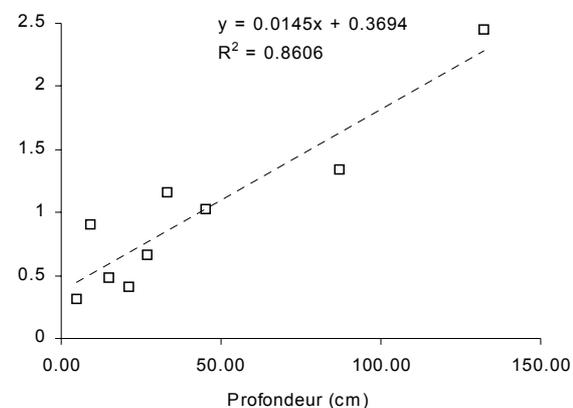
◇ 24Et-5 α - Δ 3,22E? / 24Et-5 α - Δ 22E-3 β -ol (GC-MS)



◇ 24Me- Δ 3,5,22E / 24Me- Δ 5,22E-3 β -ol



○ 24Et- Δ 3,5,22E (GC-MS) / 24Et- Δ 5,22-3 β -ol (GC-MS)



□ 23,24DiMe- Δ 3,5,22E? / 23,24DiMe- Δ 5,22E-3 β -ol

Figure 3.30 (suite): Variations de $\ln\left(\frac{[\text{stérène}] + [\text{stérol}]}{[\text{stérol}]}\right)$ pour différents couples précurseur-produit stérol-stérène.

Un second type de graphique se distingue par une augmentation apparente du rapport $\ln\left(\frac{[\text{stérène}]_t + [\text{stérol}]_t}{[\text{stérol}]_t}\right)$ avec la profondeur avec cependant une forte dispersion des points. C'est le cas des graphiques correspondant aux couples 24-méthyl-5 α -cholest-2-ène / 24-méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol, 24-méthyl-5 α -cholest-2-ène / 24-méthyl-5 α -cholestan-3 α -ol, 24-

éthyl-5 α -cholest-2-ène / 24-éthyl-5 α -cholestan-3 β -ol, cholesta-3,5-diène /cholestérol ainsi que les couples homologues en C₂₈ et C₂₉.

Un troisième et dernier type de graphique se distingue par l'absence de points à 219-225 cm et 242-248 cm et une faible corrélation. Les couples correspondant à ces graphiques sont le 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et le stérène associé et son 23,24-diméthyle-homologue.

Sur treize couple étudiés, cinq couples ne montrent pas de corrélation, quatre couples montrent une corrélation très médiocre avec un coefficient de corrélation au carré ne dépassant pas 0.55. Pour les quatre couples restants, le coefficient de corrélation au carré est compris entre 0.68 et 0.86. Il faut cependant remarquer que pour deux de ces couples la corrélation n'est établie que jusque 135 cm en raison de l'absence de quantité quantifiable de stérol en-dessous de cette profondeur.

Une disparité des résultats peut être observée concernant les couples "stérol/stérène" homologues. En effet le graphique correspondant au couple 5 α -cholestan-3 β -ol / 5 α -cholest-2-ène ne montre pas de corrélation alors que pour les homologues en C₂₈ et C₂₉, une augmentation du rapport $\ln([\text{stérène}] + [\text{stérols}])/[\text{stérol}]$ avec la profondeur pourrait être envisagée. Pour le couple cholestérol / cholesta-3,5-diène, la pente de la droite de régression est 0.00205 cm⁻¹ tandis qu'elle est environ trois fois moins importante pour les homologues en C₂₈ et C₂₉. Pour le couple le 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol / 24-méthylcholesta-3,5,22E-triène la pente est 5 fois inférieure à celle de son 23,24-diméthyle-homologue, tandis qu'il n'existe pas de corrélation pour le 24-éthyle-homologue.

Une autre observation est la quantité élevée de stérènes dans les premiers centimètres du sédiments. En prenant l'exemple de la tranche 4-6 cm, cette quantité est égale en moyenne à 69% de la quantité maximale de toutes les tranches de la carotte pour les douze stérènes de la Figure 3.30. Elle peut même correspondre à la concentration la plus élevée dans la carotte pour certains stérènes (*p. ex.* cholesta-3,5-diène, 24-méthylcholesta-3,5,22E-triène). Cette observation montre d'ores et déjà que le modèle exposé dans le paragraphe 7.5.1 ne peut reproduire fidèlement la formation des stérènes dans la carotte sédimentaire.

Une comparaison des profils des stérols et stérènes (*cf.* § 7.3.1, Figure 3.23) et des graphiques de la Figures 3.30 est également intéressante. Ainsi pour les couples correspondant au cholestérol / cholesta-3,5-diène et ses homologues en C₂₈ et C₂₉, au 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol / 24-méthylcholesta-3,5,22E-triène et à son 23,24-diméthyle-homologue, la concentration des stérols diminuent très nettement dans la tranche 84 à 248 cm. Or cette diminution de la concentration en stérols n'est pas compensée par une hausse équivalente de la concentration en stérènes comme prévu par la Réaction 3.1. La variation des apports des stérols

correspondants entre 84 et 248 cm pourrait être une explication alternative de ces résultats. Néanmoins, ceci n'explique pas les variations des stérènes dont la concentration est plus ou moins constante. Ces observations montrent dès lors que la Réaction 3.1 n'est pas adaptée pour décrire la formation des stérènes dans le sédiment pour les couples considérés. Ceci rend dès lors le modèle du paragraphe 7.5.1 inapplicable pour les couples précédents car il ne tient pas compte de processus secondaires éventuels (*p. ex.* reminéralisation, piègeage, réactions de réduction, etc.).

Bien que les conditions anoxiques soient propices à la préservation de la matière organique (Killops et Killops, 1993), la dégradation des stérols a été mise en évidence dans ce milieu par différentes expériences d'incubation de plancton (*p. ex.* Harvey *et al.*, 1995; Harvey et Macko, 1997). La reminéralisation des stérols ainsi que leur transformation en différents sous produits a été notamment démontrée par Sun *et Wakeham* (1998) qui ont utilisé du ¹⁴C-cholestérol. Ce phénomène de dégradation des stérols en des composés autres que les stérènes a toute son importance pour le modèle cinétique. En effet les stérols déposés à la surface du sédiment pourront subir des réactions de dégradation ultérieures dans les premiers centimètres du sédiments vu la nature meuble des sédiments de Cadagno. La Réaction 3.1 sera donc accompagnée dans les premiers centimètres au moins par d'autres réactions de dégradation. Ceci démontre à nouveau les limites du modèle expliquant l'absence de corrélation pour un certains nombre de couples stérol/stérène. Sun *et Wakeham* (1994) ont proposé un modèle cinétique considérant qu'une partie de la matière organique associée à un biomarqueur est facilement dégradable tandis que l'autre partie est réfractaire à la dégradation. Ce modèle a notamment permis de faire corrélérer l'équation du modèle cinétique aux points expérimentaux qui, au-delà d'une certaine profondeur, témoignent d'une concentration résiduelle constante. Ce modèle implique toutefois que le taux de sédimentation et les apports de stérols soient restés constants pendant la déposition. Ce n'est pas le cas pour les sédiments du lac de Cadagno montrant notamment des fluctuations considérables entre 0 et 54 cm.

Un autre facteur à considérer pour expliquer les résultats observés pourrait être l'enveloppe biologique du biomarqueur. En effet, Rieley *et al.* (1998) ont suggéré que le "packaging" des stérols des plantes supérieures peut constituer une protection contre les attaques microbiologiques, ralentissant la vitesse de dégradation. Les auteurs ont fait cette proposition sur la base d'incubations menées en laboratoire avec des feuilles d'une plante supérieure (*Fagus sylvatica*) et une algue unicellulaire (*Isochrysis galbana*). Canuel et Martens (1996) suggèrent également que des sources différentes peuvent être à l'origine de différentes enveloppes biologiques de résistances différentes à la dégradation. L'hypothèse de la formation plus rapide des stérènes à partir de stérols possédant une enveloppe biologique plus fragile pourrait être

également émise ici. Ainsi, cela conduirait à une concentration de stérols plus basse et une concentration de stérènes plus élevée pour les stérols possédant une enveloppe biologique plus fragile. Ceci pourrait expliquer les rapports $\ln(([\text{stérène}] + [\text{stérol}]) / [\text{stérol}])$ ou encore $\ln(1 + [\text{stérène}] / [\text{stérol}])$ plus élevés pour les stérols correspondants. Toutefois lorsque sont comparés les rapports $[\text{stérène}] / [\text{stérol}]$ de stérols caractéristiques d'apports autochtones à savoir le 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol, le 23,24-diméthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol et le cholestérol (*cf.* § 7.2.1.3), on peut constater que celui du 23,24-diméthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol est 9 à 20 fois plus grand que celui des autres stérols. De telles différences ne peuvent pas être expliquées en termes d'enveloppe biologique plus ou moins protectrice ni d'ailleurs par une réactivité dépendant de l'origine du biomarqueur (Meyers et Ishiwatari, 1993).

L'ensemble de ces observations montre que le modèle cinétique basé sur une réaction physico-chimique est inadapté pour reproduire les variations des stérènes et stérols dans le sédiment. Les différences de réactivité entre les stérols homologues, la quantité élevée de stérènes observés dans les premiers centimètres du sédiment, les variations des profils des stérols et stérènes sont tous des arguments pointant vers un mécanisme microbien sélectif ayant lieu à la surface du sédiment comme ceci a été proposé par McEvoy *et* Maxwell (1983) et Robinson *et al.* (1984). La grande majorité des stérènes détectés dans les sections profondes était donc déjà formée au temps de déposition et une déshydratation physico-chimique au cours de l'enfouissement ne peut être qu'une source secondaire négligeable dans la carotte de Cadagno. Une transformation déjà opérante dans la colonne d'eau est à considérer également. En effet, un changement de composition des stérols dans des trappes à sédiment et dans le sédiment de surface supporte cette idée d'activité bactérienne sélective dans la colonne d'eau (*p. ex.* dans la Mer Noire variation de l'abondance relative du 24-méthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol de 23% à 7% et du 4 α ,23,24-triméthyl-5 α -cholest-22E-én-3 β -ol 4 α (Me) de 4 à 7% dans une trappe à sédiment à 400 m de profondeur et dans le premier centimètre du sédiment de surface respectivement, Sun *et* Wakeham, 1994; Wakeham *et* Beier, 1991). La détection de stérènes dans la colonne d'eau elle-même constitue un autre argument (Wakeham *et al.*, 1984). L'observation de quantités significatives de stérènes (Robinson *et al.*, 1984) ainsi que des taux de dégradation élevés des stérols (Canuel *et* Martens, 1996) dans les premiers centimètres du sédiment sont également d'autres motifs soutenant cette hypothèse.

Certains couples montrent toutefois une corrélation linéaire significative entre le rapport $\ln(([\text{stérène}] + [\text{stérol}]) / [\text{stérol}])$ et la profondeur. Une explication de ces résultats pourrait être trouvée dans l'analyse des profils des stérols et stérènes. Ainsi on peut remarquer sur la Figure 3.23 (*cf.* § 7.3.1) que la concentration du 23,24-diméthylcholesta-5,22E-dién-3 β -ol, du 24-

méthylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol, du cholestérol et de ses homologues en C₂₈ et C₂₉ augmente tandis que celle des stanols en C₂₇₋₂₉ fluctue ou augmente entre 84 et 248 cm. Or cette période pourrait être associée à un taux de sédimentation plus faible (*cf.* § 3.2). Dans ces conditions il est possible que le remaniement bactérien ait été plus important expliquant ainsi la transformation des sténols en stanols et les profils correspondant de ces composés. Si la transformation bactérienne associée à la formation des stanols a pu être plus importante, il est également possible que la formation des stérènes l'a pu l'être aussi en supposant un mécanisme bactérien en surface comme proposé par Robinson *et al.* (1984). Dans le cas des couples "sténol/stéradiène" tels que ceux du 24-méthylcholesta-5,22E-dièn-3 β -ol et de son 23,24-diméthyle-homologue ainsi que du cholestérol et de ses homologues en C₂₈ et C₂₉, la concentration de stérols diminue sensiblement tandis que celle des stérènes correspondants augmente ou ne diminue pas. Ceci explique l'augmentation du rapport $\ln(1+[\text{stérène}]/[\text{stérol}])$ observé pour ces couples. Dans le cas des stanols en C₂₈ et C₂₉, leur concentration augmente peu mais celle des stérènes correspondants augmente plus sensiblement. Ceci permet également d'expliquer la hausse du rapport $\ln(1+[\text{stérène}]/[\text{stérol}])$ pour ces couples. Ainsi, un taux de sédimentation plus faible - impliquant un remaniement bactérien plus important - explique l'augmentation du rapport $\ln(1+[\text{stérène}]/[\text{stérol}])$ avec la profondeur et non pas l'existence d'une réaction physico-chimique de déshydratation des stérols en stérènes.

8 Conclusions

Les résultats d'analyses géochimiques permettent de distinguer des conditions de déposition sédimentaires différentes pour la tranche de 0 à 48 cm et la tranche de 48 à 248 cm de la carotte. Le profil du TOC montre entre 0 et 48 cm une zone correspondant à de fortes fluctuations tandis qu'entre 48 et 248, une augmentation progressive est constatée. Les fluctuations entre 0 et 48 cm du TOC se retrouvent également dans les profils des biomarqueurs de type *n*-alcanes, pristane, phytane, hopanoïdes, stérols et stérènes. Entre 48 et 248 cm, le profil de ces biomarqueurs ne montre toutefois pas d'augmentation mais généralement un palier. L'examen au microscope de certains niveaux de la carotte entre 0 et 48 cm indique que des apports clastiques ont dilué la matière organique sédimentaire expliquant les minima observés. Ces apports clastiques ont pu provenir d'avalanches, courantes en raison de l'existence d'un couloir abrupt sur le versant Nord-Nord-Ouest du lac, de glissements de terrain ou encore de crues torrentielles. Les tranches entre 48 et 248 cm se caractérisent par une proportion d'apports clastiques plus faible. Ceci permet

d'expliquer les valeurs élevées de TOC et suggère une sédimentation plus "calme" caractérisée par un taux de sédimentation plus faible pendant la période correspondante.

Les distributions des hydrocarbures dans les tranches de la carotte montrent que l'apport allochtone est significatif et qualitativement constant pour la tranche 0 à 48 cm de la carotte. En dessous de 48 cm, une distribution des *n*-alcane légèrement différente suggère une modification de la nature des apports allochtones. Ce changement concorde avec l'analyse palynologique des périodes correspondantes (en se basant sur les datations approximatives à disposition) reportant une végétation riche en arbres et buissons.

Les variations brusques observées entre 0 et 48 cm peuvent également être liées en partie à l'activité humaine qui s'est intensifiée autour du lac durant le dernier siècle. En effet le lac est utilisé comme réservoir secondaire pour l'usine hydroélectrique de Piotta. La construction d'une digue et l'aménagement d'un chemin ont nécessité le déversement de remblais sur les pourtours du lac. Des déchets liés à la présence d'une ferme d'alpage ainsi qu'à l'activité d'une fromagerie situées à quelques centaines de mètres en amont du lac sont également rejetés dans celui-ci.

L'analyse géochimique a également permis d'obtenir des informations complémentaires spécifiques à certains types de biomarqueurs.

Ainsi l'analyse des stérols liés dans le sédiment de surface ainsi qu'à une profondeur de 242-248 cm révèle la meilleure résistance des stérols liés par rapport aux stérols libres. Ceci relève certainement de leur réactivité diminuée par leur liaison avec une matrice réduisant ainsi fortement leur biodisponibilité. L'analyse des composés liés par liaisons polysulphures a révélé que ces derniers ne sont pas présents en quantités significatives dans le lac de Cadagno. Un traitement plus drastique coupant les ponts mono- et polysulphures mais aboutissant à une réduction partielle des double liaisons a montré que la sulphurisation est effective très tôt dans les sédiments riches en soufre du lac de Cadagno.

Le rapport stérol/stanol indique une hydrogénation bactérienne sélective opérationnelle sur toute la longueur de la carotte sédimentaire. Cette réduction concerne les Δ^5 -stérols mono insaturés avec une facilité augmentant de C_{29} à C_{27} .

L'étude cinétique de la transformation des stérols en stérènes montre que la cinétique d'ordre un via une réaction physico-chimique de déshydratation ne s'applique pas pour les sédiments du lac de Cadagno. En effet l'absence de corrélation pour une partie des couples étudiés et les coefficients de corrélations médiocres dans l'ensemble témoignant de la forte dispersion des points sur les graphiques montre les limites du modèle appliqué. La présence de quantités significatives de stérènes dans les premiers centimètres du sédiment, les différences de réactivité observées entre couples homologues, l'examen des profils des stérols et stérènes fournissent des arguments pour un mécanisme de déshydratation bactérien sélectif. Ce dernier opérant dans les

premiers centimètres du sédiment est sans doute actif dans la colonne d'eau étant donné la détection de stérènes dans celle-ci (Wakeham *et al.*, 1984). L'observation du rapport $\ln([\text{stérène}]+[\text{stérol}])/[\text{stérol}]$ qui augmente toutefois pour certains couples stérols/stérènes avec la profondeur peut être attribué à un remaniement bactérien pendant la période de déposition en raison d'un taux de sédimentation plus faible.

Ces résultats permettent de tirer deux conclusions importantes. La première concernant le mécanisme de déshydratation bactérien sélectif des stérols proposé dans le cadre de ce travail a pour conséquence que les distributions des stérènes présents dans le sédiment ne sont pas directement représentatifs des apports des stérols précurseurs. Ceci peut être illustré par l'exemple du stigmastérol qui, bien que plus abondant dans le sédiment que son 23,24-diméthyle-homologue, donne un stérène en quantité près de 5 fois moins importante que le 23,24-diméthyle-homologue. Une deuxième conclusion importante est reliée à la présence des stérènes dans la colonne d'eau (Wakeham *et al.*, 1984). Si le mécanisme de formation de ces stérènes est bactérien, il est tout à fait possible que les communautés bactériennes responsables soient différentes de celles présentes à la surface ou dans les premiers centimètres du sédiment. Ceci implique que la formation des stérènes est le résultat de la contribution de plusieurs voire une multitude de communautés bactériennes avec des sélectivités pouvant être différentes. Ceci a une répercussion importante sur l'interprétation des compositions en hydrocarbures stéroïdiens dans les sédiments plus anciens.

Ces résultats devraient stimuler des études sur d'autres sites afin de pouvoir généraliser ces résultats aux sédiments lacustres. Des sédiments provenant de sites préservés de l'activité humaine et dont la production primaire est restée relativement constante au fil du temps seraient plus appropriés pour élargir cette étude.

9 Références

- Adam P., Schneckenburger P., Schaeffer P. et Albrecht P. (2000) Clues to early diagenetic sulfurization processes from mild chemical cleavage of labile sulfur-rich geomacromolecules. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 3485-3503.
- Ageta H. & Arai Y. (1983) Fern Constituents - Pentacyclic Triterpenoids Isolated from Polypodium-Niponicum and Polypodium-Formosanum. *Phytochemistry* **22**, 1801-1808.
- Ageta H. & Arai Y. (1984) Fern Constituents - Cycloartane Triterpenoids and Allied Compounds from Polypodium-Formosanum and Polypodium-Niponicum. *Phytochemistry* **23**, 2875-2884.
- Ageta H., Shiojima K., Arai Y., Kasama T. et Kajii K. (1975) Fern Constituents - Dryocrassol and Dryocrassyl Acetate Isolated from Leaves of Aspidiaceae Fern. *Tetrahedron Letters* , 3297-3298.
- Artaud J., Iatrides M. C. et Gaydou E. M. (1984) Co-Occurrence of Δ^5 -Sterols and Δ^7 -Sterols in 2 Gleditsia Species - A Reassessment of the Sterol Composition in Oils Rich in Delta-7-Sterols. *Phytochemistry* **23**, 2303-2306.
- Bankova V., Stefanov K., Dimitrova-Konaklieva S., Keremedchieva G., Frette X., Nikolova C., Kujungiev A. et Popov S. (2001) Secondary metabolites and lipids in *Chara globularis* Thuill. *Hydrobiologia* **457**, 199-203.
- Berner R. A. (1984) Sedimentary pyrite formation: An update. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**, 605-615.
- Bertoni R., Callieri C. et Pugnetti A. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Organic carbon dynamics in Lake Cadagno and microbial activities in the mixolimnion. 105-120.
- Birch L., Hanselmann K. et Bachofen R. (1996) Heavy metal conservation in lake Cadagno sediments: historical records of anthropogenic emissions in a meromictic alpine lake. *Water Research* **30**, 679-687.
- Bossard P., Gammeter S., Lehmann C., Schanz F., Bachofen R., Burgi H. R., Steiner D. et Zimmermann U. (2001) Limnological description of the Lakes Zurich, Lucerne, and Cadagno. *Aquatic Sciences* **63**, 225-249.
- Camacho A., Erez J., Chicote A., Florin M., Squires M. M., Lehmann C. et Bachofen R. (2001) Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. *Aquatic Sciences* **63**, 91-106.
- Canuel E. A. & Martens C. S. (1993) Seasonal-Variations in the Sources and Alteration of Organic- Matter Associated with Recently-Deposited Sediments. *Organic Geochemistry* **20**, 563-577.
- Canuel E. A. & Martens C. S. (1996) Reactivity of recently deposited organic matter: degradation of lipid compounds near the sediment-water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 1793-1806.

