



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Intérêt des pigments phytoplanctoniques dans l'étude des communautés algales et dans la compréhension de leurs relations trophiques avec le zooplancton

Métens, Arnaud

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX

NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Intérêt des pigments phytoplanctoniques dans
l'étude des communautés algales et dans la
compréhension de leurs relations trophiques
avec le zooplancton.**

Mémoire présenté pour l'obtention du
grade de licencié en Sciences
Biologiques

Arnaud METENS

1994

Remerciements

Au moment de concrétiser ce passionnant travail qui m'a été confié, je tiens à exprimer ma gratitude à l'ensemble des personnes qui ont fait mon quotidien.

Parmi celles-ci, je remercie tout particulièrement le Professeur Micha pour m'avoir ouvert les portes de son Unité et avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de mon mémoire.

Je voudrais remercier également le Professeur Remacle et Marc Dieu pour m'avoir permis d'expérimenter dans l'Unité de Biochimie.

C'est à Mr. Siebrand de la société Waters Millipore que j'exprime la plus profonde reconnaissance. Il m'a beaucoup appris.

J'aimerais que les membres, de ce que j'appellerai « l'équipe phyto. », soient conscients de la profonde reconnaissance que j'ai pour ce qu'ils ont fait pour moi tout au long de mon séjour dans le laboratoire et plus encore pour le vent porteur qu'ils ont fait souffler sur moi durant les moments difficiles de la rédaction. Je m'adresse ici en particulier à Véronique, Godelieve et Laurent.

J'adresse un immense merci au Docteur Descy pour ce qu'il a toujours été à mes yeux et pour ce qu'il est encore. Il fut un guide parfait. Qu'il accepte un jour mon irrévérencialité.

Je n'oublierai sûrement pas les étudiants embarqués dans le même bateau et le personnel du laboratoire pour tous les moments forts qui ont été partagés.

C'est envers mes parents, toute ma famille et mes amis que je suis le plus reconnaissant. Que mes parents soient remerciés de leur encouragement continu et pour m'avoir fait confiance toutes ces années. Je ne regrette pas l'aventure. Que Yves et Mathilde ne se sentent pas oubliés; on garde toujours le meilleur pour la fin.

A vous tous, MERCI !!

Sommaire

I. Synthèse Bibliographique	2
1. Le plancton fluviatile	2
1.2. Dynamique du plancton fluviatile	2
1.2. Le phytoplancton Mosan	4
1.3. Le zooplancton Mosan	5
2. Les pigments et leur intérêt en ecologie	7
2.1. Les biliprotéines	7
2.2. Les chlorophylles	8
2.2.1. Spectre d'absorption des chlorophylles	10
2.3. Les caroténoïdes	11
2.4. Dégradation des pigments	12
2.4.1. Pendant la sénescence	13
2.4.2. Durant le transit intestinal du plancton	14
3. Perspectives analytiques des pigments en écologie	15
3.1. Utilisation des pigments dans l'étude des communautés algales, de leurs successions temporelles et spatiales, et de la contribution de chaque groupe à la biomasse totale	17
3.2. Mesures de « grazing » par les pigments	19
3.3. Application en paléolimnologie	23
3.4. Facteurs fragilisant l'utilisation des pigments comme biomarqueurs	23
4. La chromatographie liquide haute performance	25
4.1. La chromatographie analytique	25
4.1.1. La colonne	27
4.1.2. Les solvants	28

4.1.3. La détection et l'identification.....	28
4.1.4. La quantification	30
4.2. Intérêts de la C.L.H.P. en écologie.....	31
II. Matériels et Méthodes	33
1. Etude des communautés zooplanctoniques.....	33
1.1. Lugol acide	33
2. Etude du phytoplancton.....	34
2.1. Etude microscopique selon Utermöhl (1958) des communautés phytoplanctoniques.....	34
2.2. Estimation de la biomasse du phytoplancton par la chlorophylle <i>a</i> dite classique	34
2.3. Etude de la composition phytoplanctonique par les pigments.....	35
2.3.1. L'extraction des pigments	35
2.3.2. L'analyse en C.L.H.P.	36
2.3.3. Le gradient	36
2.3.4. L'identification des pigments	38
2.3.5 La quantification en absorbance.....	39
2.3.6. La quantification en fluorescence	40
2.3.7. Méthode de travail et analyse des chromatogrammes	41
3. Mesure du « grazing »	41
3.1. Méthode de Haney	42
3.2. La mesure de grazing par dilution	44
4. Mesures physico-chimique.....	46
III. Résultats et Discussion	47
1. Conditions physico-chimiques.....	47

2. Evolution de la composition et de la biomasse phytoplanktonique	48
2.1 Evolution de la composition	48
2.2 Evolution de la biomasse totale évaluée d'après la chlorophylle <i>a</i>	49
2.3. Relation C.O.P. : chlorophylle <i>a</i>	50
3. Evolution des pigments marqueurs et relation avec les biomasses des groupes algaux	51
2.1. Relation pigment - biomasse des différents groupes algaux	52
4. Evolution de la composition du zooplancton	56
4.1. Grazing par la méthode de Haney	58
4.2. Grazing global par la méthode de dilution	59
4.3. Approche de la sélectivité du broutage	62
4.4. Potentialité d'étude du broutage basée sur les processus de dégradation des pigments : cas de la phaeophytine <i>a</i>	65
IV. Résumé et Conclusions générales	67

Bibliographie

Annexe 1

Annexe 2

INTRODUCTION

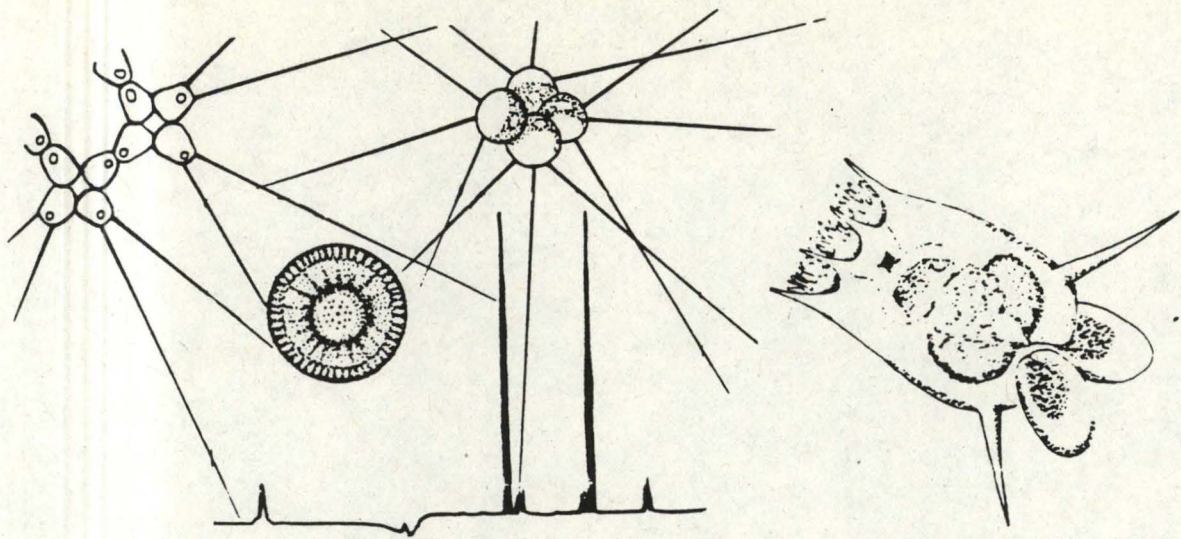
La transformation de nos grandes rivières en d'importants axes de transports fluviaux, la démographie galopante associée à l'urbanisation, la production industrielle et agricole, garantes de l'image glorieuse que nous nous faisons de notre civilisation, sont notamment à la source de modifications du mode de fonctionnement de l'ensemble des écosystèmes.

C'est ainsi que beaucoup de nos cours d'eau ont perdu leur aspect naturel originel. Une foule d'habitats et de zones frayères abrités par les macrophytes ont donc disparu, et ce sera ainsi tant que rien ne sera fait pour leur protection et leur restauration. Actuellement, la production primaire y est l'apanage quasi exclusif du phytoplancton dont le développement souvent excessif résulte de la levée des carences en nutriments par eutrophisation.

Dans ces rivières eutrophes où le phytoplancton est devenu l'élément majeur de la productivité du milieu, une partie seulement de cette production est transférée vers les niveaux trophiques supérieurs par l'intermédiaire du zooplancton et des bactéries. Cependant les mécanismes qui lient ces deux niveaux trophiques ont très rarement fait l'objet de recherches approfondies, faute de techniques rapides et appropriées.

L'utilisation des pigments algaux en tant que biomarqueurs en eau douce permettrait de combler cette lacune et d'accélérer la compréhension du fonctionnement de ces milieux, étape indispensable à leur protection.

Très technique à la base, notre travail s'inscrit dans ce cadre. Notre objectif sera de démontrer la valeur de l'information fournie par les dosages et l'identification des pigments algaux. En effet, la pigmentation, critère taxonomique chez les algues, pourrait s'avérer être très utile dans l'étude des communautés phytoplanctoniques, et ce de manière non seulement qualitative mais aussi quantitative. Ces mêmes molécules offrirait la possibilité d'étudier les relations trophiques existant entre le phytoplancton et le zooplancton.



Synthèse bibliographique

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.

Dans ce chapitre, nous aborderons les communautés planctoniques d'eau douce et leur dynamique, nous évoquerons leurs relations et le rôle que le plancton occupe en milieu fluviatil.

La seconde partie sera consacrée aux pigments. Nous y décrirons leur structure, leur fonction ainsi que leur comportement au sein des milieux naturels.

Nous nous pencherons alors sur les perspectives analytiques offertes par leur étude, notamment lors de la caractérisation des communautés algales et dans l'étude des relations trophiques avec le zooplancton. Nous évoquerons quelques facteurs susceptibles de fragiliser leur utilisation en tant que biomarqueurs en écologie.

Enfin, nous essayerons de synthétiser au mieux toute la théorie de la C.L.H.P. d'analyse et son intérêt dans la résolution des problèmes d'écologie scientifique.

1. Le potamoplancton.

L'ensemble de l'information reprise ci-dessous est extrait des mémoires de Polet (1992), de Sanderson (1992) et de Viroux (1993), des articles de Descy et Gosselain (1994) et de Gosselain *et al.* (1994) ainsi que de l'ouvrage de Kirk (1983).

L'ensemble des organismes soumis aux mouvements de l'eau, pour cause d'immobilité ou de petite taille, est appelé plancton. Les spécialistes y distinguent le phytoplancton du zooplancton et du bactérioplancton.

1.2. Dynamique du plancton fluviatil.

Depuis une dizaine d'années, l'unité d'Ecologie s'intéresse à la dynamique du phytoplancton dans des milieux tels que la Meuse. Il en ressort que le développement du phytoplancton (Phyto.) au cours du temps (t) est une fonction de plusieurs termes. Le premier exprime la production et est déterminé par la capacité photosynthétique (P) et la respiration (R). Le second, la disparition, fait appel à des phénomènes comme l'exportation et la dilution (E), la mortalité (M), la sédimentation (S) et le « grazing » (G).

$$\Delta \text{Phyto.} / \Delta t = [(P - R) - S - G - M - E] * \text{Phyto.}$$

En d'autres termes, le développement du phytoplancton est possible en tout point d'une rivière dès que la production phytoplanctonique nette est supérieure à l'ensemble des processus de disparition, y compris la dilution par les apports d'eaux latéraux (apports de la nappe phréatique et des affluents). De plus, le potamoplancton (plancton peuplant les grandes rivières), pour se développer de façon significative dans un secteur donné, doit avoir une croissance telle que son temps de génération soit inférieur au temps de transit de la masse d'eau dans ce

secteur. La lumière disponible dans un milieu aquatique turbulent est une fonction du rapport entre la zone photique (Z_e) et la zone de mélange (Z_m), cette dernière correspondant à la profondeur du cours d'eau. Dès lors, nous assistons à un développement phytoplanctonique tant que les conditions optimales d'irradiance sur toute la colonne d'eau sont favorables (Z_e/Z_m élevé), ce qui est le cas dans le secteur amont du fleuve. En aval, la production est freinée par l'augmentation de la profondeur de la colonne d'eau couplée à une turbidité croissante, qui, diminuant la pénétration de la lumière, réduisent la photosynthèse et accroissent la respiration des algues. L'augmentation de la taille du bassin versant a par ailleurs comme conséquence la dilution de plus en plus importante du phytoplancton par apport d'eau aux confluences. En période de faible débit, les contraintes du transport longitudinal et de dilution par les apports d'eau latéraux diminuent, ce qui a pour conséquence de modifier la nature des facteurs influençant la dynamique du phytoplancton. Dans ces conditions, les phénomènes tels que le « grazing », la mortalité par parasitisme, ainsi que la sédimentation peuvent prendre une importance croissante et déterminer le devenir du phytoplancton. Dans la mesure où les pertes par sédimentation peuvent être approchées par des modèles basés sur les lois physiques qui conditionnent ce processus, c'est surtout le « grazing », activité de prédation du zooplancton sur le phytoplancton qui fait l'objet des recherches actuelles sur le potamoplancton développées au sein de l'Unité d'Ecologie.

Dans la plupart des grandes rivières européennes, nous assistons au cours d'une saison à une dominance des diatomées (« bloom » au printemps et en automne) et des algues vertes (en été). Comme déjà mentionné antérieurement, ce sont surtout les facteurs physiques (température, lumière, débit) qui contrôlent le développement des espèces et leur succession. Au printemps, le développement est parfois perturbé par de courtes périodes de débit élevé. En fin de printemps et début d'été, suite à une augmentation importante de l'irradiance et de la température, les algues vertes se développent et la proportion relative des diatomées diminue. Les autres groupes d'algues sont plus sporadiques: les Cryptophycées, unicellulaires flagellés, se développent de façon irrégulière tout au long de la période de croissance, tandis que les Cyanobactéries sont généralement peu développées et restreintes à la saison estivale. La biomasse phytoplanctonique est relativement basse durant tout l'été et ce phénomène pourrait s'expliquer par le « grazing » et la sédimentation. En effet, si les rotifères se développent abondamment après le début du « bloom » algal printanier, ils sont accompagnés en été par les crustacés, brouteurs beaucoup plus efficaces. En octobre, la baisse de température, la diminution de la lumière et l'augmentation du débit mettent définitivement fin au développement phytoplanctonique jusqu'au prochain printemps.

En ce qui concerne l'influence du broutage sur le potamoplancton, il est communément admis qu'il ne peut avoir un impact significatif sur le développement algal que quand les grands brouteurs (Crustacés, Copépodes et Cladocères) sont suffisamment abondants. Autrement dit, le broutage ne serait effectif que pendant la seconde partie de l'été et négligeable au cours du reste de la saison de croissance, dominée par les Rotifères, dont le taux de broutage individuel est considérablement plus faible, étant environ 50 fois inférieur à celui des grandes Daphnies communes en milieu lacustre mais plus rares en rivière. Cependant, ainsi que l'ont montré des travaux antérieurs (en particulier Viroux 1993), les populations de rotifères peuvent atteindre des densités telles que le broutage du

microzooplancton peut s'avérer tout à fait significatif. C'est dans l'optique de la validation de cette hypothèse que se situe le présent travail.

1.2. Le phytoplancton Mosan

Les principaux éléments du phytoplancton des eaux douces se retrouvent en Meuse. Voici une rapide description de ces groupes:

Les Cyanophycées, algues bleues ou Cyanobactéries, sont des organismes à caractère procaryotique, tout en possédant des caractéristiques communes avec les algues eucaryotes. Comme ces dernières, elles contiennent de la chlorophylle *a* mais c'est leurs pigments accessoires, les phycobilines, qui leur confèrent leur couleur particulière, typiquement bleu - vert. Elles abondent sous forme de colonies ou de filaments dans les eaux eutrophes et particulièrement en fin de stratification estivale dans les lacs.

• **Les Chromophytes** ou algues jaunes - brunes, abondent en eau douce. Elles sont caractérisées par la présence d'un "C.E.R." (reticulum endoplasmique granuleux) entourant les chloroplastes. Ces algues possèdent la chlorophylle *a* et *c* et de nombreux caroténoïdes. Cinq classes se rencontrent en eau douce:

• Les ***Dinophycées*** sont des algues unicellulaires biflagellées entourées de plaques celluloseuses, à noyau mésocaryotique et présentant parfois un caractère hétérotrophe.

• Les ***Chrysophycées*** sont des algues unicellulaires à kystes siliceux et généralement peu abondantes en milieu eutrophe.

• Les ***Cryptophycées*** sont des Chromophytes unicellulaires biflagellés possédant entre autres des phycobilines.

• Les ***Euglenophycées*** sont des algues unicellulaires biflagellées à caractère hétérotrophe facultatif, et possédant la chlorophylle *b* à la place de la *c*

• Les ***Bacillariophycées*** ou diatomées sont des Chromophytes, unicellulaires ou sous forme de colonies, à paroi siliceuse. Elles sont abondantes en eau courante.

Les Chlorophytes sont aussi très abondantes en eau douce. Elles contiennent de la chlorophylle *a* et *b* ainsi que des caroténoïdes. Elles se présentent sous forme unicellulaire, de colonies ou de filaments. Dans le plancton il faut distinguer les Volvocales flagellées, les Chlorococcales et les Desmidiées toutes deux non flagellées. Le graphique de la (fig.1) montre la répartition temporelle des différents groupes en Meuse durant l'année 1992.

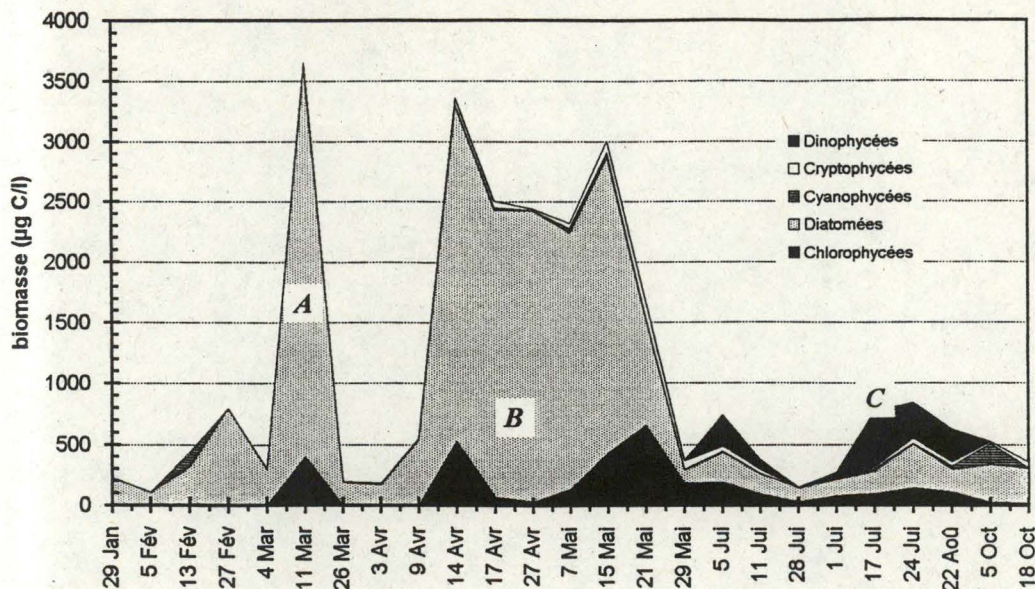


Fig.1: Evolution des communautés phytoplanctoniques durant l'année 1992 (Gosselain *et al.* 1994). Au cours d'une année, on constate que le phytoplancton est dominé principalement par les diatomées et les algues vertes. Le développement algal s'explique par des conditions favorables de température, de débit et de lumière (A, B & C)

1.3. Le zooplancton Mosan.

Le zooplancton d'eau douce se compose essentiellement de protozoaires (10 à 100 µm), de rotifères (100 à 600 µm), de crustacés copépodes et cladocères (200 à 3000 µm), et d'autres petits organismes tel que des larves de mollusques et des coelentérés.

- Le rôle des Protozoaires, essentiellement tenu par des amibes, des microflagellés et des ciliés, serait important dans le « turn over » des nutriments par leur activité de prédation sur les bactéries, le picoplancton et les matières en suspension. Leur implication dans le broyage du phytoplancton ne semble pas faire l'unanimité. Ils font partie de ce que l'on appelle le microzooplancton et peuvent être la fraction dominante du zooplancton durant les mois d'hiver.

- Les larves véligères de Dreissena, mollusque bivalve à stade larvaire planctonique, sont également picoplanctivores, bactériophages et détritivores. Le stade planctonique relativement court de ces larves peut néanmoins être contrebalancé par l'étalement de la période de reproduction chez les adultes. Avec les rotifères, autres membres du mésozooplancton, elles peuvent dominer le zooplancton durant certaines périodes de l'année. D'après la littérature, ces larves nageuses sont essentiellement microphages. Pourtant il n'est pas rare de remarquer la présence de nanoplancton de taille inférieure à 10 µm dans leur système digestif (Descy, communication personnelle).

Deux milles espèces de Rotatoria (rotifères) ont été répertoriées en eaux douces. Ces animaux acoelomates de petite taille (100 à 600 µm), de par leur morphologie, se rapprochent des Némertiens, des Nématodes et des

Gastérotiches. Une structure buccale ciliée affectée de mouvements dirige les particules en suspension vers la cavité buccale. Dans le fond de cette dernière se trouve un organe broyeur, le mastax, formé par l'association de pièces masticatoires dures. Le pied fait office de gouvernail chez les formes planctoniques. La reproduction se faisant essentiellement de façon parthénogénétique, les rotifères présentent la dynamique d'accroissement de population la plus rapide de tout le plancton animal de taille supérieure à 100 μm , avec un temps de génération de deux jours en conditions favorables.

- Parmi les Crustacés Entomostracés, les *Cladocères*, rarement pigmentés, ne montrent pas de segmentation apparente. Zooplancton de grande taille (0,2 à 3 mm), ces animaux sont recouverts d'une carapace bivalve s'ouvrant sur un sillon ventral où, à l'aide de leurs appendices, ils attirent et capturent leurs proies. Les deux appendices céphaliques, antennes et antennules, servent respectivement à la perception sensorielle et à la locomotion. Filtreurs, herbivores, détritivores et bactériophages, ils présentent, eux aussi, un mode de reproduction à prédominance parthénogénétique. Cependant, leur dynamique d'accroissement de population est nettement plus lente que celle des rotifères.

Un autre sous-ordre des Crustacés Entomostracés, les *Copépodes*, animaux à segmentation apparente, fusiformes, se reproduisant uniquement par la voie sexuée. Leur régime alimentaire est très varié et la durée de leur développement s'étale sur plus ou moins trois mois et passe par de nombreux stades larvaires (nauplies et copépodites) avant le stade adulte.

Dans la majorité des milieux aquatiques, la présence de rotifères et de crustacés ne permet aucun doute sur le fait qu'ils constituent le lien vital entre la production primaire et les niveaux trophiques supérieurs.

En 1993, en haute Meuse, le plancton animal a surtout été dominé par des rotifères des genres *Keratella* et *Brachionus*, accompagnés dès la fin juillet et jusqu'en septembre d'une quantité parfois notable de crustacés (Fig.2).

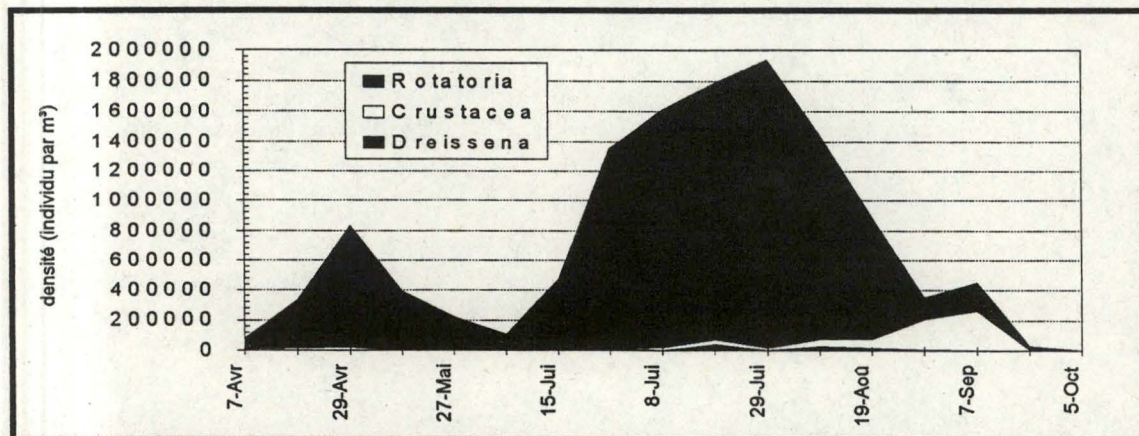


Fig. 2: Evolution du zooplancton (densités cumulées) en Meuse au cours de l'année 1993 (d'après Viroux, 1993) : si les rotifères sont abondants toute la saison, les crustacés ne se développent qu'en fin d'été.

2. Les pigments et leur intérêt en écologie:

Les pigments sont généralement considérés comme étant les molécules assurant l'absorption d'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse. Il ne faut cependant pas oublier leur rôle en tant que molécules photoprotectrices. Ils sont présents dans tout le règne végétal.

Les pigments photosynthétiques absorbent, en raison de leur structure moléculaire, l'énergie lumineuse de la P.A.R. (gamme de radiations photosynthétiquement actives, c'est à dire celles comprises entre 400 et 700 nm) et transfèrent cette énergie à un système d'oxydoréduction. Trois types chimiquement distincts sont responsables de ce phénomène : les chlorophylles, les caroténoïdes et les biliprotéines. Les caroténoïdes constituent l'essentiel des pigments photoprotecteurs (Anderson *et al.*, 1986; Hari *et al.*, 1994; Kirk, 1983; Latassa, 1992; Sheer, 1991).

2.1. Les biliprotéines

Essentiellement présentes chez les Rhodophytes, Cryptophytes et Cyanophytes (ou Cyanobactéries), les biliprotéines sont des protéines porteuses de chromophores appelées phycobilines parmi lesquelles il faut distinguer les phycocyanines de couleur bleue et phycoérythrines rouges. Ce sont des chaînes tétrapyrroliques ouvertes (*Fig.3*) qui, liées de façon covalente aux protéines chez les « algues bleues » et rouges, sont assemblées en phycobilisomes, particules visibles au microscope électronique à la surface des thylacoïdes (Kirk, 1983).

Ces molécules peuvent être des marqueurs intéressants mais leurs propriétés physico-chimiques impliquent des méthodes d'investigation quelque peu différentes des autres pigments. En effet, les phycobiliprotéines sont hydrophiles, ce qui n'est pas le cas des autres pigments, tous hydrophobes, et liés à des protéines (Kirk, 1983).

C'est non extraites qu'elles sont les plus utiles. Grâce à leur fluorescence particulière (exemple la fluorescence orange des phycocyanines), elles trouvent leur application en microscopie à fluorescence et en cytométrie de flux. En écologie, elles servent à différencier les petites Cyanobactéries coccoïdes des petites algues eucaryotes et des Prochlorophytes, procaryotes abondants dans le picoplancton marin et dans certains milieux d'eau douce et ne présentant que la fluorescence rouge des chlorophylles *a* et *b* (Chisholm *et al.*, 1988 a et b; Frankel *et al.*, 1989).

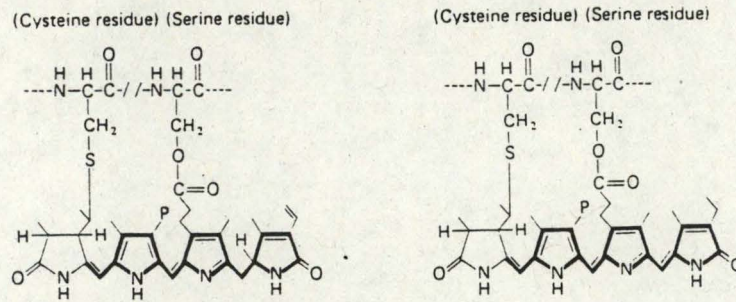


Fig.3: Structure des phycobilines : à gauche la phycoerythrobiline, à droite la phycocyanine.

2.2. Les chlorophylles

Les chlorophylles sont des tétraproles cycliques à noyau magnésien. Elles se classent parmi les porphyrines, les chlorines, et les bactériochlorines. La définition chimique, plus large, n'exclut pas les précurseurs et les produits de dégradation, contrairement à la conception biologique de ces molécules (Sheer, 1991).

La chlorophylle *a* est présente chez tous les organismes à photosynthèse oxygénique et apparaît comme un dérivé de la dihydroxyprophyrine. Elle comprend une chlorine et un phytol (C_{20} terpenoïde alcool) lié par estérification sur le « ring I » en représentation IUPAC (Fig.4) (Sheer, 1991).

La chlorophylle *a* se rencontre, chez tous les végétaux, au niveau des thylacoïdes et plus précisément dans les L.H.C. (complexe de capture de la lumière) de chaque photo-système (P.S.). Elle est le donneur primaire et secondaire d'électrons des P.S._I et P.S._{II} (Sheer, 1991). Sa concentration cellulaire peut varier fortement d'un environnement à l'autre (Kirk, 1983). Malgré les variations de teneur cellulaire en chlorophylle *a* liées à la photoadaptation, la concentration en chlorophylle *a* est classiquement utilisée comme estimateur de la biomasse algale. En milieu eutrophe, le rapport C : Chl *a* est typiquement proche de 40 (Descy et Gosselain, 1994)

• **La chlorophylle *b*** se distingue de la précédente par un 7-formyl à la place du 7-méthyl sur le « ring III » (Fig.4). Les deux molécules, mise à part cette différence, sont stéréochimiquement et chimiquement identiques. Le 7-formyl confère cependant à la chlorophylle *b* un caractère un peu moins basique responsable d'un déplacement du spectre d'absorption par rapport à son homologue.

Chez les Prochlorophytes, les algues vertes et les plantes supérieures, la chlorophylle *b* est présente dans les L.H.C._{II} en tant que pigment accessoire de la chlorophylle *a* dans un rapport un/trois par rapport à cette dernière. On la rencontre également chez les Euglénophycées (Sheer, 1991).

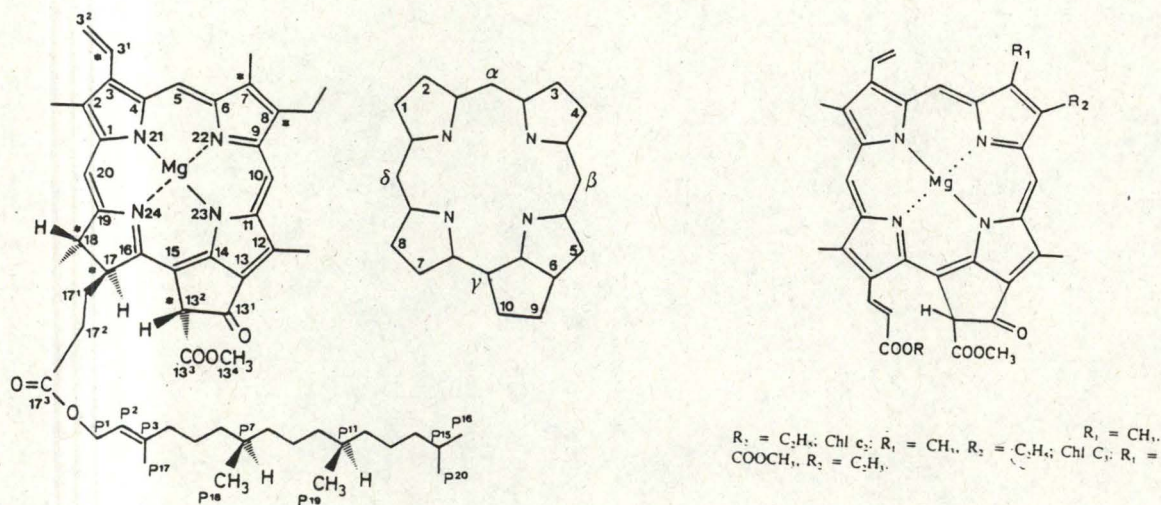


Fig.4: Structure des chlorophylles :de gauche à droite, la chlorophylle *a* selon le système IUPAC et celui de Fischer, la chlorophylle *c*.

•La chlorophylle *a'*, épimère réversible de la chlorophylle *a* est moins stable et est souvent considérée comme un artefact d'extraction, elle se distingue de la chlorophylle *a* par sa polarité et correspond en fait au changement de configuration *cis/trans* du carbone 13² du cycle porphyrinique (Fig.4). Il n'est pas exclu que cette molécule intervienne lors de la séparation de charge dans le P.S._I (Sheer, 1991).

•La chlorophylle *a* allomère est un produit très courant apparaissant suite à l'extraction. C'est en réalité le résultat de l'oxydation du carbone 13² du cycle porphyrinique (Hynninen, 1991).

•La chlorophylle *d* diffère de la chlorophylle *a* par un groupe formyl greffé sur le carbone 3 (Fig.4). Elle se rencontre chez les Rhodophycées (Sheer, 1991).

•Les chlorophylles *c*, souvent appelées chlorophyllides ne possèdent pas de phytol. Trois structures ont été mises en évidence : la *c*₁, *c*₂ et *c*₃.

Les chlorophylles *c* jouent le même rôle que la chlorophylle *b* chez les Chromophytes, soit chez les diatomées, les Dinophycées, les Cryptophycées, les Chrysophycées et les Xanthophycées. La *c*₃ ne se rencontre que chez les

Chrysophycées ainsi que chez les Prasinophycées et les Prymnésiophycées, deux groupes exclusivement marins (Sheer, 1991).

• **Les phaeophytines** sont des chlorophylles sans magnésium. Elles ne sont pas considérées comme des chlorophylles par les biologistes. La démétalisation est le résultat du déplacement du magnésium central par des protons en milieu acide, ce qui est souvent le cas lors d'une mauvaise extraction. Certaines bactéries pourpres semblent pourtant fonctionner avec ce type de pigment comme accepteur d'électrons (Sheer, 1991).

• **Beaucoup d'autres pigments**, dérivés des formes précitées ont été isolés et définis. Ils sont souvent considérés comme des précurseurs de synthèse ou des produits de la dégradation car ils n'apparaissent que dans les matériaux trop jeunes ou trop vieux (Sheer, 1991).

Pour chaque structure, nous notons l'existence de formes allomère et épimère.

2.2.1. Spectre d'absorption des chlorophylles

Les spectres de ces molécules (*Fig.5*) peuvent se comprendre à l'aide du modèle des quatre orbitales de Gouterman (Hoff et Amesz, 1991). Celui-ci propose que le spectre des porphyrines résulte de la combinaison linéaire de l'énergie d'un électron qui serait partagé entre les deux plus hautes orbitales Π liantes et les deux plus basses anti-liantes.

La chlorophylle *a* montre deux bandes étroites: La **Q**, **Q_y** ou α proche de l'infrarouge et la bande **B** ou de Soret qui est plus étroite et proche de l'UV (Hoff et Amesz, 1991; Kirk, 1983).

Le caractère moins basique de l'azote du cycle III de la chlorophylle *b* déplace les bandes α et de Soret légèrement vers l'intérieur du spectre visible (Sheer, 1991; Hoff et Amesz, 1991).

Pour les chlorophylles *c*, l'absence du phytol perturbe quelque peu le profil d'absorption. Plus ou moins semblable chez les trois formes, nous remarquons la grande intensité de la bande de Soret et deux larges bandes dans la région jaune - verte (Hoff et Amesz, 1991; Porra, 1991).

La démétalisation et la déphytolation modifient également le spectre d'absorption des molécules originelles (Hoff et Amesz, 1991).

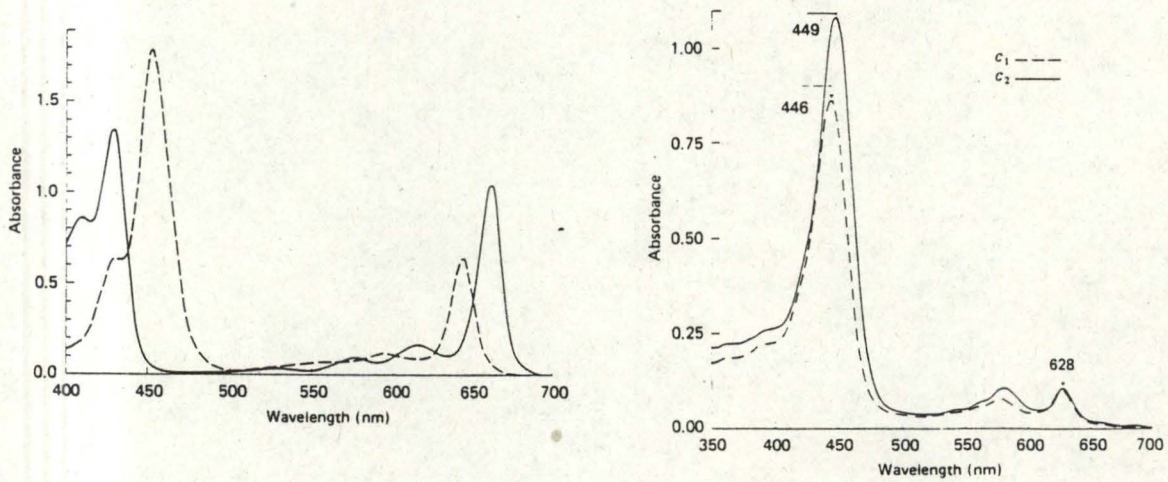


Fig. 5 : Spectre d'absorption des chlorophylles. A gauche en trait plein : la chlorophylle a; en discontinu : la chlorophylle b; à droite: les chlorophylles c.

2.3. Les caroténoïdes

Parmi les pigments naturels, les caroténoïdes sont les plus nombreux, les plus répandus et ceux qui remplissent les fonctions les plus variées. Il faut y distinguer les carotènes des xanthophylles. Ces molécules sont issues de l'agencement de huit unités d'isoprène en un composé en $C_{40}H_{58}$ acyclique. Elles présentent deux têtes et une longue chaîne centrale, des doubles liaisons conjuguées, montrant une nette symétrie centrale (Fig.6). Les xanthophylles sont les formes oxydées des carotènes. Dans la nature, plus de six cents espèces chimiques ont été isolées aussi bien chez les végétaux, les animaux que chez les champignons (Hari *et al.*, 1994; Pfander, 1992; Thurnam, 1994). Outre leur rôle dans la photosynthèse, les caroténoïdes sont responsables de la couleur des fleurs, des oiseaux, des insectes, etc. Cependant, seuls les végétaux sont capables de les synthétiser; les autres organismes ne savent que les transformer pour leurs besoins notamment en provitamine A (Hari *et al.*, 1994; Pfander, 1992; Thurnam, 1994). Récemment, Hari *et al.* (1994), Lachance (1994) et Thurnam (1994) ont cité ces molécules pour leur implication dans la protection contre les cancers, et notamment celui de la peau, mais aussi contre les maladies cardio-vasculaires.

Le peu d'études relatives aux caroténoïdes est dû aux problèmes liés à leur séparation, leur identification et leur quantification.

Comme les chlorophylles, ils ne sont pas liés de façon covalente aux protéines des L.H.C. où certains accompagnent ces chlorophylles dans leur fonction. D'autres, souvent les carotènes, jouent le rôle de

photoprotecteur dans les photo-systèmes. Un minimum de neuf doubles liaisons est indispensable à l'interaction du carotène avec le singulet de l'oxygène excité. Ce n'est pas un processus oxydatif mais le transfert de l'énergie d'excitation d'un oxygène pour donner un état triplet chez le carotène et un état stable chez l'oxygène. L'énergie acquise par le carotène est alors dissipée sous forme de chaleur (Thurnam, 1994).

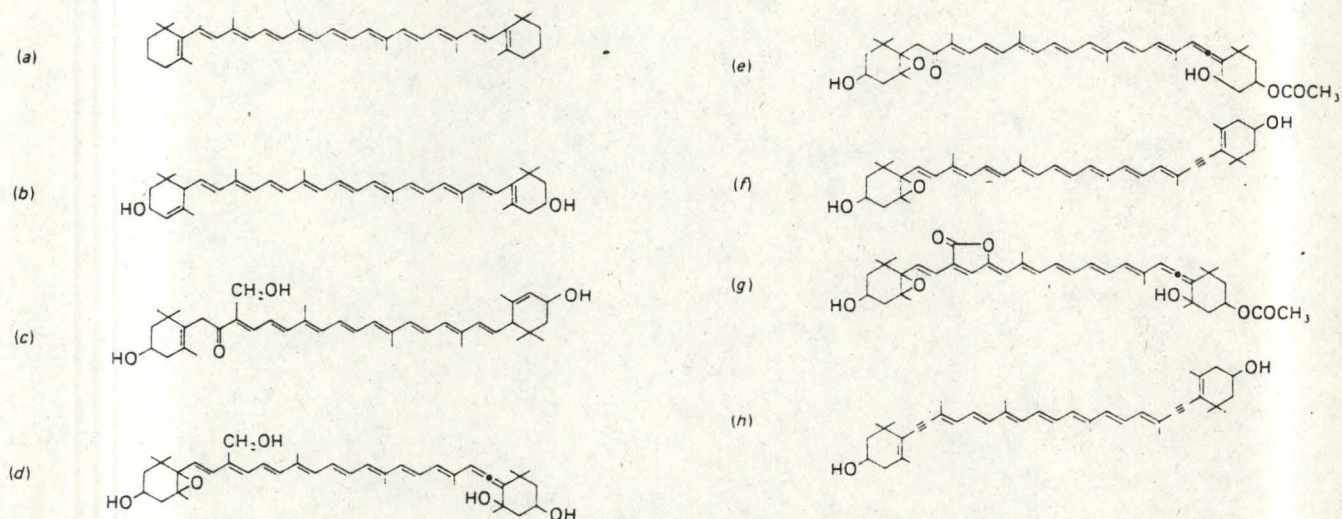


Fig. 6: Structure de quelques caroténoïdes rencontrés chez les algues : a : BB-carotène; b : lutéine; c : siphonaxanthine; d : vauchériaxanthine; e : fucoxanthine; f : diadinoxanthine; g : péridinine; h : alloxanthine.

Les mélanges les plus complexes se rencontrent dans les organes reproducteurs végétaux. Les plus simples se retrouvent parmi les autres organismes. Ceux-ci éprouvent en effet quelques difficultés à absorber, transformer et stocker efficacement ces molécules (Goodwin, 1992).

2.4. Dégradation des pigments

Svec (1991) insiste sur l'impossibilité d'extraire les pigments sans perte d'information suite à plusieurs réactions. L'acidité provoque la démétalation. A la chaleur, les chlorophylles s'isomérisent. Parfois, les conditions d'extraction ne sont assez pas radicales pour inactiver les enzymes responsables de l'hydrolyse et de l'oxydation naturelle des chlorophylles. Les alcools peuvent être aussi la source d'oxydations et d'allomérisations.

Hynninen (1991) explique les mécanismes chimiques sous-jacents à ces transformations. Shioi (1991) et Svec (1991) conseillent d'extraire les chlorophylles le plus rapidement possible, à froid et à l'obscurité. Les alcools, en raison de leur action catalytique, sont ici aussi prohibés. Svec (1991) conseille de conserver les chlorophylles sous azote dans l'obscurité et à des températures inférieures à zéro degré Celsius.

Outre les artefacts d'extraction, la nature regorge de formes de dégradation des chlorophylles (*Fig.7*). Brown *et al.* (1991) décrivent deux types de processus conduisant à l'altération naturelle des chlorophylles au sein des systèmes biologiques eux-mêmes, dans les organismes sains mais aussi au cours de leur sénescence. Comme le montrent plusieurs auteurs, ces processus peuvent être accentués par une série de facteurs externes comme la température, l'irradiance, l'ingestion par des organismes, la biodégradation, et même la pollution (Brown *et al.*, 1991, Vincent *et al.*, 1993, Vincent et Quesada, 1994).

Dans le premier type, la perte du magnésium central conduit à la formation d'un composé brun - gris, la phaeophytine. L'hydrolyse du phytol conduisant aux chlorophyllides fait partie de ce premier type de processus. Elle peut être obtenue *in vitro* à l'aide d'une chlorophyllase. Les modifications des résidus du tétrapyrole sont aussi courantes que pendant l'extraction et mènent à la formation des allomères, des pyrochlorophylles, des hydroxychlorophylles, des chlorophyllines solubles dans l'eau, etc.

Le second type de dégradation conduit à la formation de composés incolores. L'oxydation photochimique est rapide dans les solutions oxygénées. Dans l'organisme, elle est prévenue grâce à l'action des photoprotecteurs que sont le β -carotène, la violaxanthine, la zéaxanthine, etc. Les peroxydes et les radicaux libres agissent comme la lumière. Certaines voies enzymatiques impliquées dans la sénescence aboutissent également à des dégradations de second type.

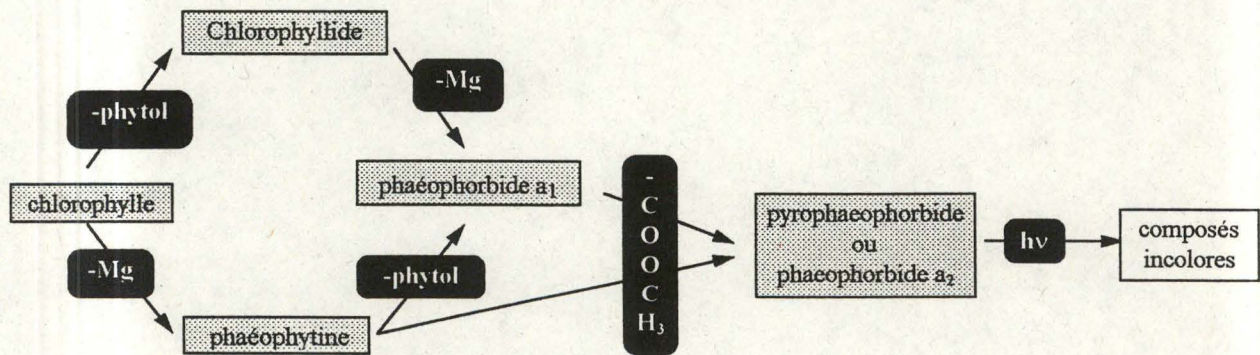


Fig.7: Voies de dégradation possibles de la chlorophylle chez les algues (Barlow *et al.*, 1993 a) : Dans la voie supérieure, la chlorophylle suit un processus de sénescence. La voie inférieure est typique du « grazing ».

2.4.1. Pendant la sénescence

Au cours de la sénescence chloroplastique, la chlorophylle subit une déphytylation enzymatique donnant naissance aux chlorophyllides et aux phaeophorbides. C'est l'étape initiale de la sénescence. Le reste est

dépendant de la présence d'oxygène et de lumière responsables de l'ouverture du cycle porphyrique et donc de la décoloration du matériel. Les formes déphytolées, solubles dans l'eau, quittent les thylacoïdes pour s'accumuler dans les vacuoles; la dégradation enzymatique des protéines chloroplastiques peut alors prendre place (Brown *et al.*, 1991; Matile, 1992). Ces pigments sont aussi des indicateurs de stress et leur présence peut être augmentée par les méthodes d'investigation telles que la centrifugation et la filtration (Millie *et al.* 1993 a et b)

La dégradation des caroténoïdes semblerait beaucoup plus lente lors de la sénescence quoique ce phénomène ait été peu étudié chez les algues. Les xanthophylles subissent néanmoins l'estérification (Matile, 1992; Mínguez-Mosquera et Hornero-Méndez, 1994).

2.4.2. Durant le transit intestinal du plancton

Klein et Riaux Gobin (1991) et Quiblier-Lloberas (1994) montrent qu'au sein des pelotes fécales, les phaeophorbides, souvent considérées comme indicateurs du grazing, sont accompagnées d'un dérivé moins polaire que la fucoxanthine : le fucoxanthinol. L'observation de cette forme digérée de la fucoxanthine s'accompagne d'autres observations intéressantes et relatives à la digestion des caroténoïdes; c'est ainsi qu'a pu être constaté la destruction partielle de la diadinoxanthine lors de son passage au travers le tractus digestif des copépodes (Head et Harris, 1992). Des études menées en laboratoire montrent une bonne conservation de la zéaxanthine et de la lutéine (Millie *et al.*, 1993 a et b).

Pfander (1991) parle de la grande instabilité chimique des caroténoïdes sous la lumière, la chaleur, l'oxygène et les acides. En réalité, très peu de choses sont connues dans ce domaine (Matile, 1992) malgré l'observation d'une bonne conservation des caroténoïdes après ingestion par les crustacés planctoniques (Quiblier-Lloberas, 1994).

Klein et Riaux Gobin (1991) montrent aussi une élimination plus importante des caroténoïdes, par absorption ou dégradation, par rapport aux chlorines lors de leur passage dans le macrozooplancton (copépodes). Brown *et al.* (1991) constatent que 2 % de la chlorophylle se retrouvent intacts dans les pelotes fécales du macrozooplancton; le reste a été converti en chlorophyllides et phaeopigments. Ils observent également qu'avec le temps, ces pigments se décolorent par photo-oxydation.

Chez le microzooplancton, l'accumulation des pigments de dégradation ne se fait qu'à faible irradiance. Seuls quelques phaeopigments sont détectables : ce sont les chlorophylles dans les vacuoles digestives acides. Les formes déphytolées ne sont pas observées (Brown *et al.*, 1991).

3. Perspectives analytiques des pigments en écologie

Depuis vingt ans, la spectrophotométrie d'absorption permet, à partir des équations de Richards et Thompson (1952), de Lorenzen (1967) et de Parsons et Strickland (1963), la mesure de la quantité de chlorophylle *a* extraite d'un milieu. La fluorescence, plus sensible, permet la mesure de la chlorophylle *a* dans les basses concentrations sans devoir passer par une quelconque extraction. Dans ces deux méthodes, l'incapacité à résoudre les chlorophylles accessoires et les caroténoïdes conduit à une surestimation de la chlorophylle *a* (Millie *et al.* 1993 a et b; Gieskes et Kraay, 1983).

La C.L.H.P. couplée à la détection en absorbance ou en fluorescence permet une rapide séparation des pigments et peut conduire à leur identification et à leur quantification. L'analyse des dérivés des chlorophylles fournit l'information relative à l'état physiologique des algues et aux relations trophiques en cours (Millie *et al.*, 1993 a et b).

La capacité photosynthétique algale est directement sous l'influence de leur équipement pigmentaire. En milieu aquatique, la photosynthèse dépend énormément des propriétés de l'eau. En effet, la quantité d'énergie lumineuse diminue avec la profondeur et le spectre se modifie radicalement. Cela se traduit dans l'eau pure par une rapide extinction dans les grandes longueurs d'onde. En milieu naturel, la présence de matières en suspensions, de substances dissoutes et du phytoplancton conduit à une atténuation dans différentes parties du spectre visible, à la fois dans les courtes et grandes longueurs d'onde (Anderson et Barrett, 1986; Kirk, 1983).

Toutes les algues contiennent la chlorophylle *a* et le β -carotène, molécules essentielles à la photosynthèse et à la photoprotection. En plus de ceux-ci, il existe différents assemblages de pigments accessoires, conséquences de l'adaptation des groupes à des environnements lumineux particuliers, et sur lesquels se base la systématique algale.

On dénombre plus de soixante caroténoïdes algaux. Chaque groupe taxonomique en contient approximativement cinq principaux dont certains pourraient servir de biomarqueurs dans l'étude de la succession des communautés algales.

Le *tableau 1* ci-dessous synthétise l'information de plusieurs auteurs sur la composition pigmentaire des algues dont les pigments sont utilisés comme marqueurs de certaines communautés phytoplanctoniques. Les données proviennent de Barlow *et al.* (1993b), Fawley (1992), Gieskes et Kraay (1983), Haugan et Liaaen-Jensen (1994), Johnson *et al.* (1992), Kirk (1983), Klein et Riaux Gobin (1991), Mantoura et Llewellyn (1983), Merete *et al.* (1993; 1994), Millie *et al.* (1993a et b), Quiblier-Lloberas (1994), Vincent *et al.* (1993), Wrigth et Jeffrey (1987).

	Din.	Cyan.	Chlor.	Bacillar.	Chrys.	Crypt.	Euglén.
<i>Chlorophylle a</i>							
<i>Chlorophylle b</i>							
<i>Chlorophylle c1</i>							
<i>Chlorophylle c2</i>							
<i>Chlorophylle c3</i>							
<i>19-butanyloxyfucoxanthine.</i>							
<i>19-Hexanoyloxyfucoxanthine</i>							
<i>Alloxanthine</i>							
<i>Anthéroxanthine</i>							
<i>Astaxanthine</i>							
<i>Cantaxanthine</i>							
<i>Crocoxanthine</i>							
<i>Diadinoxanthine</i>							
<i>Diatoxanthine</i>							
<i>Dinoxanthine</i>							
<i>Echinénone</i>							
<i>Fucoxanthine</i>							
<i>Lutéine</i>							
<i>Monodinoxanthine</i>							
<i>Myxoxanthophylle</i>							
<i>Néofucoxanthine</i>							
<i>Néoxanthine</i>							
<i>Oscillaxanthine</i>							
<i>Péridinine</i>							
<i>Vanchériaxanthine</i>							
<i>Violaxanthine</i>							
<i>Zeaxanthine</i>							





	pigment présent mais non considéré comme caractéristique
	pigment considéré comme caractéristique par un seul auteur
	pigment considéré comme caractéristique par plusieurs auteurs
	pigment caractéristique faisant l'unanimité

Tableau 1: Composition pigmentaire des algues dont les pigments peuvent être utilisés comme marqueurs de certaines communautés phytoplanctoniques: (Din)ophycées, (Cyan)ophycées, (Chlor)ophycées, (Bacillar)ophycées, (Chrys)ophycées, (Crypt)ophycées et (Euglén)ophycées.

3.1. Utilisation des pigments dans l'étude des communautés algales, de leurs successions temporelles et spatiales, et de la contribution de chaque groupe à la biomasse totale

C'est surtout en milieu océanique que les pigments ont fait leurs preuves en tant que biomarqueurs. Auparavant, l'étude des communautés phytoplanctoniques ne pouvait se faire qu'à l'aide d'un microscope et nécessitait une grande compétence taxonomique et un temps d'analyse assez long (Millie *et al.*, 1993 a et b). De plus, les algues trop petites y passaient souvent inaperçues (Gieskes et Kraay, 1983).