- Conte M. H., Madureira L. A. S., Eglinton G., Keen D. et Rendall C. (1994) Millimeter-scale profiling of abyssal marine sediments: role of bioturbation in early sterol diagenesis. *Organic Geochemistry* **22**, 979-990.
- Cranwell P. A. (1982) Lipids of aquatic sediments and sedimenting particulates. *Prog.Lipid Res.* **21**, 271-308.
- Cranwell P. A. (1984a) Lipid geochemistry of sediments from Upton Broad, a small productive lake [UK]. *Organic Geochemistry* **7**, 25-37.
- Cranwell P. A. *Lake Sediments and Environmental History*. Ed. Haworth, E. Y. & Lund, J. W. G. (1984b). Organic geochemistry of lacustrine sediments: triterpenoids of higher-plant origin reflecting post-glacial vegetational succession. 69-92.
- Cranwell P. A., Eglinton G. et Robinson N. (1987) Lipids of aquatic organisms as potential contributors to lacustrine sediments - II. *Organic Geochemistry* **11**, 513-527.
- Cranwell P. A., Jaworski G. H. M. et Bickley H. M. (1990) Hydrocarbons, Sterols, Esters and Fatty-Acids in 6 Fresh-Water Chlorophytes. *Phytochemistry* **29**, 145-151.
- Dachs J., Bayona J. M., Fillaux J., Saliot A. et Albaiges J. (1999) Evaluation of anthropogenic and biogenic inputs into the western Mediterranean using molecular markers. *Marine Chemistry* **65**, 195-210.
- Del Don C., Hanselmann K., Peduzzi R. et Bachofen R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Orographical and geological description of the meromictic Alpine Lake Cadagno. 5-9.
- Del Don C., Hanselmann K. W., Peduzzi R. et Bachofen R. (2001) The meromictic alpine lake Cadagno: Orographical and biogeochemical description. *Aquatic Sciences* **63**, 70-90.
- Demarta A., Tonolla M., Caminada A. P., Ruggeri N. et Peduzzi R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Phylogenetic diversity of the bacterial community from the anoxic layer of the meromictic Lake Cadagno. 19-30.
- Duan Y. (2000) Organic geochemistry of recent marine sediments from the Nansha Sea, China. *Organic Geochemistry* **31**, 159-167.
- Duan Y. & Ma L. (2001) Lipid geochemistry in a sediment core from Ruorgai Marsh deposit (Eastern Qinghai-Tibet plateau, China). *Organic Geochemistry* **32**, 1429-1442.
- Farrimond P., Fox P. A., Innes H. E., Miskin I. P. et Head I. M. (1998) Bacterial sources of hopanoids in recent sediments: improving our understanding of ancient hopane biomarkers. *Ancient Biomolecules* **2**, 147-166.
- Fisher E., Oldfield F., Wake R., Boyle J., Appleby P. et Wolff G. A. (2003) Molecular marker records of land use change. *Organic Geochemistry* **34**, 105-119.
- Freeman K. H., Wakeham S. G. et Hayes J. M. (1994) Predictive isotopic biogeochemistry: hydrocarbons from anoxic marine basins. *Organic Geochemistry* **21**, 629-644.
- Gagosian R. B., Lee C. et Heinzer F. (1979) Processes controlling the stanol/stenol ratio in Black Sea seawater and sediments. *Nature* **280**, 574-576.

- Gaskell S. J. & Eglinton G. (1975) Rapid hydrogenation of sterols in a contemporary lacustrine sediment. *Nature* **254**, 209-211.
- Goad L. J. *Lipids and Lipids Polymers in Higher Plants*. Ed. Tevini, M. & Lichtenthaler, H. K. (1977). Chap. 8: The Biosynthesis of Plant Sterols. 146-168.
- Harvey H. R. & Macko S. A. (1997) Kinetics of phytoplankton decay during simulated sedimentation: changes in lipids under oxic and anoxic conditions. *Organic Geochemistry* **27**, 129-140.
- Harvey H. R., Tuttle J. H. et Bell J. T. (1995) Kinetics of Phytoplankton Decay During Simulated Sedimentation - Changes in Biochemical-Composition and Microbial Activity Under Oxic and Anoxic Conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 3367-3377.
- Hudson E. D., Parrish C. C. et Helleur R. J. (2001) Biogeochemistry of sterols in plankton, settling particles and recent sediments in a cold ocean ecosystem (Trinity Bay, Newfoundland). *Marine Chemistry* **76**, 253-270.
- Innes H. E., Bishop A. N., Head I. M. et Farrimond P. (1997) Preservation and diagenesis of hopanoids in Recent lacustrine sediments of Priest Pot, England. *Organic Geochemistry* **26**, 565-576.
- Ishiwatari R., Ogura K. et Horie S. (1980) Organic Geochemistry of a Lacustrine Sediment (Lake Haruna, Japan). *Chemical Geology* **29**, 261-280.
- Jeng W. L., Huh C. A. et Chen C. L. (1997) Alkanol and sterol degradation in a sediment core from the continental slope off southwestern Taiwan. *Chemosphere* **35**, 2515-2523.
- Killops S. D. & Frewin N. L. (1994) Triterpenoid diagenesis and cuticular preservation. *Organic Geochemistry* **21**, 1193-1209.
- Killops S. D. & Killops V. J. *An introduction to organic geochemistry*. Gill, R. C. O., Longmann Scientific & Technical (1993).
- Kok M. D., Rijpstra W. I. C., Robertson L., Volkman J. K. et Sinninghe Damsté J. (2000) Early steroid sulfurisation in surface sediments of a permanently stratified lake (Ace Lake, Antarctica). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 1425-1436.
- MacKenzie A. S., Brassell S. C., Eglinton G. et Maxwell J. R. (1982) Chemical Fossils: The Geological Fate of Steroids. *Science of the Total Environment* **217**, 491-504.
- Marsili A. & Morelli I. (1970) Triterpenes from mosses. II. Triterpenes from *Thuidium tamariscifolium*. *Phytochemistry* **9**, 651-653.
- Matsumoto G., Torii T. et Hanya T. (1982) High Abundance of Algal 24-Ethylcholesterol in Antarctic Lake Sediment. *Nature* **299**, 52-54.
- McEvoy J. & Maxwell J. R. (1983) Diagenesis of steroidal compounds in sediments from the Southern California Bight (DSDP Leg 63, Site 467). *Adv.Org.Geochem.Proc.Int.Meet.*, 10th , 449-464.
- Mermoud F. (1982) Géochimie des stérols et des acides gras dans les sédiments du lac Léman et du Voua de la Motte. Thèse, Université de Genève.

- Mermoud F., Clerc O., Gülaçar F. O. et Buchs A. (1981) Analyse des acides gras et des stérols dans le plancton dans le plancton du lac Léman. *Archives des Sciences, Université de Genève* **34**, 367-382.
- Meyers P. A. (1997) Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. *Organic Geochemistry* **27**, 213-250.
- Meyers P. A. & Ishiwatari R. (1993) Lacustrine organic geochemistry-an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* **20**, 867-900.
- Meyers P. A., Tenzer G. E., Lebo M. E. et Reuter J. E. (1998) Sedimentary record of sources and accumulation of organic matter in Pyramid Lake, Nevada, over the past 1,000 years. *Limnology and Oceanography* **43**, 160-169.
- Muhlebach A. & Weber K. (1998) Origins and fate of dissolved sterols in the Weddell Sea, Antarctica. *Organic Geochemistry* **29**, 1595-1607.
- Nakane T., Maeda Y., Ebihara H., Arai Y., Masuda K., Takano A., Ageta H., Shiojima K., Cai S. Q. et Abdel-Halim O. B. (2002) Fern constituents: Triterpenoids from *Adiantum capillus-veneris*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **50**, 1273-1275.
- Nishimura M. (1977a) Origin of stanols in young lacustrine sediments. *Nature* **270**, 711-712.
- Nishimura M. (1977b) The geochemical significance in early sedimentation of geolipids obtained by saponification of lacustrine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**, 1817-1823.
- Nishimura M. (1978) Geochemical characteristics of the high reduction zone of stenols in Suwa sediments and the environmental factors controlling the conversion of stenols into stanols. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**, 349-357.
- Nishimura M. & Koyama T. (1976) Stenols and stanols in lake sediments and diatoms. *Chemical Geology* **17**, 229-239.
- Nishimura M. & Koyama T. (1977) The occurrence of stanols in various living organisms and the behavior of sterols in contemporary sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**, 379-385.
- Ourisson G. & Rohmer M. (1992) Hopanoids. 2. Biohopanoids - A Novel Class of Bacterial Lipids. *Accounts of Chemical Research* **25**, 403-408.
- Pandey G. N. & Mitra C. R. (1967) Neriifoliol - A New Pentacyclic Triterpene Alcohol from *Oleandra Neriifolia*. *Tetrahedron Letters* , 1353-&.
- Patterson G. W. *Isopentenoids and other natural products, Evolution and Function*. Ed. Nes, W. D., 205 (1993). The Phylogenetic Distribution of Sterols. 90-108.
- Patterson G. W., McKenna K. C., Lusby W. R. et Bisson M. A. (1991) Sterols of the Charophyceae. *Journal of Natural Products* **54**, 1141-1143.
- Pearce G. E. S., Harradine P. J., Talbot H. M. et Maxwell J. R. (1998) Sedimentary sterols and steryl chlorin esters: distribution differences and significance. *Organic Geochemistry* **28**, 3-10.

- Peduzzi R., Demarta A. et Tonolla M. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). The meromictic Lake Cadagno: an overview. 1-4.
- Putschew A., Scholz-Böttcher B. M. et Rullkötter J. *Geochemical transformations of sedimentary sulfur*. Ed. Vairavamurthy, M. A. & Schoonen, M. A. A. (1995). Chap. 4: Organic geochemistry of sulfur-rich surface sediments of meromictic lake Cadagno, Swiss Alps. 59-79.
- Putschew A., Scholz-Böttcher B. M. et Rullkötter J. (1996) Early diagenesis of organic matter and related sulphur incorporation in surface sediments of meromictic lake Cadagno in the Swiss Alps. *Organic Geochemistry* **25**, 379-390.
- Rieley G., Collier R. J., Jones D. M. et Eglinton G. (1991) The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K. - I. Source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. *Organic Geochemistry* **17**, 901-912.
- Rieley G., Raven A. M., Lawson A., Evershed R. P., Parkes R. J. et Maxwell J. R. (1998) Laboratory studies on sedimentary lipid preservation: different preservation potentials inferred for leaf and algal lipids. *Ancient Biomolecules* **2**, 177-183.
- Robinson N., Cranwell P. A., Eglinton G., Brassell S. C., Sharp C. L., Gophen M. et Pollinger U. (1986) Lipid geochemistry of lake Kinneret. *Organic Geochemistry* **10**, 733-742.
- Robinson N., Cranwell P. A., Finlay B. J. et Eglinton G. (1984) Lipids of aquatic organisms as potential contributors to lacustrine sediments. *Organic Geochemistry* **6**, 143-152.
- Rontani J. F. & Volkman J. K. (2003) Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Organic Geochemistry* **34**, 1-35.
- Salt T. A., Xu S. H., Patterson G. W. et Adler J. H. (1991) Diversity of Sterol Biosynthetic Capacity in the Caryophyllidae. *Lipids* **26**, 604-613.
- Schanz F. & Stalder S. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Phytoplankton summer dynamics and sedimentation in the thermally stratified Lake Cadagno. 71-76.
- Schouten S., Hoefs M. J. L. et Sinninghe Damsté J. (2000) A molecular and stable carbon isotopic study of lipids in late Quaternary sediments from the Arabian Sea. *Organic Geochemistry* **31**, 509-521.
- Schouten S., Pavlovic D., Sinninghe Damsté J. et De Leeuw J. W. (1993) Nickel boride: an improved desulphurizing agent for sulphur-rich geomacromolecules in polar and asphaltene fractions. *Organic Geochemistry* **20**, 901-909.
- Schouten S., Rijpstra W. I. C., Kok M. D., Hopmans E. C., Summons R. E., Volkman J. K. et Sinninghe Damsté J. (2001) Molecular organic tracers of biogeochemical processes in a saline meromictic lake (Ace Lake). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**, 1629-1640.
- Schüpfer P. Y. & Gülaçar F. O. (2000) Relative stabilities of cholestadienes calculated by molecular mechanics and semi-empirical methods: application to the acid-catalyzed rearrangement reactions of cholesta-3,5-diene. *Organic Geochemistry* **31**, 1589-1596.
- Sieskind O., Joly G. et Albrecht P. (1979) Simulation of the geochemical transformation of sterols: superacid effect of clay minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **43**, 1675-1679.

- Silliman J. E. & Schelske C. L. (2003) Saturated hydrocarbons in the sediments of Lake Apopka, Florida. *Organic Geochemistry* **34**, 253-260.
- Smith D. J., Eglinton G., Morris R. J. et Poutanen E. L. (1982) Aspects of the Steroid Geochemistry of a Recent Diatomaceous Sediment from the Namibian Shelf. *Oceanologica Acta* **5**, 365-378.
- Stapfer A. (1991) Pollenanalytische Untersuchungen im Val Piora (Tessin) Ein Beitrag zur Klima und Vegetationsgeschichte der Nacheiszeit. *Geographica Helvetica* **4**, 156-165.
- Steffen D. & Gorin G. (1993) Palynofacies of the Upper Tithonian - Berriasian Deep-Sea Carbonates in the Vocontian Trough (Se France). *Bulletin des Centres de Recherches Exploration-Production Elf Aquitaine* **17**, 235-247.
- Stonik V. A., Ponomarenko L. P., Makarieva T. N., Boguslavsky V. M., Dmitrenok A. S., Fedorov S. N. et Strobikin S. A. (1998) Free sterol compositions from the sea cucumbers *Pseudostichopus trachus*, *Holothuria* (*Microtele*) *nobilis*, *Holothuria scabra*, *Trochostoma orientale* and *Bathyploetes natans*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **120B**, 337-347.
- Sun M. Y. & Wakeham S. G. (1994) Molecular Evidence for Degradation and Preservation of Organic- Matter in the Anoxic Black-Sea Basin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**, 3395-3406.
- Sun M. Y. & Wakeham S. G. (1998) A study of oxic/anoxic effects on degradation of sterols at the simulated sediment-water interface of coastal sediments. *Organic Geochemistry* **28**, 773-784.
- Tonolla M., Peduzzi S., Hahn D. et Peduzzi R. (2003) Spatio-temporal distribution of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 89-98.
- Tonolla M., Demarta A., Peduzzi S., Hahn D. et Peduzzi R. (2000) In situ analysis of sulfate-reducing bacteria related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 820-824.
- Volkman J. K. (1986) A Review of Sterol Markers for Marine and Terrigenous Organic- Matter. *Organic Geochemistry* **9**, 83-99.
- Volkman J. K. (2003) Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 495-506.
- Volkman J. K., Kearney P. et Jeffrey S. W. (1990) A New Source of 4-Methyl Sterols and 5 α (H)-Stanols in Sediments - Prymnesiophyte Microalgae of the Genus *Pavlova*. *Organic Geochemistry* **15**, 489-497.
- Volkman J. K., Rijpstra W. I. C., De Leeuw J. W., Mansour M. P., Jackson A. E. et Blackburn S. I. (1999) Sterols of four dinoflagellates from the genus *Prorocentrum*. *Phytochemistry* **52**, 659-668.
- Volkman J. K., Barrett S. M., Dunstan G. A. et Jeffrey S. W. (1993) Geochemical significance of the occurrence of dinosterol and other 4-methyl sterols in a marine diatom. *Organic Geochemistry* **20**, 7-15.

- Volkman J. K., Gillan F. T., Johns R. B. et Eglinton G. (1981) Sources of neutral lipids in a temperate intertidal sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**, 1817.
- Wakeham S. G. & Beier J. A. (1991) Fatty-Acid and Sterol Biomarkers As Indicators of Particulate Matter Source and Alteration Processes in the Black-Sea. *Deep-Sea Research Part A-Oceanographic Research Papers* **38**, S943-S968.
- Wakeham S. G., Gagosian R. B., Farrington J. W. et Canuel E. A. (1984) Sterenes in suspended particulate matter in the eastern tropical North Pacific. *Nature* **308**, 840-843.
- Werne J. P., Hollander D. J., Behrens A., Schaeffer P., Albrecht P. et Sinninghe Damsté J. (2000) Timing of early diagenetic sulfurization of organic matter: A precursor-product relationship in Holocene sediments of the anoxic Cariaco Basin, Venezuela. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 1741-1751.
- Wiggli M., Schenk A., Horath T., Stettler R., Lüthy L., Grüter D., Buchs U., Smallcombe A. et Bachofen R. *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Ed. Peduzzi, R., Bachofen, R. & Tonolla, M., Istituto Italiano di Idrobiologia (1998). Chemical, physiological and molecular-biological investigations in the microbial mats West of Cadagno in the Piora Valley. 127-136.
- Wünsche L. (1987) Géochimie des lipides neutres et diagénèse précoce des stérols dans des sédiments du bassin lémanique. Thèse, Université de Genève.
- Wünsche L., Mendoza Y. A. et Gülaçar F. O. (1988) Lipid geochemistry of a post-glacial lacustrine sediment. *Organic Geochemistry* **13**, 1131-1143.
- Züllig H. (1985) *Schweiz.Z.Hydrol.* **47**, 87-125.

Conclusion Générale

Dans une première partie, un sondage de la littérature a permis d'obtenir les nouvelles données géochimiques concernant les biomarqueurs utilisés dans le cadre de cette étude, à savoir notamment leurs origines et leur diagenèse associée. Une meilleure compréhension du milieu de déposition du lac de Cadagno a également été possible en rassemblant les différentes études physico-chimiques, biologiques et géochimiques déjà publiées. Dans une seconde partie, la partie expérimentale des travaux est exposée. L'extraction par micro-ondes testée ne s'est pas révélée adaptée pour concurrencer l'extraction par ultra-sons plus rapide et plus pratique. L'élaboration d'une procédure d'élimination du soufre élémentaire sans discrimination des lipides a été adaptée. L'établissement d'une procédure de séparation quantitative des stérols et des stérènes a également été réalisée. L'utilisation d'un tamis moléculaire spécifique a notamment permis de mener une quantification plus précise et sans artéfact. Dans une dernière partie, l'étude géochimique de biomarqueurs spécifiques ainsi que l'étude cinétique de la transformation des stérols en stérènes dans le milieu sédimentaire ont été menées. Les résultats montrent que la carotte sédimentaire se décompose en deux parties. La première se caractérise par de fortes fluctuations entre 0 et 48 cm observées sur le profil du TOC ainsi que sur les profils de concentration des biomarqueurs étudiés, à savoir les hydrocarbures linéaires, ramifiés, les hopanoïdes et les stéroïdes. Entre 48 et 248 cm, les profils obtenus montrent des variations de faible amplitude. L'analyse au microscope de certaines tranches de la carotte révèle des apports clastiques (avalanches, glissements de terrain, crues torrentielles) ayant dilués la matière organique entre 0 et 48 cm et expliquant les minima de TOC observés. Entre 48 et 248 cm, la faible proportion des apports clastiques parmi la matière sédimentaire suggère une sédimentation plus "calme" justifiant les valeurs de TOC élevées. L'analyse des biomarqueurs de type *n*-alcanes révèle une évolution de la nature des apports allochtones en dessous de 48 cm. Ceci est en accord avec l'analyse palynologique reportant une végétation constituée d'arbres et buissons pour les niveaux les plus profonds de la carotte. L'activité humaine (construction de digues, exploitation d'une ferme d'alpage de taille significative et en moindre mesure l'utilisation du lac comme réservoir secondaire) qui s'est développée autour du lac durant le dernier siècle peut également expliquer, au moins en partie, les fortes fluctuations observées entre 0 et 48 cm. La présence des hopanoïdes en grandes proportions témoigne de la forte activité bactérienne du lac confirmée également par l'étude du rapport stanol/sténol. L'étude cinétique menée a permis de montrer qu'une cinétique de déshydratation des stérols d'ordre 1 via une réaction physico-chimique ne permet pas d'expliquer les différences de réactivité entre les couples stérol/stérène ni la variation de leur profil de concentration ou encore les quantités significatives de stérènes présents dans les premiers centimètres du sédiment. Un processus bactérien sélectif permet de justifier ces résultats. L'augmentation du rapport $\ln([\text{stérène}] + [\text{stérol}]) / [\text{stérol}]$ entre 48 et 248

cm suggère dès lors que l'activité bactérienne était plus importante pendant la déposition pour cette tranche de la carotte. Ceci est soutenue par la plus forte concentration de matière organique observée entre 48 et 248 cm, reliée à des apports clastiques et un taux de sédimentation plus faible. La sélectivité bactérienne de la réaction de déshydratation des stérols mise en évidence par cette étude a pour conséquence une distribution des stérènes qui diffère fortement de celle des stérols précurseurs caractéristiques des apports de matière organique. Dès lors l'interprétation de la composition en stérènes - supposés provenir de la réduction des stérènes - dans des sédiments anciens doit être réalisée avec la plus grande prudence. En effet ces résultats montrent que la composition en stérènes ne reflète pas celle des stérols précurseurs mais plutôt la sélectivité de l'activité bactérienne dans le milieu de déposition.

En conséquence une compréhension plus approfondie des mécanismes bactériens transformant les stérols s'avère nécessaire pour pouvoir mener à bien une interprétation géochimique de ces biomarqueurs. Ces résultats devraient donc stimuler des études ultérieures dans le domaine de la diagenèse précoce des stérols sous influence bactérienne.

Section II:

**Occurrence d'une Nouvelle Classe
de Biomarqueurs Stéroïdiens:
les 4,14-Diméthylstéranes**

Dans le cadre d'une collaboration avec le département des Sciences de la Terre (Professeur Gorin G.E.), j'ai pu participer à l'étude de la matière organique provenant de la formation de Monterey (El Capitan, Californie, USA) datant du Miocène (~14 millions d'années). L'analyse de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" de certaines tranches sédimentaires (*cf.* Deuxième Partie pour la procédure expérimentale adoptée) a permis de mettre en évidence une nouvelle série de biomarqueurs stéroïdiens: les 4,14-diméthylstéranes.

Les sédiments provenant de la formation de Monterey ont fait l'objet d'un nombre conséquent d'études lors des vingt dernières années (Kruger, 1986; Curiale et Odermatt, 1989; Schouten *et al.*, 1997; Isaacs et Rullkoetter, 2000). Dans les sédiments prélevés (Pellaton, 2003), le 17 α ,21 β -28,30-bisnorhopane, identifié grâce à son temps de rétention et son spectre de masse (Figure 1), domine très largement la distribution des autres biomarqueurs. Ce composé a été détecté pour la première fois dans les sédiments de Monterey (Seifert *et al.*, 1978). Depuis, il a également été détecté dans d'autres échantillons possédant une origine marine ou terrestre (Requejo *et al.*, 1989; De Grande *et al.*, 1993; Yamamoto et Watanabe, 1994; Killips *et al.*, 1997; Kashirtsev *et al.*, 1999; Mercado *et al.*, 2000). Le précurseur biologique et/ou le mécanisme de formation de ce composé restent cependant sujet à discussion (Curiale *et al.*, 1985; Schoell *et al.*, 1992).

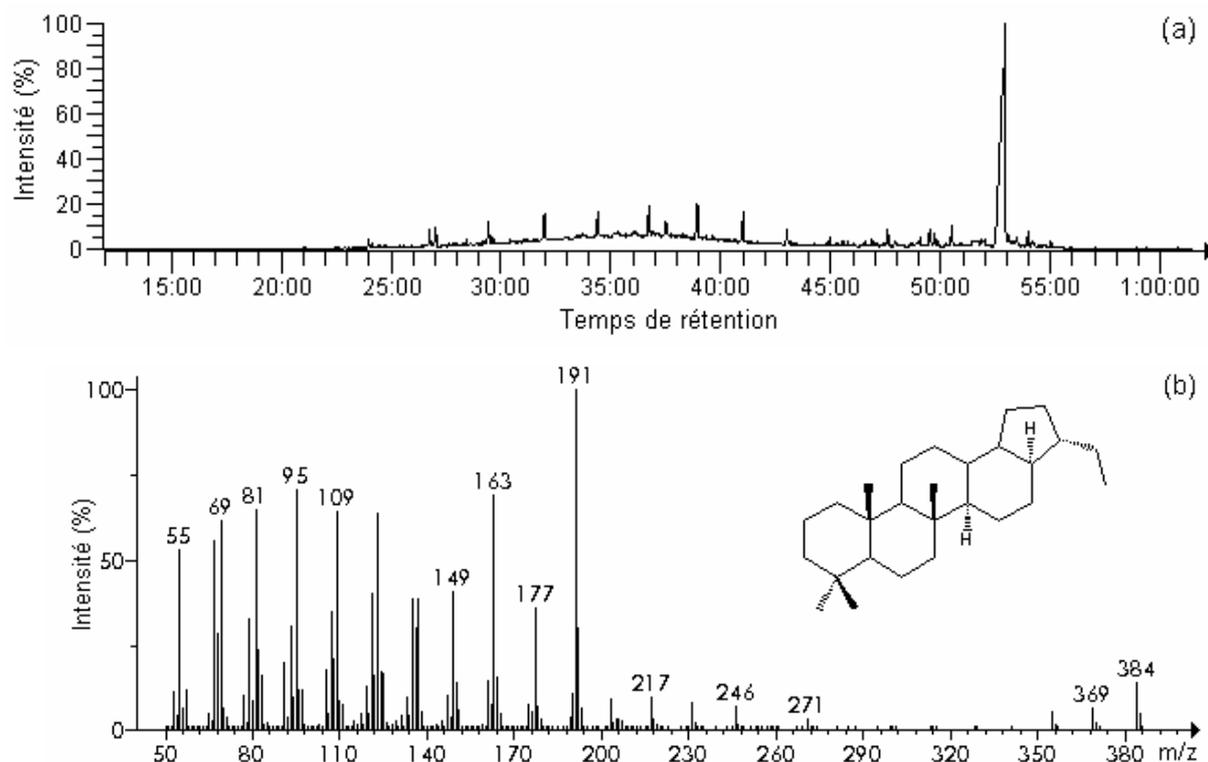


Figure 1: Chromatogramme du courant ionique total de la fraction "hydrocarbures non aromatiques" (a) et spectre de masse du 17 α ,21 β -28,30-bisnorhopane correspondant au pic majeur (b).

Un examen plus approfondi du pic du $17\alpha,21\beta$ -28,30-bisnorhopane révèle la présence en quantités plus faibles d'un second composé. Ce dernier se démarque du précédent par un temps de rétention légèrement supérieur. La déconvolution du pic majeur du chromatogramme permet d'obtenir le spectre de masse propre au composé inconnu (Figure 2) sans superposition des ions spécifiques au $17\alpha,21\beta$ -28,30-bisnorhopane. Cette opération est réalisée en "soustrayant" les ions propres au bruit de fond et aux composés coéluant légèrement avant ou après le composé en question grâce au logiciel AMDIS (Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System) fourni par le National Institute of Standards and Technology, USA).

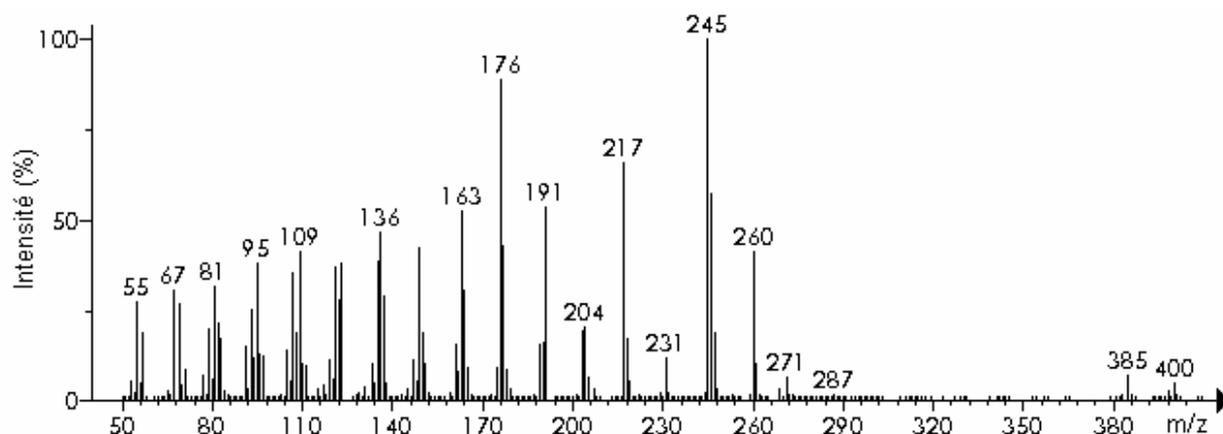


Figure 2: Spectre de masse du composé inconnu présent en plus faibles quantités et coéluant avec le $17\alpha,21\beta$ -28,30-bisnorhopane après déconvolution.

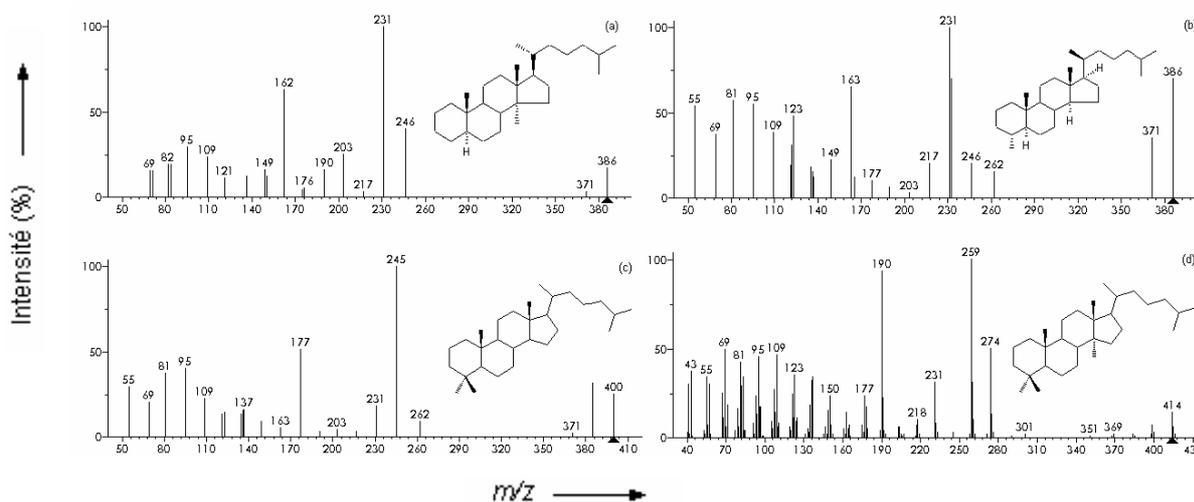


Figure 3 : Spectres de masse du 14α -méthylcholestane (a), du 4α -méthylcholestane (b), du 4,4-diméthylcholestane (c), du 4,4, 14α -triméthylcholestane (d).

L'ion moléculaire à m/z 400, les ions majeurs à m/z 176, 245 et 260 et la comparaison avec les spectres de masse d'isomères permettent de déduire la structure de ce composé. Sur la Figure 3 sont représentés, les spectres de masse du 14α -méthylcholestane du 4α -méthylcholestane, du 4,4-

diméthylcholestane et du lanostane (4,4,14 α -triméthylcholestane) disponibles dans la littérature. La confrontation de ces spectres avec celui de l'inconnu permet de conclure qu'il s'agit du 4,14-diméthylcholestane. La structure de ce dernier est représentée sur la Figure 4.

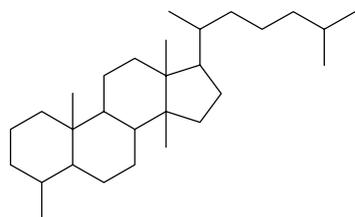


Figure 4: Structure du 4,14-diméthylcholestane.

Ce composé a la particularité de ne pas avoir été reporté ni dans la littérature géochimique ni dans la littérature chimique. De faibles quantités de 4,14-diméthyle- stérols ont été reportés dans une large variété d'organismes (Rangaswami et Ayengar, 1968; Itoh *et al.*, 1978; Itoh *et al.*, 1982; Vishnoi *et al.*, 1988; Afaq-Husain *et al.*, 1991; Sawaikar et Pandhare, 1992; Masaoud *et al.*, 1995). Toutefois certains échinodermes (Holothuriens) ont révélé contenir des quantités majeures de ces stérols (Cordeiro et Djerassi, 1990; Ponomarenko *et al.*, 2001). Dans l'espèce commune *Holothuria scabra*, le 4 α ,14 α -diméthyl-5 α -cholest-9(11)-én-3 β -ol et le 4 α -diméthyl-5 α -cholest-7-én-3 β -ol ont ainsi été identifiés en tant que composés majeurs de la fraction stérol (Stonik *et al.*, 1998). A ce stade, il est prématuré d'affirmer que le 4,14-diméthylcholestane est un biomarqueur propre aux échinodermes. Toutefois, vu la rareté de ce composé d'un point de vue géochimique, le 4,14-diméthylcholestane doit sûrement être spécifique à une espèce ou un groupe d'espèce très restreint. Il n'est pas non plus exclu que le précurseur puisse avoir disparu de la biosphère actuelle. De plus, il faut noter que les homologues en C₂₈ et C₂₉ ont également pu être détectés en plus faibles quantités.

Afin de déterminer la stéréochimie complète de ce composé, diverses techniques chromatographiques ont été employées pour isoler ce dernier. Ces tentatives se sont révélées infructueuses pour le moment. Toutefois, de nouvelles tentatives sont envisagées afin de parvenir à isoler complètement ce composé et publier prochainement les résultats.

Références

- Afaq-Husain S., Shameel M., Usmanghani K., Ahmad M. et Ahmad V. U. (1991) Phychochemical studies on *Dermonema abbottiae* (Nemaliales - Rhodophyta). *Botanica Marina* **34**, 215-220.
- Cordeiro M. L. & Djerassi C. (1990) Biosynthetic studies of marine lipids. 25. Biosynthesis of $\Delta^{9(11)}$ - and Δ^7 -sterols and saponins in sea cucumbers. *Journal of Organic Chemistry* **55**, 2806-2813.
- Curiale J. A., Cameron D. et Davis D. V. (1985) Biological marker distribution and significance in oils and rocks of the Monterey formation, California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **49**, 271-288.
- Curiale J. A. & Odermatt J. R. (1989) Short-term biomarker variability in the Monterey Formation, Santa Maria Basin. *Organic Geochemistry* **14**, 1-13.
- De Grande S. M. B., Neto F. R. A. et Mello M. R. (1993) Extended tricyclic terpanes in sediments and petroleums. *Organic Geochemistry* **20**, 1039-1047.
- Isaacs C. M. & Rullkoetter J. *The Monterey Formation — From Rocks to Molecules*. Isaacs, C. M. and Rullkoetter, J., Columbia University Press, New York (2000). 1-608.
- Itoh T., Ishii T., Tamura T. et Matsumoto T. (1978) Four new and other 4α -methylsterols in the seeds of Solanaceae. *Phytochemistry* **17**, 971-977.
- Itoh T., Tani H., Fukushima K., Tamura T. et Matsumoto T. (1982) Structure-retention relationship of sterols and triterpene alcohols in gas chromatography on a glass capillary column. *Journal of Chromatography* **234**, 65-76.
- Kashirtsev V. A., Kontorovich A. E., Philp R. P., Chalaya O. N., Zueva I. N. et Memetova N. P. (1999) Biomarkers in petroleums of eastern regions of the Siberian Platform as indicators of source-rock formation conditions. *Geologiya i Geofizika* **40**, 1700-1710.
- Killops S. D., Cook R. A., Sykes R. et Boudou J. P. (1997) Petroleum potential and oil-source correlation in the Great South and Canterbury basins. *New Zealand Journal of Geology and Geophysics* **40**, 405-423.
- Kruege M. A. (1986) Biomarker geochemistry of the Miocene Monterey Formation, West San Joaquin Basin, California: Implications for petroleum generation. *Organic Geochemistry* **10**, 517-530.
- Masaoud M., Schmidt J. et Adam G. (1995) Sterols and triterpenoids from *Dracaena cinnabari*. *Phytochemistry* **38**, 795-796.
- Mercado I., Garcia-Calderon N., Ibanez A. et Martin F. (2000) Composition of soil lipids in two Chinampas agroecosystems from Xochimilco and Tlahuac Municipalities, Mexico. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **31**, 1003-1016.
- Pellaton C. (2003) Palynofacies and sequence stratigraphy on continental margins. Thèse, Université de Genève.

Ponomarenko L. P., Kalinovsky A. I., Moiseenko O. P. et Stonik V. A. (2001) Free sterols from the holothurians *Synapta maculata*, *Cladolabes bifurcatus* and *Cucumaria* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **128B**, 53-62.

Rangaswami S. & Ayengar K. N. N. (1968) Chemical components of *Smilax aspera* (Sarsaparilla). *Journal of Research in Indian Medicine* **3**, 1-7.

Requejo A. G., Hollywood J. et Halpern H. I. (1989) Recognition and source correlation of migrated hydrocarbons in Upper Jurassic Hareelv Formation, Jameson Land, East Greenland. *AAPG Bulletin* **73**, 1065-1088.

Sawaikar D. D. & Pandhare E. D. (1992) Chemical constituents of *Maytenus emarginata* Willd. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* **31B**, 639.

Schoell M., McCaffrey M. A., Fago F. J. et Moldowan J. M. (1992) Carbon isotopic compositions of 28,30-bisnorhopanes and other biological markers in a Monterey crude oil. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **56**, 1391-1399.

Schouten S., Schoell M., Rijpstra W. I. C., Sinninghe Damsté J. et De Leeuw J. W. (1997) A molecular stable carbon isotope study of organic matter in immature Miocene Monterey sediments, Pismo basin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**, 2065-2082.

Seifert W. K., Moldowan J. M., Smith G. W. et Whitehead E. V. (1978) First proof of structure of a C₂₈-pentacyclic triterpane in petroleum. *Nature* **271**, 436-437.

Stonik V. A., Ponomarenko L. P., Makarieva T. N., Boguslavsky V. M., Dmitrenok A. S., Fedorov S. N. et Strobikin S. A. (1998) Free sterol compositions from the sea cucumbers *Pseudostichopus trachus*, *Holothuria* (*Microtele*) *nobilis*, *Holothuria scabra*, *Trochostoma orientale* and *Bathyploetes natans*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **120B**, 337-347.

Vishnoi S. P., Shoeb A. et Kapil R. S. (1988) New cycloartenol derivatives from *Aglaia roxburghiana*. *Planta Medica* **54**, 40-41.

Yamamoto M. & Watanabe Y. (1994) Biomarker geochemistry and paleoceanography of Miocene Onnagawa diatomaceous sediments, northern Honshu, Japan. *Proc.Int.Geol.Congr., 29th*, 53-74.

Annexe de la section I

1 Alcanes linéaires et ramifiés

Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Concentration (µg/g d'échantillon sec)							
		Echantillon d'algues	Echantillon de plantes	Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)				
					4-6	12-18	42-48	129-135	242-248
C ₁₆ H ₃₄	226.00	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
C ₁₇ H ₃₆	240	0.69	0.33	0.46	0.35	0.07	1.03	0.18	0.30
C ₁₈ H ₃₈	254	2.03	0.84	0.25	0.80	0.18	0.76	0.26	0.35
C ₁₉ H ₄₀	268	2.22	0.78	0.57	0.98	0.26	1.20	0.35	0.71
C ₂₀ H ₄₂	282	1.62	0.65	0.36	0.67	0.24	1.11	0.36	0.75
C ₂₁ H ₄₄	296	1.07	1.43	0.96	0.96	0.52	1.94	0.60	1.38
C ₂₂ H ₄₆	310	0.60	0.79	0.68	0.78	0.54	1.28	0.42	0.93
C ₂₃ H ₄₈	324	0.38	7.64	1.61	1.58	0.82	3.45	1.65	4.19
C ₂₄ H ₅₀	338	0.32	1.61	0.68	1.06	0.47	1.53	0.45	0.94
C ₂₅ H ₅₂	352	0.36	17.68	2.12	2.26	1.14	5.45	2.03	5.04
C ₂₆ H ₅₄	366	0.22	2.33	0.62	1.24	0.48	1.48	0.58	1.56
C ₂₇ H ₅₆	380	0.37	21.46	3.21	3.82	2.36	9.41	4.17	11.67
C ₂₈ H ₅₈	394	0.29	5.33	0.89	1.32	0.76	1.91	0.55	1.43
C ₂₉ H ₆₀	408	0.57	71.95	6.33	6.62	5.04	15.95	4.39	10.32
C ₃₀ H ₆₂	422	0.22	4.63	0.78	0.86	0.50	2.58	0.66	1.15
C ₃₁ H ₆₄	436	0.36	51.79	6.39	6.90	5.88	16.66	4.27	8.81
C ₃₂ H ₆₆	450	Tr	1.52	0.29	0.33	0.27	0.85	0.17	0.34
C ₃₃ H ₆₈	464	0.16	14.73	2.39	2.55	2.24	6.67	1.19	2.19
Pristane	478	1.29	0.86	0.18	0.45	0.09	0.30	0.19	0.22
Phytane	492	2.21	1.01	0.35	0.84	0.22	0.82	0.29	0.42

Tableau A.1: Concentrations des alcanes libres, du pristane et phytane à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno. Signification des abréviations: Tr: composé détecté à l'état de traces.

2 Terpénoïdes non stéroïdiens

Triterpénoïde non stéroïdien	Désignation	RI	Mm	Concentration (µg/g de sédiment sec)													
				Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)												
					4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248
22,29,30-Trisnorhop-17(21)-ène	T1	1087	368	0.10	0.35	1.00	0.07	0.08	0.11	0.16	0.22	0.27	0.09	0.32	0.36	0.68	0.82
17β-22,29,30-Trisnorhopane	T2	1147	370	S	Tr	Tr	-	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	-	Tr	Tr	
Triterpénoïde inconnu	T3	1182	410	Tr	Tr	S	S	S	-	Tr	-	Tr	Tr	-	-	-	-
30-Norhop-17(21)-ène	T4	1313	410	S	Tr	S	Tr	S	-	Tr	S	S	Tr	-	-	Tr	Tr
Hop-17(21)-ène (GC-MS)	T5	1385	410	0.94	2.97	0.96	0.52	0.90	3.19	2.17	4.55	2.17	4.39	1.62	1.67	1.17	1.26
17β,21α-30-Norhopane	T6	1394	398	Tr	-	-	-	S	-	-	-	-	Tr	-	Tr	-	-
17α,21β-Hopane	T7	1446	412	S	Tr	Tr	Tr	Tr	S	Tr	Tr	Tr	Tr	-	-	Tr	Tr
Hop-13(18)-ène	T8	1476	410	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
Hop-22(29)-ène	T9	1496	410	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	Tr	S
17β,21β-30-Norhopane	T10	1502	398	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Triterpénoïde inconnu	T11	1524	410	0.31	0.88	0.15	0.07	0.21	0.30	0.52	0.56	0.23	0.36	0.52	0.30	0.65	0.51
Hop-12-ène	T12	1597	410	S	S	S	Tr	-	S	S	S	S	-	-	-	-	-
Fern-7-ène	T13	1602	410	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17α-30-Nor-29-éthylhopane	T14	1618	426	Tr	-	Tr	-	-	Tr	Tr	Tr	-	-	-	Tr	Tr	Tr
17β,21β-Hopane	T15	1667	412	0.09	0.12	0.05	0.02	0.04	0.13	0.10	0.15	0.11	0.09	0.15	0.13	0.09	0.11
Hop-21-ène	T16	1729	410	-	Tr	-	S	Tr	-	-	-	-	Tr	-	-	-	-
Triterpénoïde inconnu	T17	1789	424	Tr	Tr	S	S	S	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
17β,21β-Homohopane	T18	1855	426	0.20	0.28	0.08	0.03	0.09	0.28	0.22	0.36	0.26	0.10	0.20	0.29	0.21	0.23

Tableau A.2: Concentrations des triterpénoïdes non stéroïdiens libres à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno. Signification des abréviations: Mm: masse molaire (g/mol); Tr: composé détecté à l'état de traces; S: quantités significatives de composé; "-": composé non détecté. Pour la quantification par GC-MS de l'hop-17(21)ène, cf. Deuxième Partie, § 5.1.4.

3 Stérols

Stérols	Désignation	Indice de rétention (RI)	Masse molaire (g/mol)	Présence dans l'extrait de			
				Sédiment	Sédiment après saponification	Plantes herbacées	Algues Chara
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22Z-dién-3β-ol	O1	909	456	-	x	-	-
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dién-3β-ol	O2	940	456	x	x	-	-
27-Nor-24-méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O3	950	458	-	x	-	-
Cholest-5-én-3β-ol	O4	1000	458	x	x	x	x
5α-Cholestan-3β-ol	O5	1014	460	x	x	-	x
27-Nor-24-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O6	1028	460	x	-	-	-
24-Méthyl-5α-cholestan-3α-ol? (GC-MS)	O7	1051	474	x	-	-	-
24-Méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol?	O8	1054	472	x	-	-	-
24-Méthylcholesta-5,22E-dién-3β-ol	O9	1064	470	x	x	-	x
24-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O10	1074	472	x	x	-	-
24-Méthylcholesta-5,24(28)-dién-3β-ol	O11	1143	470	-	x	-	x
24-Méthylcholest-5-én-3β-ol	O12	1152	472	x	x	x	x
24-Méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O13	1166	474	x	x	-	-
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-dién-3β-ol	O14	1181	484	x	-	-	-
24-Ethylcholesta-5,22E-dién-3β-ol	O15	1200	484	x	x	x	x
23,24-Diméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O16	1203	486	x	-	-	-
24-Ethyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O17	1216	486	x	x	-	-
24-Méthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol	O18	1239	472	x	x	-	-
24-Ethylcholesta-5,25-dién-3β-ol	O19	1266	484	-	x	-	x
24-Ethylcholest-5-én-3β-ol	O20	1300	486	x	x	x	x
23,24-Diméthyl-5α-cholestan-3β-ol	O21	1305	488	x	-	-	-
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol	O22	1316	488	x	x	-	-
24-Ethylcholesta-5,24(28)Z-dién-3β-ol	O23	1333	484	-	-	x	x
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O24	1355	500	x	-	-	-
24-Ethylcholesta-5,24(28)E-dién-3-ol?	O25	1361	484	-	-	x	-
24-Ethyl-4α-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O26	1364	500	x	-	-	-
24-Ethyl-5α-cholest-7-én-3β-ol	O27	1387	486	-	x	x	-
24-Ethyl-5α-cholesta-7,24(28)Z-dién-3β-ol	O28	1414	484	-	-	x	-
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholestan-3β-ol	O29	1451	502	x	-	-	-
24-Ethyl-4α-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O30	1463	502	x	-	-	-

Tableau A.3: Indices de rétention (RI) et désignations alphanumériques des stérols identifiés dans le cadre de l'étude des sédiments du lac de Cadagno.