Le changement pigmentaire, visible en C.L.H.P., traduit l'adaptation des communautés algales à un changement du milieu et permet d'établir aisément la corrélation entre les caractéristiques du milieu et l'assemblage phytoplanctonique. Comme le montre le tableau, certains pigments n'ont aucune utilité taxonomique. D'autres sont typique de groupes particuliers mais c'est parce que les caroténoïdes sont les moins variés au sein de l'organisme, qu'ils sont considérés comme les meilleurs marqueurs taxonomiques (Millie *et al.*, 1993 a et b). Les pigments sont non seulement des outils taxonomiques mais aussi le moyen de quantifier l'abondance relative des différents groupes algaux dans la population naturelle (Barlow *et al.*, 1993 b; Buma *et al.*, 1992; Gieskes et Kraay, 1983; Johnson *et al.*, 1992). Quiblier -Lloberas (1994) montre un très bon parallélisme entre les pigments marqueurs et la biomasse des algues correspondantes (*fig. 8*).

Wright et Jeffrey (1987) utilisent les dérivés de la fucoxanthine dans un but taxonomique. Cela leur permet de discriminer toutes les classes d'algues marines présentes ensemble dans le milieu naturel et possédant cette molécule.

Fawley (1992) différencie et établit des liens phylogénétiques au sein des Micromonadophycées sur la seule base des caroténoïdes secondaires, ceux-ci étant l'expression des voies enzymatiques de synthèse ou de dégradation des caroténoïdes.

Goericke et Welschmeyer (1993) ont montré, grâce à une chlorophylle b spéciale et caractéristique d'un nouveau Prochlorophyte (*Prochlorococcus marinus* Chisholm), l'importance de ce dernier dans la production primaire des écosystèmes océaniques tropicaux et subtropicaux. Ils ont pu ainsi décrire la dynamique de croissance de ce *Prochlorococcus* et sa localisation dans la colonne d'eau.

Klein et Riaux Gobin (1991) se sont servis des pigments pour étudier la structure et l'évolution temporelle des communautés microphytobenthiques sur les côtes des Iles Kerguelen, alors que les méthodes d'analyses classiques s'avéraient difficiles d'application.

Malcolm *et al.* (1992) ont utilisé les pigments pour connaître la composition du phytoplancton en place dans les bassins d'une mariculture où les algues servent à l'alimentation des larves juvéniles de mollusques. Le succès de leur croissance dépend de la constitution biochimique en acides aminés et en sucres des algues. Celle-ci est différente d'un groupe d'algues à l'autre.

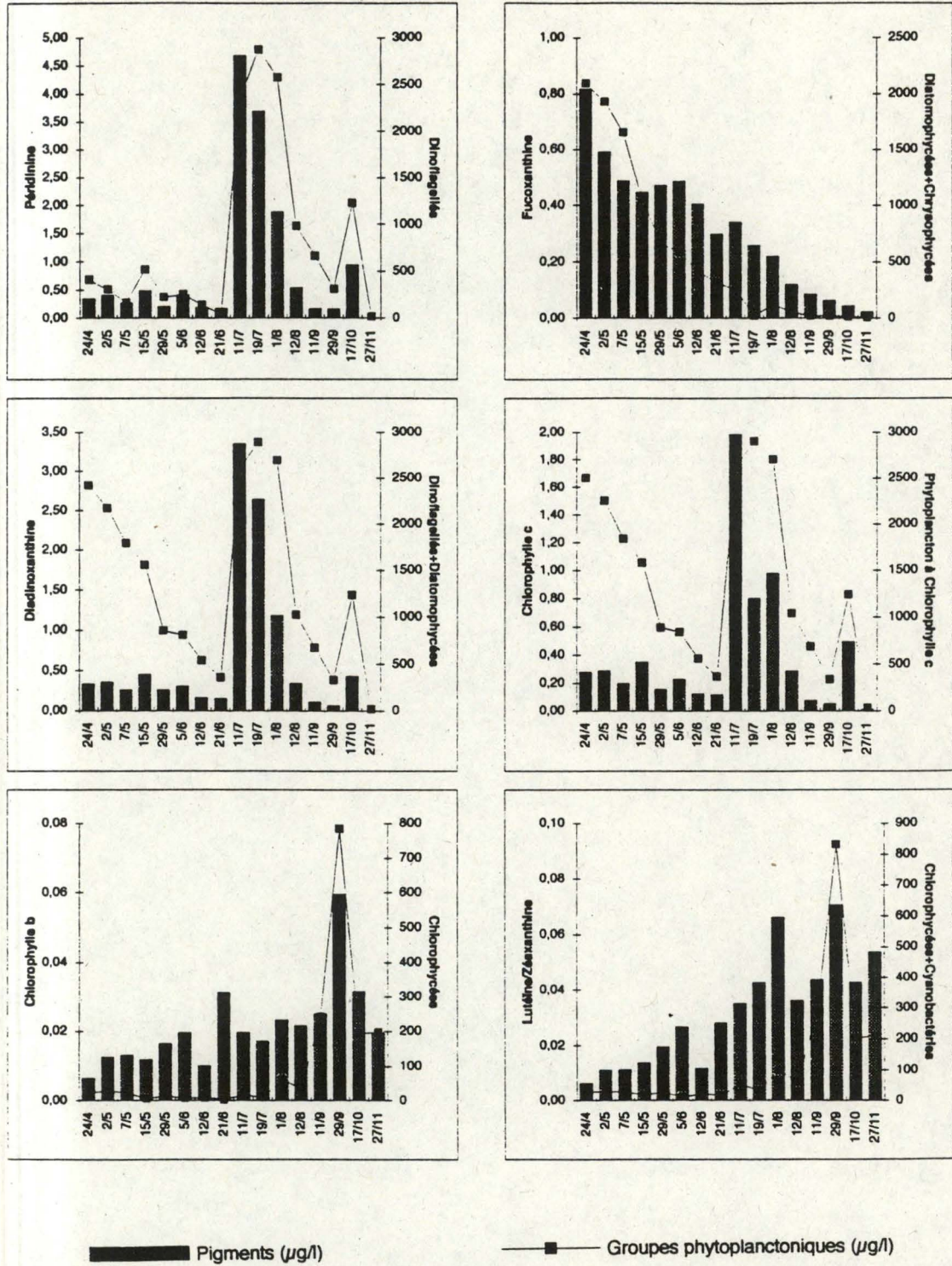


Fig. 8 : Evolution parallèle des pigments marqueurs et de la biomasse algale correspondante, dans le lac Pavin (Auvergne) (d'après Quiblier-Lloberas, 1994).

L'étude du picoplancton marin de façon classique (microscopie optique) est rendue délicate par les difficultés d'identification imposées par la fixation des échantillons. Buma *et al.* (1992) se sont donc servis des pigments pour montrer l'importance de cette portion du plancton dans la productivité de l'écosystème marin au large de l'Ecosse.

Barlow *et al.* (1993 b), sur base de régressions linéaires, à partir des rapports de la chlorophylle *a* avec les pigments marqueurs et d'un comptage microscopique, calculent la participation à la chlorophylle *a* totale de chaque groupe d'algues présents dans le nord-est Atlantique :

$$\text{Chl. } a = -0.272 + 1.180(\text{fucox.}) + 0.808(\text{hex.}) + 1.036(\text{chl. } b) + 0.010(\text{périd.})$$

Gieskes *et al.* (1988), par une approche similaire avaient déjà établi ce type d'équation en mer de Banda (Indonésie)

$$\text{Chl. } a = -0,077 + 1,606(\text{fucox.}) + 2,948(\text{hex.}) + 3,340(\text{zeax.}) + 0,778(\text{chl. } b)$$

et comme Letelier *et al.* (1993), pour la Mer du Nord, en se basant sur le rapport chlorophylle *a* / pigments mesurés sur des cultures monospécifiques :

$$\text{Chl. } a = -0.06 + 1.47(\text{fucox.}) + 4.28(\text{allox.})$$

3.2. Mesures de « grazing » par les pigments

Il existe deux expressions couramment utilisées pour évaluer le prélèvement, par une espèce zooplanctonique, de la nourriture dans le milieu :

Le taux d'ingestion exprime la biomasse algale ingérée par l'animal en un temps donné. On le rencontre souvent sous l'appellation de « grazing rate », taux de « grazing », ou taux de broutage.

• *Le taux de filtration* permet une meilleure visualisation de l'impact réel de la nutrition sur le milieu. Il correspond au volume filtré par l'animal en un temps donné.

Francesc (1994) montre que, chez les protozoaires, les résultats de « grazing » obtenus par plusieurs méthodes ne sont pas influencés par celles-ci mais par le milieu étudié. Il apparaît aussi au terme de cette étude, que le taux de « grazing », chez les protozoaires, répond à la température selon une loi en Q10 (Q10 = 2,14). Il est une fonction de la concentration en proies mais aussi des volumes relatifs des proies et des prédateurs, par un phénomène de sélectivité de taille. Le taux d'ingestion augmente avec la taille du prédateur et avec une réduction du volume des proies. Aucune étude statistique de ce genre ne semble avoir été réalisée pour les autres membres du zooplancton. Il ne faut cependant pas y négliger l'importance de la taille des pièces buccales du zooplancton. De plus, certaines algues présentant une toxicité semblent être épargnées par les processus de « grazing »; c'est souvent le cas dans le groupe des Cyanobactéries. La concentration en proies influence de façon évidente le taux de filtration (Arfi et Guiral, 1994; Mac Clatchie, 1992; Mac Clatchie *et al.*, 1991; Viroux, 1993).

La mesure du « grazing » se fait souvent *in vitro* sur des algues monospécifiques marquées par un radiotracteur. La transposition au milieu naturel des conclusions tirées de ce type d'expériences est assez délicate

compte tenu des conditions expérimentales souvent très éloignées de la réalité naturelle. Ces expériences souffrent également souvent d'une grande variabilité consécutive aux manipulations successives des organismes brouteurs, à laquelle s'ajoute en plus une échelle de temps de mesure relativement réduite, à partir de laquelle les résultats sont extrapolés à de plus longues périodes. La fiabilité des mesures dépend aussi beaucoup trop de l'état physiologique des algues et du temps d'acclimatation du zooplancton aux densités algales imposées par l'expérimentateur (Gifford, 1988; Millie *et al.*, 1993 a et b).

En milieu naturel, la concentration en nourriture et la diversité des algues disponibles changent au cours du temps (Millie *et al.*, 1993 a et b). C'est pourquoi beaucoup de chercheurs ont tenté de transposer ces techniques de mesure au milieu naturel (Mac Clatchie, 1992). La méthode de Haney (1971 et 1973), basée sur l'ingestion d'algues radioactives, permet une mesure *in situ* du taux de « grazing » par le plancton animal. Cependant, ces expériences, considérées comme traditionnelles, ne mesurent pas le « grazing » directement sur le phytoplancton naturel mais nécessitent l'introduction d'algues de cultures monospécifiques parfois très différentes des groupes dominants dans le milieu (Millie *et al.*, 1993 a et b).

Il existe deux grands types d'approches du « grazing » basées sur les pigments. La première se base sur la mesure des pigments et de leurs produits de dégradation durant ou après leur transit à l'intérieur de l'animal. Quiblier-Lloberas (1994) met, en effet, en évidence la conservation du profil pigmentaire caractéristique des algues ingérées au cours de la digestion de celles-ci par les crustacés planctoniques. Ces techniques ont surtout été employées en milieu océanique sur les copépodes. Il est possible de calculer un taux de « grazing » journalier sur base du modèle de Welschmeyer *et al.* (1984) et Welschmeyer et Lorenzen (1985). Celui-ci exprime le « grazing » par le rapport de concentrations des phaeopigments et des chlorophylles présents dans l'animal ou ces pelotes fécales, le tout étant pondéré par un terme exprimant la photodégradation. Ce qui s'exprime sous la forme :

$$G = I * k * [Phaeo.] / [Chloro.] \text{ (où } I \text{ est l'irradiance et } k \text{ la constante de photodégradation)}$$

Ce modèle suppose que la conversion des chlorophylles en phaeopigments est stœchiométrique et totale. Il suppose également que la production de phaeopigments par sénescence est négligeable en milieu naturel. Une estimation de l'abondance du zooplancton permet d'exprimer une pression de "grazing" par jour et par individu (Latassa *et al.*, 1992).

Latassa *et al.* (1992) montrent une bonne corrélation entre la quantité de phaeopigments et la biomasse du mésozooplancton, ce qui n'est pas le cas pour le microzooplancton. Sur base d'études préalable, ces mêmes auteurs, considérant une disparition rapide des pelotes faecales, montrent que seulement 0, 5 % des phaeopigments se trouvent dans l'animal, le reste se retrouve dans l'eau.

Mac Manus et Ederington-Cantrell (1992) mettent en évidence par C.L.H.P. une sélectivité du broutage en repérant les formes dégradées de pigments indicateurs de communautés, comme la fucoxanthine.

Toujours en milieu océanique, Bautista et Harris. (1992) montrent une sélectivité de taille, chez les copépodes, lors du "grazing" tout au long du développement d'un bloom algal. Pour ce faire, ils effectuent un tri sur des tamis disposés en série et considèrent ainsi trois classes de tailles chez les copépodes. Ils calculent un taux d'ingestion par classe de taille qu'ils comparent avec le phytoplancton en place ce jour-là. Tout comme Wong *et al.* (1992),

Peressinotto (1992) et Quiblier-Lloberas (1994), ils expriment l'ingestion en fonction du contenu pigmentaire de l'intestin et d'une constante d'élimination des pigments ("gut clearance rate").

$$I = k * G \quad (\text{ou } I \text{ est l'ingestion, } G \text{ est le contenu pigmentaire et } k \text{ la constante})$$

Cette constante est mesurée expérimentalement pour chaque classe (Bautista et Harris, 1992). Bautista reconnaît néanmoins la simplicité de son modèle. Le « grazing » dépend en réalité d'une quantité de facteurs externes et internes.

Initialement, les mesures de grazing ont surtout été basées sur la fluorescence des chlorophylles présentes dans le tractus digestif des animaux. Head (1992 a et b) et Gifford (1988) critiquent ces modèles car la dégradation des pigments lors des processus de digestion est loin d'être stœchiométrique et beaucoup de ces produits ne sont plus fluorescents. En réalité, l'efficacité de ces transformations dépend de nombreux facteurs physiologiques et environnementaux. Ainsi a-t-il constaté qu'un individu issu d'un milieu pauvre en nourriture est beaucoup plus « conservateur » que les autres préalablement mieux nourris. A ceci s'ajoute la photodégradation. Head insiste sur le fait que ces comportements ne sont pas la conséquence de taux d'ingestion différents mais le résultat de modifications dans la manière de digérer. Head et Harris. (1992) concluent une autre étude en expliquant que beaucoup de pigments sont détruits dans l'intestin malgré une assez bonne résistance de beaucoup de caroténoïdes. Ils conseillent une grande prudence face à ces résultats et admettent qu'au pire ils sous-estiment le phénomène; ce que concluent également Barlow *et al.* (1993 a), Bautista et Harris (1992) et Quiblier-Lloberas (1994). C'est pourquoi ce type d'investigation ne peut donner qu'une information sur la sélectivité du broutage des algues par le macrozooplancton, sauf si l'on évalue pour chaque série de mesure la dégradation chlorophyllienne pour chaque type d'organisme (Quiblier-Lloberas, 1994).

Le second type de mesure est indirect. Il évalue en réalité la fluctuation de la biomasse algale sur vingt-quatre heures après dilution du milieu dans de l'eau préalablement filtrée (Landry et Hassett, 1982). Cette méthode est plus appropriée au micro- et mésozooplancton. Le modèle utilisé postule que la croissance du phytoplancton est le résultat de sa croissance nette diminuée du « grazing » (Gifford, 1988; Landry et Hassett, 1982; Gallegos, 1989 et Paranjape, 1987) :

$$P_t = P_o e^{(K-G) * t} \quad \text{ou } K - G = 1/t \ln (P_t / P_o) = \text{le taux de croissance apparent}$$

« P_t et P_o » sont les biomasses algales aux temps t et zéro d'incubation, « K » est le taux de croissance net ou spécifique du phytoplancton, et « G » est le taux de « grazing ».

En diluant le milieu naturel, on réduit la probabilité de rencontre entre la proie et son prédateur, c'est à dire la pression de grazing sur le phytoplancton. La relation entre le taux de croissance apparent et la dilution est linéaire. En première approximation, le coefficient angulaire de la droite exprime la pression de « grazing » et l'ordonnée à l'origine le taux de croissance net du phytoplancton (*Fig. 9*). Pour que ce modèle soit d'application, il faut répondre à trois conditions :

- Le taux de croissance algal est indépendant de leur densité, c'est à dire que les nutriments ne sont jamais limitants durant la durée de l'incubation.

- L'ingestion est une fonction linéaire de la densité en zooplancton, c'est à dire qu'à aucun moment de l'expérience, les algues se trouvent en concentration telle qu'elles deviennent saturantes pour le zooplancton.
- L'équation décrit le plus adéquatement la croissance du phytoplancton.

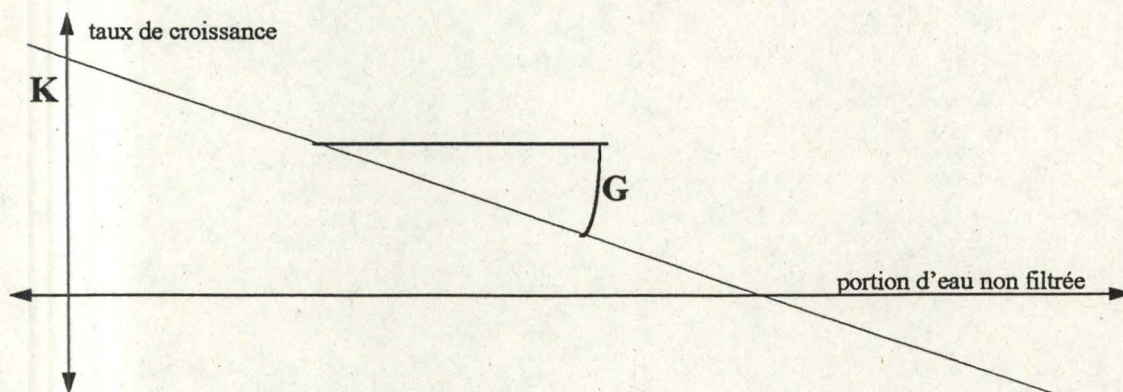


Fig.9: Graphique exprimant le taux de croissance et de « grazing » en fonction de la dilution des organismes. En diluant le milieu naturel, la relation entre le taux de croissance apparent et la dilution est linéaire.

Cette technique a l'avantage de ne nécessiter que très peu de manipulations sur le matériel vivant (Gifford, 1988; Landry et Hassett, 1982; Gallegos, 1989 et Paranjape, 1987).

En milieu eutrophe, où on assiste à une saturation nutritionnelle permanente du zooplancton, la deuxième des trois conditions n'est donc pas respectée. Gallegos (1989) solutionne le problème en ne considérant que les fortes dilutions, hors des conditions nutritionnelles saturantes.

Cette technique, couplée à la séparation, l'identification et la quantification des pigments par H.P.L.C. pourrait s'avérer être une mesure satisfaisante du « grazing » à la fois dans son ampleur et sa sélectivité (Strom et Welshmeyer, 1991). Son principal inconvénient est la grande dispersion des points autour de la droite de régression (**Fig.10**).

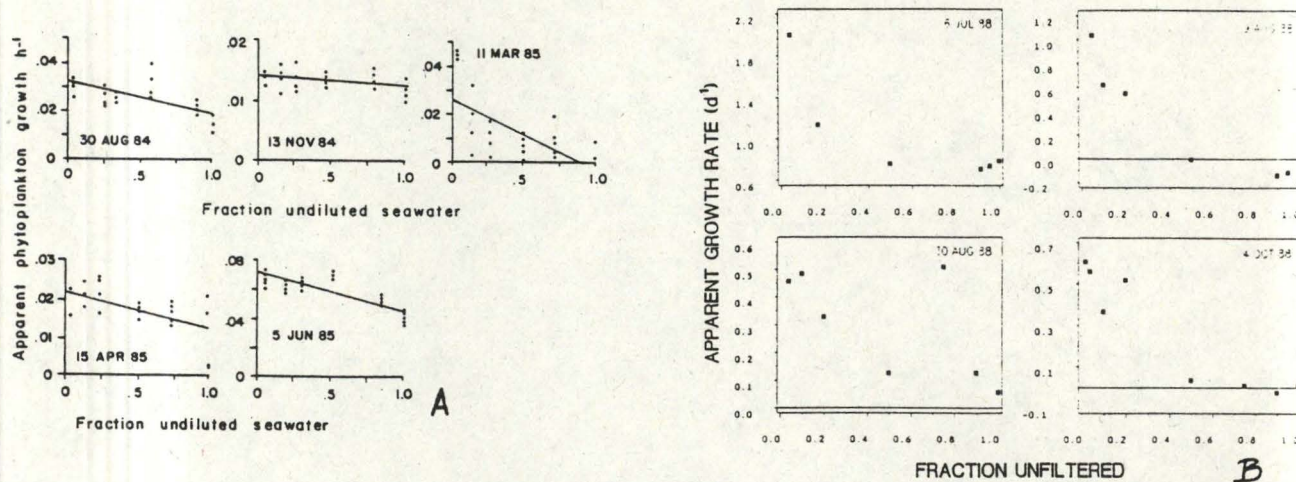


Fig.10: Résultat obtenu par la méthode de mesure du grazing par dilution: (A) en situation non saturante (Landry et Hassett, 1982) et (B) en milieu eutrophe, saturé (Gallegos, 1989)

3.3. Application en paléolimnologie

Les pigments contenus dans les sédiments océaniques permettraient l'étude de l'historique de la production d'une colonne d'eau, et de la distribution du plancton dans cet espace. La distinction des phaeopigments est ici déterminante car ils sont les indicateurs des voies de disparition des algues. La quantification des caroténoïdes donne quant à elle des informations concernant l'importance de certains groupes algaux au cours du temps. L'analyse est cependant rendue délicate vu la complexité (200 pics) des chromatogrammes obtenus (Millie *et al.*, 1993 a et b).

3.4. Facteurs fragilisant l'utilisation des pigments comme biomarqueurs

L'augmentation intracellulaire de la concentration des pigments par photoadaptation, quoique généralement admise, n'est pas toujours observée dans le milieu naturel. Les pigments photoprotecteurs tels que la violaxanthine, les carotènes et la diatoxanthine suivent une cinétique inverse de celle de pigments photosynthétiques, c'est à dire qu'ils augmentent avec l'intensité lumineuse (Falkowski, 1992 et Latassa *et al.*, 1992). Il est admis que si ces pigments sont constitutifs des algues, ils augmentent fortement de concentration à forte intensité à certaines longueurs d'ondes (Herzig et Dubinsky, 1992; Kobayashi *et al.*, 1992; Vincent et Quesada, 1994; Vincent et Roy, 1993). Si la concentration cellulaire en pigments photosynthétiques augmente quand la lumière diminue (Kirk, 1983), il semblerait cependant que le rapport xanthophylles / chlorophylle *a* soit assez stable. Brunet *et al.* (1992) constatent en effet que le rapport entre la chlorophylle *a* et ces pigments accessoires ne change pas avec la photoadaptation dans un même milieu, ce qui permet toujours d'évaluer la contribution des différents groupes algaux à la biomasse totale (Wilhelm *et al.*, 1991).

Une carence en azote affecte la synthèse des chlorophylles et conduit à la formation, chez les algues vertes, de caroténoïdes secondaires non constitutifs des algues saines (Siep *et al.*, 1992; Vechtel *et al.*, 1991).

4. La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P.) permet la séparation, la détection et même la récupération de mélanges. Les solvants (phase mobile), la pompe, l'injecteur, la colonne (phase stationnaire) et le détecteur font partie intégrante du système. La séparation se base sur les propriétés physico-chimiques de la colonne, des solvants, et du mélange. De nombreux systèmes ont été développés en fonction du champ d'application.

La *chromatographie de partage* ou liquide - liquide se compose d'une phase stationnaire liquide non miscible dans la phase mobile et adsorbée sur un support solide. Dans un tel système, toutes erreurs dans le choix des solvants peuvent entraîner la « mort » de la colonne. Les deux modes de chromatographies, en phase normale ou inverse, sont d'application. La séparation de deux substances est possible lorsqu'elles présentent des coefficients de partage différents pour les deux phases liquides: stationnaire et mobile.

La *chromatographie d'adsorption* ou liquide - solide présente les deux modes de séparation et fera l'objet du point suivant (la chromatographie analytique). Le phénomène responsable de la séparation est appelé physisorption, c'est à dire une adsorption sélective des divers constituants selon leur polarité.

La *chromatographie ionique* est applicable aux composés cationiques et anioniques minéraux et organiques ainsi qu'aux protéines. La phase stationnaire se compose d'une résine échangeuse d'ions ou de silice fonctionnalisée. La séparation fait intervenir des phénomènes d'échanges ioniques entre la phase stationnaire et les composants du mélange. La force ionique de la phase mobile ainsi que le pH, responsable de la charge de l'échantillon, sont les facteurs déterminants lors de la séparation.

La *chromatographie par perméation de gel* a pour objectif la séparation par la taille de macromolécules. Un polymère réticulé à porosité contrôlée constitue la phase stationnaire et des solvants organiques la phase mobile.

La *chromatographie d'affinité* joue sur des interactions spécifiques entre un ligand, greffé sur la phase stationnaire, et la molécule cible se trouvant dans le soluté.

4.1. La chromatographie analytique

La chromatographie analytique est une méthode qui sépare les constituants de mélanges parfois très complexes en vue d'en identifier et d'en quantifier les composants; la purification n'est pas son objectif, qui est celui de la chromatographie préparative.

Optimaliser un protocole d'analyse n'est pas chose facile vu le nombre de variables à manipuler, afin de réduire le temps d'analyse, de diminuer la consommation de solvant et d'augmenter la sensibilité de la détection. L'analyste peut jouer sur le matériel de la colonne (« packing » de colonne ou phase stationnaire utilisée, le degré de « end-capping » des silanols restés libres, la taille des particules et de leurs pores, la surface d'échange développée); il doit aussi prendre en considération la configuration de cette colonne (longueur et diamètre interne, nature chimique de la matrice), les conditions d'élution (composition de l'éluant, profil d'élution, débit de la phase liquide, température), le type de détecteur utilisé et la méthode de quantification (standardisation externe ou interne). L'optimisation d'un protocole se fait généralement expérimentalement. Cependant, il existe des modèles théoriques permettant de développer la méthode la plus adéquate. Il faut y distinguer les facteurs chimiques affectant la résolution, et les facteurs physiques affectant la vitesse et l'efficacité de l'analyse. Ces facteurs englobent toutes les variables précitées. Au sein des facteurs chimiques, la sélectivité α mesure la rétention relative de deux composants du mélange, autrement dit la sélectivité de la colonne.

$$\alpha = (V_2 - V_0) / (V_1 - V_0) = K'_2 / K'_1$$

Où V_0 est le volume mort du système, c'est à dire le temps de sortie d'un composé qui ne serait pas retardé dans la colonne. V_1 et V_2 expriment les temps de rétention des substances 1 et 2 (*Fig.11*)

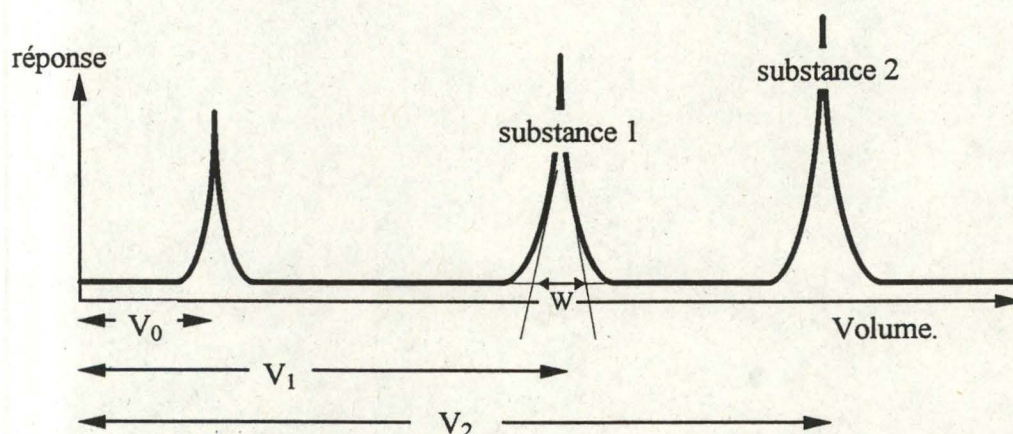


Fig.11: Valeurs caractéristiques d'un chromatogramme

La sélectivité est fonction du matériel empaqueté et des conditions d'élution. La capacité K' , deuxième facteur chimique, évalue la manière avec laquelle une colonne retient un composé. C'est aussi une mesure du temps de rétention de la molécule en question, mais cette fois exprimée en unité de volume mort. Elle est donc affectée par les mêmes variables qu' α .

$$K' = (V_1 - V_0) / V_0$$

Si K' augmente la résolution, le temps d'analyse croît proportionnellement.