Stérol	Désignation	Concentration (µg/g de sédiment sec)							
		Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)						
			0-4	4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol	O2	1.58	2.05	1.45	0.43	0.18	0.37	0.72	0.72
Cholest-5-én-3β-ol	O4	4.01	19.43	3.92	1.38	0.47	0.69	2.86	1.92
5α-Cholestan-3β-ol	O5	2.38	17.28	2.22	0.84	0.27	0.62	1.57	0.96
27-Nor-24-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O6	0.41	2.65	0.19	Tr	-	0.15	0.37	0.27
24-Méthyl-5α-cholestan-3α-ol? (GC-MS)	O7	1.10	1.37	0.53	0.37	-	0.20	1.06	0.72
24-Méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol? (GC-MS)	O8	-	2.46	0.92	Tr	-	-	-	-
24-Méthylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol	O9	2.37	13.53	2.89	1.14	0.48	0.82	1.04	0.86
24-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O10	-	-	-	-	-	-	-	-
24-Méthylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O12	2.26	13.94	2.36	1.30	0.91	1.26	0.93	1.42
24-Méthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O13	1.01	6.86	2.36	0.72	0.51	0.45	0.93	1.15
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol	O14	1.46	-	2.65	0.36	0.41	1.06	1.66	0.92
24-Ethylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol (GC-MS)	O15	6.78	22.68	3.11	2.65	1.40	2.34	5.42	5.16
23,24-Diméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O16	Tr	7.47	2.78	-	-	-	-	-
24-Ethyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O17	2.61	25.70	6.02	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
24-Méthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol	O18	0.88	-	-	Tr	-	Tr	-	-
24-Ethylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O20	18.22	86.20	16.94	8.12	4.89	7.82	14.24	12.05
23,24-Diméthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O21	-	-	-	-	-	-	-	-
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O22	7.60	33.17	5.19	3.40	2.38	2.62	3.54	4.15
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O24	1.91	0.90	-	-	-	-	-	-
24-Ethyl-4α-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O26	1.76	-	-	-	-	-	-	-
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholestan-3β-ol	O29	2.52	1.22	-	-	-	-	-	-
24-Ethyl-4α-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O30	3.75	1.33	-	-	-	Tr	-	-

Tableau A.4: Concentrations des stérols libres à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno. Signification des abréviations: Tr: composé détecté à l'état de traces; "-": composé non détecté.

Stérol	Désignation	Concentration (µg/g de sédiment sec)							
		Tranche de la carotte sédimentaire (cm)							
		36-42	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol	O2	0.20	0.75	0.48	0.35	0.38	0.26	0.41	0.09
Cholest-5-én-3β-ol	O4	0.90	1.79	1.22	1.14	0.79	0.33	0.23	0.28
5α-Cholestan-3β-ol	O5	0.43	2.05	2.16	0.85	1.46	1.25	1.77	1.98
27-Nor-24-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O6	0.10	0.28	0.40	0.17	0.25	0.20	0.20	0.22
24-Méthyl-5α-cholestan-3α-ol? (GC-MS)	O7	0.33	0.63	0.50	0.13	0.32	0.16	0.28	0.36
24-Méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol? (GC-MS)	O8	-	0.44	0.43	0.25	0.27	0.29	0.45	0.37
24-Méthylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol	O9	0.43	0.74	0.48	0.86	0.40	Tr	Tr	Tr
24-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O10	-	-	-	0.21	Tr	Tr	Tr	Tr
24-Méthylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O12	1.41	1.06	0.97	0.92	0.59	0.42	0.36	0.36
24-Méthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O13	0.75	1.14	0.90	0.62	0.74	0.49	1.01	0.87
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol	O14	0.40	2.03	-	1.73	0.32	-	-	-
24-Ethylcholesta-5,22E-dièn-3β-ol (GC-MS)	O15	2.97	1.83	0.33	1.45	1.55	0.30	0.96	1.20
23,24-Diméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O16	-	2.20	2.20	1.33	1.33	1.51	2.40	1.76
24-Ethyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O17	Tr	2.09	2.68	1.39	1.31	1.22	2.34	1.75
24-Méthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol	O18	-	-	-	-	-	-	-	-
24-Ethylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O20	9.46	10.05	6.99	5.81	4.53	3.01	2.30	2.31
23,24-Diméthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O21	-	-	-	-	3.78	4.71	4.75	-
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O22	3.93	3.37	1.91	2.96	3.53	2.18	3.28	2.67
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O24	-	-	-	-	2.53	-	Tr	-
24-Ethyl-4α-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O26	-	-	-	-	-	-	-	-
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholestan-3β-ol	O29	-	-	-	-	1.72	0.25	Tr	-
24-Ethyl-4α-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O30	-	-	-	-	0.88	-	Tr	-

Tableau A.4 (suite): Concentrations des stérols libres à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno.

Stérol	Désignation	Abondance relative (%)							
		Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)						
			0-4	4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dié-3β-ol	O2	2.5	0.8	2.7	2.1	1.5	2.0	2.1	2.4
Cholest-5-én-3β-ol	O4	6.4	7.5	7.3	6.6	4.0	3.7	8.3	6.3
5α-Cholestan-3β-ol	O5	3.8	6.7	4.2	4.1	2.3	3.4	4.6	3.2
27-Nor-24-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O6	0.7	1.0	0.3	Tr	-	0.8	1.1	0.9
24-Méthyl-5α-cholestan-3α-ol? (GC-MS)	O7	1.8	0.5	1.0	1.8	-	1.1	3.1	2.4
24-Méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol? (GC-MS)	O8	-	1.0	1.7	Tr	-	-	-	-
24-Méthylcholesta-5,22E-dié-3β-ol	O9	3.8	5.2	5.4	5.5	4.0	4.5	3.0	2.8
24-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O10	-	-	-	-	-	-	-	-
24-Méthylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O12	3.6	5.4	4.4	6.3	7.6	6.9	2.7	4.7
24-Méthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O13	1.6	2.7	4.4	3.5	4.3	2.5	2.7	3.8
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-dié-3β-ol	O14	2.3	-	5.0	1.7	3.4	5.8	4.8	3.0
24-Ethylcholesta-5,22E-dié-3β-ol (GC-MS)	O15	10.8	8.8	5.8	12.8	11.8	12.7	15.8	17.0
23,24-Diméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O16	Tr	2.9	5.2	-	-	-	-	-
24-Ethyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O17	4.2	10.0	11.2	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
24-Méthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol	O18	1.4	-	-	Tr	-	Tr	-	-
24-Ethylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O20	29.1	33.4	31.6	39.2	41.1	42.5	41.5	39.8
23,24-Diméthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O21	-	-	-	-	-	-	-	-
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O22	12.1	12.8	9.7	16.4	20.0	14.2	10.3	13.7
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O24	3.1	0.3	-	-	-	-	-	-
24-Ethyl-4α-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O26	2.8	-	-	-	-	-	-	-
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholestan-3β-ol	O29	4.0	0.5	-	-	-	-	-	-
24-Ethyl-4α-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O30	6.0	0.5	-	-	-	Tr	-	-

Tableau A.5: Abondances relatives des stérols libres à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno. Signification des abréviations identique à celle indiquée au Tableau A.4.

Stérol	Désignation	Abondance relative (%)							
		Tranche de la carotte sédimentaire (cm)							
		36-42	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248
27-Nor-24-méthylcholesta-5,22E-dié-3β-ol	O2	1.0	2.5	2.2	1.7	1.4	1.6	2.0	0.7
Cholest-5-én-3β-ol	O4	4.2	5.9	5.6	5.7	3.0	2.0	1.1	1.9
5α-Cholestan-3β-ol	O5	2.0	6.7	10.0	4.2	5.5	7.5	8.5	13.9
27-Nor-24-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O6	0.5	0.9	1.8	0.8	0.9	1.2	0.9	1.6
24-Méthyl-5α-cholestan-3α-ol? (GC-MS)	O7	1.6	2.1	2.3	0.6	1.2	0.9	1.4	2.6
24-Méthyl-5α-cholest-22Z-én-3β-ol? (GC-MS)	O8	-	1.4	2.0	1.2	1.0	1.8	2.2	2.6
24-Méthylcholesta-5,22E-dié-3β-ol	O9	2.0	2.4	2.2	4.2	1.5	Tr	Tr	Tr
24-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O10	-	-	-	1.0	Tr	Tr	Tr	Tr
24-Méthylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O12	6.6	3.5	4.5	4.6	2.2	2.5	1.7	2.5
24-Méthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O13	3.5	3.8	4.1	3.1	2.8	2.9	4.9	6.1
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-dié-3β-ol	O14	1.9	6.7	-	8.6	1.2	-	-	-
24-Ethylcholesta-5,22E-dié-3β-ol (GC-MS)	O15	13.9	6.0	1.5	7.2	5.8	1.8	4.6	8.4
23,24-Diméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O16	-	7.2	10.1	6.6	5.0	9.1	11.6	12.4
24-Ethyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol (GC-MS)	O17	Tr	6.8	12.4	6.9	4.9	7.4	11.3	12.3
24-Méthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol	O18	-	-	-	-	-	-	-	-
24-Ethylcholest-5-én-3β-ol (GC-MS)	O20	44.4	33.0	32.3	28.8	17.0	18.2	11.1	16.3
23,24-Diméthyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O21	-	-	-	-	14.2	28.4	22.9	-
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol (GC-MS)	O22	18.4	11.1	8.8	14.7	13.2	13.2	15.8	18.7
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O24	-	-	-	-	9.5	-	Tr	-
24-Ethyl-4α-Méthyl-5α-cholest-22E-én-3β-ol	O26	-	-	-	-	-	-	-	-
4α,23,24-Triméthyl-5α-cholestan-3β-ol	O29	-	-	-	-	6.5	1.5	Tr	-
24-Ethyl-4α-méthyl-5α-cholestan-3β-ol	O30	-	-	-	-	3.3	-	Tr	-

Tableau A.5 (suite): Abondances relatives des stérols libres à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno. Signification des abréviations identique à celle indiquée au Tableau A.4.

4 Stérènes

Stérène/ane	Désignation	Indice de rétention (RI)	Masse molaire (g/mol)	Présence dans l'extrait de	
				Sédiment	Sédiment traité par NaBH ₄ /NiCl ₂
27-Nor-24-méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N1	947	368	x	-
5 β -Cholestane	N2	950	372	-	x
Cholest-4-ène	N3	989	370	-	x
5 α -Cholest-2-ène	N4	1000	370	x	-
5 α -Cholestane	N5	1007	372	-	x
Cholest-5-ène	N6	1008	370	-	x
5 α -Cholest-3-ène	N7	1015	370	x	-
24-Méthyl-5 β -cholesta-22E-ène?	N8	1018	384	-	x
24-Méthylcholesta-4,22Z-diène?	N9	1028	382	-	x
24-Méthyl-5 α -cholesta-2,22Z-diène?	N10	1040	382	x	-
24-Méthylcholesta-5,22Z-diène?	N11	1045	382	-	x
24-Méthyl-5 α -cholest-22Z-ène?	N12	1046	384	-	x
24-Méthylcholesta-4,22E-diène	N13	1054	382	-	x
C ₂₈ -Stéradiène (RI=1062)	N14	1062	382	-	x
24-Méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N15	1064	382	x	-
Cholesta-3,5-diène	N16	1072	368	x	-
24-Méthylcholesta-5,22E-diène?	N17	1073	382	-	x
24-Méthyl-5 α -cholest-22E-ène?	N18	1074	384	-	x
24-Méthyl-5 β -cholestane?	N19	1100	386	-	x
24-Méthylcholesta-3,5,22Z-triène?	N20	1109	380	x	-
C ₂₈ -Stéradiène (RI=1135)	N21	1135	382	-	x
24-Méthylcholesta-3,5,22E-triène	N22	1135	380	x	-
24-Méthylcholest-4-ène?	N23	1142	384	-	x
24-Méthyl-5 α -cholest-2-ène	N24	1150	384	x	-
24-Méthyl-5 α -cholestane	N25	1163	386	-	x
24-Méthylcholest-5-ène	N26	1163	384	-	x
23,24-Diméthylcholesta-4,22E-diène?	N27	1177	396	-	x
23,24-Diméthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N28	1177	396	x	-
23,24-Diméthylcholesta-3,22E-diène?	N29	1187	396	x	-
24-Ethyl-5 α -cholesta-2,22E-diène?	N30	1194	396	x	-
24-Ethylcholesta-4,22E-diène?	N31	1200	396	-	x
23,24-Diméthylcholesta-5,22E-diène?	N32	1200	396	-	x
23,24-Diméthyl-5 α -cholest-22E-ène?	N33	1202	398	-	x
24-Ethyl-5 α -cholesta-3,22E-diène?	N34	1208	396	x	-
24-Ethylcholesta-5,22E-diène	N35	1217	396	-	x
24-Ethyl-5 α -cholest-22E-ène	N36	1219	398	-	x
24-Méthylcholesta-3,5-diène	N37	1236	382	x	-
24-Ethyl-5 β -cholestane	N38	1239	400	-	x
23,24-Diméthylcholesta-3,5,22E-triène?	N39	1278	394	x	-
24-Ethylcholest-4-ène	N40	1285	398	-	x
23,24-Diméthyl-5 α -cholest-2-ène?	N41	1288	398	x	-
24-Ethylcholesta-3,5,22E-triène	N42	1291	394	x	-
23,24-Diméthyl-5 α -cholestane?	N43	1296	400	-	x
24-Ethyl-5 α -cholest-2-ène	N44	1300	398	x	-
24-Ethyl-5 α -cholestane	N45	1312	400	-	x
24-Ethylcholest-5-ène?	N46	1312	398	-	x
24-Ethyl-5 α -cholest-3-ène?	N47	1317	398	x	-
24-Ethylcholesta-3,5-diène	N48	1381	396	x	-

Tableau A.6: Indices de rétention (RI) et désignations alphanumériques des stérènes et stérènes identifiés dans le cadre de l'étude des sédiments du lac de Cadagno.

		Concentration (µg/g de sédiment sec)													
Stérène	Désignation	Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)												
			4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248
27-Nor-24-méthyl-5α-cholesta-2,22E-diène?	N1	0.051	0.068	0.015	Tr	0.018	0.093	Tr	0.037	Tr	0.016	-	0.017	0.021	Tr
5α-Cholest-2-ène	N4	0.342	0.454	0.138	0.057	0.157	0.650	0.347	0.431	0.177	0.164	0.285	0.482	0.403	0.494
5α-Cholest-3-ène	N7	0.097	0.113	0.021	Tr	0.022	0.061	0.055	0.054	0.017	0.015	0.032	0.027	0.028	0.028
24-Méthyl-5α-cholesta-2,22Z-diène?	N10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tr	-	0.029	0.023	0.040
24-Méthyl-5α-cholesta-2,22E-diène?	N15	0.103	0.164	0.034	0.014	0.040	0.177	0.111	0.179	0.041	0.084	0.102	0.150	0.160	0.216
Cholesta-3,5-diène	N16	0.390	0.414	0.162	0.029	0.112	0.356	0.290	0.172	0.130	0.054	0.122	0.215	0.140	0.224
24-Méthylcholesta-3,5,22Z-triène?	N20	0.110	0.158	0.027	0.009	0.039	0.084	0.095	0.305	0.092	0.255	0.182	0.092	0.156	0.180
24-Méthylcholesta-3,5,22E-triène	N22	0.297	0.413	0.111	0.031	0.111	0.263	0.243	0.319	0.094	0.320	0.199	0.315	0.302	0.331
24-Méthyl-5α-cholest-2-ène (GC-MS)	N24	0.059	0.088	0.025	0.012	0.039	0.124	0.067	0.108	0.049	0.071	0.100	0.206	0.141	0.160
23,24-Diméthyl-5α-cholesta-2,22E-diène?	N28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.031	0.060	Tr	0.071	0.083
23,24-Diméthylcholesta-3,22E-diène?	N29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
24-Ethyl-5α-cholesta-2,22E-diène?	N30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.036	0.046	0.077	Tr	0.068
24-Ethyl-5α-cholesta-3,22E-diène?	N34	0.096	0.119	0.023	0.012	0.036	0.091	0.066	0.156	0.032	0.091	0.135	0.191	0.064	0.123
24-Méthylcholesta-3,5-diène (GC-MS)	N37	0.097	0.138	0.051	0.009	0.043	0.095	0.616	0.288	0.070	0.082	0.118	0.063	0.095	
23,24-Diméthylcholesta-3,5,22E-triène?	N39	1.026	0.930	0.499	0.245	0.517	1.478	1.933	3.507	0.628	4.642	3.218	2.211	2.978	2.689
23,24-Diméthyl-5α-cholest-2-ène? (GC-MS)	N41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.080	0.029	0.062
24-Ethylcholesta-3,5,22E-triène (GC-MS)	N42	0.244	0.457	0.098	0.021	0.103	0.359	0.237	0.529	0.159	0.297	-	0.196	0.133	0.128
24-Ethyl-5α-cholest-2-ène (GC-MS)	N44	0.118	0.213	0.059	0.027	0.082	0.377	0.155	0.108	0.149	0.198	0.255	0.501	0.287	0.423
24-Ethyl-5α-cholest-3-ène? (GC-MS)	N47	0.044	0.055	0.012	-	0.015	0.029	0.019	0.038	0.012	0.015	-	-	Tr	Tr
24-Ethylcholesta-3,5-diène (GC-MS)	N48	2.245	0.624	0.776	0.017	0.214	0.723	0.359	0.740	0.500	0.254	0.356	0.619	0.361	0.614

Tableau A.7: Concentrations des stérènes libres à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno. Signification des abréviations identique à celle indiquée au Tableau A.4.

		Abondance relative (%)													
Stérène	Désignation	Sédiment de surface	Tranche de la carotte sédimentaire (cm)												
			4-6	6-12	12-18	18-24	24-30	30-36	42-48	48-54	84-90	129-135	174-180	219-225	242-248
27-Nor-24-méthyl-5α-cholesta-3,22E-diène	N2	1.0	1.5	0.7	Tr	1.2	1.9	Tr	0.5	Tr	0.2	-	0.3	0.4	Tr
5α-Cholest-2-ène	N4	6.4	10.3	6.7	11.8	10.2	13.1	8.6	5.9	7.5	2.5	5.5	8.7	7.5	8.3
5α-Cholest-3-ène	N7	1.8	2.6	1.0	Tr	1.4	1.2	1.4	0.7	0.7	0.2	0.6	0.5	0.5	0.5
24-Méthyl-5α-cholesta-2,22Z-diène?	N10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tr	-	0.5	0.4	0.7
24-Méthyl-5α-cholesta-2,22E-diène?	N15	1.9	3.7	1.7	2.9	2.6	3.6	2.8	2.5	1.7	1.3	2.0	2.7	3.0	3.6
Cholesta-3,5-diène	N18	7.3	9.4	7.9	6.0	7.2	7.2	2.4	5.5	0.8	2.4	3.9	2.6	3.8	
24-Méthylcholesta-3,5,22Z-triène?	N20	2.1	3.6	1.3	1.9	2.5	1.7	2.4	4.2	3.9	3.9	3.5	1.7	2.9	3.0
24-Méthylcholesta-3,5,22E-triène	N23	5.6	9.4	5.4	6.3	7.1	5.3	6.0	4.4	4.0	4.8	3.8	5.7	5.6	5.6
24-Méthyl-5α-cholest-2-ène (GC-MS)	N24	1.1	2.0	1.2	2.5	2.5	2.5	1.7	1.5	2.1	1.1	1.9	3.7	2.6	2.7
23,24-Diméthyl-5α-cholesta-2,22E-diène?	N28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	1.2	Tr	1.3	1.4
23,24-Diméthylcholesta-3,22E-diène	N29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
24-Ethyl-5α-cholesta-2,22E-diène?	N30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	0.9	1.4	Tr	1.1
24-Ethyl-5α-cholesta-3,22E-diène?	N34	1.8	2.7	1.1	2.6	2.3	1.8	1.6	2.1	1.3	1.4	2.6	3.4	1.6	2.1
24-Méthylcholesta-3,5-diène (GC-MS)	N38	1.8	3.1	2.5	1.8	2.8	1.9	1.4	8.4	12.2	1.1	1.6	2.1	1.2	1.6
23,24-Diméthylcholesta-3,5,22E-triène?	N39	19.3	21.1	24.3	50.8	33.4	29.8	47.9	48.1	26.5	70.2	62.2	40.0	55.3	45.1
23,24-Diméthyl-5α-cholest-2-ène (GC-MS)	N41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	0.5	1.0
24-Ethylcholesta-3,5,22E-triène (GC-MS)	N42	4.6	10.4	4.8	4.3	6.6	7.2	5.9	7.2	6.7	4.5	-	3.5	2.5	2.2
24-Ethyl-5α-cholest-2-ène (GC-MS)	N44	2.2	4.8	2.9	5.5	5.3	7.6	3.8	1.5	6.3	3.0	4.9	9.1	5.3	7.1
24-Ethyl-5α-cholest-3-ène (GC-MS)	N46	0.8	1.3	0.6	-	1.0	0.6	0.5	0.5	0.5	0.2	-	-	Tr	Tr
24-Ethylcholesta-3,5-diène (GC-MS)	N48	42.2	14.2	37.8	3.5	13.8	14.6	8.9	10.1	21.1	3.8	6.9	11.2	6.7	10.3

Tableau A.8: Abondances relatives des stérènes libres à différentes profondeurs dans les sédiments du lac de Cadagno.

5 Spectres de masse

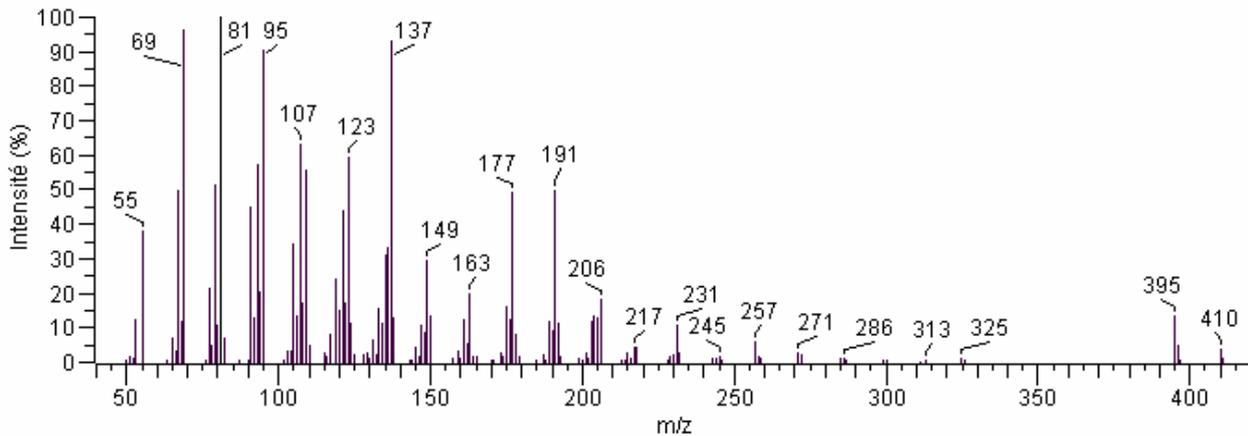
5.1 Remarques préliminaires

Les spectres de masse reportés ont été obtenus grâce au logiciel AMDIS ("Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System" disponible via le National Institute of Standards and Technology, USA). Ce logiciel permet d'une part d'éliminer des spectres de masse les ions provenant du bruit de fond. D'autre part, il donne la possibilité d'effectuer la déconvolution de pics où il y a coélution de deux voire plusieurs composés. Toutefois, si les temps de rétention de ces derniers sont quasi identiques, la déconvolution ne s'avère plus possible. Dans ce dernier cas, le spectre de masse reporté correspond à la superposition du spectre de chacun des deux composés coéluant. Par ailleurs, les spectres de masse obtenus par AMDIS pour des composés présents sous forme de traces sont peu significatifs en raison du nombre de pics trop réduits. Pour cette raison, le spectre de masse brut - c'est à dire sans soustraction de bruit de fond - est présenté pour quelques composés. La mention (spectre brut) permet de distinguer ces spectres de ceux obtenus avec AMDIS.

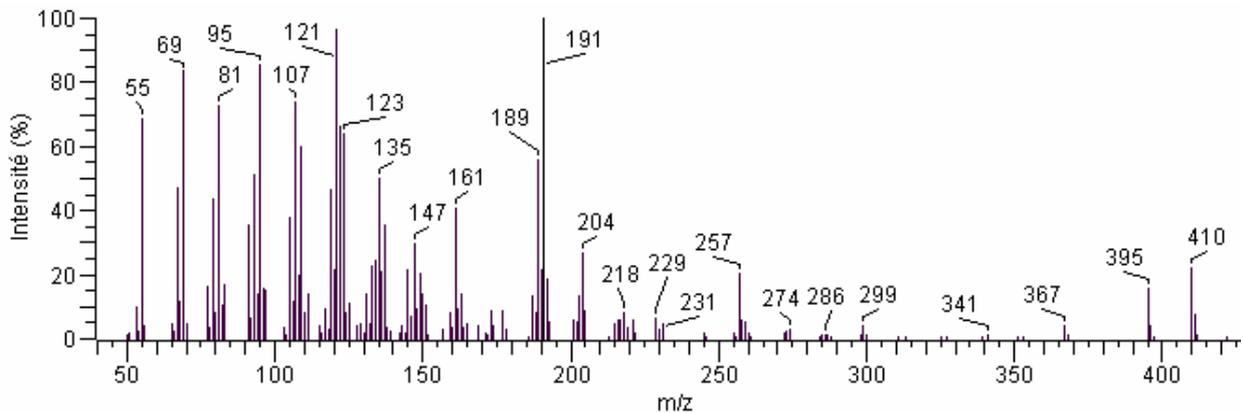
Les spectres de masse présentés ci-dessous correspondent à ceux dont l'identification a été discutée dans le paragraphe 7.1. La présence d'un point d'interrogation après le composé indique que soit le spectre de masse correspondant n'a pas été publié dans la littérature, soit le spectre de masse reporté ci-dessous ne permet pas avec certitude d'identifier le composé.

Les composés identifiés sans ambiguïté par comparaison de leur spectre de masse et de celui déjà publié dans la littérature ainsi que grâce au RI ne sont pas reportés ci- dessous.

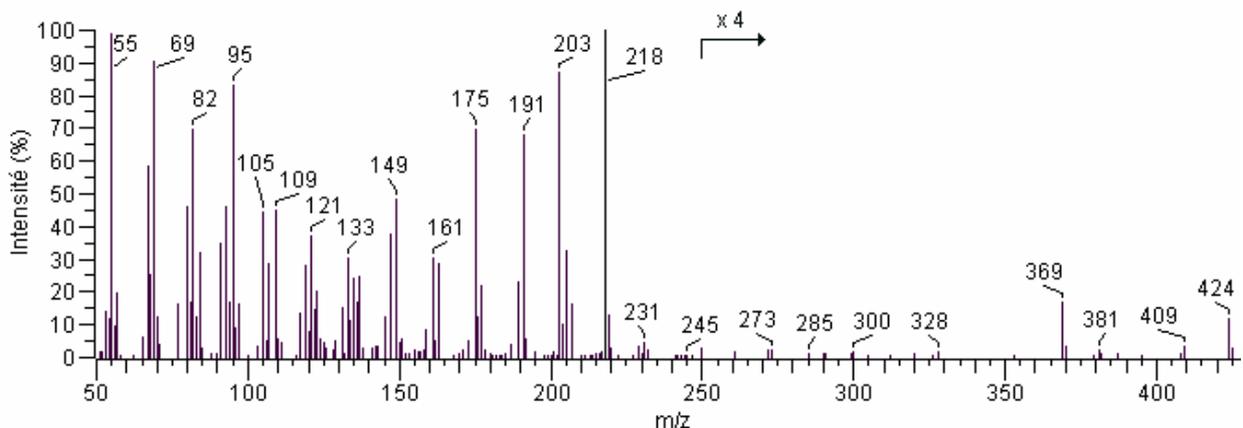
5.2 Spectres de masse par impact électronique de triterpénoïdes non stéroïdiens



Spectre A.1: Triterpénoïde inconnu (RI=1182) (T3) possédant un ion moléculaire à m/z 410.

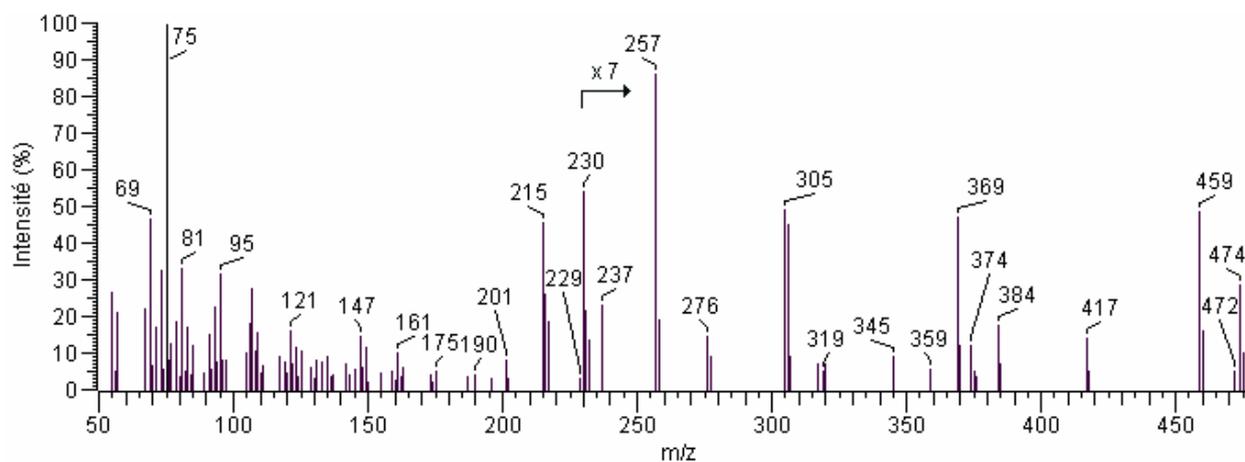


Spectre A.2: Triterpénoïde inconnu (RI=1524) (T11) possédant un ion moléculaire à m/z 410.

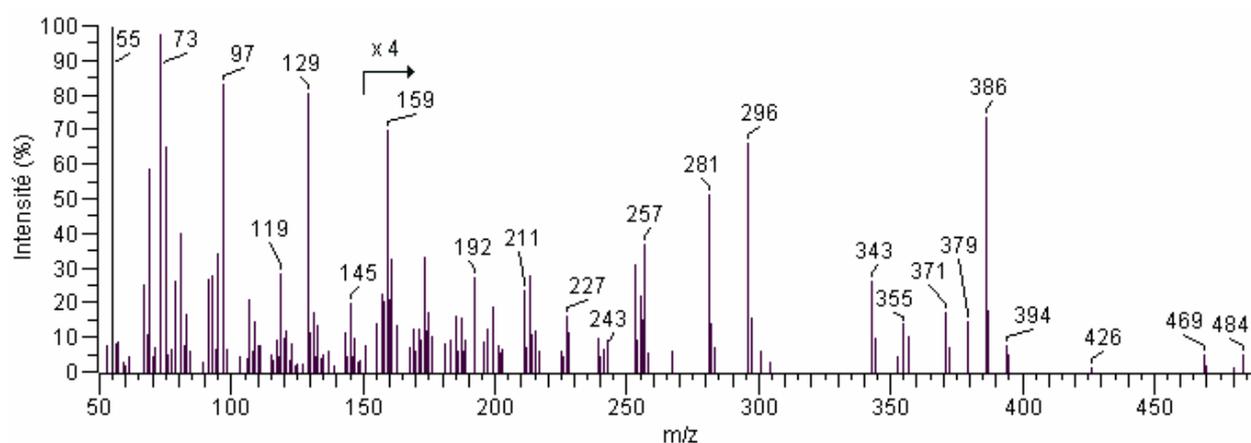


Spectre A.3: Triterpénoïde inconnu (RI=1789) (T17) possédant un ion moléculaire à m/z 424.

5.3 Spectres de masse par impact électronique de stérols dérivatisés sous la forme d'éthers triméthylsilylés

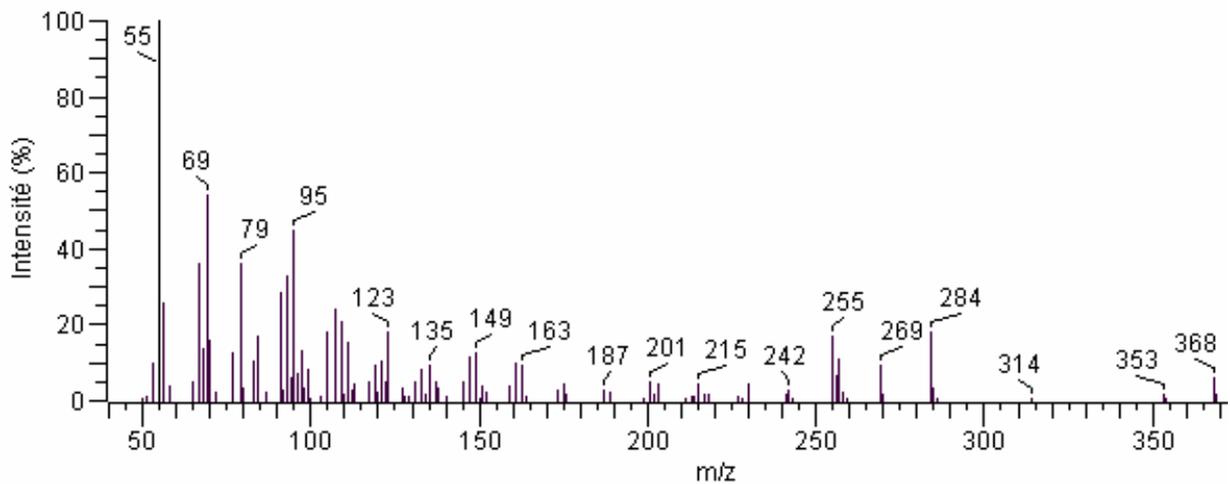


Spectre A.4: 24-méthyl-5 α -cholestan-3 α -ol? (O7) coéluant avec le 24-méthyl-5 α -cholest-22Z-én-3 β -ol? (O8).

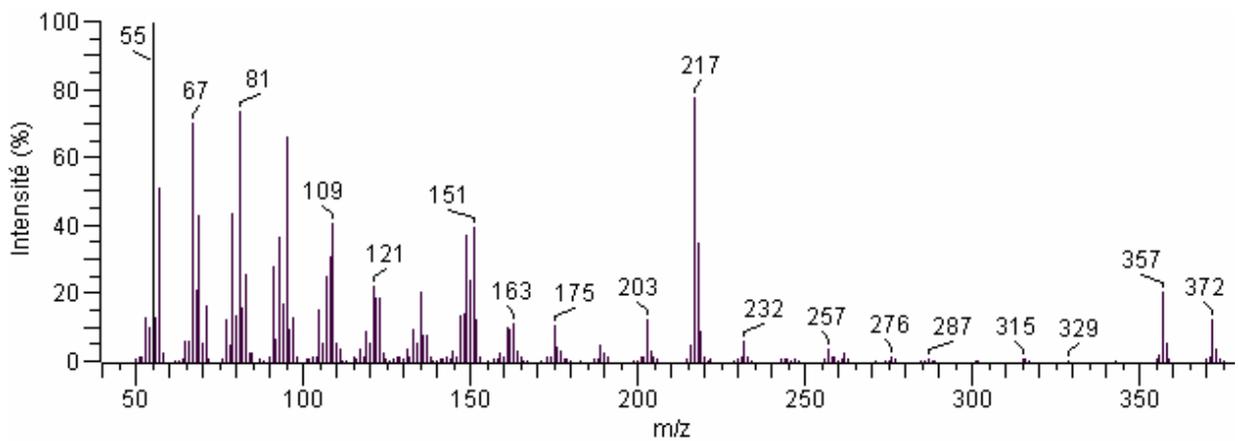


Spectre A.5: 24-Ethylcholesta-5,24(28)E-dién-3 β -ol? (O25).

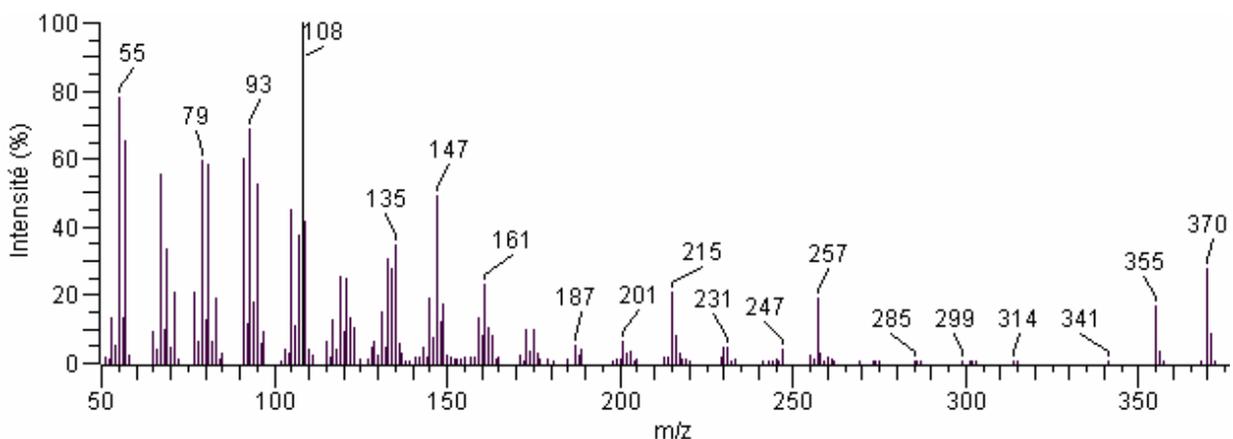
5.4 Spectres de masse par impact électronique des stérènes



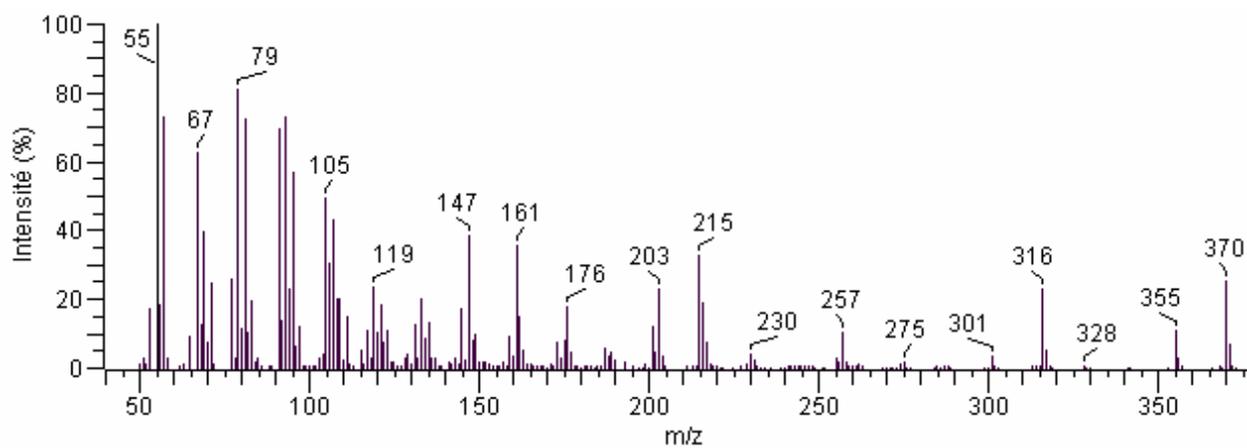
Spectre A.6: 27-Nor-24-méthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène? (N1).



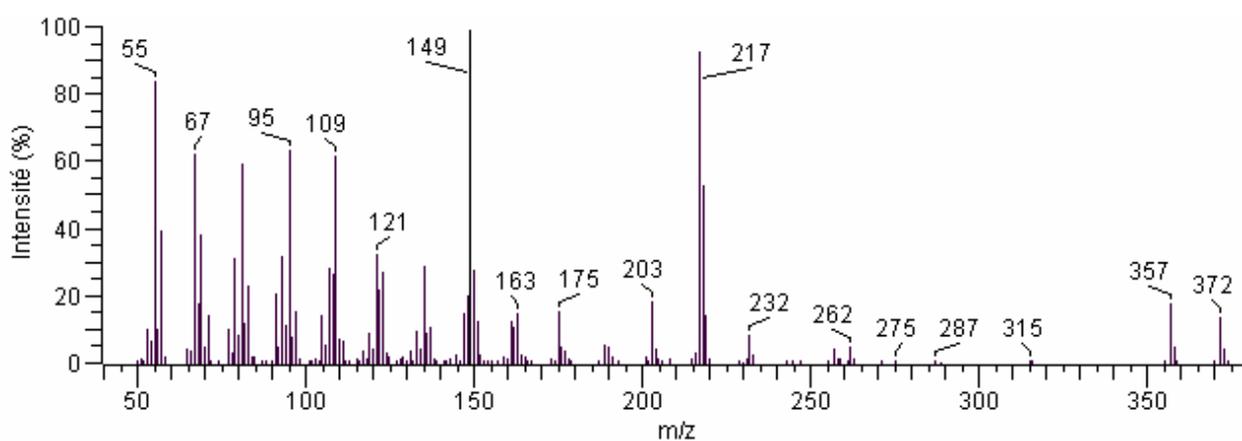
Spectre A.7 : 5 β -Cholestane (produit commercial) (N2).



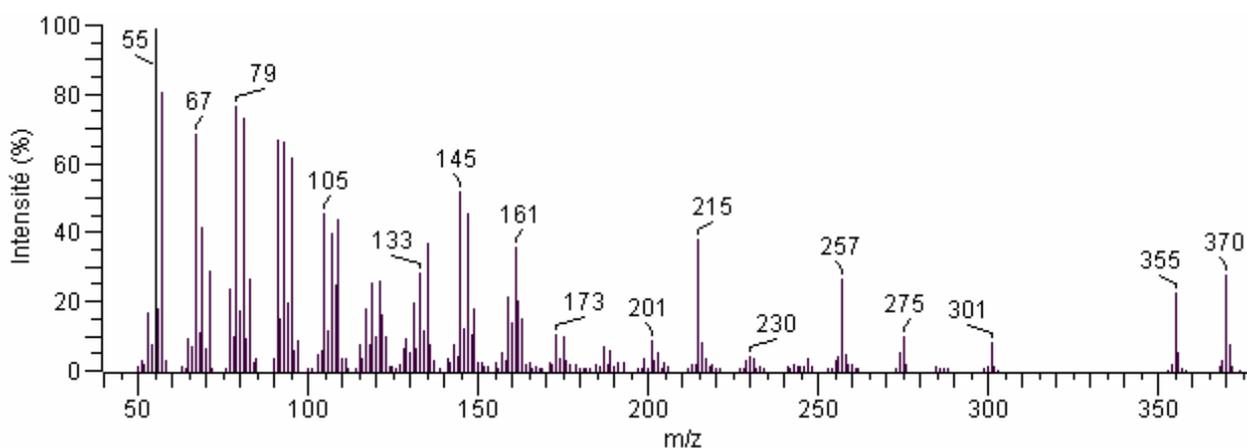
Spectre A.8 : Cholest-4-ène (produit commercial) (N3).



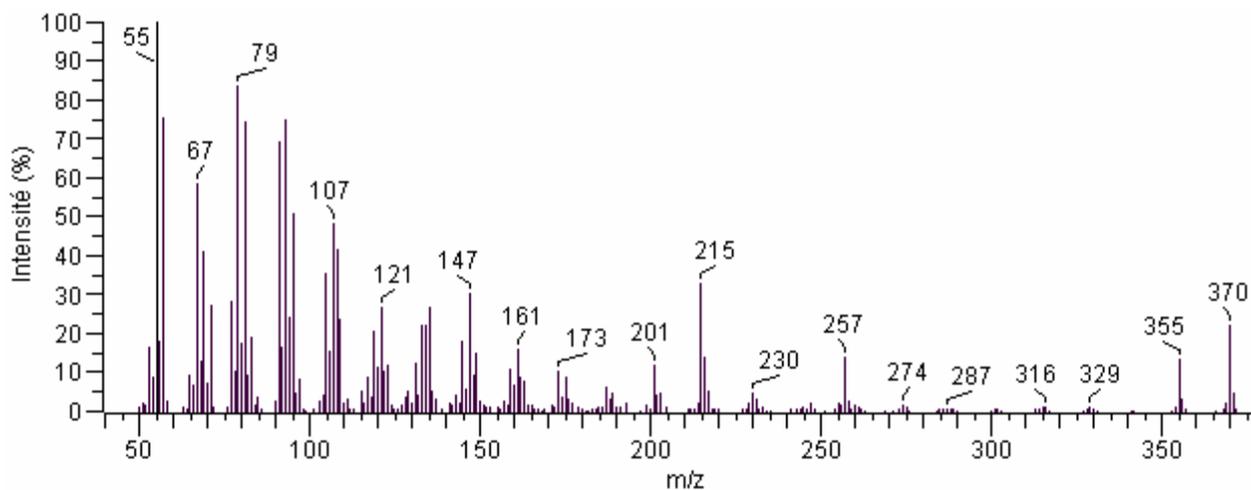
Spectre A.9: 5 α -Cholest-2-ène (produit commercial) (N4).