Le nombre de plateaux théoriques N , paramètre physique, est non seulement une mesure de l'efficacité de la colonne mais aussi de la performance globale du système chromatographique.

$$N = 16 * (V / W)^2 \quad (W \text{ exprime la largeur d'un pic à sa base voir Fig 11}).$$

Il exprime également l'élargissement d'un pic autour de son centre. La résolution et l'efficacité en découlent directement. La résolution R évalue la séparation entre deux composés.

$$R = 0.25 \{ (\alpha - 1) / \alpha \} * N^{0.5} * \{ K' / (K' + 1) \}$$

Son expression permet de visualiser l'effet de chacun des trois facteurs :

$$H = L / N$$

L'efficacité H de la colonne correspond en réalité à la mesure de la hauteur équivalente où L est la longueur de la colonne.

4.1.1. La colonne

La compréhension du rôle de la colonne en chromatographie est importante, elle a en effet une grande influence sur la sélectivité α et sur la capacité K' , soit sur la résolution R du mélange. Le mode de séparation, le matériel empaqueté, la phase liée, l'« end-capping » des silanols, la charge en carbone, la taille des pores et des particules sont autant de variables à considérer lors du choix de la colonne.

Les modes de séparation existant sont les phases normale et inverse. Le choix du mode de séparation détermine le type de matériel empaqueté et se base sur la solubilité du mélange à étudier. En mode normal, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire. Les composés plus hydrophobes, apolaires, sont emportés par le solvant alors que les plus polaires sont freinés par physisorption au niveau de la phase stationnaire. Son avantage majeur tient dans l'aisance avec laquelle la sélectivité peut être modifiée en jouant uniquement sur les solvants d'élution. Cependant, la lente équilibration des colonnes, le nombre restreint de ses applications, le prix élevé des solvants et leur toxicité, contribuent à l'impopularité de ce mode de séparation. En mode inverse, la phase mobile polaire entraîne les composés les plus polaires non retenus par la phase stationnaire apolaire. Ce second mode de séparation est le plus utilisé vu la rapide équilibration des colonnes, la grande surface d'échange offerte, le coût des solvants, et sa plus grande fonctionnalité.

En phase inverse on utilise souvent des particules de silice greffées de phényles, CN, C₄, C₈ ou C₁₈. Cependant, il y reste souvent des groupements silanols non liés pour cause d'encombrements stériques. Ces

silanols peuvent ensuite réagir avec les composés basiques ou polaires de l'échantillon. Pour éviter ces réactions, des agents moins dépendants des interactions stériques y sont greffés, les silanols sont alors dits « end-capped ».

La taille des pores et des particules est évidemment critique pour la séparation. Trois types de pores et particules sont à distinguer: le premier type constitué de grandes particules très poreuses est surtout destiné à la chromatographie préparative. La chromatographie d'analyse exige de petites particules à pores étroits voire à noyau impénétrable. Pour une même longueur de colonne, de petites particules offrent une meilleure efficacité.

4.1.2. Les solvants

Le choix des solvants, basé sur l'indice de polarité, permet d'englober des propriétés telles que le moment dipolaire, l'électrophilie, etc.. Ce sont souvent les caractéristiques de solubilité de l'échantillon et les impératifs de la séparation qui déterminent ce choix. Il faut toutefois veiller à ce qu'il ne soit pas incompatible avec la phase stationnaire utilisée. En phase inverse notre choix ira vers des solvants à faible indice de polarité. Dans un système avec gradient, le premier solvant sera le plus polaire.

La manipulation des solvants est souvent critique dans la chromatographie d'analyse. La variabilité inhérente à leur préparation, leur degrés de pureté (solvant sans particule en suspension, sans ions et matières organiques dissoutes) sont souvent à l'origine de problèmes d'ordre résolitif s'ils ne sont pas considérés avec sérieux. Il est parfois nécessaire d'ajouter des agents « d'ion-pairing » afin d'augmenter l'affinité pour la colonne des substances trop polaires. Elles pourront ainsi interagir avec une phase stationnaire apolaire et être séparées.

La séparation ne nécessite parfois qu'un seul solvant, c'est à dire en mode isocratique. Souvent, plusieurs solvants sont nécessaires à la séparation. On parlera alors de gradient binaire, ternaire, quaternaire selon le cas.

4.1.3. La détection et l'identification

La sensibilité et la spécificité sont des facteurs déterminants dans le choix du détecteur mais évoluent généralement en sens contraire. La limite de détection dépend de la sensibilité mais peut être améliorée par une préparation adéquate de l'échantillon. La spectroscopie, la conductimétrie, et l'électrochimie sont parmi les méthodes les plus utilisées pour la détection de molécules.

En *spectroscopie*, une molécule excitée par un rayon lumineux peut transmettre, diffracter ou bien réémettre de la lumière.

•Le *réfractomètre* est un détecteur universel, sensible à la température, à la pression et au débit, ce qui ne le rend opérationnel qu'en mode isocratique. Il détecte les polymères, les sucres, et tous les produits n'absorbant pas la lumière.

•La détection par *spectrophotométrie d'absorption* se base sur la loi de Beer-Lambert qui établit la relation existant entre la concentration d'une molécule et son absorbance à une longueur d'onde précise. L'U.V/visible couvre quatre-vingts pour cent des applications en C.L.H.P., il est particulièrement indiqué dans la détection de molécules possédant des groupements chromophores.

Depuis peu, il est devenu possible d'enregistrer à chaque instant le spectre d'absorption d'une molécule à la sortie de la colonne grâce au *détecteur à barrette de diodes* (Fig.12 & 13). Cet instrument permet l'acquisition du spectre caractéristique d'un composé en temps réel, en trois dimensions.

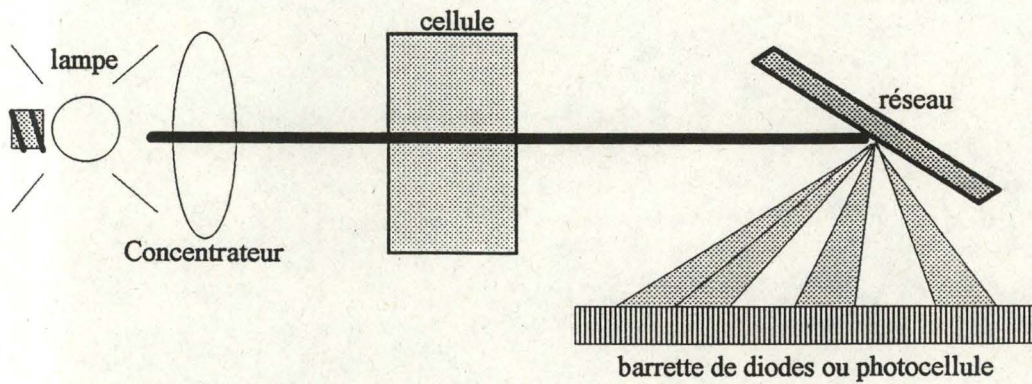


Fig.12: Détecteur à barrette de diodes. Cet instrument permet l'acquisition du spectre caractéristique de composé en temps réel, en trois dimensions

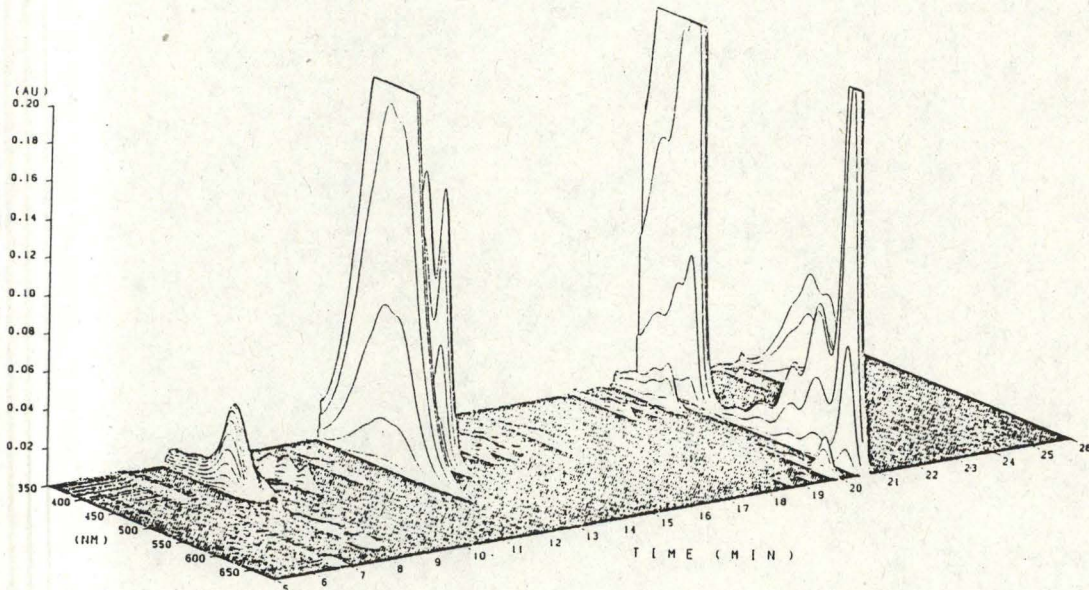


Fig.13: Chromatogramme obtenu par un détecteur à barrette de diodes.

•Le *fluorimètre* consiste à exciter les molécules avec une longueur d'onde définie et à détecter les rayonnements, d'énergie inférieure, réémis par les composés possédants des structures fluorochromes. Cet appareil est très spécifique et applicable aux substances à fluorescence naturelle mais aussi à celles complexées chimiquement à des marqueurs fluorescents.

Les propriétés d'oxydoréduction des molécules sont à la base de la *détection électrochimique*. Le signal correspond à une perte ou un gain d'électrons. C'est un procédé très utile pour les structures phénoliques, les acides aminés aromatiques, les ions et les carbohydrates.

4.1.4. La quantification

Idéalement, l'objectif de la quantification est de déterminer la concentration de chacun des constituants au sein de l'échantillon: une fois la méthode de séparation mise au point, les problèmes liés à la quantification doivent être résolus. Celle-ci se construit à partir de standards pour chaque composant. Son plus grand problème est la coélution de plusieurs substances. La pureté d'un pic déterminé peut aisément se calculer par le rapport de réponse sur l'ensemble du pic à différentes valeurs de détection. Ainsi, un composé pur aura un rapport constant tout le long de son pic et pour l'ensemble de son spectre de détection. Un autre problème est lié aux limites de détection des appareils. La plupart des détecteurs émettent une réponse proportionnelle à la concentration en molécules. Il existe deux procédés de quantification, utilisant soit la standardisation externe ou la standardisation interne.

Dans la standardisation externe, chaque standard doit être injecté à concentration connue et croissante. La fenêtre couverte par les standards doit être plus large que la gamme de concentration de la substance dans l'échantillon. Ce mode de standardisation convient particulièrement pour les mélanges complexes comme il en existe souvent en biologie, où les composés sont en plus de nature chimique variée. Si les standards sont purs, la standardisation externe donne une quantité absolue pour chaque constituant dans le volume injecté. Cependant, la précision des volumes injectés peut être critique. Dans ce cas, la quantité d'une substance de même nature que le standard est calculée en fonction du signal mesuré par le détecteur, ce qui peut s'écrire :

$$\text{Quantité de la substance} = f(\text{réponse de cette substance})$$

Travailler avec un standard interne implique l'addition d'une quantité constante de ce standard dans tous les standards et les échantillons avant leurs manipulations. Ici, la quantité de substance s'exprime par le rapport de sa réponse (aire du pic) avec celle du standard interne (ayant subi les mêmes transformations lors de la préparation de l'échantillon). Autrement dit :

$$\text{Quantité du composé} = f(\text{réponse composé} / \text{réponse stand. int.})$$

La calibration par cette méthode est généralement recommandée pour les applications de routine. Le standard doit être chimiquement proche des substances à quantifier et son K' doit être nécessairement différent de tout autre composant. Il doit être ajouté en concentration constante à la fois dans tous les standards et les

échantillons. Ce mode de standardisation permet de faire abstraction d'éventuelles pertes d'échantillon lors de l'étape d'extraction. En effet, toute perte de matériel à doser s'accompagne de celle du standard interne en proportion équivalente. De plus, cette molécule étant toujours présente dans l'aliquote, elle peut servir de marqueur d'identification des autres pics en cas de léger « shift ». Le *tableau 2* permet de comparer les avantages et inconvénients des deux types de quantification.

Modes de standardisation:	avantages:	inconvénients:
externe	<ul style="list-style-type: none"> - donne la quantité absolue de chaque substance dans l'extrait. - tous les composants ne doivent pas être quantifiés. 	<ul style="list-style-type: none"> - la précision des volumes injectés et de la méthode d'extraction peut être critique. - les standards doivent être purs
interne	<ul style="list-style-type: none"> - permet une bonne quantification quels que soit la précision des volumes injectés et le rendement de l'extraction. 	<ul style="list-style-type: none"> - le standard interne doit être de la même famille chimique. - il doit éluer dans une zone vide du chromatogramme et doit être pur. - la précision finale dépend de celle de l'addition.

Tableau 2: Récapitulatif des avantages et inconvénients associés aux deux méthodes de quantification en C. L. H. P.

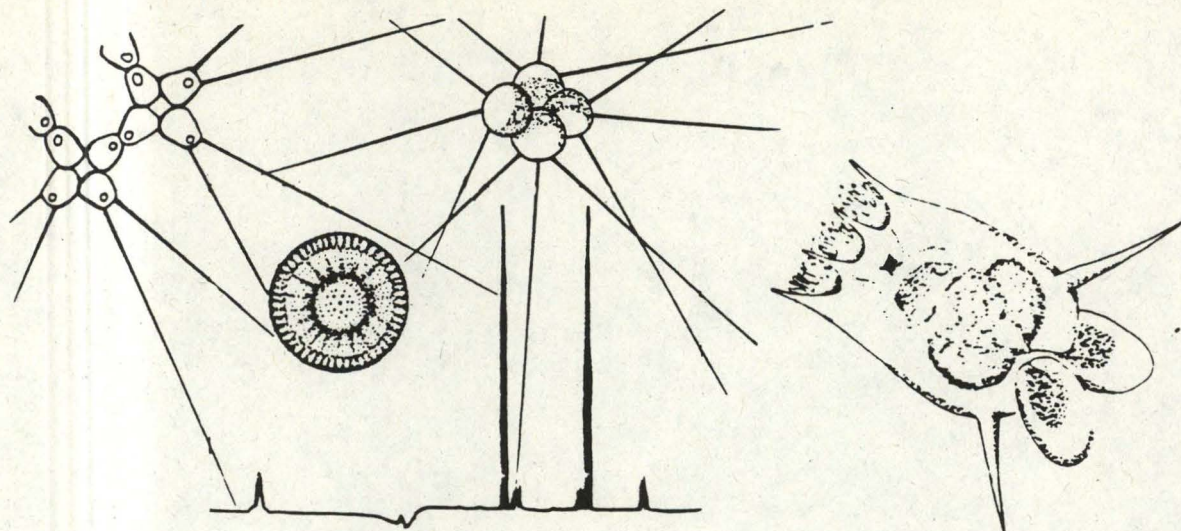
4.2. Intérêts de la C.L.H.P. en écologie

L'utilisation de matières organiques telles que les pigments en tant que biomarqueurs des communautés algales n'est pas neuve, et depuis peu, la C.L.H.P. ouvre la possibilité d'étude des relations trophiques, des flux de matières entre les producteurs primaires et secondaires (Quiblier *et al.*, 1991). Auparavant, comme le mentionnent Millie *et al.* (1993 a et b), les chercheurs disposaient des analyses par spectrométrie et fluorométrie de la chlorophylle basées sur les modifications spectrales du matériel avant et après acidification. Ce mode d'investigation apporte peu d'information hormis une idée assez générale de la biomasse algale en place.

La méthode classique de mesure de la biomasse algale, utilisée pour connaître la composition taxonomique du milieu, nécessite la concentration et la fixation de l'échantillon, et passe par le comptage, la mesure du biovolume et l'identification des algues au microscope optique (Gieskes et Kraay, 1983; Utermöhl, 1958). Cette méthode apporte beaucoup d'informations mais demande une grande compétence taxonomique et nécessite beaucoup de temps. Les résultats ainsi obtenus peuvent éventuellement varier d'un manipulateur à l'autre et n'apportent pas d'information sur l'état physiologique des organismes étudiés. Tous ces problèmes sont résolus de façon satisfaisante par la C.L.H.P (Millie *et al.*, 1993 a et b). En effet, la C.L.H.P. sépare les chlorophylles et leurs

produits de dégradation, ce qui rend possible l'examen des voies de dégradation des chlorophylles par sénescence mais surtout par prédation. La C.L.H.P. permet aussi la détection des caroténoïdes indécélabes par les techniques classiques et ouvre la voie à l'étude des successions dans les communautés algales de façon rapide et satisfaisante (Millie *et al.*, 1993 a et b).

Il faut cependant se méfier de toute interprétation hâtive en ce qui concerne les biomarqueurs. Le caractère spécifique de ceux-ci et leurs intérêts dans l'étude des transferts de matière peut s'avérer fragile si leur concentration n'est pas proportionnelle à la biomasse de manière plus ou moins constante au cours du temps (Bourdier, 1991).



Matériel et méthodes

II. MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre vous découvrirez nos motivations quant aux choix des outils et leurs évolutions au cours de l'avancement du travail.

Par celui-ci, nous espérons contribuer à l'utilisation des pigments comme traceurs dans l'étude des communautés phytoplanctoniques et de leur dynamique, notre finalité étant d'arriver à apprécier les liens existants entre le phytoplancton et le zooplancton dans des milieux tels que la haute Meuse.

Ce travail comprend une phase analytique de laboratoire consistant à exploiter au mieux un outil performant (CLHP) et finalement pouvoir évaluer la qualité des informations ainsi obtenues. Une deuxième phase dite de terrain réside en la récolte régulière du plancton mosan afin de pouvoir établir, dans ce milieu, des relations entre le profil pigmentaire et la composition du plancton.

En Meuse, les échantillons ont été prélevés à La Plante, en amont de Namur. Nous y étudierons le zooplancton, le phytoplancton, le « grazing » et la physico-chimie de base (température, oxygène dissous, pH, alcalinité, carbone organique total et transparence de l'eau).

1. Etude des communautés zooplanctoniques

Lors de chaque prélèvement, 15 l d'eau ont été récoltés à l'aide d'une bouteille de Van Dorn d'une capacité de 3 l et directement filtrés sur un filet de 35 ou 63 μm de vide de maille pour y concentrer le zooplancton. Après la remise en suspension du matériel se trouvant sur le filtre, dans un volume proche de 100 ml d'eau filtrée, nous le fixons au moyen de 0,4 % de solution de Lugol acide (Leakey *et al.*, 1994) dont les propriétés sont testées pour une identification et un comptage ultérieur par un chercheur (L. Viroux) du laboratoire.

1.1. Lugol acide (Leakey *et al.*, 1994).

Mise au point pour la fixation des ciliés, c'est une solution à pH 2,6 préparée par dissolution de 100g d'iodure de potassium dans un litre d'eau désionisée, complétée par 50 g d'iode en cristaux et de 100 ml d'acide acétique glacial.

2. Etude du phytoplancton.

Pour étudier le phytoplancton, 5 litres d'eau sont prélevés au moyen d'un bidon de 10 l en polyéthylène.

2.1. Etude microscopique selon Utermöhl (1958) des communautés phytoplanctoniques

Pour chaque prélèvement, 1 l d'eau est fixé par 2 ml de solution de Lugol et ensuite mis à décanter pour concentrer l'échantillon d'algues. La détermination et le comptage des algues sont l'objet du travail d'une autre personne du laboratoire (Y Hassani).

La conversion des estimations de densité en biomasse se fait par calcul des biovolumes de chaque taxon obtenu en multipliant le nombre d'individus du taxon par le biovolume individuel moyen. Ensuite, la biomasse est obtenue par conversion du biovolume en carbone par diverses équations (Smayda, 1978).

2.2. Estimation de la biomasse du phytoplancton par la chlorophylle *a* dite classique

Comme déjà mentionné antérieurement, le dosage de la chlorophylle *a*, présente chez toutes les algues, sert à évaluer la biomasse phytoplanctonique totale. Pour ce faire, lors de chaque prélèvement, trois fois 200 ml d'eau sont filtrés sur des filtres GF/C Whatman (diamètre : 2,5 cm, porosité : 1,2 µm) et subissent immédiatement l'extraction.

Selon la méthode de Péchar (1987), les filtres sont broyés dans 5 ml d'un mélange d'acétone et de méthanol dans un rapport 5/1. Après deux minutes à 65°C, les tubes à essais contenant l'extrait de chlorophylle, refroidi durant une quinzaine de minutes, sont prêts pour l'analyse spectrophotométrique.

Le dosage de la chlorophylle *a* active (Lorenzen, 1967) fait intervenir l'absorbance de la chlorophylle *a* à 665 nm avant et après acidification. La première mesure donne en réalité l'absorbance d'une solution contenant la chlorophylle *a* et les phaeopigments. L'acidification entraîne la perte du magnésium et permet la mesure de l'absorbance d'une solution ne contenant plus que des phaeopigments. Par différence, en faisant intervenir des facteurs de corrections, nous arrivons à estimer la quantité de chlorophylle *a* contenue dans l'échantillon. La formule est la suivante :

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/l)} = (D_b - D_a) * 2,439 * 11,89 * V_f / (v_s * d)$$

où D_b et D_a sont les absorbances avant et après acidification, V_f le volume d'eau filtrée (l), v_s le volume de solvant (ml) et d le parcours optique (cm).

L'extraction entraîne souvent une variabilité parfois assez grande dans l'estimation de la quantité de chlorophylle *a*.

La multiplication par un facteur 37 des valeurs de chlorophylle *a* transforme ces données en valeur de biomasse exprimée en carbone (Descy et Gosselain, 1994).

2.3. Etude de la composition phytoplanctonique par les pigments.

Lors de chaque échantillonnage, 3 * 250 ml sont filtrés sur filtres GF/C Whatman (diamètre : 2,5 cm; porosité : 1,2 µm). Les filtres sont ensuite immédiatement congelés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction, tout ceci en accord avec le protocole expérimental de Wright *et al.* (1991) et l'étude de la conservation des pigments à basse température (Redden *et al.*, 1991).

2.3.1. L'extraction des pigments

Elle se réalise à froid en accord avec le protocole de Wright *et al.* (1991) amélioré afin d'optimiser l'extraction des caroténoïdes sans altérer celle des chlorophylles (Downes *et al.*, 1993 et Webb *et al.*, 1992).



Fig. 14: Superposition des chromatogrammes d'un même échantillon sans ajout de 2 % d'ammonium acétate (.....) et avec (—). Vue sur les chlorophylles *a*.

Elle s'est d'abord réalisée dans 5 puis 2,5 ml d'acétone pure (acétone pour chromatographie, UCB). Au moyen d'un Potter, les filtres sont broyés dans l'acétone pendant 90 s. Le broyat est alors soniqué durant 30 s à une longueur d'onde de 6 microns. 4 h 00 après, le lysat biologique est séparé de l'extrait à travers un filtre Gelman Nylon acrodisc 13 de 0,45 µm de porosité. Durant l'extraction, nous avons toujours veillé à opérer à 4 °C et à l'abri de la lumière afin de prévenir la dégradation photochimique des pigments.

Par accident, vers la fin de notre étude, nous avons constaté que l'utilisation de 100 % d'acétone comme extractant conduit à une mauvaise extraction des chlorophyllides et des chlorophylles *c*. Il semblerait que l'adjonction d'un mélange d'eau et d'ammonium acétate pourrait pallier cette lacune.

Juste avant l'injection, l'extrait est ramené à 90 % du volume avec de l'eau bidistillée et additionné de 2 % d'ammonium acétate à 0,5 M. Ces opérations augmentent l'affinité des pigments pour la colonne ainsi que

leur résolution (*Fig. 14*). L'ammonium acétate, molécule comprenant une extrémité polaire et l'autre apolaire, diminue la polarité de molécules plus polaires qui peuvent alors « s'accrocher » à la phase solide plutôt que d'être emportées par les solvants plus polaires de la phase liquide.

2.3.2. L'analyse en C.L.H.P.

Nous avons choisi la colonne Nova-Pak C₁₈ (Dim. : 4,6 * 250 mm; taille des particules : 4 µm; porosité : 60 Å) de chez Waters pour la meilleure séparation qu'elle offrait par rapport à la Pico-Tag de la même société, notamment dans la résolution de la lutéine et de la zéaxanthine, dans la zone des chlorophylles *a* et *b* et celle des néoxanthines (*Fig. 15*).

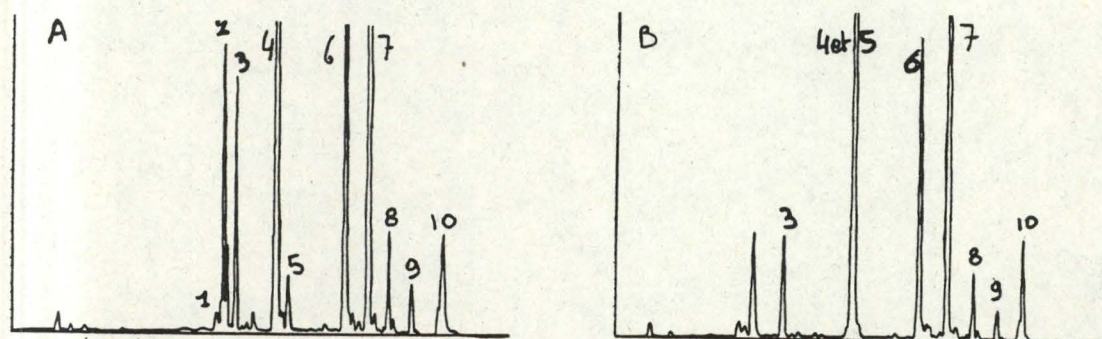


Fig. 15: Comparaison de chromatogrammes obtenus avec le même échantillon sur une Nova-Pak (a) et sur une Pico-Tag (b). 1 : trans-néoxanthine, 2 : cis-néoxanthine, 3 : anthéroxanthine, 4 : lutéine, 5 : zéaxanthine, 6 : chlorophylle *b*, 7 : chlorophylle *a*, 8 & 9 : phaeophytine *b* et *a*, 10 : carotènes.

Les analyses ont été faites sur du matériel Waters. Il se compose du « Multisolvant Delivery System Waters 600 » à injecteur manuel et de deux détecteurs disposés en série : un détecteur UV / visible « Tunable Absorbance Detector Waters 486 » branché sur 436 nm et un « Scanning Fluorescence Detector Waters 470 » émettant à une longueur d'onde de 420 nm pour une détection à 650 nm, longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des porphyrines.

La gestion du système et des données est réalisée à travers le logiciel Millennium 2010 version 2.0 de Waters.

2.3.3. Le gradient

Nous avons choisi de travailler avec le gradient ternaire mis au point par Wright *et al.* (1991). Contrairement à d'autres gradients, tous binaires ou isocratiques (Bidigare *et al.*, 1985; Bowles *et al.*, 1985; Canjura et Schwartz, 1991; Chen et Chen, 1991; Craft, 1992; Francis, 1992; Mantoura et Llewellyn, 1983;

Sartory, 1985; Shioi, 1991), et trop spécifiques des caroténoïdes ou des chlorophylles, ce gradient a l'avantage d'être efficace pour les deux types de structures et de permettre la séparation de la lutéine et de la zéaxanthine, deux marqueurs hautement spécifiques et non séparés par les autres méthodes (Mantoura et Llewellyn., 1983; Bidigare *et al.*, 1985; Welshmeyer et Lorenzen, 1991; Quiblier-Lloberas, 1994). Cependant une perturbation inhérente au système, gênante dans le chromatogramme, affecte sérieusement la détection, l'identification et la quantification des chlorophylles *c* et de la péridinine. En effet, nous observons systématiquement dans cette zone une chute de potentiel en absorbance. Elle est la manifestation du passage d'une solution saline aqueuse vers une solution organique et non saline. Tous nos solvants sont « UV cut off » et d'une pureté chromatographique (ALLTECH) Le gradient originel est le suivant (*tableau 3*) :

<i>temps(min.)</i>	<i>solvant A</i>	<i>solvant B</i>	<i>solvant C</i>	<i>Gradient</i>	<i>débit (ml/min.)</i>
0.00	100%	0%	0%		1
4.00	0%	100%	0%	linéaire	1
18.00	0%	20%	80%	linéaire	1
21.00	0%	100%	0%	linéaire	1
24.00	100%	0%	0%	linéaire	1
26.00	100%	0%	0%	linéaire	1

Tableau 3 : Gradient de Wrigth *et al.*(1991).

- Solvant A : Solution 80:20 vv de méthanol : ammonium acétate (pureté de 98% chez Sigma) 0,5 M (pH 7,2).
- Solvant B : Solution 90:10 vv d'acétonitrile : eau bidistillée.
- Solvant C : acétate d'éthyle pure.

Pour des raisons inhérentes à la reproductibilité dans la préparation des solvants, c'est à dire finalement dans celle du chromatogramme, nous avons modifié le gradient. Il s'est avéré que ces changements (*tableau 4*) n'affectaient en rien la résolution des pigments. Au contraire, la réduction de la chute de potentiel et le déplacement de l'ensemble du chromatogramme vers la gauche permet une meilleure résolution des chlorophylles *c*. Par contre, rien n'est amélioré pour la péridinine. Le nouveau gradient se compose de :

- Solvant A : méthanol 100 %
- Solvant B : acétonitrile 100 %
- Solvant C : éthyle acétate 100 %
- Solvant D : Solution aqueuse d'ammonium acétate 0,5 M (pH : 7,2)

Temps (min.)	solvant A	solvant B	solvant C	solvant D	Gradient	débit (ml/min.)
0.00	80%	0%	0%	20%		1
4.00	0%	90%	0%	10%	linéaire	1
18.00	0%	18%	80%	2%	linéaire	1
21.00	0%	90%	0%	10%	linéaire	1
24.00	80%	0%	0%	20%	linéaire	1
26.00	80%	0%	0%	20%	linéaire	1

Tableau 4 : Gradient modifié par nos soins.

2.3.4. L'identification des pigments

L'identification des pigments a été réalisée aux moyens de cultures monospécifiques d'algues dont la composition pigmentaire est relativement bien connue (Fig.16).

- *Dictyosphaerium ehrenbergianum*. (NÄG.) - Algue verte.
- *Planktothrix agardhii*. (GOM.) - Cyanobactérie.
- *Cyclotella meneghiniana*. (KÜTZING) - Diatomée.
- *Cryptomonas ovata* var. *palustris*. (EHRENBERG) - Cryptophycée.

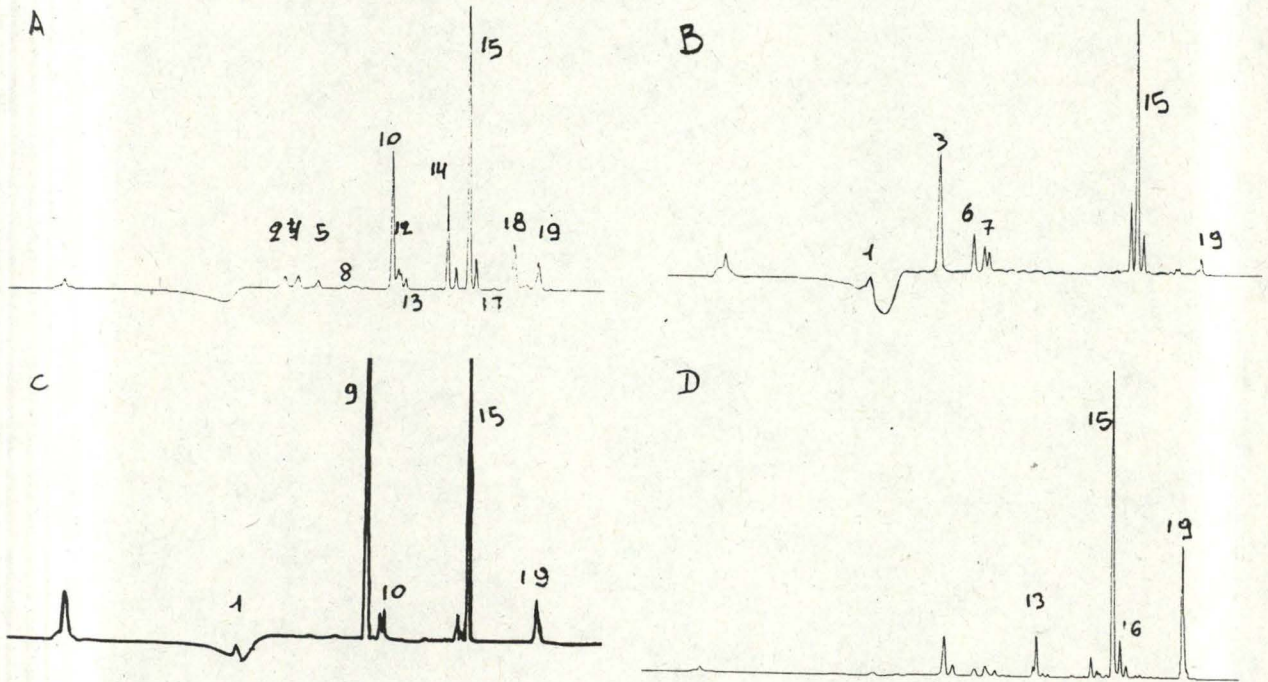


Fig. 16: Profils pigmentaires des algues standards. (A) algue verte *Dictyosphaerium* sp., (B) diatomée *Cyclotella* sp., (C) Cryptophycée *Cryptomonas* sp. et (D) Cyanophycée *Planktothrix* sp.. 1 : chlorophylle *c*; 2 : cis-néoxanthine; 3 : fucoxanthine; 4 : trans-néoxanthine; 5 : violaxanthine; 6 : cis-fucoxanthine; 7 : diadinoxanthine; 8 : anthéroxanthine; 9 : alloxanthine; 10 : monadinoxanthine; 11 : lutéine; 12 : lutéine « like »; 13 : zéaxanthine; 14 : chlorophylles *b*, allomère, native et épimère; 15 : chlorophylles *a* allomère, native et épimère; 16 : échinénone; 17 : phaeophytine *b*; 18 : phaeophytine *a*; 19 : carotènes.

Au laboratoire de Biochimie (Prof. Remacle), au moyen d'un détecteur à barrette de diode (HP 900), nous avons pu obtenir le spectre de chaque pigment grâce aux maxima d'absorption données par Wright *et al.* (1991). Ainsi, nous avons pu identifier les principaux pigments (Fig.17) de chaque culture standard et noter leur temps de rétention.

Pour les autres pigments, nous nous sommes basés sur une relation entre les temps de rétentions obtenus par Wright *et al.* (1991) (Rt_W) et les nôtres (Rt_N voir « processing method » en annexe). Cette relation linéaire corrélée à 99,9 % répond à l'équation suivante :

$$Rt_N = (Rt_W + 2,53) / 0,94$$

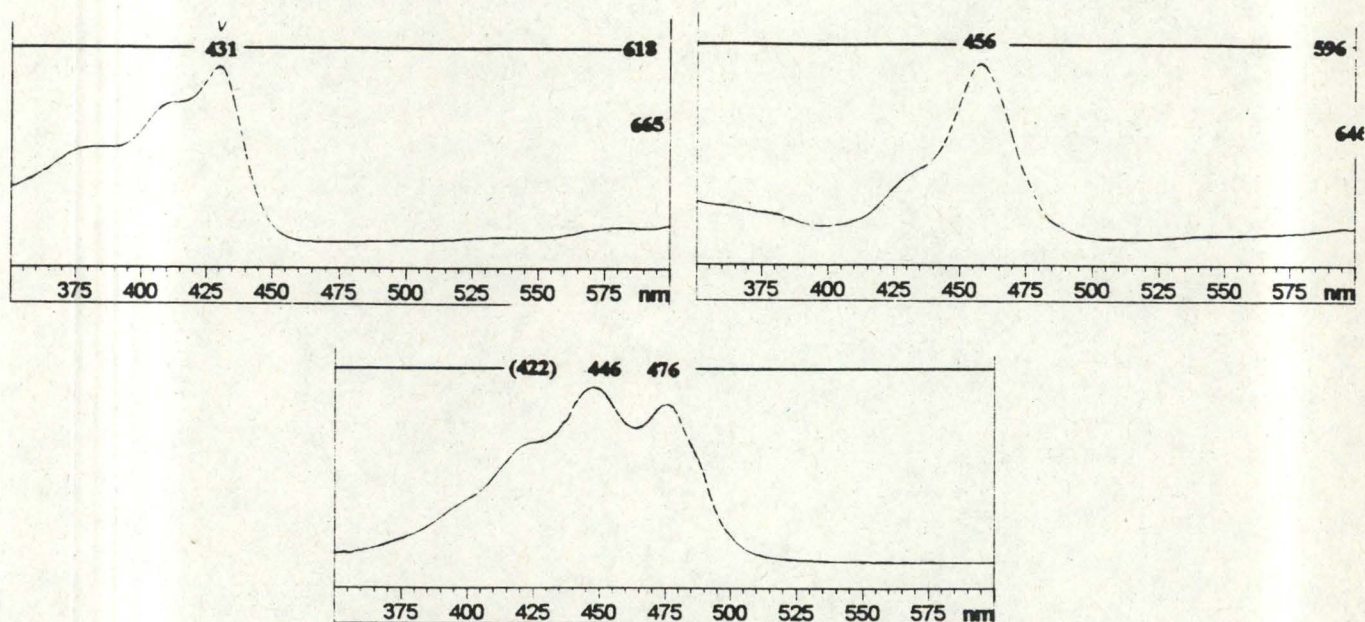


Fig.17 : Quelques spectres obtenus avec le HP 900 comparés aux valeurs obtenues par Wright *et al.* (1991). De gauche à droite : chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et lutéine.

2.3.5 La quantification en absorbance

Le principe de la quantification est basé sur l'utilisation de standards externes. Nous ne disposons malheureusement pas de standards pour tous les pigments : seuls la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* et le β -carotène sont disponibles chez Sigma. Dans les premiers temps de l'étude, chaque journée d'analyse, des standards de chlorophylle *a* ont été injectés et une courbe de calibration a été construite (voir « processing method » en annexe). Nous avons constaté une constance de la réponse à un même lot de standard au cours du temps, ce qui nous a poussé à n'injecter qu'une seule concentration de standard par journée d'analyse pour

vérifier l'absence de changements dans la réponse du détecteur. Nous forçons la courbe de calibration à passer par zéro. La quantification des autres pigments fait appel à un artifice proposé par Mantoura et Llewellyn (1983). Par extension de la loi de Beer-Lambert, sur base des coefficients d'extinction spécifiques proposés par ces mêmes auteurs, et d'une vérification sur la chlorophylle *b*, il devient possible à partir de la courbe de calibration de la chlorophylle *a* de calculer la quantité détectée des autres pigments. La formule proposée par Mantoura et Llewellyn (1983) est la suivante :

$$Q_P = (A_P * \Delta * D) / E_P$$

où Q_P est la concentration en pigment, A_P la réponse du pic (la surface), Δ la longueur d'onde de détection, D le débit du solvant et E_P le coefficient d'extinction spécifique du pigment à 440 nm.

Ce qui peut s'écrire :

$$\Leftrightarrow (Q_P * E_P) / A_P = \Delta * D = (Q_{P'} * E_{P'}) / A_{P'}$$

$$\Leftrightarrow Q_P = Q_{P'} * (E_{P'} / E_P) * (A_P / A_{P'})$$

Or, la courbe de calibration de P' , par exemple celle de la chlorophylle *a* répond à une équation de type :

$$Q_{P'} = a * A_{P'} + 0 \quad (\text{où « a » est le coefficient angulaire de la droite de calibration})$$

$$\Leftrightarrow Q_P = a * (E_{P'} / E_P) * A_P$$

En faisant intervenir la courbe de chlorophylle *a* nous prenons en considération d'éventuelles dégradations de la réponse, par exemple suite au vieillissement de la lampe du détecteur. Le *tableau 5* donne les rapports des coefficients d'extinction spécifiques entre chaque pigment et la chlorophylle *a*.

Pigment	$E_{P'} / E_P$	Pigment	$E_{P'} / E_P$	Pigment	$E_{P'} / E_P$
chlorophyllide <i>b</i>	0,805	alloxanthine	0,548	chlorophylle <i>a</i> épi.	1,000
chlorophyllide <i>a</i>	1,000	lutéine	0,287	échinénone	0,365
chlorophylle <i>c</i>	0,199	lutéine « like »	0,287	phaeophythine <i>b</i>	0,822
9'-trans-néoxanthine	0,269	zeaxanthine	0,548	phaeophythine <i>b</i> épi.	0,822
fucoxanthine	0,676	chlorophylle <i>b</i> allo.	0,805	phaeophythine <i>a</i>	0,964
9'-cis-néoxanthine	0,269	chlorophylle <i>b</i>	0,805	phaeophythine <i>a</i> épi.	0,964
violaxanthine	0,269	chlorophylle <i>b</i> épi.	0,805	$\beta\epsilon$ -carotène	0,311
9'-cis-fucoxanthine	0,676	chlorophylle <i>a</i> allo.	1,000	$\beta\beta$ -carotène	0,311
diadinoxanthine	0,295	chlorophylle <i>a</i>	1,000		

Tableau 5 : Rapports des coefficients d'extinction spécifiques entre chaque pigment identifié et la chlorophylle *a*.

2.3.6. La quantification en fluorescence

La fluorescence n'a pas fait l'objet de quantification sérieuse, sauf envers la chlorophylle *a*, faute de standards pour les autres substances de nature chlorophyllienne. Il faut noter que les caroténoïdes n'émettent pas de fluorescence. Ce détecteur est néanmoins très intéressant car il est très sensible et répond à de très faibles concentrations en substance; il est ainsi le détecteur de prédilection pour l'évaluation des processus

physiologiques et trophiques affectant les algues. En effet, les chlorophyllides, les phaeophorbides et phaeophytines sont ici très bien mises en évidence, contrairement à l'absorption à 436 nm. Hélas, le manque de standards commerciaux et de formules de calcul à partir de la chlorophylle *a*, rend leur analyse impossible pour le moment. Il est possible de les synthétiser à partir de leur chlorophylle correspondante, mais faute de temps, nous avons laissé ce problème en suspens.

2.3.7. Méthode de travail et analyse des chromatogrammes

Lors de chaque série d'analyse, nous préparons suffisamment de solvant pour la totalité des échantillons. Nous commençons par vérifier, à l'aide des extraits de culture monospécifique, les temps de rétention de chaque pigment et nous établissons ensuite la courbe de calibration de la chlorophylle *a* à l'aide de ces standards. Nous pouvons alors commencer l'injection des échantillons en y insérant de façon régulière (tous les jours) les standards ayant servi à construire la droite d'étalonnage.

Certains pigments séparés par C.L.H.P. ne sont que des formes légèrement modifiées suite aux manipulations des pigments plus classiques. C'est le cas des formes allomère et épimère des chlorophylles au sens large, des stéréoisomères *cis/trans* des caroténoïdes et de molécules nommées xanthophylle « like » qui possèdent exactement les mêmes propriétés spectrales que les xanthophylles en question. Nous avons décidé, en accord avec l'article de Shioi (1991), de considérer les formes dérivées d'un même pigment comme n'en faisant qu'un. Ainsi nous avons systématiquement regroupé et sommé la fucoxanthine avec la 9'-*cis*-fucoxanthine, la 9'-*trans*-néoxanthine avec la 9'-*cis*-néoxanthine, la lutéine avec la lutéine « like », les chlorophylles avec leurs formes épimère et allomère respectives, et enfin les phaeophytines avec leur forme épimère.

3. Mesure du « grazing »

La mesure du grazing *in situ* doit permettre de quantifier l'impact trophique du zooplancton sur le phytoplancton. Nous avons estimé cet impact à l'aide de deux méthodes différentes. L'une d'elles est indirecte et inspirée de la méthode par dilution de Landry et Hassett (1982). En collaboration avec d'autres personnes du laboratoire d'écologie, nous avons utilisé la méthode de Haney (1971, 1973). Nous comparerons les résultats obtenus par les deux méthodes sachant bien que la première n'évalue que la pression exercée par le micro- et mésozooplancton, dont font partie les rotifères, alors que la deuxième concerne surtout le méso- et macrozooplancton, c'est à dire les rotifères et les crustacés.

La méthode de Haney ne permet d'effectuer que des mesures d'ingestion à court terme vu la nécessité d'adopter un temps d'incubation inférieur au temps de transit des algues dans le système digestif des animaux. Elle est très sensible grâce au carbone 14, mais elle a l'inconvénient de baser ses mesures sur l'ingestion d'un type de cellule algale, de taille réduite (4µm de diamètre), qui ne représente pas tout le spectre alimentaire du zooplancton.

La méthode par dilution permet des mesures à long terme grâce à des temps d'incubation beaucoup plus longs. Elle évalue l'impact du zooplancton sur les différents groupes algaux présents dans le milieu naturel grâce au dosage de leurs pigments marqueurs détectés par C.L.H.P. Elle est donc à priori prometteuse pour la quantification du broutage sur les différents groupes algaux constituant la communauté naturelle.

3.1. Méthode de Haney



Fig.18: Chambre de Haney. Inoculation des algues dans le réservoir *ad hoc*.

Les mesures réalisées par cette méthode nécessitent l'isolement temporaire du milieu naturel, contenant le plancton présent, dans une chambre de Haney modifiée (Fig. 18) et l'introduction dans ce milieu d'algues marquées au C^{14} utilisées comme traceurs de la consommation du zooplancton. Cette technique permet en principe de mesurer le taux de « grazing » par la communauté zooplanctonique totale, mais aussi la contribution de chaque groupe à ce phénomène. Cette méthode nécessite le marquage d'algues issues de cultures monospécifiques et leur conditionnement pour l'incubation.

Pour ce faire, une culture de *Dictyosphaerium ehrenbergianum* est lancée quelques jours avant la date prévue de l'expérience (4 ou 5 jours avant marquage) et maintenue en conditions de température et de photopériode contrôlées (21-22°C; 16 heures de lumière). Nous obtenons ainsi, le jour de l'expérience, une culture en phase exponentielle de croissance et suffisamment dense, idéalement quelques millions de cellules par ml. Entre 24 et 48 heures avant l'expérience, la culture est marquée au ^{14}C par injection de 250 µCi de $NaH^{14}CO_3$ dans 250 à 500 ml de culture selon les besoins. Celle-ci est reliée à un erlenmeyer contenant du KOH, qui fixe le CO_2 marqué provenant de la respiration des algues.

Les algues sont rincées par centrifugations successives et concentrées. Une lecture à la cellule de Bürker ou une évaluation de la densité de la culture par la D.O. à 680 nm permet de déterminer le volume de suspension algale nécessaire à la préparation des pots, sachant que nous souhaitons utiliser les algues marquées dans une proportion ne dépassant pas 10% de la biomasse présente dans le milieu, et considérant un contenu algal en C de 4 pg par cellule. La biomasse présente est estimée par une mesure préalable de chlorophylle *a*. Du milieu frais est ajouté aux suspensions algales de manière à atteindre un volume final de 15 ml. Ces pots sont conservés, emballés dans de l'aluminium, au frigo jusqu'au moment de l'expérience.

La bouteille de Haney, d'un volume de 6,5 l, par la fermeture commandée de deux clapets, emprisonne une portion de la colonne d'eau. Au même moment, la chambre contenant les algues marquées s'ouvre et disperse le marqueur dans le volume de la bouteille.

Après environ 7 à 10 minutes d'incubation, le contenu de la chambre est filtré sur un filet de 35 ou 65 µm de vide de maille (ce qui permet de recueillir l'essentiel du zooplancton). Les animaux, sont endormis avec de l'eau gazeuse pour éviter tout stress pouvant provoquer la régurgitation du contenu intestinal. Cette suspension contenant le zooplancton est filtrée sur GF/C de 25 mm de diamètre et ensuite rincée. Le filtre est déposé dans le fond d'une fiole à scintillation de 20 ml qui est immédiatement plongée dans de l'azote liquide puis transférée au congélateur. C'est la méthode la plus efficace pour éviter toute évolution ultérieure du matériel. A la fin de chaque incubation, 10 ml de milieu filtré sont prélevés et serviront à la mesure de l'activité des algues. 2 ml de la suspension de départ sont également prélevés par mesure de sécurité afin de pouvoir éventuellement retrouver, par calcul, la valeur d'activité des algues dans le milieu.

De retour au laboratoire, les fioles contenant les filtres sont décongelées puis additionnées d'1 ml de Lumasolve®. Après une incubation de 3 heures à 50°C, 300 µl d'HAc puis 15 ml de liquide scintillant sont ajoutés avant lecture au compteur à scintillation Beckman LS 6000 SC. Plusieurs lectures ont été réalisées à intervalles de temps espacés jusqu'à obtenir des valeurs de chimioluminescence satisfaisantes (< 1%) et pour permettre l'atténuation de la coloration du cocktail ne permettant pas, dans un premier temps, la lecture de certains échantillons.

Le **taux de filtration (F)** correspond au volume filtré par heure pour l'ensemble du zooplancton piégé. Il s'exprime selon la formule générale :

$$F = \frac{\text{Activité du Zooplancton (dpm)}}{\text{Activité du Phytoplancton (dpm / ml)}} \times \frac{1}{\text{Temps d'incubation (h)}}$$

Le **taux de grazing (G)** est exprimé en % . jour⁻¹ et correspond au pourcentage du volume d'eau filtrée sur 24 heures. Il est calculé pour l'ensemble de la communauté isolée dans la chambre de Haney.

$$G = \left(\frac{F}{\text{Volume de la bouteille de Haney (6500ml)}} \times 24 \right) \times 100$$

3.2. La mesure de grazing par dilution

Rappelons que cette méthode, déjà évoquée plus haut, permet d'évaluer la variation de la biomasse algale sur vingt-quatre heures après dilution du milieu dans de l'eau préalablement filtrée (Landry et Hassett, 1982). Le modèle utilisé postule que la croissance du phytoplancton est le résultat de sa croissance nette diminuée du « grazing » :

$$P_t = P_o e^{(K-G) \cdot t} \text{ ou } K - G = 1/t \ln (P_t / P_o) = \text{le taux de croissance apparent}$$

« P_t et P_o », sont les densités algales aux temps t et zéro d'incubation, « K » est le taux de croissance net ou spécifique du phytoplancton, et « G » est le taux de « grazing ».

En diluant le milieu naturel, on réduit la probabilité de rencontre entre la proie et son prédateur, c'est à dire la pression de grazing.

L'application de cette méthode (voir synthèse bibliographique) fera l'objet d'une évolution constante au cours de l'étude. Pour la mise en oeuvre de la manipulation, il a tout d'abord fallu construire un incubateur transparent, capable de maintenir une série de flacons transparents à une profondeur adéquate et d'y assurer une agitation suffisante pour éviter une concentration du matériel biologique par sédimentation dans le fond des flacons, ce qui aurait pour conséquence l'annulation de l'effet de dilution. Nous avons pensé et repensé un système qui au terme du travail ressemble à ceci (*Fig. 19*) :

C'est un cadre d'un mètre carré, solide, en aluminium (léger et inoxydable) dont l'arête supérieure est maintenue en surface à l'aide de deux flotteurs. Un bac de Plexiglas contenant six flacons de culture en matière synthétique de 750 ml (Falcon) est fixé à un axe dans le bas du cadre. Cet axe est mis en rotation par une hélice de ventilateur de plus ou moins 30 cm de diamètre par la seule force du courant. L'incubateur est fixé entre deux berges au moyen d'une corde. Une plaque en Plexiglas fixée dans la partie supérieure du cadre fait office de quille.

Le plus régulièrement possible, nous avons tenté d'optimiser la mesure du broutage par cette méthode.

Lors de chaque campagne, nous avons recueilli 20 l d'eau du milieu au moyen de bidons de polyéthylène d'une capacité de 10 l. Au laboratoire, nous avons filtré l'intégralité des 20 l sur des filtres GF/C Whatman

(diam : 4,5 mm; porosité : 1,2 μm) afin d'en extraire la fraction planctonique. L'eau est alors stockée dans des bidons semblables propres, lavés à l'acide chromique et abondamment rincés à l'eau distillée.

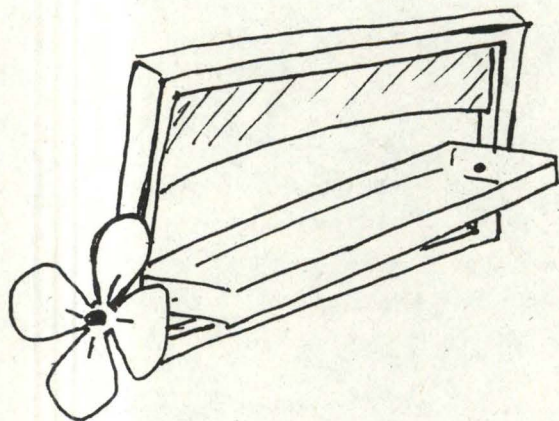


Fig 19: Incubateur définitif utilisé pour nos mesures.