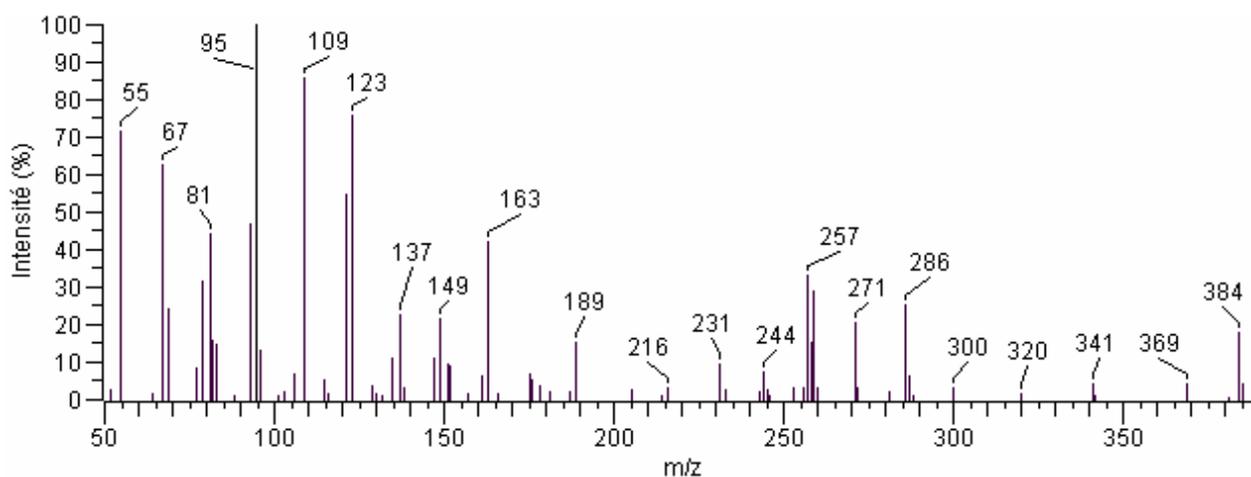
Spectre A.10: 5 α -Cholestane (produit commercial) (N5).



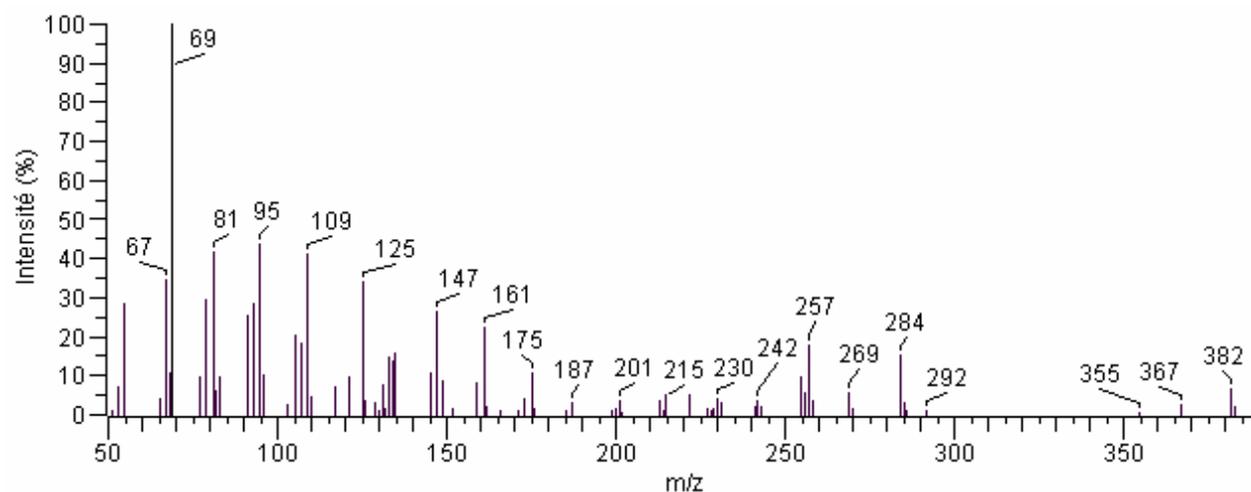
Spectre A.11: Cholest-5-ène (produit commercial) (N6).



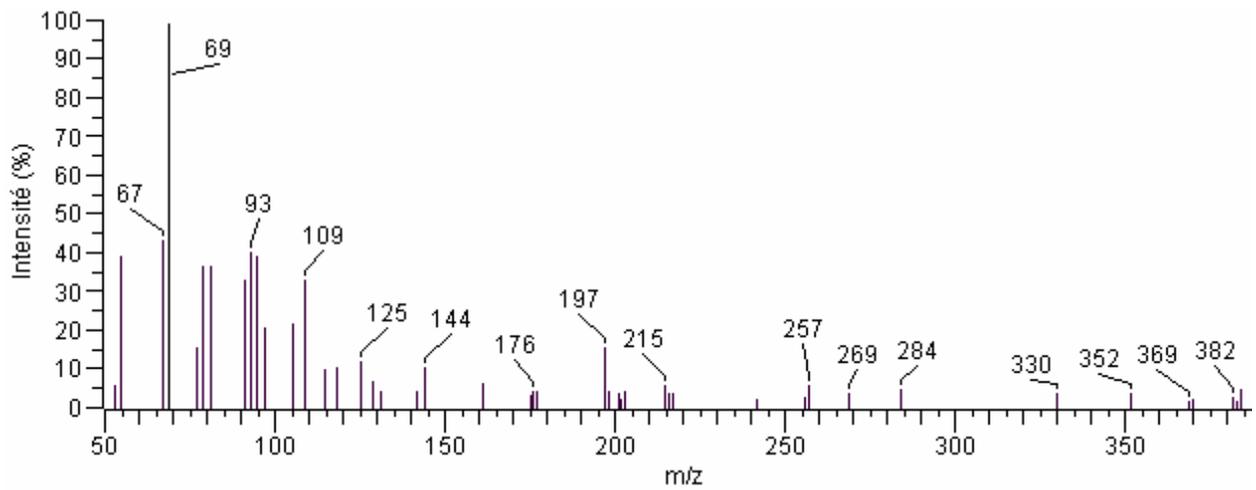
Spectre A.12: 5 α -Cholest-3-ène (produit commercial) (N7).



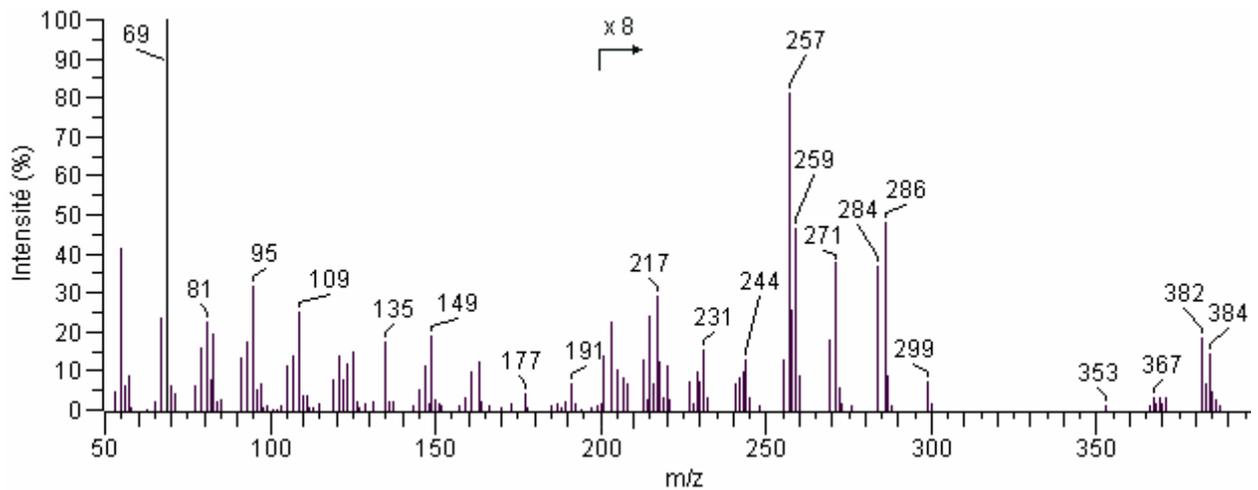
Spectre A.13: 24-Méthyl-5 β -cholest-22E-ène? (N8).



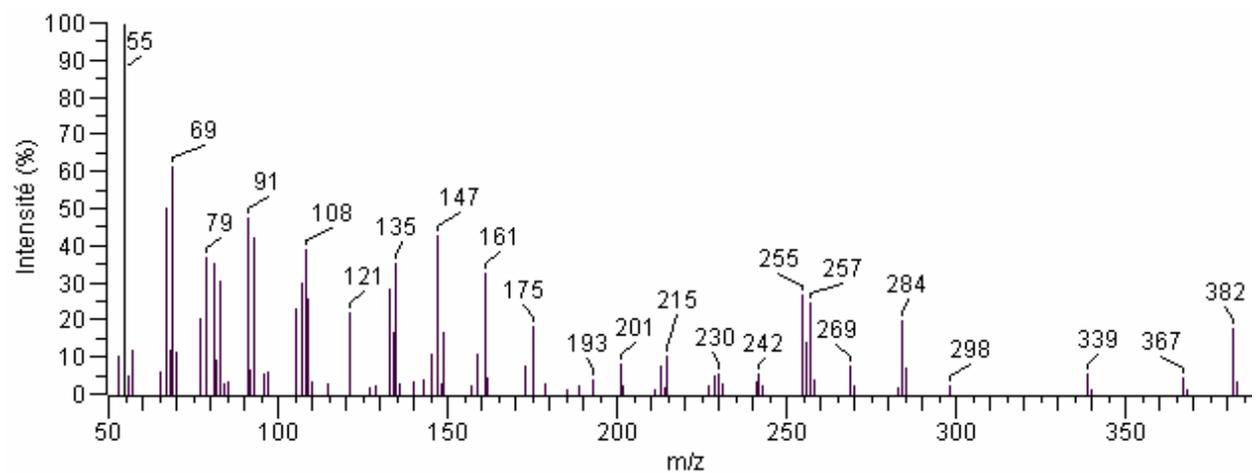
Spectre A.14: 24-Méthylcholesta-4,22Z-diène? (N9).



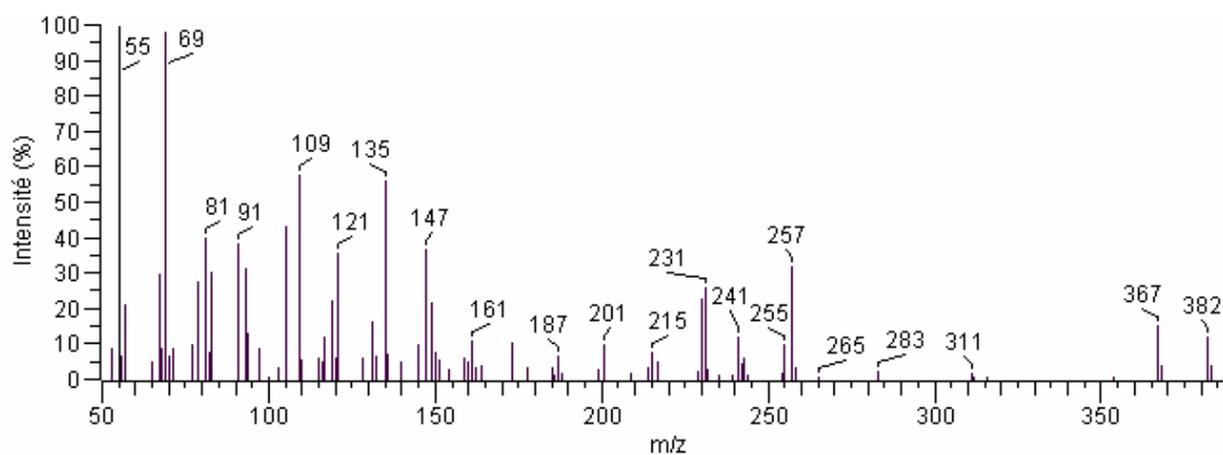
Spectre A.15: 24-Méthyl-5 α -cholesta-2,22Z-diène? (N10) coéluant avec un composé de masse moléculaire 384 g/mol.



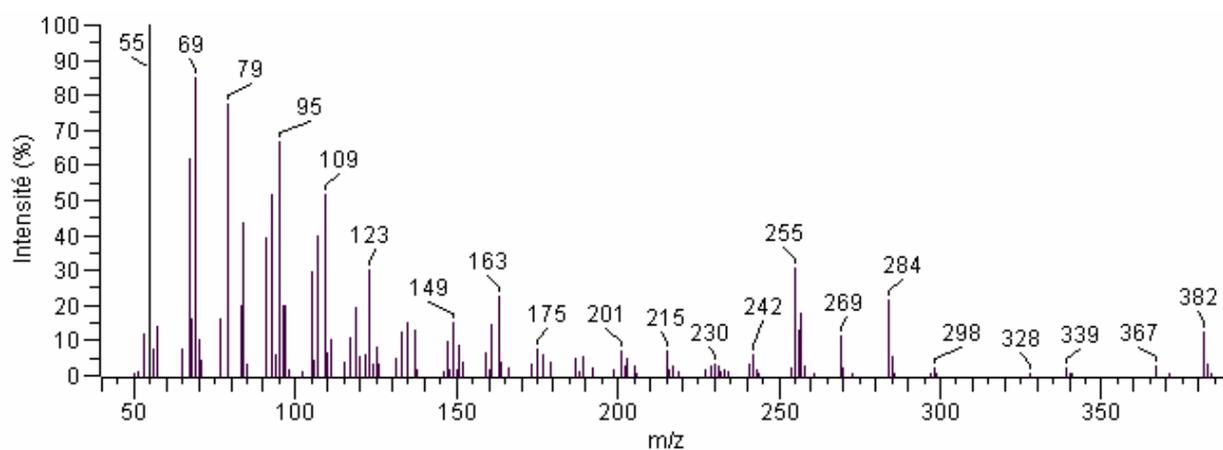
Spectre A.16: 24-Méthylcholesta-5,22Z-diène? (N11) coéluant avec le 24-méthyl-5 α -cholest-22Z-ène? (N12).



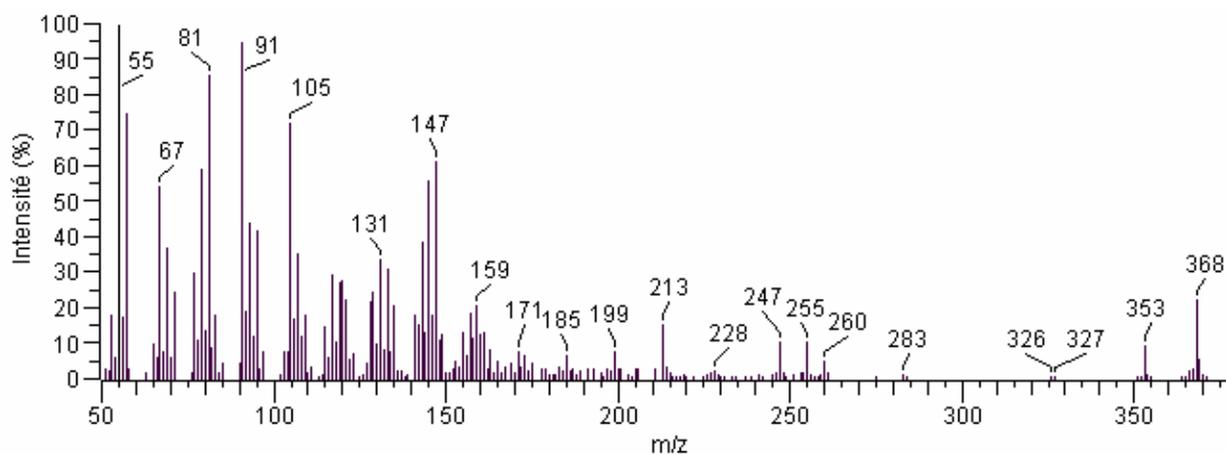
Spectre A.17: 24-Méthylcholesta-4,22E-diène (N13).



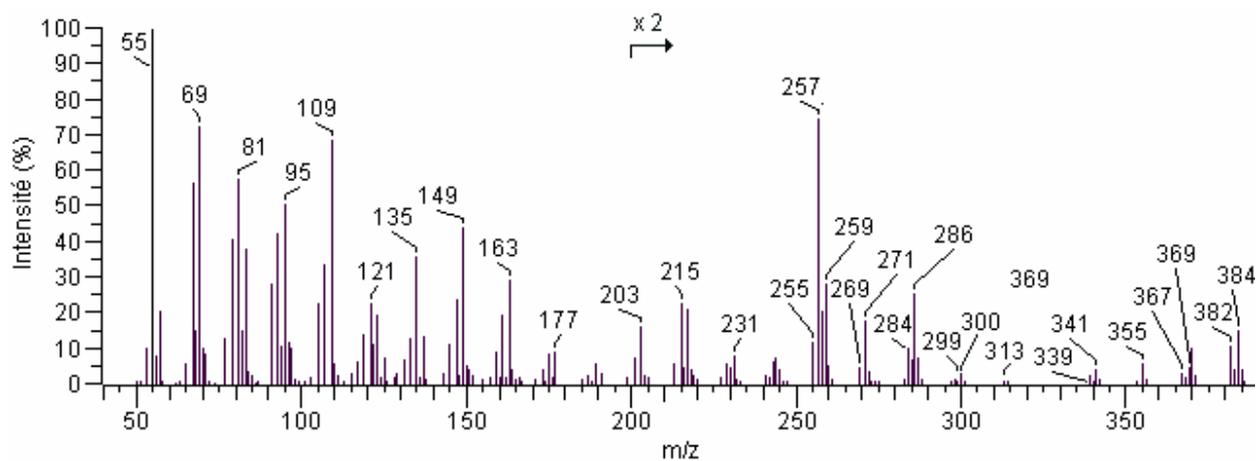
Spectre A.18: C₂₈-Stériadiène (RI=1062) (N14).



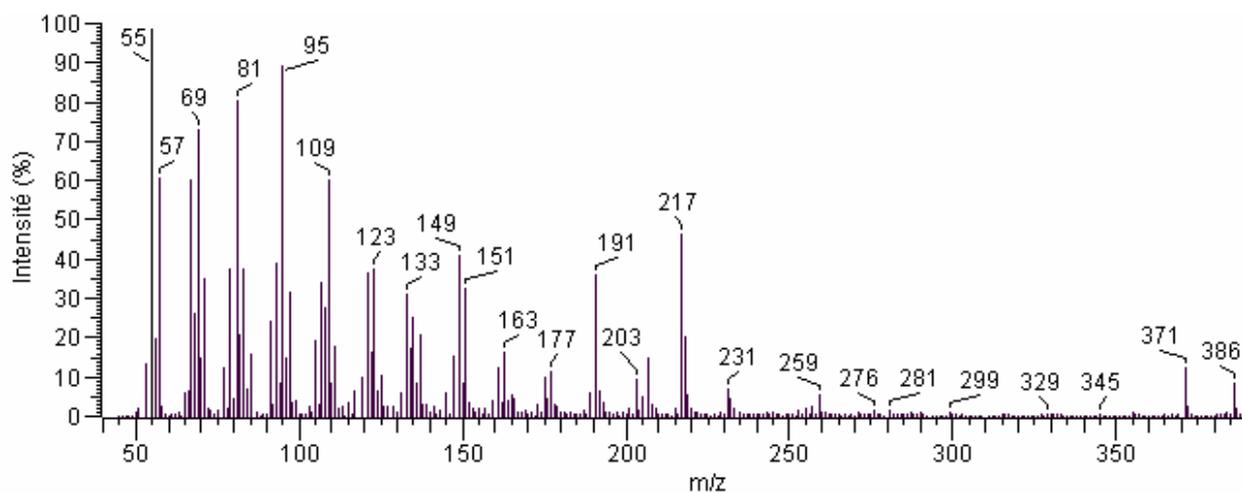
Spectre A.19: 24-Méthylcholesta-2,22E-diène? (N15).



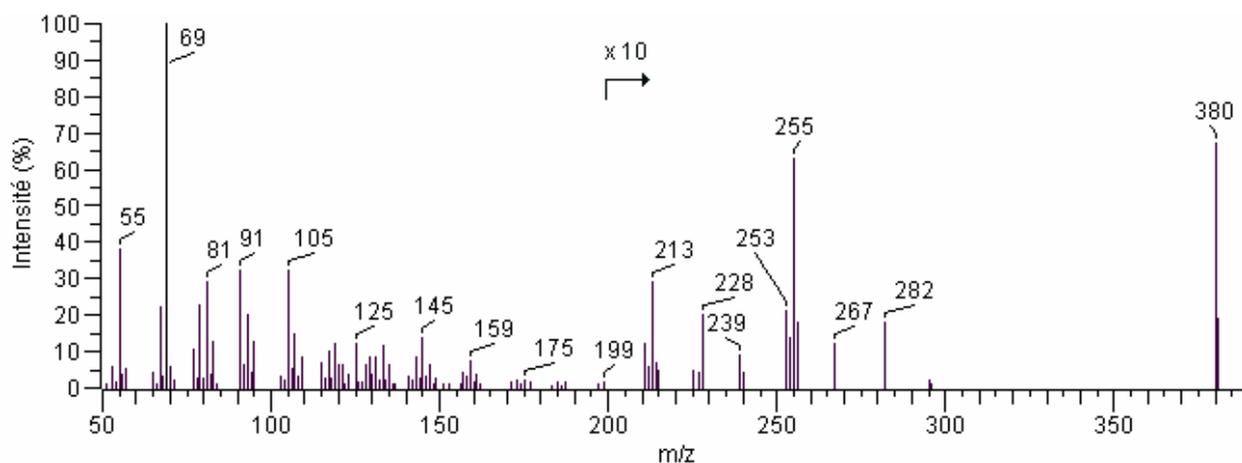
Spectre A.20: Cholesta-3,5-diène (N16).



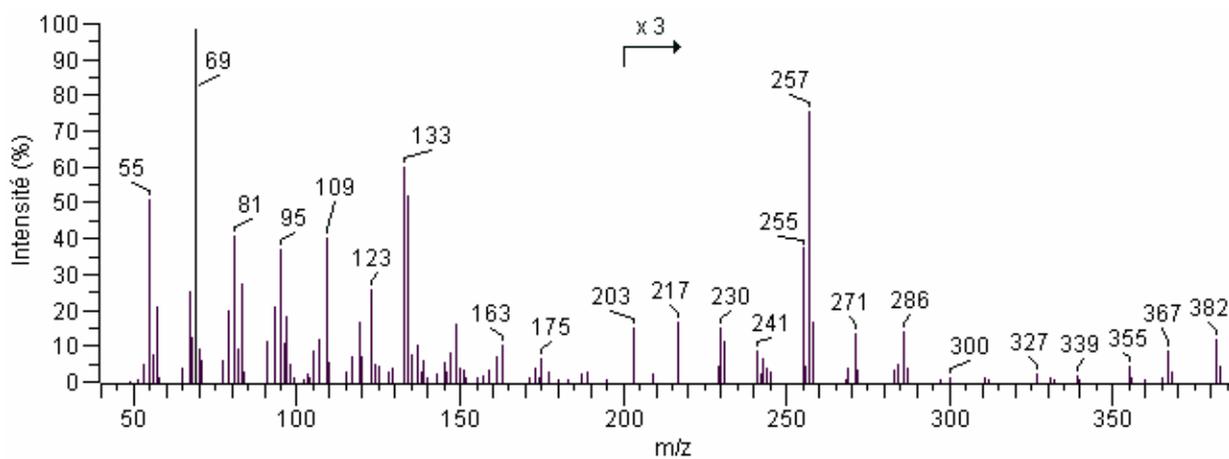
Spectre A.21: 24-Méthylcholesta-5,22E-diène? (N17) coéluant avec le 24-méthyl-5 α -cholest-22E-ène? (N18).



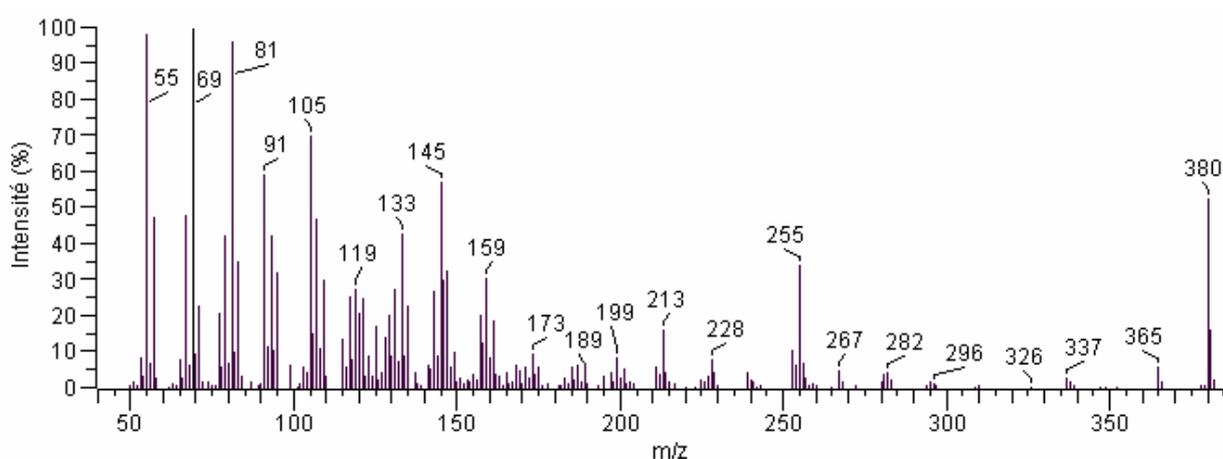
Spectre A.22: 24-Méthyl-5 β -cholestane? (N19) coéluant avec un hopane (m/z 191) (spectre brut).



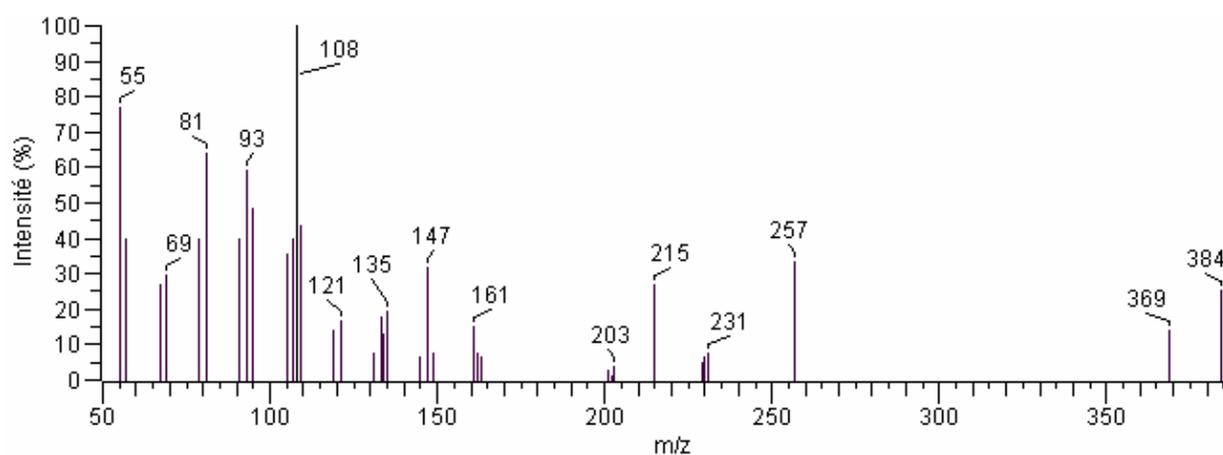
Spectre A.23: 24-Méthylcholesta-3,5,22Z-triène? (N20).



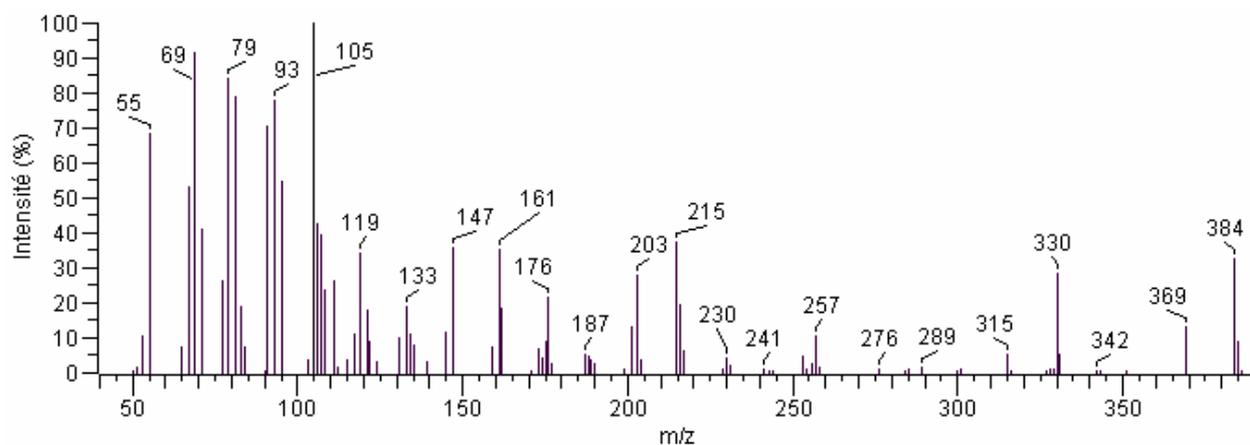
Spectre A.24: C₂₈-Stéradiène (RI=1135) (N21).



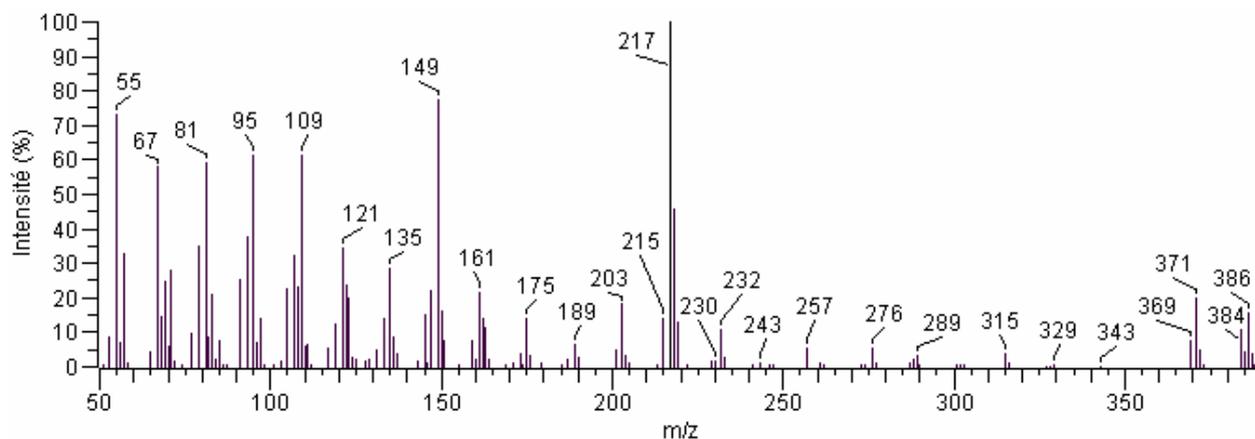
Spectre A.25: 24-Méthylcholesta-3,5,22E-triène (N22).



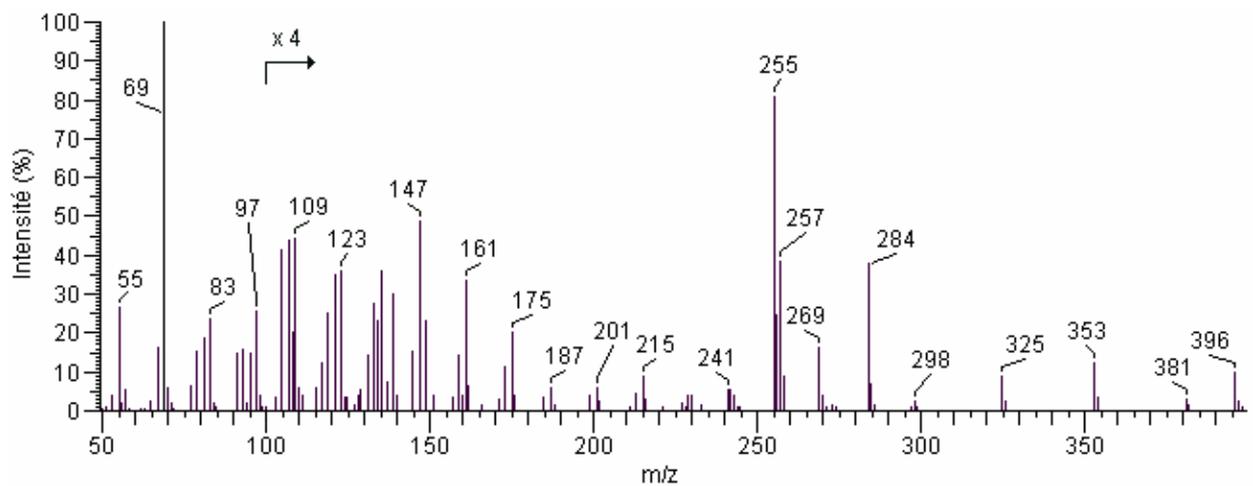
Spectre A.26: 24-Méthylcholest-4-ène? (N23).



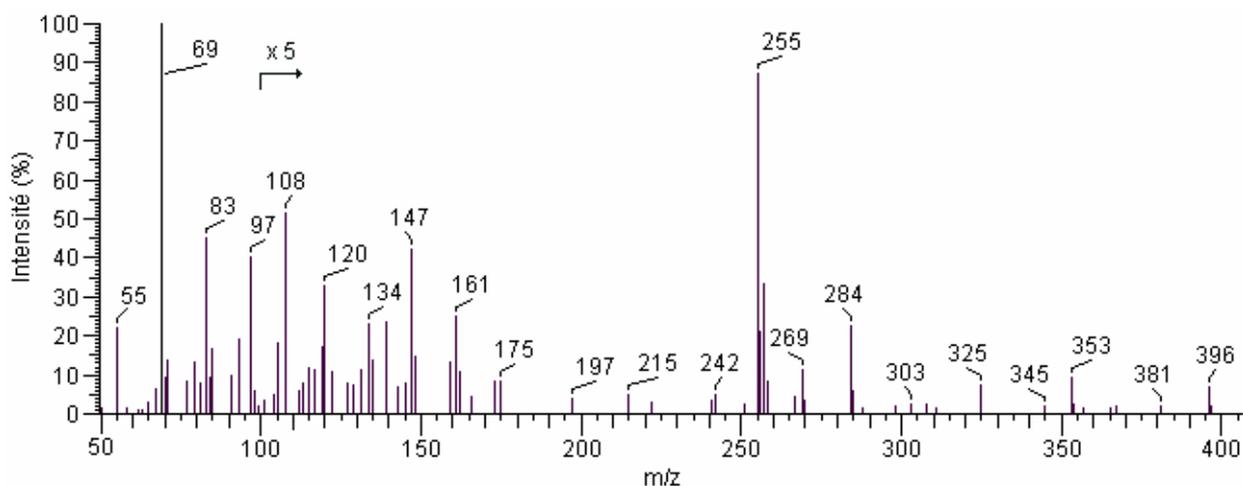
Spectre A.27: 24-Méthyl-5 α -cholest-2-ène (N24).



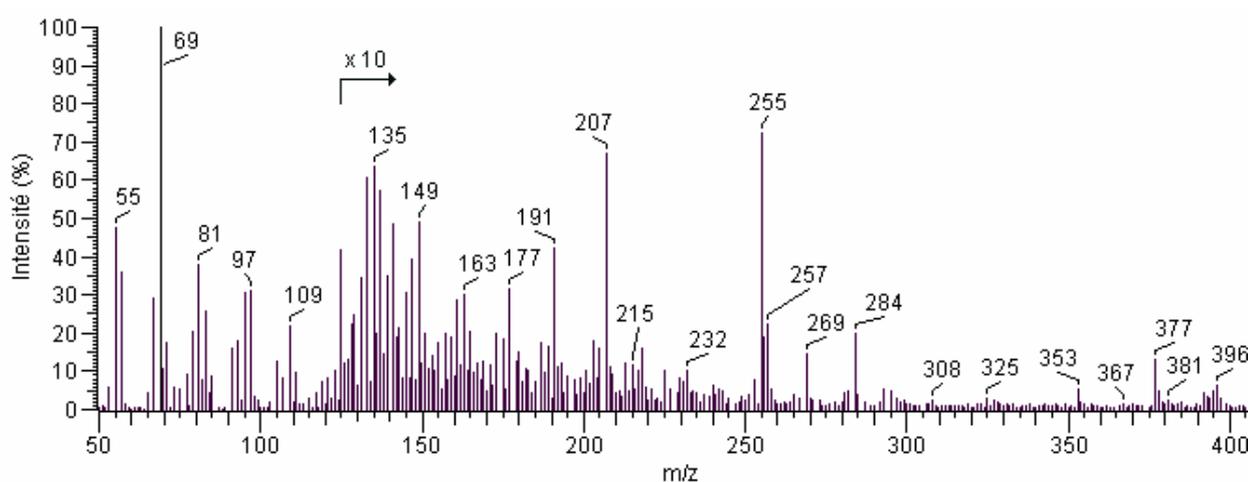
Spectre A.28: 24-Méthyl-5 α -cholestane (N25) coéluant avec le 24-méthylcholest-5-ène (N26).



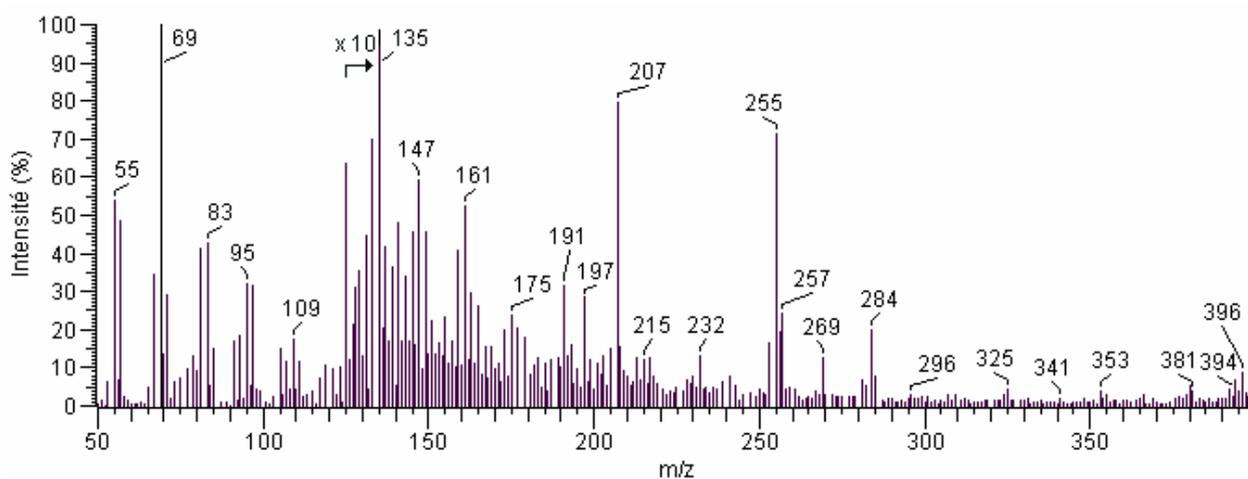
Spectre A.29: 23,24-Diméthylcholesta-4,22E-diène? (N27).



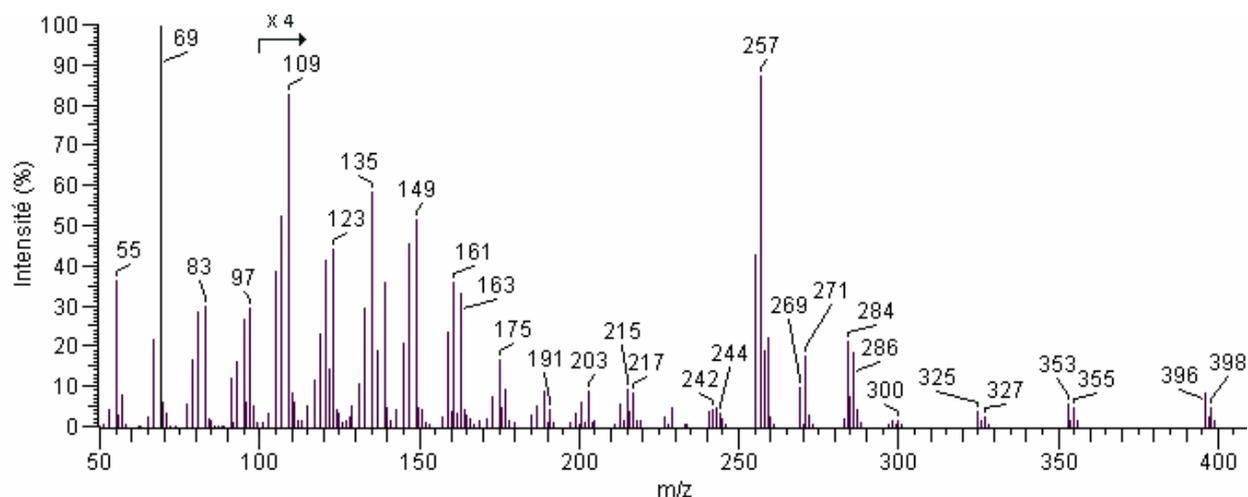
Spectre A.30: 23,24-Diméthyl-5 α -cholesta-2,22E-diène? (N28).



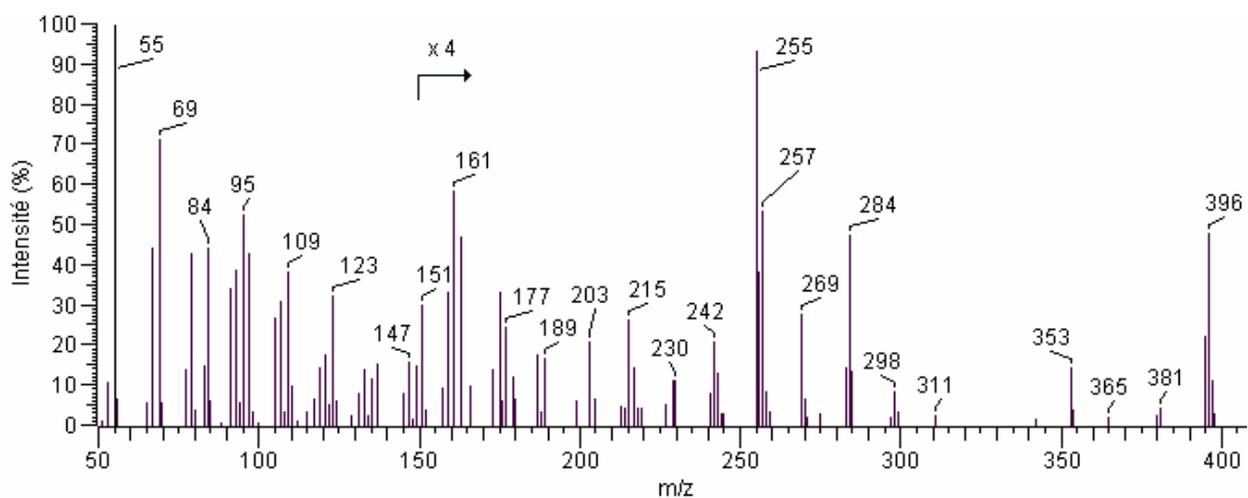
Spectre A.31: 23,24-Diméthyl-5 α -cholesta-3,22E-diène? (N29) (spectre brut) coéluant avec des impuretés en présence de bruit de fond important (m/z 207).