Avec le temps, nous sommes descendus d'une dilution minimale de 10 % d'eau non filtrée vers 3 % afin de sortir de la zone de saturation en aliment du zooplancton. Pour les fortes densités de zooplancton, nous avons choisi de travailler à des volumes relatifs de 3, 5, 8, 10, 15, 20 % d'eau non filtrée. Les incubateurs contenant les flacons de milieu dilué sont laissés 24 h juste sous la surface. Après avoir sorti les incubateurs, nous filtrons le contenu des flacons pour une analyse pigmentaire en C.L.H.P. selon le protocole expérimental déjà décrit plus haut.

Pour chaque dilution, nous calculerons la concentration de chaque pigment au temps zéro à partir des aliquotes réservés à cet effet. En appliquant la formule citée plus haut, nous pouvons évaluer le taux de croissance apparent sur chaque pigment. Un graphique du taux de croissance apparent en fonction de la dilution, de la portion d'eau non filtrée, permet de visualiser et de calculer par régression le taux de broutage sur chaque groupe algal.

De retour sur la berge, un échantillon d'eau est prélevé à l'aide de la bouteille de Van Dorn et passé sur un filet de 300 μm de vide de maille afin d'en écarter les crustacés. Nous réservons 3 * 250 ml pour la mesure de la concentration pigmentaire au temps zéro. Ce volume sera traité comme les échantillons de l'analyse des communautés phytoplanctoniques par C.L.H.P.. Le plus rapidement possible, nous réalisons les dilutions du milieu prélevé. Nous avons d'abord réalisé une dilution par flacon, ensuite, afin de réduire la variabilité entre les lots d'une même dilution, nous avons réalisé une seule dilution pour les trois flacons d'un même lot.

4. Mesures physico-chimique

Les paramètres physico-chimiques courants ont été autant que possible mesurés lors de chaque échantillonnage.

- La mesure du pH a été réalisée au moyen d'un pH-mètre de terrain (WTW pH95 d'une précision au centième d'unité). L'appareil est étalonné avant chaque mesure au moyen de standards de pH 7 et 10 (Reagecon). Sur le terrain l'électrode est plongée dans l'eau jusqu'à l'obtention d'une valeur stable.

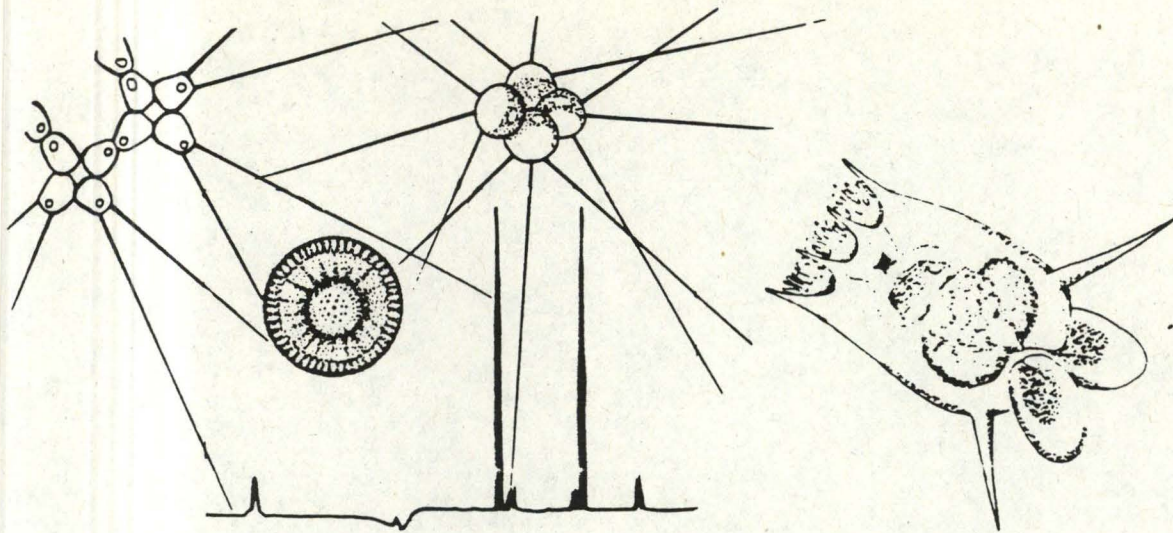
- La mesure de la conductivité évalue la minéralisation total de l'eau. L'électrode du conductivimètre de terrain (WTW LF 91, précision au $\mu\text{S}/\text{cm}$) est plongée dans l'eau jusqu'à l'obtention d'une valeur stable.

- La mesure de l'oxygène dissous a été réalisée avec un oxymètre de terrain (WTW OXI 91, précision au dixième de mg/l) étalonné à l'air humide avant la mesure. La température de l'eau est également obtenue à l'aide de cet appareil.

- Les données de débit nous ont été fournies par la station de captage de Tailfer située en amont de notre station de mesure.

- Les données d'irradiance au sol nous sont fournies par l'IRM. Sur le terrain, nous avons mesuré le coefficient d'extinction de la lumière dans l'eau à l'aide de photocellules rouge, verte et bleue plongées à différentes profondeurs. Ceci nous permet d'évaluer par calcul, l'intensité moyenne de la lumière dans la colonne d'eau.

- Nous avons réalisé une mesure du carbone organique particulaire (C.O.P), obtenue en filtrant 3*250 ml d'eau sur GF/C Whatman préalablement grillé à 500°C, et en passant les filtres séchés à l'étuve dans un « Carbon-Nitrogen Analyser » (Carlo Erba). Ces données nous permettront de calculer le carbone algal qui constitue une fraction souvent dominante du COP.



Résultats et discussion

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Conditions physico-chimiques

L'ensemble des données physico-chimiques acquises est présenté en annexe 1 (*tableau 1 annexe 1*). Nous ne retenons ici que les paramètres influençant directement le développement du plancton dans le fleuve : les *figures 20 et 21* présentent leur évolution au cours de la période d'échantillonnage, du 23 mars au 22 septembre. Peu de commentaires sont à faire sur ces variables, sinon que les conditions de débit, de température et de lumière ont évolué de façon régulière et sont devenues favorables à la croissance du phytoplancton dès la fin avril. Notons de plus que les concentrations en nutriments (N, P, Si) ont été mesurées par ailleurs et qu'elles sont en tout temps largement saturantes pour la croissance algale.

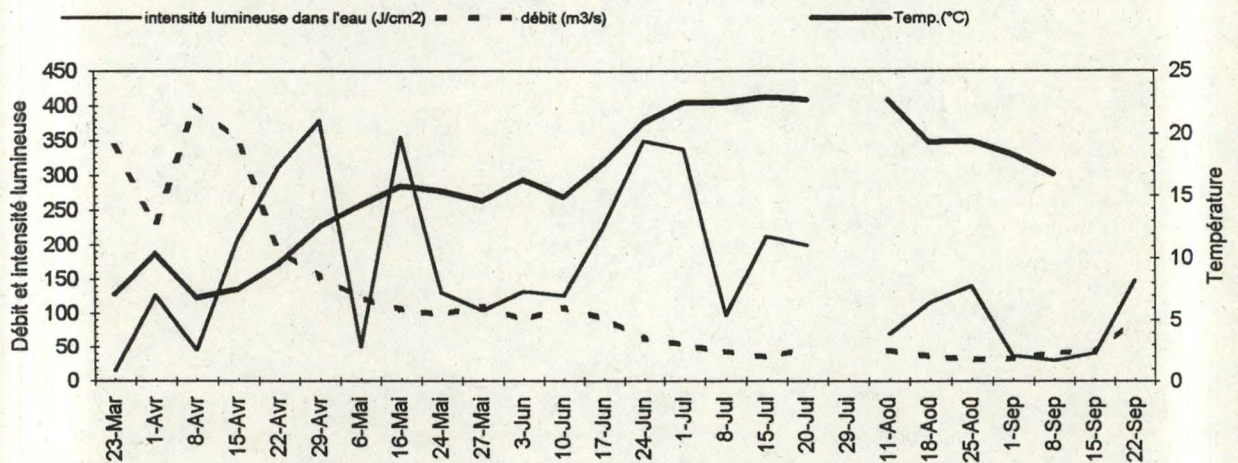


Fig. 20 : Evolution des caractéristiques physico-chimiques en Haute Meuse influençant directement le développement du plancton.

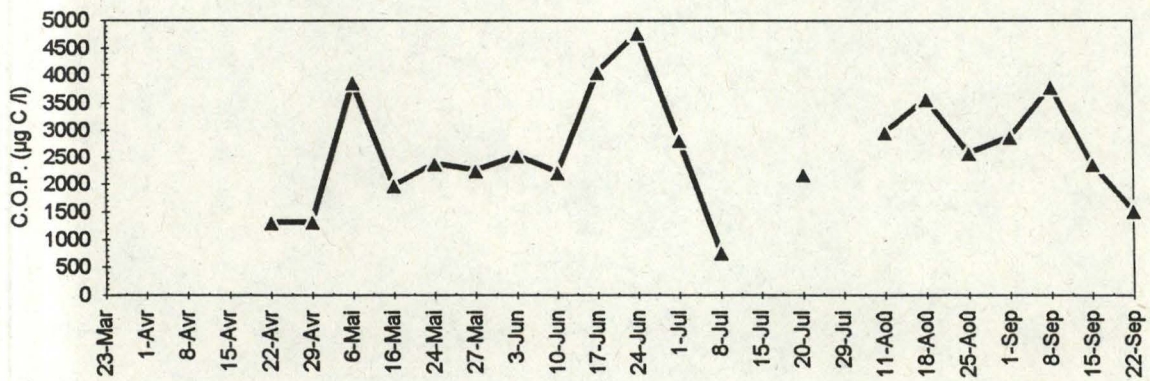


Fig. 21 : Evolution du carbone organique particulaire en Haute Meuse

Enfin, la *fig. 21* montre la variation du carbone organique particulaire au cours de la période d'étude: son intérêt réside dans le fait que la biomasse algale en constitue une partie majeure dans un fleuve comme la Meuse (voir notamment Descy & Gosselain, 1994). Il peut donc servir de référence aux estimations de biomasse phytoplanctonique réalisées d'après différentes méthodes (voir ci-dessous).

2. Evolution de la composition et de la biomasse phytoplanctonique

2.1 Evolution de la composition

Les profils des *fig. 22* et *23* ont été obtenus par examen microscopique d'échantillons d'algues, comptage des cellules et détermination de leur biovolume, suivant des méthodes classiques. Les conversions en biomasse ont été effectuées à l'aide de différentes équations de la littérature (Sournia, 1978). Ces formules permettent la transformation du biovolume total de chaque groupe algal en biomasse exprimée en carbone. Comme certaines d'entre elles fournissaient des valeurs supérieures au carbone organique particulaire, nous avons finalement adopté la formule de Taguchi (1976 in Smayda, 1978) pour les diatomées et celle de Strathman (1967 in Smayda, 1978) pour les autres algues. Les valeurs des biomasses des différentes catégories d'algues ainsi obtenues sont données en annexe 2.

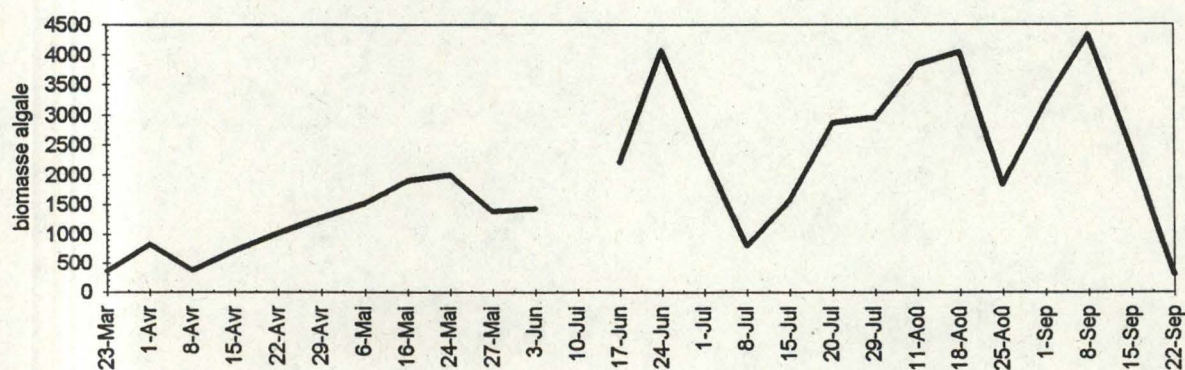


Fig. 22 : Evolution de la biomasse algale totale (en µg C/l) en Haute Meuse, 1994.

L'évolution du phytoplancton mosan en 1994 est assez typique par rapport aux études antérieures, synthétisées récemment par Gosselain *et al.* (1994). On notera en particulier, tout au long de la période, la dominance des diatomées avec une succession de différentes espèces que nous ne détaillerons pas. Cependant, il est utile de mentionner que les populations de printemps et de début d'été sont formées de Centriques unicellulaires d'un diamètre compris entre 5 et 20 µm. Par contre, après la baisse de biomasse du 8 juillet, des diatomées Centriques de plus grande taille constituent l'essentiel du peuplement : il s'agit en particulier d'espèces filamenteuse du genre *Aulacoseira*. Les algues vertes (Chlorococcales essentiellement) sont le

deuxième groupe algal par ordre d'importance, avec un développement significatif en été, principalement d'espèces coloniales. Des espèces flagellées de la classe des Cryptophycées sont remarquées régulièrement, mais toujours en densité faible : le fait qu'elles atteignent parfois une biomasse significative est dû à la croissance d'espèces de grande taille du genre *Cryptomonas*. Il en va de même pour les Dinophycées (non représentées sur le graphique), qui sont cependant encore plus sporadiques. Enfin, les Cyanobactéries se manifestent uniquement en fin d'été par des formes filamenteuses des genres *Planktothrix* et *Limnothrix*, mais leur biomasse reste très faible par rapport aux diatomées par exemple. On peut penser que les conditions de faible débit et de température élevée favorisent leur développement.

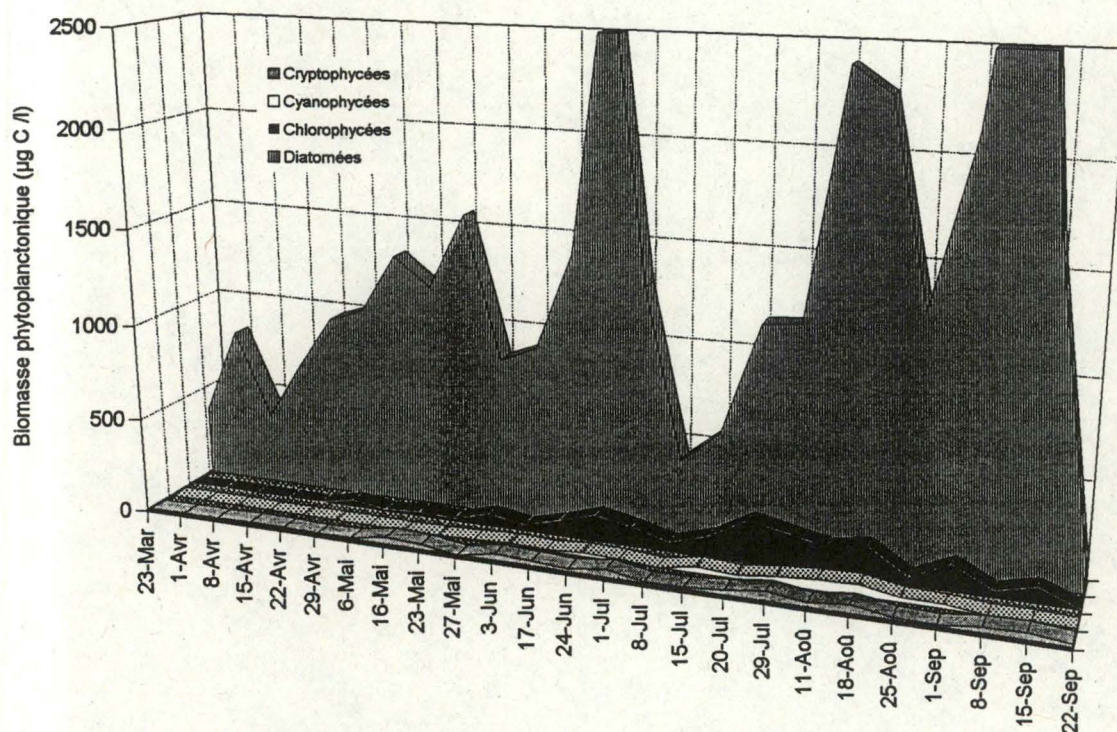


Fig. 23 : Evolution de la composition phytoplanctonique en 1994 dans la Meuse à La Plante (haute Meuse)

2.2 Evolution de la biomasse totale évaluée d'après la chlorophylle *a*

La comparaison des profils de la chlorophylle *a* dosé par la méthode spectrophotométrique et en C.L.H.P. montre qu'il existe une grande discordance entre les deux valeurs pour certaines dates (fig. 24).

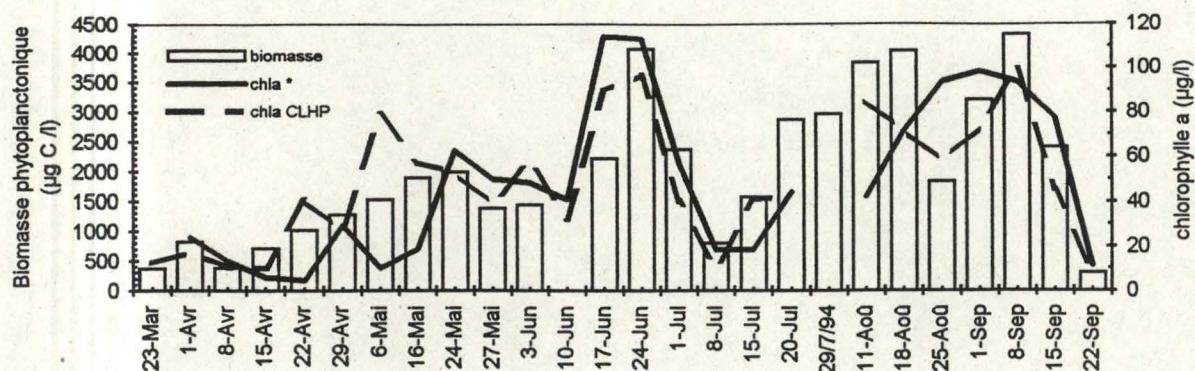


Fig. 24 : Evolution, en haute Meuse, de la chlorophylle a dosée par C.L.H.P. (chl a CLHP) et par la méthode spectrophotométrique (chl a*) superposé à la biomasse phytoplanctonique (biomasse).

Le profil obtenu en chromatographie se calquant mieux sur celui de la biomasse calculée par comptage, nous pouvons conclure que des erreurs se sont glissées dans les dosages par la méthode spectrophotométrique. Ceci étant dit, la chlorophylle a dosée en C.L.H.P sera la seule prise en considération dans la suite des interprétations. Comme Millie *et al.* (1993a, b) le mentionnent, les méthodes de dosage de la chlorophylle a par des méthodes spectrophotométriques simples semblent surestimer la concentration de cette dernière par interférence avec les autres chlorophylles et les caroténoïdes.

2.3. Relation C.O.P. : chlorophylle a

Le rapport carbone : chlorophylle a permet de convertir la quantité de chlorophylle a en biomasse algale exprimée en carbone. Ce rapport, en haute Meuse, est typiquement proche de 40 (Descy et Gosselain, 1994). L'ensemble des données de chlorophylle a obtenue en C.L.H.P. nous donne un rapport de 34,04 hautement significatif (coefficient de corrélation = 0,88). Les résultats obtenus par la méthode spectrophotométrique fournissent un rapport de 20,16 (coefficient de corrélation = 0,76), ce qui renforce l'idée que ces valeurs sont plus que douteuses.

Nous avons ensuite confronté les valeurs obtenues en C.L.H.P. avec les mesures réalisées antérieurement en haute Meuse par Descy et Gosselain (1994). La *fig. 25* montre que nos valeurs s'insèrent bien parmi les précédentes. Le rapport carbone : chlorophylle a ainsi recalculé est conforme au précédent et répond à l'équation :

$$C.O.P. = 40,77 * Chl a + 656,27. \quad (r = 0,88)$$

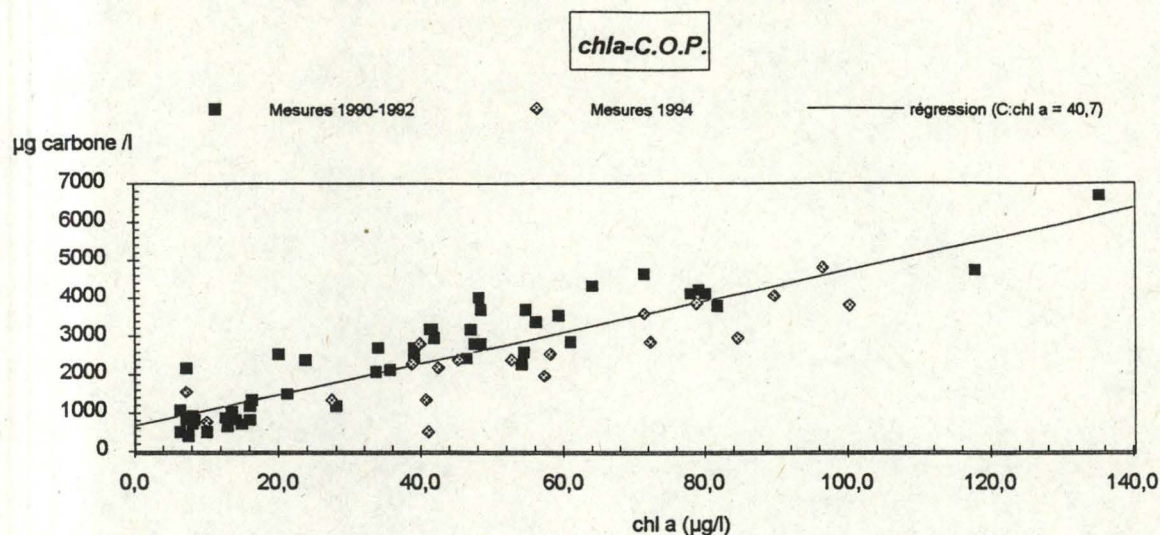


Fig. 25 : Relation existante entre le C.O.P. et la chlorophylle *a* de 1990 à 1992 et en 1994. La relation répond à l'équation : C.O.P. = 40,77 * Chl *a* + 656,27. $-r = 0,88$.

3. Evolution des pigments marqueurs et relation avec les biomasses des groupes algaux

L'évolution des concentrations des différents pigments marqueurs présentant *a priori* un intérêt écologique (voir *tableau 1*) est présentée à la *fig. 26*. Il s'agit de la fucoxanthine pour les diatomées, de la lutéine et de la chlorophylle *b* pour les algues vertes, de l'alloxanthine pour les Cryptophycées, et enfin de la zéaxanthine et de l'échinénone pour les Cyanobactéries. Pour les raisons techniques évoquées plus haut, nous n'avons pas pu résoudre la pérédinine, seul marqueur intéressant des Dinophycées (les données et les différents des profils pigmentaires sont présentés dans le *tableau 2*, les *figures 1, 2 et 3* en *annexe 1*)

On peut constater que la fucoxanthine, marqueur des diatomées, est le pigment le plus abondant. Elle suit relativement bien le profil de biomasse de ces algues et celui de chlorophylle *a*. Ensuite viennent la lutéine et la chlorophylle *b*, les deux marqueurs des algues vertes. L'alloxanthine et l'échinénone, caractéristiques respectivement des Cryptophycées et des Cyanobactéries sont nettement moins abondantes, voire sporadiques.

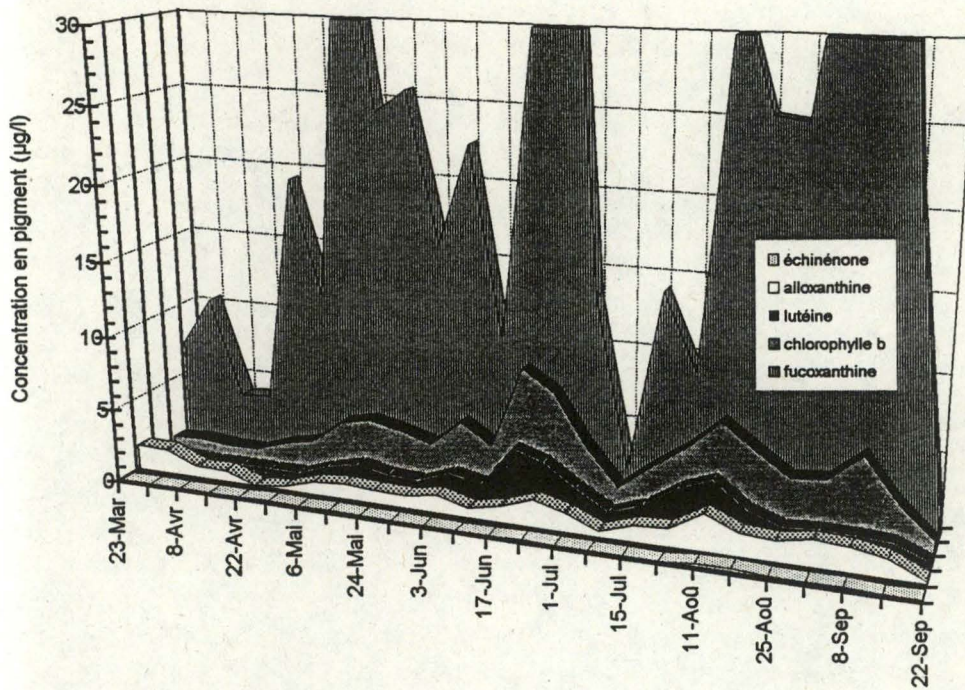


Fig. 26 : Profil des pigments considérés comme marqueurs de certaines communautés algales en 1994 à La Plante.

2.1. Relation pigment - biomasse des différents groupes algaux

Pour mieux mettre en évidence la relation pigment - biomasse algale, les profils de ces deux variables ont été superposés (fig.27..a et b.); ensuite, nous avons établi des régressions pigment marqueur - biomasse, dont les diagrammes sont présentés à la fig. 28.

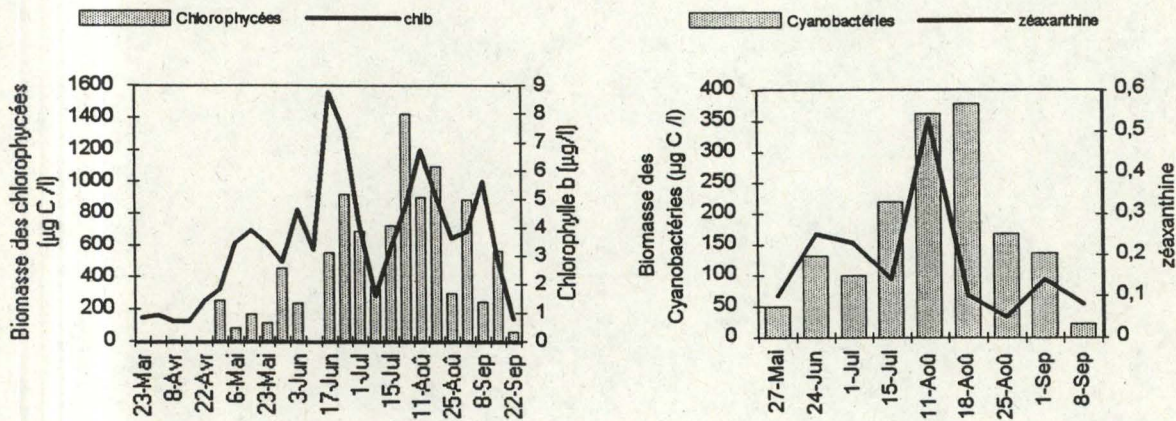


Fig. 27 a : Comparaison du profil en chlorophylle b avec celui de la biomasse des Chlorophycées et celui de la zéaxanthine avec la biomasse des Cyanobactéries. (La Plante en haute Meuse, 1994)

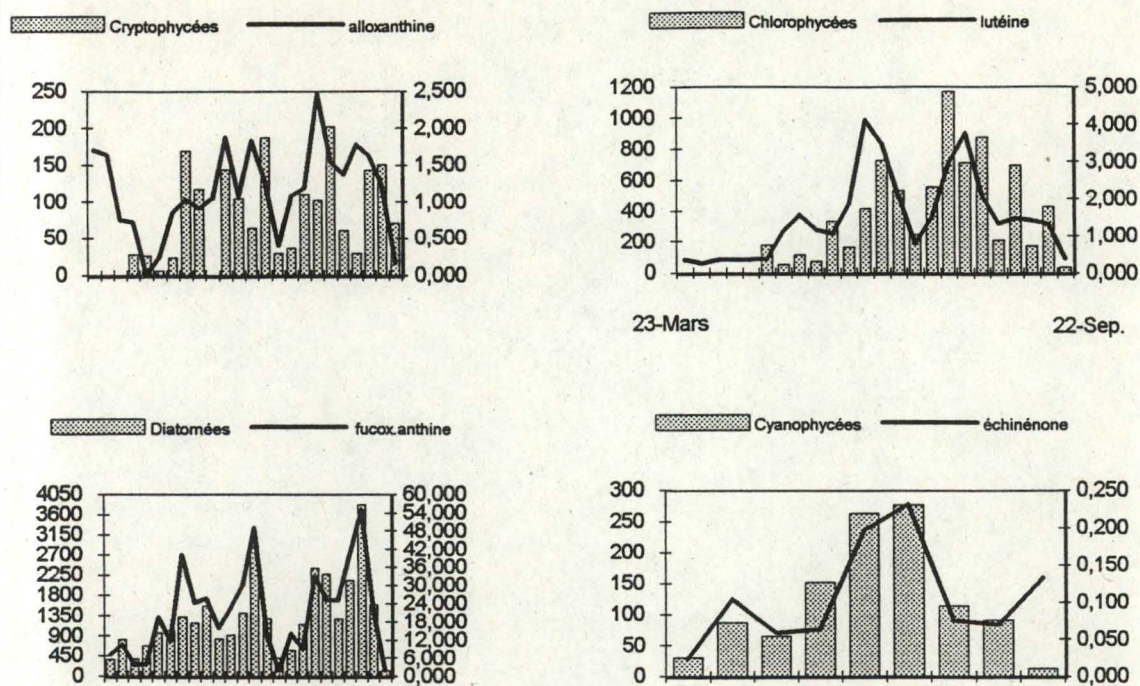


Fig. 27 b : Comparaison de profils de pigments et des biomasses des algues correspondantes (La Plante, haute Meuse, 1994). A gauche se trouve l'axe de biomasses en $\mu\text{g C l}^{-1}$, à droite : l'axe de la concentration en pigment ($\mu\text{g/l}$). Les dates des 3 graphiques s'étendent du 23 mars au 22 septembre 1994. Pour le dernier graphique, il faut lire en abscisses 27/05, 24/06, 1/07, 15/07, 11/07, 18/07, 25/07, 01/07 et 08/07/94.

Nous pouvons mettre en évidence une bonne relation entre la fucoxanthine et la biomasse des diatomées ($r^2=0,77$). Il existe un parallélisme satisfaisant mais perfectible entre les algues vertes et la lutéine ($r^2=0,36$) ce qui n'est pas le cas pour l'alloxanthine et les Cryptophycées ($r^2=0,02$) ainsi que pour l'échinénone et les Cyanobactéries ($r^2=0,58$). Pour obtenir un r^2 aussi élevé avec l'échinénone, nous avons dû retirer certains points correspondant à des échantillons où les Cyanobactéries n'ont pas été relevées. Cette opération se justifie par le fait que de faibles concentrations en échinénone, souvent à la limite de détection de notre système chromatographique, ont été mesurées au début de notre étude, alors que certaines manipulations n'étaient pas encore au point.

La zéaxanthine, souvent considérée comme caractéristique des Cyanobactéries par les auteurs utilisant le gradient de Mantoura et Lewellyn (1982), a été systématiquement trouvée dans l'algue verte *Dictyosphaerium ehrenbergianum*; sa présence chez les algues vertes a été prouvée par Merete *et al.* (1994). C'est pourquoi nous ne considérerons pas cette molécule comme un biomarqueur des Cyanobactéries.

La relation entre la chlorophylle *b* et la biomasse des algues vertes ($r^2=0,16$) est moins bonne que celle de la lutéine ($r^2=0,36$). Ceci peut sans doute s'expliquer par le fait que la teneur cellulaire en chlorophylle *b* est

susceptible de se modifier suite à la photoacclimatation, c'est-à-dire suivant les variations de la lumière au cours de la période d'observation (Kirk, 1983). La teneur cellulaire en lutéine ne se modifie sans doute que relativement peu. Ceci est confirmé par Millie *et al.* (1993a, b), qui considèrent que les caroténoïdes sont moins variables au sein des cellules que les chlorophylles.

Le *tableau 6* et la *fig. 28* synthétisent l'information obtenue par régression linéaire sur les couples Cryptophycées - alloxanthine, diatomées - fucoxanthine, algues vertes - lutéine et Cyanobactéries - échinénone.

Les relations répondent à une équation de type :		$Biomasse = A * Concentration \text{ en pigment}$			
	algues vertes lutéine	- Cyanobactéries échinénone	- Cryptophycées - alloxanthine	diatomées - fucoxanthine	
A	278,32	1491,28	106,80; NS	59,39	
r^2	0,36	0,58	0,02	0,77	

Tableau 6 : Synthèse des relations entre pigment et biomasse. NS indique que le coefficient angulaire de la droite de régression n'est pas significativement différent de zéro.

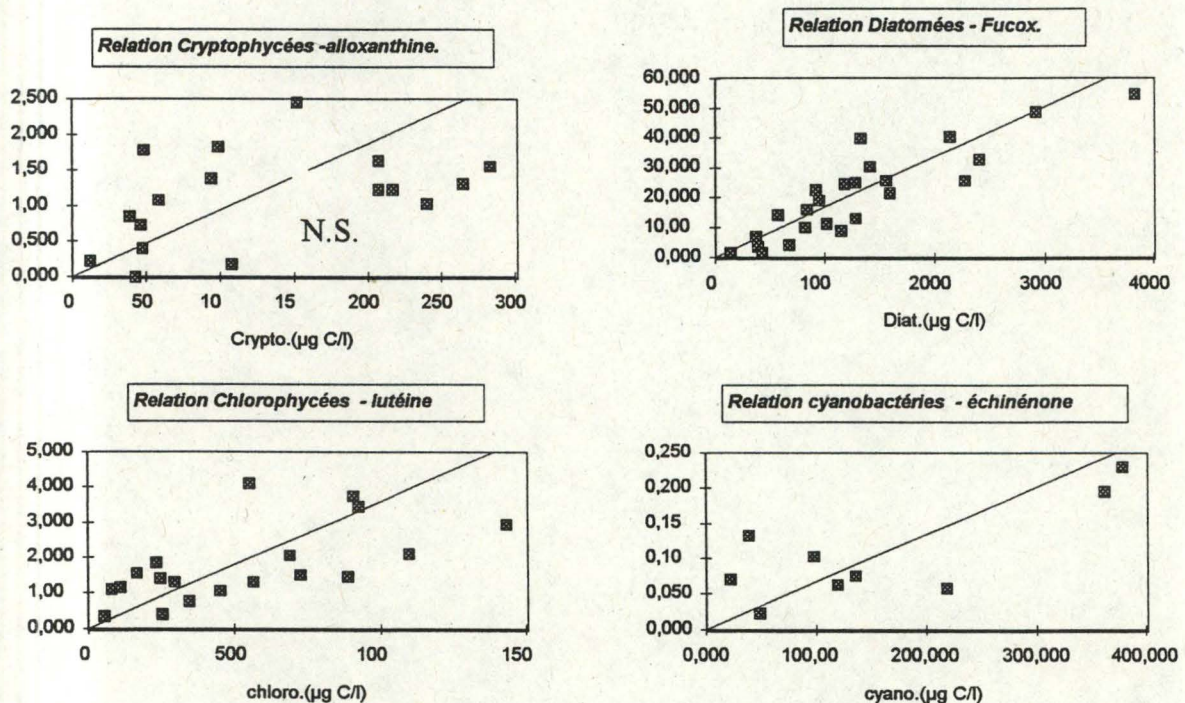


Fig. 28 : Droites de régression établies pour chaque couple pigment - biomasse. Les concentrations en pigments sont exprimées en $\mu\text{g/l}$.

Quiblier-Lloberas (1994) montre également de très bons parallélismes entre ces différents taxons et leur pigment. Il faut d'autre part souligner que la précision des examens microscopiques conditionne celle de l'évaluation de la biomasse. Ainsi, si nous obtenons une bonne corrélation entre la fucoxanthine et la biomasse

des diatomées, c'est parce que les comptages ont fait l'objet d'une vérification systématique par J-P Descy. Pour les diatomées, nous avons systématiquement mesuré les dimensions des cellules comptées. Par contre, pour les autres groupes d'algues, on a utilisé des biovolumes moyens issus d'études antérieures (dont Gosselain *et al.*, 1994). Dès lors, les biomasses des algues non siliceuses ne sont connues que de façon approximative et avec une précision insuffisante pour notre étude des relations avec la concentration en pigments. Dans le même ordre d'idées, on peut de plus penser que la technique standard de comptage des unités phytoplanctoniques est peu adaptée aux besoins de l'étude. Tous cela explique, au moins pour une part, les moins bonnes corrélations pigment - biomasse pour les groupes algaux autres que les diatomées. Pour les Cryptophycées par exemple, il apparaît nécessaire de mesurer le biovolume de chaque individu compté et de calculer pour chaque échantillon le biovolume moyen de ce taxon comme nous l'avons fait pour les diatomées. En effet, la distinction entre les taxons n'a pas ici été assez poussée et un certain nombre de taxons parfois très différents en taille ont été rangés dans la même catégorie. En ce qui concerne les Cyanobactéries, l'énumération du nombre de cellules par colonie est souvent techniquement impossible; de plus, celles-ci se rencontrent généralement dans des gammes de taille très variées. Pour les grandes colonies, une mesure à faible grossissement des dimensions de chacune d'elles semblerait être la manière la plus fidèle de rendre compte de leur densité et de leur biovolume. Nous pensons donc qu'il serait possible d'améliorer ces relations par un comptage plus fin du phytoplancton et une meilleure estimation des biovolumes cellulaires.

Il nous a paru intéressant, en guise de tentative de validation de nos dosages de pigments en tant que biomarqueurs, de tester une combinaison des coefficients de Barlow *et al* (1993b) et Letelier *et al* (1994) reliant la concentration en certains pigments à celle de la chlorophylle *a*. Ceux-ci ont été établis en Mer du Nord et en Atlantique nord - est. La chlorophylle *a* est recalculée à partir de la fucoxanthine, de l'alloxanthine et de la chlorophylle *b* (fig. 29).

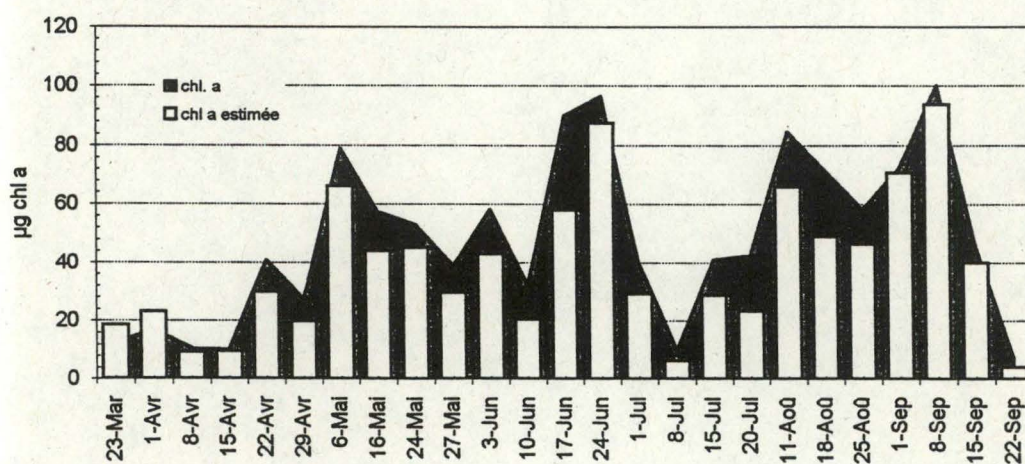


Fig. 29 : Estimation de la chlorophylle *a* à partir des équations de régression multiple de Letelier *et al* (1994) et Barlow *et al* (1993b) basée sur la chlorophylle *b*, la fucoxanthine, et l'alloxanthine.

Les écarts entre les valeurs mesurées et calculées sont remarquablement faibles. Cela nous conforte dans l'idée que les pigments d'un milieu comme la Meuse peuvent être utilisés comme estimateurs de biomasse au même titre que la chlorophylle *a*, et que les relations pigments - biomasse sont éventuellement généralisables à d'autres milieux.

Nous avons tenté de tester nos équations de régression sur les concentrations en pigment obtenues en 1992 à la même station par Polet (1992). Les résultats sont assez décevants, sauf peut-être avec les diatomées (Fig. 30), pour lesquelles la biomasse en carbone estimée à partir de la fucoxanthine concorde globalement avec le profil de biomasse obtenu par comptage. Certaines différences pourraient être l'expression d'une méthode d'extraction différente, de l'utilisation d'un autre système chromatographique, et de la non-identification de la 9'-cis-fucoxanthine dans le travail de Polet alors que nous l'assimilons à la fucoxanthine pour établir notre relation.

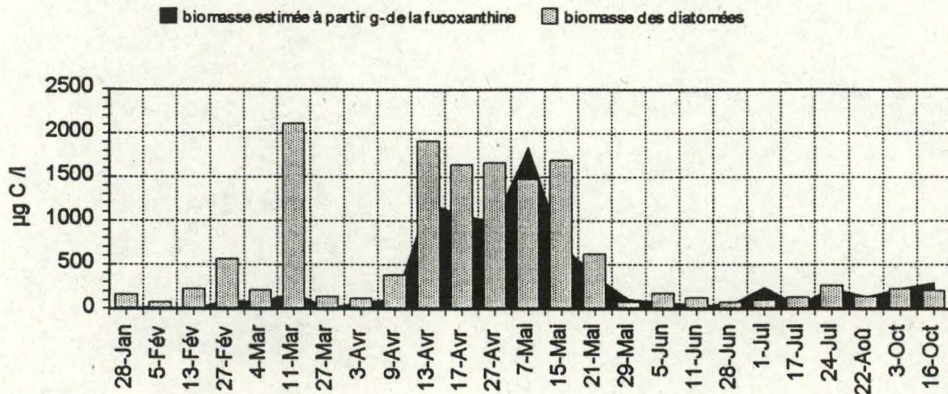


Fig. 30 : biomasse des diatomées recalculée à partir des données de fucoxanthine de Polet (1992) superposée à la biomasse diatomique évaluée par Gosselain *et al* (1994). Les données ont été récoltées à la même station (La Plante, haute Meuse) en 1992.

4. Evolution de la composition du zooplancton

Comme les années précédentes (Sanderson, 1992; Viroux, 1993), les rotifères dominent durant toute la période de développement zooplanctonique (fig. 31). Les crustacés font leur apparition dès fin juillet jusqu'au début septembre mais leurs densités restent néanmoins très basses (33200 individus / m³ au maximum). Début juin, une forte densité de larves de *Dreissena* (528000 individus / m³ au maximum) domine sensiblement les autres composants du zooplancton, en déclin temporaire à cette époque.

Une analyse plus fine du zooplancton (*tableau 2 en annexe I*) montre cependant une présence constante des cladocères, accompagnés par les copépodes durant leurs pics d'abondance les 8 juillet, 11 août et 25 août. Les genres *Brachionus* et *Keratella* sont les deux groupes qui dominent la communauté de rotifères. Les genres *Synchaeta* et *Polyarthra* sont plutôt estivaux alors que les *Euchlanis* se développent en début de saison. *Brachionus* et *Keratella* montrent une succession de phases d'abondance et de déclin en alternance l'un par rapport à l'autre (*fig. 32*) et de manière brutale en valeur absolue.

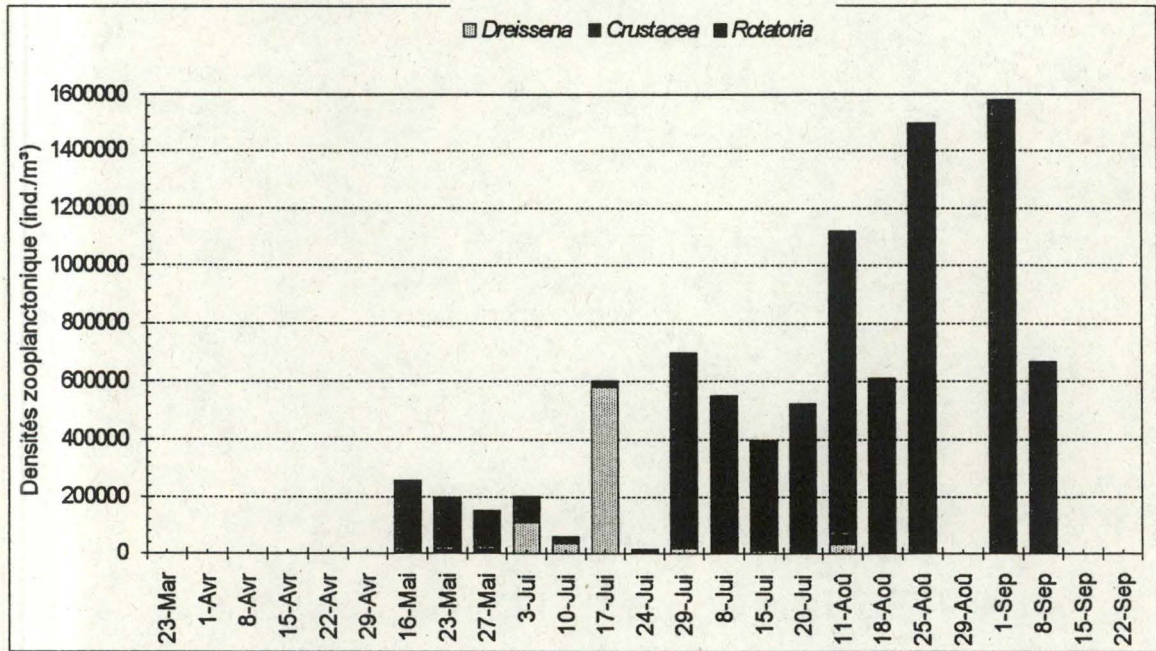


Fig.31 : Evolution des communautés zooplanctoniques au cours de l'année 1994 dans la Meuse à La Plante.

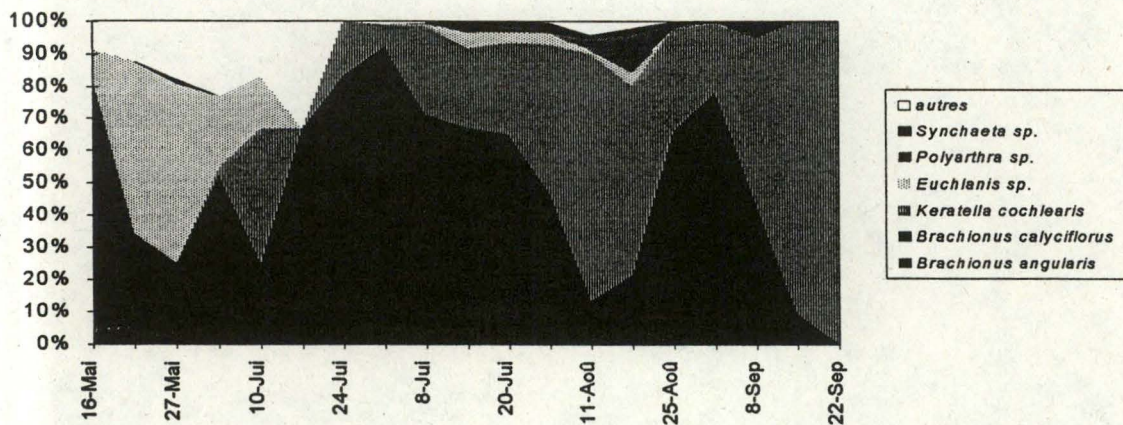


Fig.32 : Abondance relative des rotifères en 1994 à La Plante. Les genres *Brachionus* et *Keratella* se succèdent tour à tour tout au long de la saison de façon plus ou moins marquée.

Nous ne retrouvons pas le pic d'abondance printanier mis en évidence à la même station par Viroux (1993) l'année précédente, de même qu'il n'a pas été observé de fortes densités phytoplanctoniques sur cette période.

L'alternance de *Keratella* et *Brachionus* pourrait être l'expression d'une compétition pour les ressources (en particulier le phytoplancton) entre ces deux genres.

4.1. Grazing par la méthode de Haney

L'évolution dans le temps du taux de « grazing » mesuré à l'aide de la chambre de Haney (Tableau 7) paraît suivre celle des rotifères ($r=0,64$ contre 0,56 avec le zooplancton total, et 0,10 avec les crustacés seuls). Les taux de « grazing » apparaissent plus élevés après la date du 8 juillet. (fig.33)

Il est intéressant de noter que la période de dominance de *Dreissena* coïncide avec celle du broitage minimum.

grazing Haney : communauté zooplanctonique totale											
date	3/06/94	8/06/94	17/06/94	29/06/94	15/07/94	29/07/94	11/08/94	18/08/94	25/08/94	1/09/94	8/09/94
densité en rotife par m ³	88000	24000	18000	680000	386000		1056000	612000	1497000	1580000	668000
taux de « grazing » en % . J ⁻¹	6,5	1,7	2,4	6,6	25,1	22,7	11,3	17,3	34,4	16,8	7,4
écart type	5,3	0,0	0,8	0,6	1,2	1,0	0,5	1,7	3,0	9,5	5,2

Tableau 7 : Résumé des données obtenues à l'aide de la chambre de Haney.

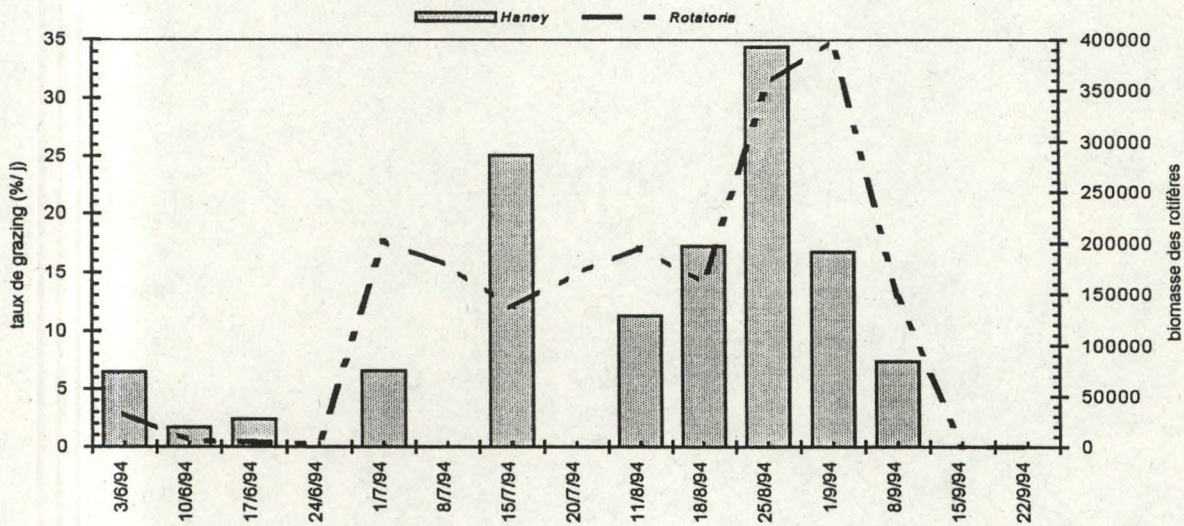


Fig. 33 : Evolution du taux de broitage en chambre de Haney mis en parallèle avec la biomasse des rotifères dans la Meuse à La Plante, 1994.

Il apparaît que les rotifères, bien que considérés comme des brouteurs peu efficaces, soient le groupe qui marque le plus son influence sur le phytoplancton par une consommation allant jusqu'à 35 % de la biomasse phytoplanctonique par jour lors de leurs plus fortes densités. On peut d'ailleurs remarquer que les deux chutes estivales de la biomasse phytoplanctonique correspondent bien aux maxima de taux de broutage du zooplancton. Il semblerait que les Cladocères ne soient pas ici très actifs sur le phytoplancton. Le 25 août, la valeur particulièrement élevée du taux de « grazing » est sans doute due à la présence d'autres espèces de cladocères que celles qui composent la population du 11 août. Une autre hypothèse explicative serait un changement de la composition phytoplanctonique vers des tailles beaucoup plus consommables pour le zooplancton présent. *Dreissena* ne semble pas constituer une « menace » pour les algues planctoniques.

4.2. Grazing global par la méthode de dilution

Si l'on considère les taux de « grazing » sur la chlorophylle *a*, qui constituent une estimation de la prédation globale sur les algues planctoniques, il ne s'en dégage pas de tendances particulières (fig. 34), si ce n'est la valeur très élevée du 1er septembre. Les taux de « grazing » ainsi mesurés semblent relativement faibles sur l'ensemble de la période étudiée.