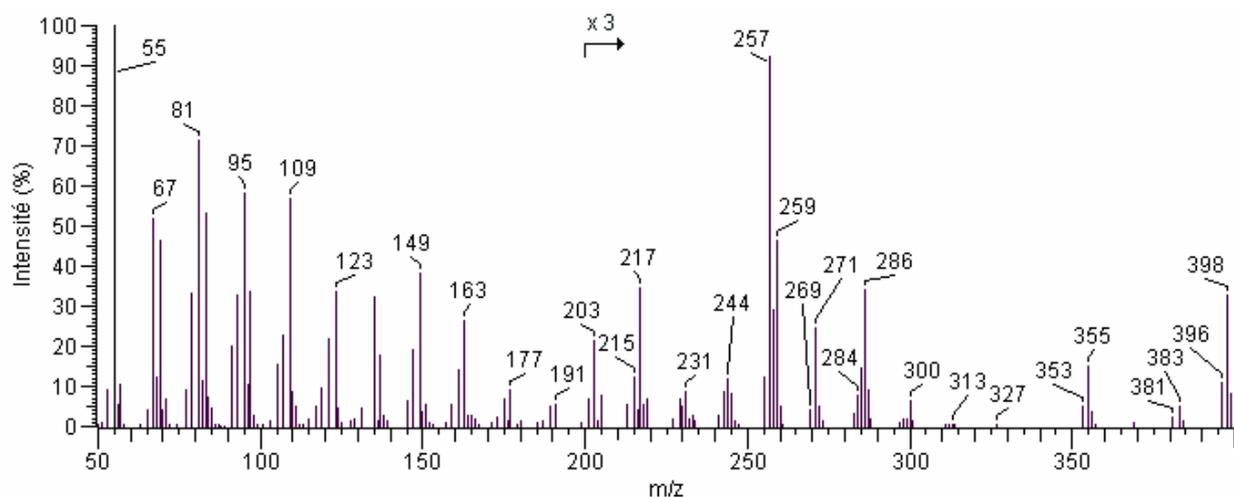
Spectre A.32: 24-Ethyl-5 α -cholesta-2,22E-diène? (N30) (spectre brut) coéluant avec des impuretés en présence de bruit de fond important (m/z 207).



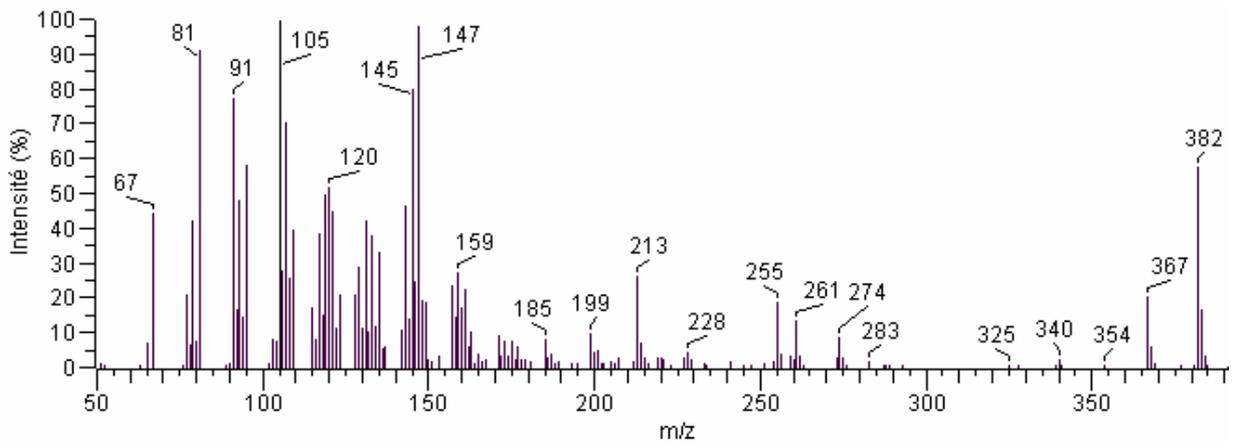
Spectre A.33: 24-Ethylcholesta-4,22E-diène? (N31) coéluant avec le 23,24-diméthylcholesta-5,22E-diène? (N32) et le 23,24-diméthyl-5 α -cholest-22E-ène? (N33).



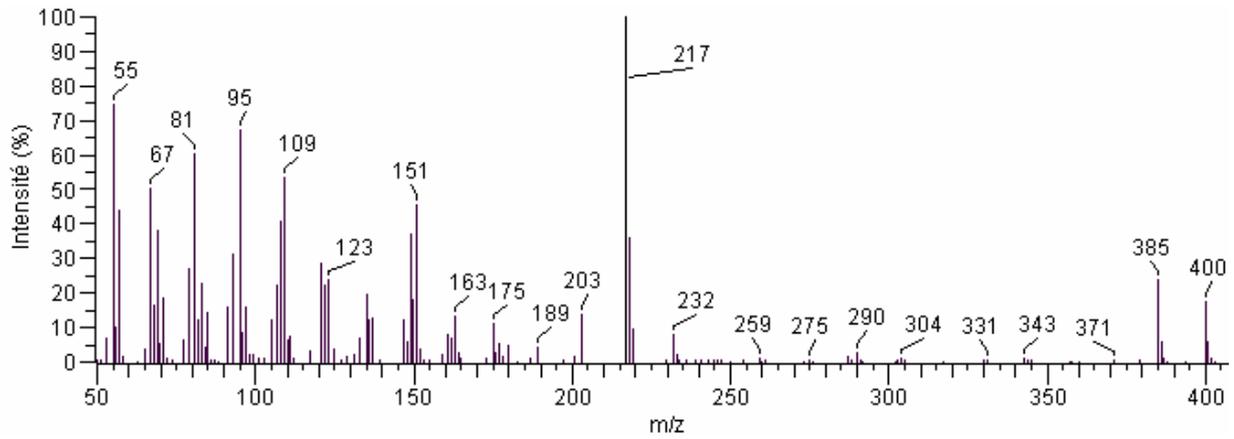
Spectre A.34: 24-Ethyl-5 α -cholesta-3,22E-diène? (N34).



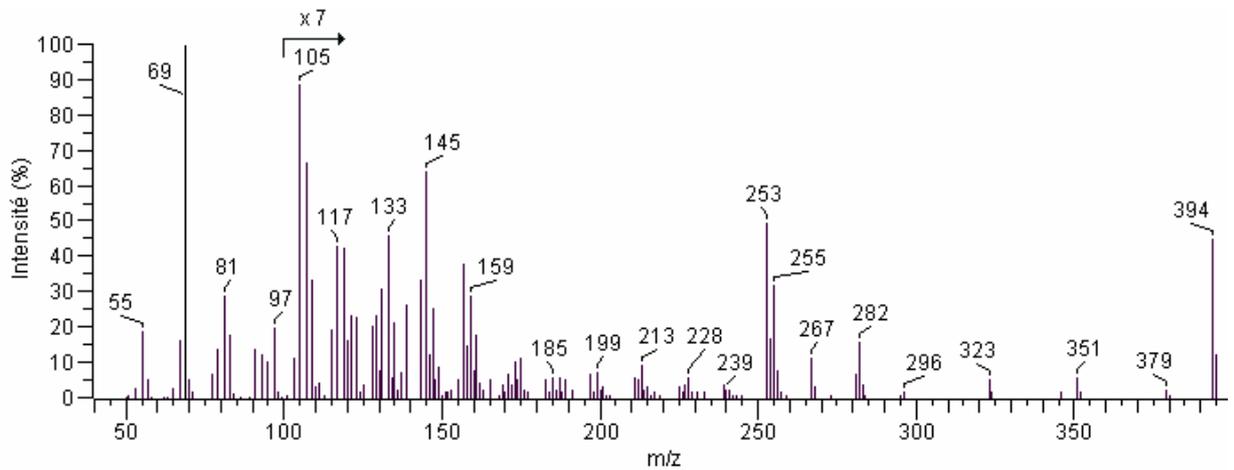
Spectre A.35: 24-Ethylcholesta-5,22E-diène (N35) coéluant avec le 24-éthyl-5 α -cholest-22E-ène (N36).



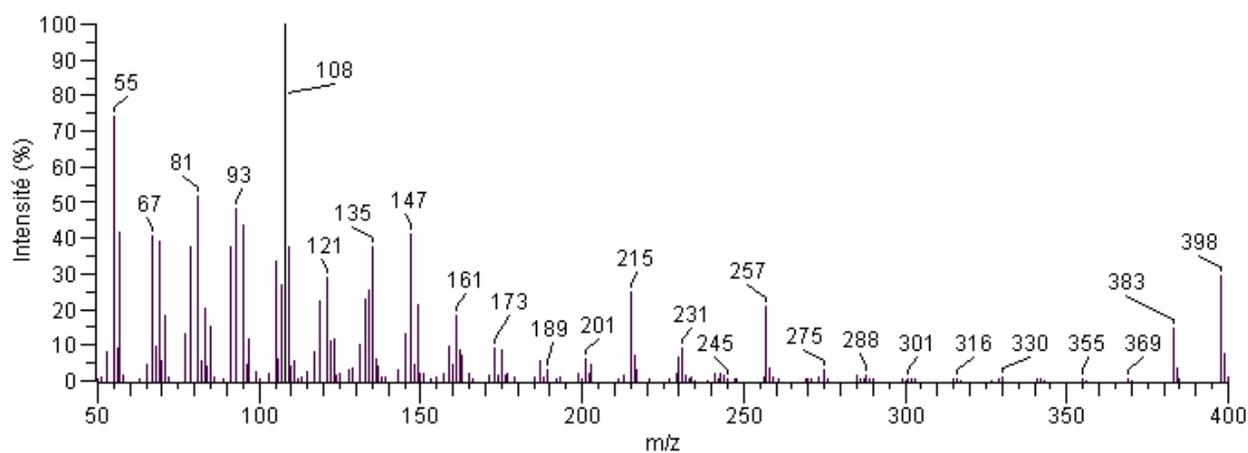
Spectre A.36: 24-Méthylcholesta-3,5-diène (N37).



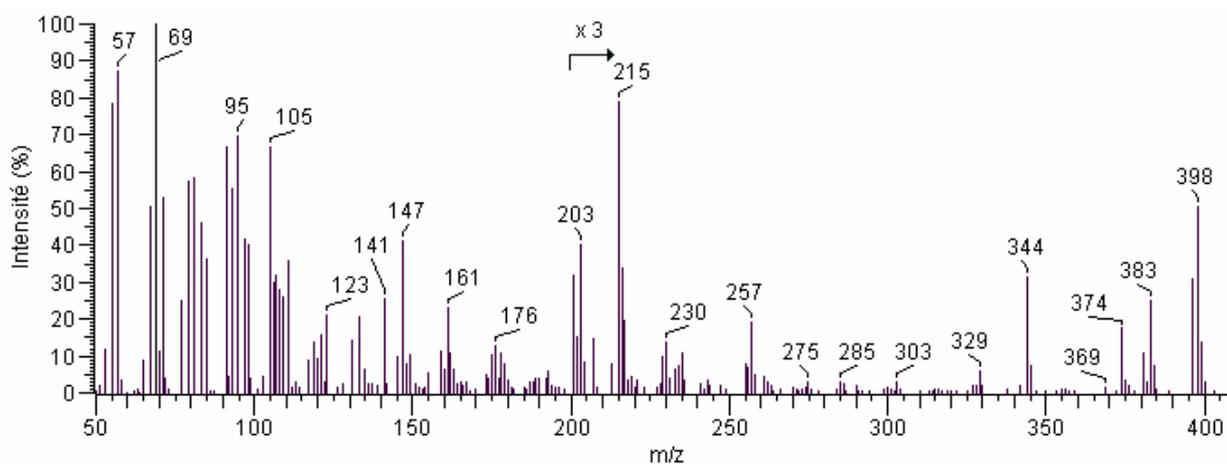
Spectre A.37: 24-Ethyl-5β-cholestane (N38).



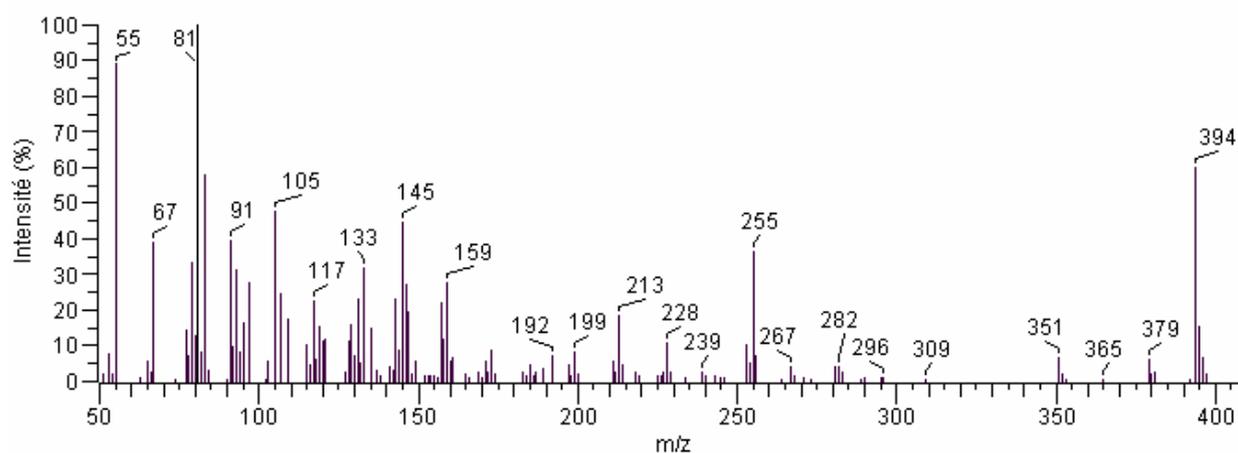
Spectre A.38: 23,24-Diméthylcholesta-3,5,22E-triène? (N39).



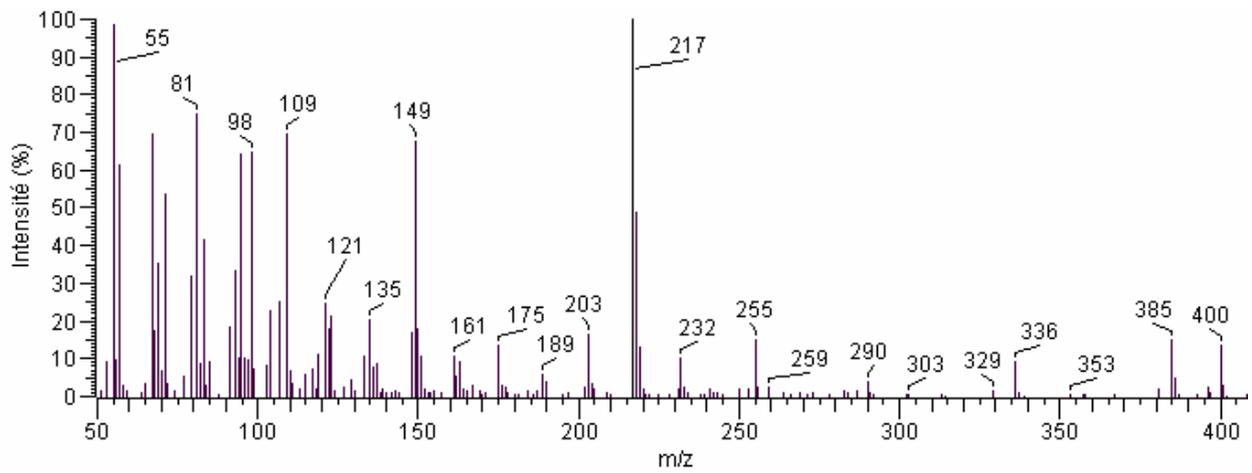
Spectre A.39: 24-Ethylcholest-4-ène (N40).



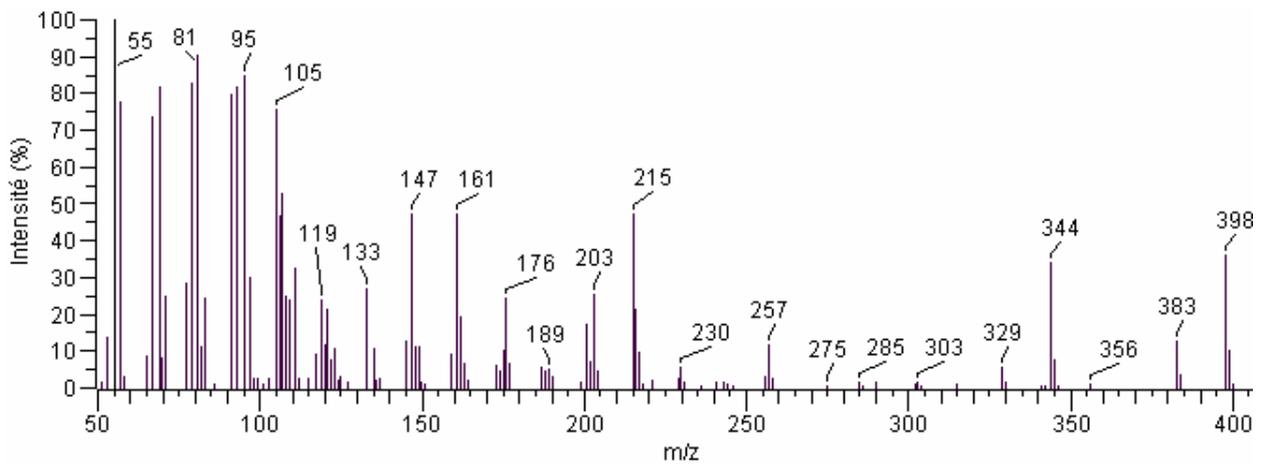
Spectre A.40: 23,24-Diméthyl-5 α -cholest-2-ène? (N41) coéluant avec une impureté.



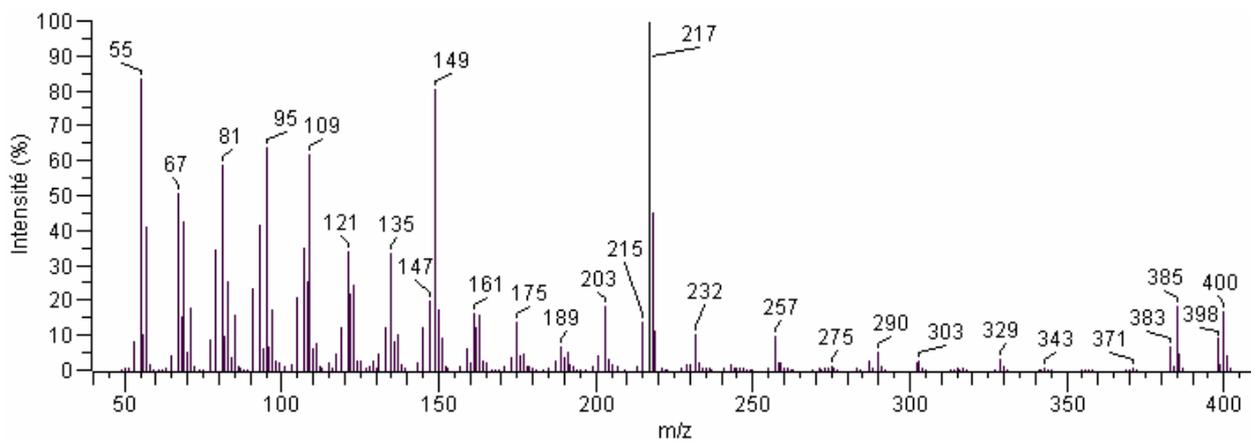
Spectre A.41: 24-Ethylcholesta-3,5,22E-triène (N42).



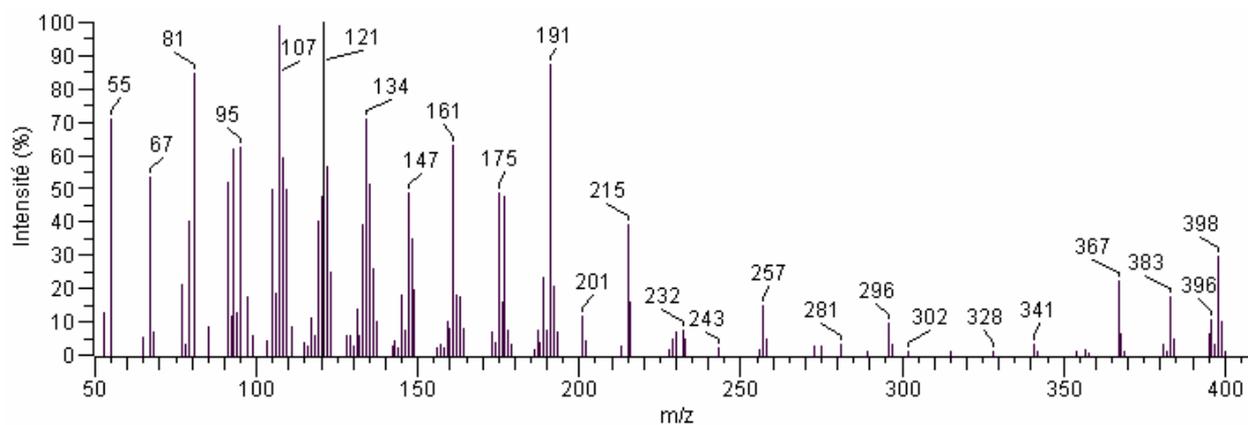
Spectre A.42: 23,24-Diméthyl-5 α -cholestane? (N43) coéluant avec une impurété.



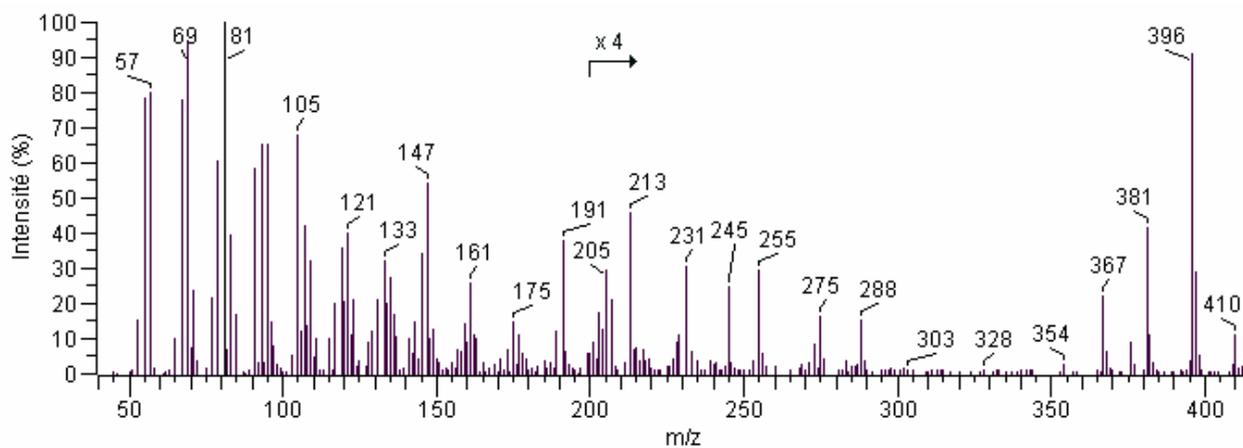
Spectre A.43: 24-Ethylcholest-2-ène (N44).



Spectre A.44: 24-Ethyl-5 α -cholestane (N45) coéluant avec le 24-éthylcholest-5-ène? (N46).



Spectre A.45: 24-Ethylcholest-3-ène? (N47) coéluant avec hopène (m/z 191) de masse moléculaire m/z 396.



Spectre A.46: 24-Ethylcholesta-3,5-diène (N48) coéluant avec l'hop-17(21)-ène (T5).