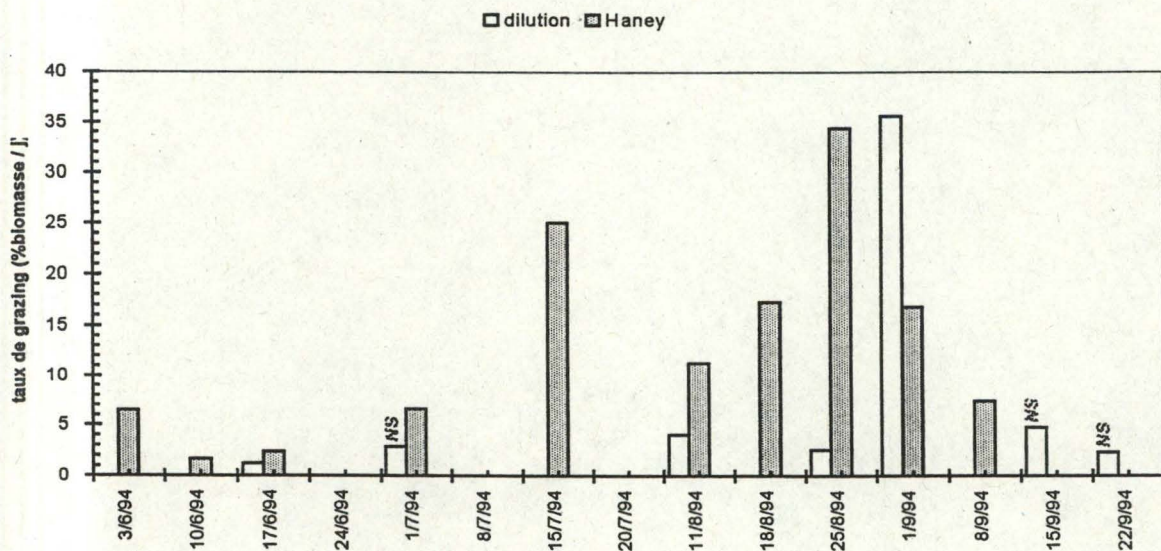


Fig. 34 : Valeurs de « grazing » sur la chlorophylle *a* obtenues par la méthode des dilutions, comparées aux mesures obtenues par la méthode de Haney. NS indique que le coefficient angulaire de la droite de régression (qui évalue le taux de grazing) n'est pas significativement différent de zéro.

En réalité, nous nous sommes heurtés à une grande variabilité des résultats et ceci dans toute les gammes des dilutions (Voir tableau 4 en annexe I). Une variabilité comparable se retrouve également chez les auteurs

utilisant cette méthode (Paranjape, 1987; Gifford, 1988; Landry & Hassett, 1982; Gallegos, 1989). Un certain nombre de nos estimations s'avèrent non significatives (NS). Pour certains échantillons, un nombre de points insuffisant pour établir une régression correcte est à mettre en cause. Pour d'autres, une pression de « grazing » sans doute trop faible s'exprime de manière insignifiante par rapport à la variabilité de la méthode (cas du 10/07/94).

Si nous confrontons les deux méthodes d'évaluation du broutage global (*Fig. 35*), nous constatons immédiatement une forte discordance entre les deux méthodes, notamment après le 8 juillet. Avant cette date, les deux mesures se suivent assez bien malgré les valeurs systématiquement inférieures fournies par la méthode par dilution. La discordance générale constatée après le 8 juillet peut trouver plusieurs explications :

- La méthode de Landry et Hassett (1982) étendue aux milieux eutrophes par Gallegos (1989) serait peut-être à la limite de son applicabilité dans les conditions expérimentales employées :

- ⇒ Dans un premier temps, les volumes d'eau mis à incuber contenaient peut-être trop peu de rotifères pour pouvoir exercer un impact significatif sur la biomasse algale et pour pouvoir être représentatif de l'ensemble des rotifères. Il serait bon, alors, d'augmenter le volume des bouteilles mises à incuber.

- ⇒ Deuxièmement, un temps d'incubation de 24 h serait encore trop court pour observer un « grazing » significatif. Paranjape (1987) opère pendant 48 h.

- ⇒ Le calcul des concentrations pigmentaires initiales pour chaque dilution est théorique. En réalité, compte tenu de la variabilité inhérente à la préparation de telles dilutions, la concentration effective en plancton n'est pas exactement celle fournie par calcul et varie d'un flacon à l'autre pour une même dilution.

- Le « grazing » ne serait pas un processus constant au cours d'un cycle circadien. Il se peut qu'opérer en pleine journée favorise la mesure de taux élevés. La méthode de Haney extrapole à 24 h des mesures effectuées sur une dizaine de minutes, alors que, par l'autre méthode, nous tentons d'évaluer l'impact journalier du processus.

- Le 25 juillet, une activité intense de « grazing » par une population différente de cladocères peut être mesurée en chambre de Haney alors que l'autre méthode en fait abstraction.

- Le modèle utilisé dans la méthode par dilution est théorique, il ne tient pas compte de la mortalité naturelle ou par parasitisme, et de la croissance zooplanctonique.

Nous pourrions par contre reprocher à la méthode de Haney de mesurer un broutage potentiel, ou mieux, un taux de filtration potentiel plutôt que la prédation réelle du zooplancton sur le phytoplancton. La méthode de Haney, qui se base sur l'introduction dans le milieu d'algues marquées d'une taille permettant leur ingestion par

un large éventail de zooplancton et dans un rapport inférieur à 10 % de la biomasse phytoplanctonique en place, mesure en réalité le taux d'ingestion de ces algues. Celui-ci est une fonction du taux de filtration de l'eau par les organismes consommateurs. Or, comme le mentionne notamment Viroux (1993), ce taux de filtration est fonction de la concentration en nourriture dans le milieu : il diminue avec l'augmentation de la quantité d'aliment disponible. Dans le milieu, toutes les algues ne sont pas consommables par le zooplancton et ce principalement pour des raisons d'inadéquation au niveau de leur taille (Arfi et Guiral, 1994). Les diatomées filamenteuses en sont le plus bel exemple. Ainsi, lorsque nous calculons, sur base du dosage de la chlorophylle *a*, la biomasse phytoplanctonique présente, nous ne tenons pas compte de la taille des différentes espèces d'algues composant cette biomasse. Si, comme c'est le cas en août et septembre, la majorité de la biomasse algale est constituée de formes filamenteuses, le zooplancton va développer des taux de filtration élevés afin d'accéder à suffisamment de nourriture. L'introduction soudaine de petites algues marquées et « passe-partout » peut en réalité considérablement augmenter la quantité de nourriture disponible pour ces animaux. Ceci se traduit par une ingestion d'algues marquées probablement beaucoup plus intense que celle des algues autochtones. Ainsi, on risque d'aboutir à une surévaluation du « grazing » et ce que l'on mesure serait en fait la **capacité** du zooplancton à consommer du phytoplancton au moment de l'expérience. C'est ce qui pourrait se produire après le 8 juillet, date à laquelle nous passons d'une biomasse algale à majorité unicellulaire, donc parfaitement « grazable », vers une population phytoplanctonique typiquement pluricellulaire, plus difficilement consommable par le zooplancton en place (fig. 35). Nous pouvons en effet remarquer des taux de « grazing » bien supérieurs à la première période, et cela pour des biomasses de rotifères équivalentes (cas du 15/07/94 contre le 01/07/94 où seules les communautés phytoplanctoniques diffèrent). Ce que nous y mesurons ne serait donc pas l'expression de l'impact réel du zooplancton sur les populations algales, mais l'expression de l'activité, de l'énergie investie dans la prise d'aliments.

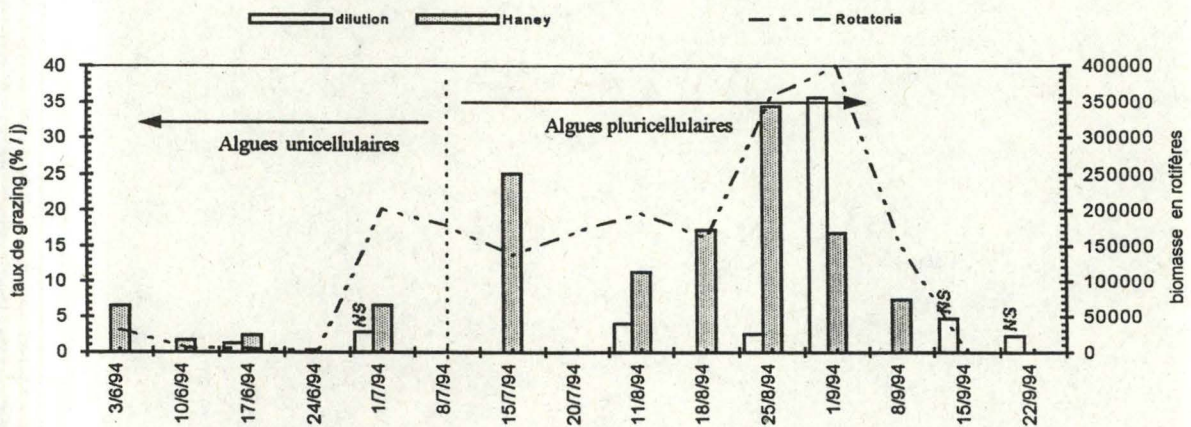


Fig. 35 : Comparaison des deux méthodes de mesure du « grazing » avec quelques éléments d'interprétation. NS : mesure non significative.

Il est clair que la méthode par dilution est peu fiable pour la mesure du broutage global. Cependant, le parallélisme presque parfait des droites, correspondant aux taux de « grazing » obtenus sur la lutéine et la chlorophylle *b*, marqueurs des algues vertes, suggère que cette méthode pourrait être utile dans l'étude de la sélectivité de la relation zoo-phytoplancton.

4.3. Approche de la sélectivité du broutage

En considérant les résultats obtenus par la méthode par dilution sur la chlorophylle *b* et la lutéine, la fucoxanthine, l'alloxanthine et l'échinénone, marqueurs respectifs des algues vertes, des diatomées, des Cryptophycées et des Cyanobactéries, on peut espérer en tirer des informations sur la sélectivité du broutage.. Notons d'abord que nous ne disposons de résultats interprétables que pour la période estivale. Ces résultats sont synthétisés sur la *fig. 36*, où les taux de broutage calculés, assortis de l'intervalle de confiance à $p = 0,05$, sont superposés à la concentration en pigments dans le phytoplancton présent dans le fleuve à chaque date .

Des taux de « grazing » significatifs s'observent, par ordre d'importance, sur les Cryptophycées, puis sur les diatomées et les algues vertes. Cependant, la forte variabilité souvent constatée rend ces observations assez incertaines. Néanmoins, il est bien connu qu'un broutage important sur les petites algues flagellées comme les Cryptophycées s'exerce dans tous les milieux aquatiques d'eau douce. Quant aux deux autres groupes algaux, il est peu surprenant que le broutage soit assez variable d'une date à l'autre, étant donné les variations de la taille des cellules et des colonies. Il en résulte une « consommabilité » très différente des espèces dominantes : pour les diatomées par exemple, le fait que la communauté de fin d'été soit dominée par des *Aulacoseira* (espèces filamenteuses très vraisemblablement pas ou peu consommées par les rotifères) est sans doute partiellement lié à une réduction des pertes par broutage chez ces diatomées.

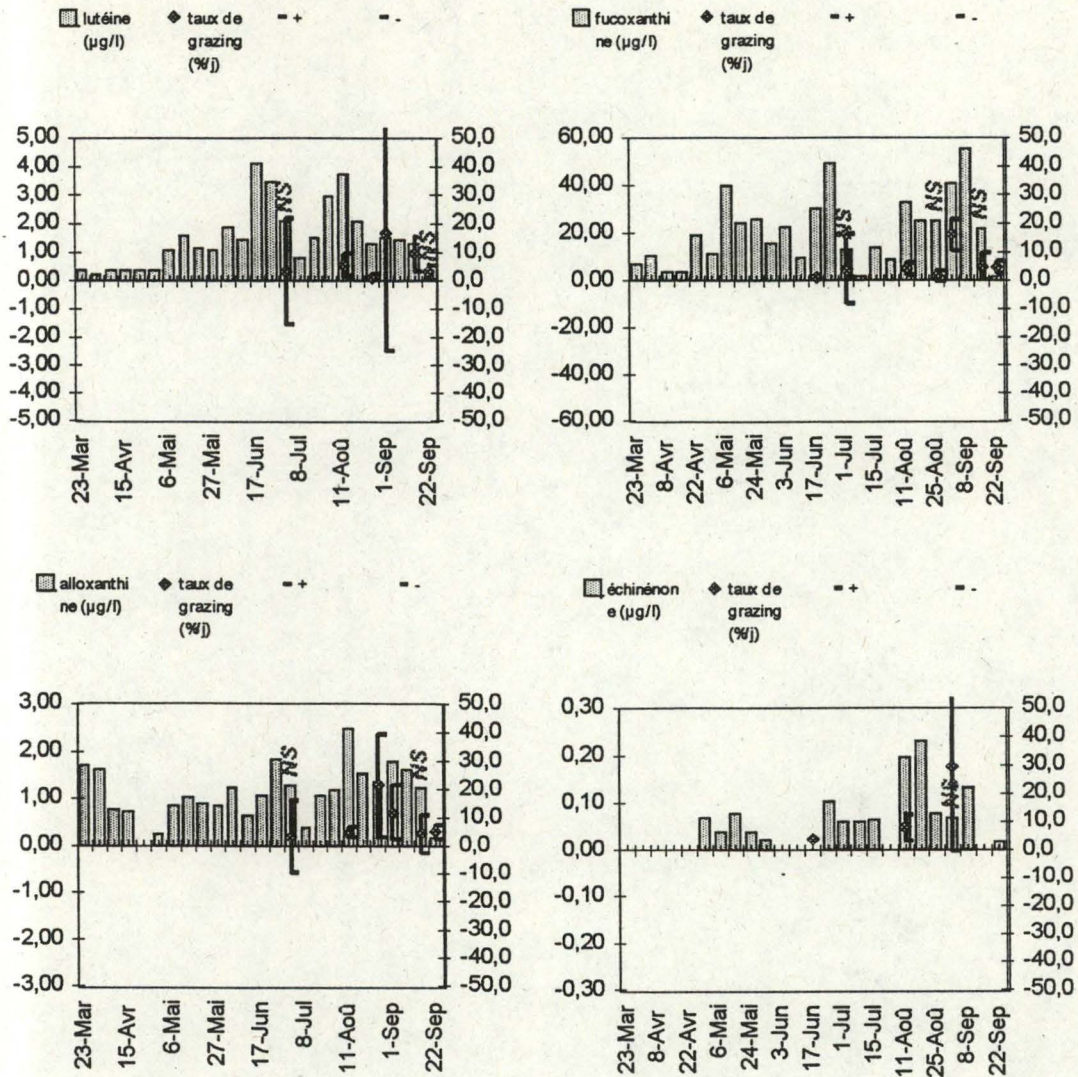


Fig. 36 : Synthèse des taux de « grazing » obtenus par la méthode de dilution, pour chaque pigment marqueur . Les taux de broutage calculés sont assortis d'un intervalle de confiance à p 0,05 et sont superposés à la concentration en pigments dans le phytoplancton présent dans le fleuve à chaque date. L'axe du taux de Grazing est à droite.

Etant donné les incertitudes liées à la méthode des dilutions, nous avons voulu vérifier une sélectivité éventuelle du broutage par analyse C.L.H.P. du contenu digestif du zooplancton. Pour ce faire, le premier septembre, nous avons prélevé du zooplancton à l'aide de la bouteille de Haney. Après traitement selon le protocole suivi dans cette méthode (filtration sur filet à plancton, anesthésie et congélation), nous avons effectué un premier tri de l'échantillon décongelé afin d'isoler environ 200 rotifères. Ensuite nous nous sommes attelé à un deuxième tri, afin d'éliminer le phytoplancton contaminant. Le profil obtenu par C.L.H.P. est présenté ci-après.

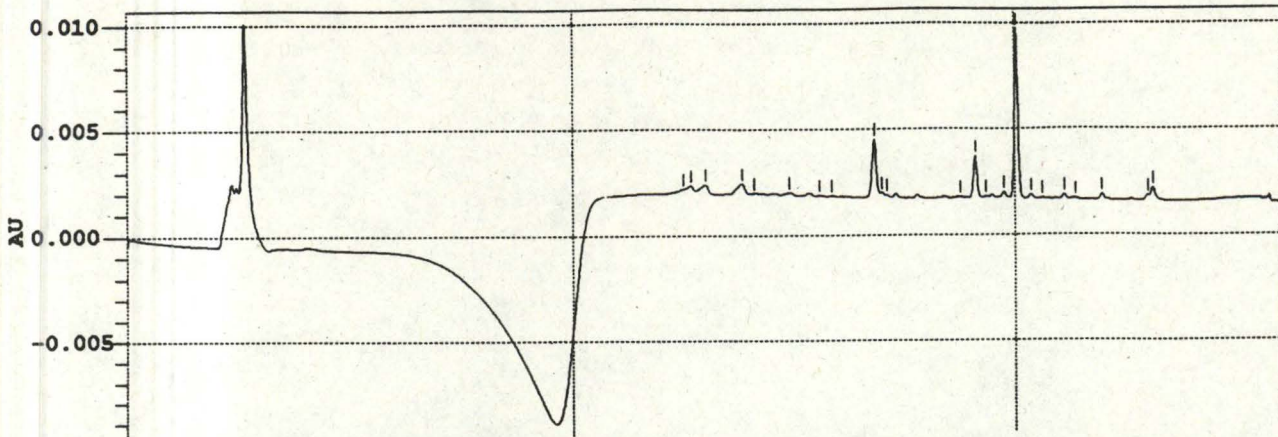


Fig 37 : Profil chromatographique du contenu digestif de 200 rotifères prélevés le 01/09/94. 1 : fucoxanthine; 2 : neoxanthine; 3 : violaxanthine; 4 : lutéine; 5-6 : Chlorophylle *b* et *a*; 7 : échinénone; 8-9 : phaeophytine *b* et *a*; 10 : carotènes

Ce profil est typique des algues vertes, il y a très peu de pigment caractéristique des diatomées. Nous y trouvons de l'alloxanthine et de l'échinénone. Par un calcul très simple, en considérant, comme nous l'avons montré plus haut, que les pigments caroténoïdes sont de bons indicateurs de biomasse et qu'ils ne sont pas ou peu dégradés à l'intérieur du tractus digestif des animaux (Quiblier-Lloberas, 1994), il nous est possible d'évaluer la proportion relative de chacun des groupes algaux au menu des rotifères. Par rapport aux proportions pigmentaires fucoxanthine / lutéine / alloxanthine / échinénone de 92 / 3 / 4 / 1 dans le phytoplancton en place ce jour-là, nous constatons dans les rotifères le rapport 36 / 62 / 1 / 1. Ceci signifierait que les algues vertes (représentées par la lutéine) constitueraient la majorité du repas de ces animaux, dans lesquels elles y seraient concentrées plus de 20 fois.

Cette technique, comme le démontre Quiblier-Lloberas (1994), permettrait de mettre en évidence la sélectivité du broutage de manière beaucoup plus sensible et fiable que la méthode par dilution. Etant basée sur les pigments contenus dans le tractus digestif des consommateurs, ce type d'analyse permet de visualiser le broutage sur les deux niveaux trophiques concernés et non plus uniquement sur un seul, comme c'est le cas dans les deux méthodes précédemment décrites. La méthode de Haney concerne plus l'aspect zooplanctonique du phénomène, alors que la méthode par dilution évalue les impacts directs du broutage sur les algues.

4.4. Potentialité d'étude du broutage basée sur les processus de dégradation des pigments : cas de la phaeophytine *a*

D'une analyse globale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de l'étude, se dégage à la *fig. 38* une relation intéressante.

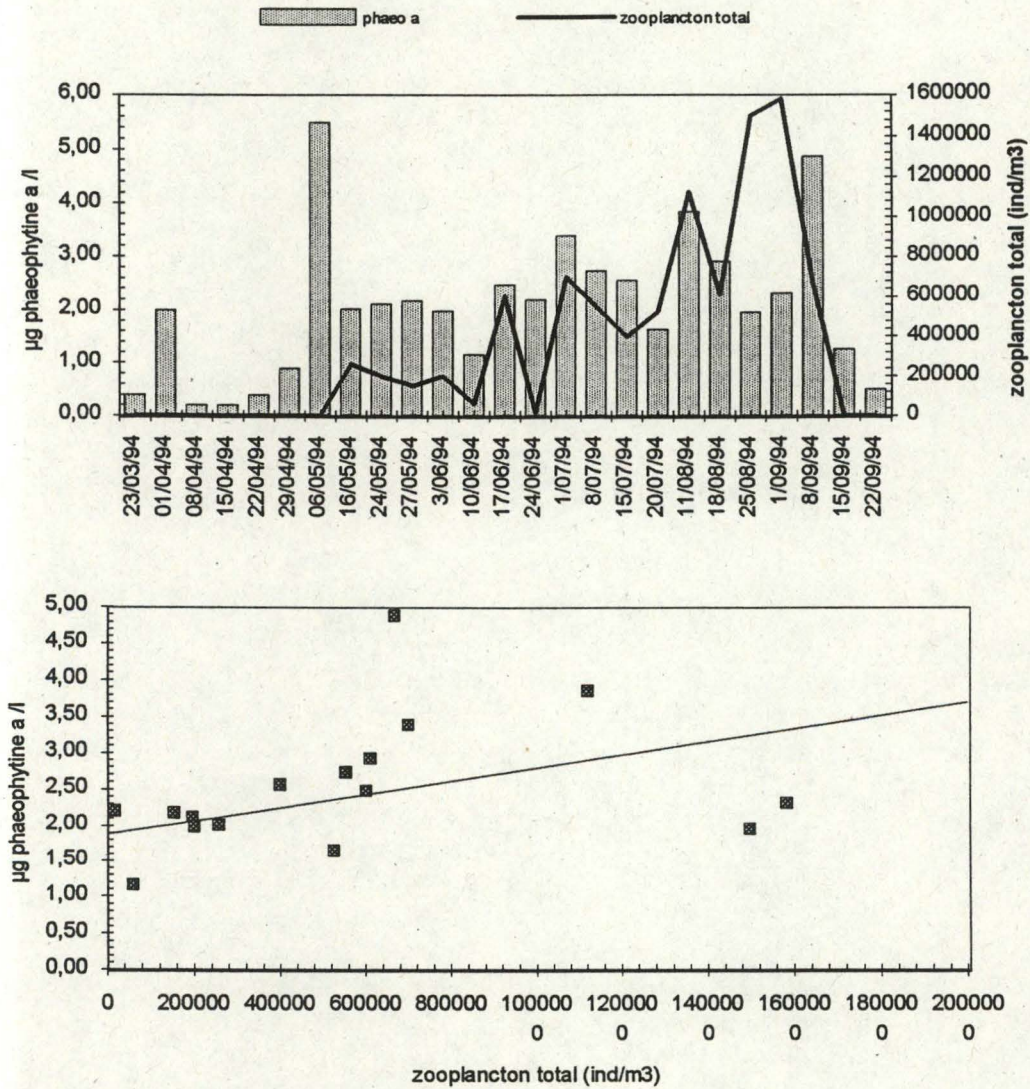
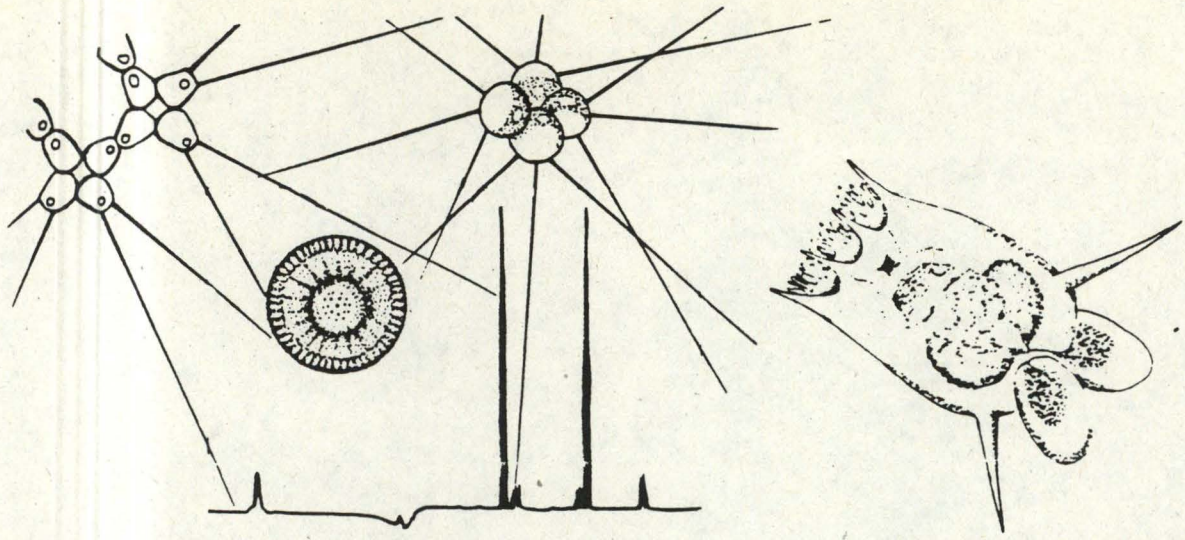


Fig. 38 : Relation entre la phaeophytine *a* et le zooplancton total. En haut, les profils des deux variables observées en haute mer, à La Plante en 1994. En bas : corrélation des deux variables.

La phaeophytine *a* évolue parallèlement à la biomasse zooplanctonique ($r = 0,42$). C'est à partir de mi-août que la correspondance n'est plus parfaite. Nous observons également la présence de cette substance au même moment que le pic de *Dreissena*.

Cette corrélation n'est pas parfaite mais elle est néanmoins suggestive. Elle interpelle parce que la phaeophytine *a* est un produit de dégradation de la chlorophylle *a*, se produisant notamment au cours de la digestion des algues par le zooplancton. Cependant, la phaeophytine n'est pas seulement un indicateur de la consommation : elle peut apparaître au cours du processus de sénescence algale et du renouvellement de la chlorophylle. C'est ce qui pourrait expliquer l'écart observé fin août quand la biomasse algale est en grande partie constituée d'*Aulacoseira*, algues filamenteuses connues pour leur résistance au broutage. La correspondance observée durant le pic de *Dreissena* pourrait alors être une simple coïncidence. En effet, il est fort probable que la phaeophytine *a* observée à cette période soit plutôt en rapport avec la forte biomasse phytoplanctonique rencontrée à ce moment là.

Nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'intérêt du suivi de la concentration en phaeophytine *a* comme indicateur du « grazing », ne disposant de mesure de ce processus pour toute la saison de croissance du plancton.



Résumé et conclusion

IV. RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

La première partie de notre travail consistait à mettre au point une technique d'analyse fiable pour le dosage des pigments algaux: la C.L.H.P. Nous avons utilisé le gradient mis au point par Wright *et al.* (1992). Au moyen de détecteurs en absorbance et en fluorescence et d'un détecteur à barette de diodes, nous avons pu confirmer les temps de rétention et la séquence d'éluion des différents pigments présents chez des algues de composition pigmentaire connue. Ce gradient, parfaitement adapté pour la séparation des xanthophylles, ne nous a cependant pas permis de détecter la péridinine, marqueur des Dinophycées. De même, il ne nous a pas permis de quantifier les chlorophylles *c*. En spectrophotométrie d'absorption, nous avons quantifié la plupart des pigments identifiés à l'aide de la chlorophylle *a*, après vérification des équations sur la chlorophylle *b* et le BB-carotène, dont les standards sont disponibles commercialement. Enfin, toujours faute de standards, nous n'avons pas pu faire de quantification en fluorescence pour d'autres porphyrines que les chlorophylles *a* et *b*.

Cet outil analytique nous a permis de vérifier les relations existantes entre certains pigments caroténoïdes et la biomasse d'algues faisant partie du phytoplancton de la Meuse (diatomées, algues vertes, Cryptophycées et Cyanobactéries). Sur base de comptages du phytoplancton, de calculs de biovolumes et de conversions en biomasse, nous avons effectivement mis en évidence une bonne relation entre la fucoxanthine et la biomasse des diatomées et d'autres, moins bonnes, entre la biomasse des Cyanobactéries et l'échinénone, entre celle des algues vertes et la lutéine et enfin entre celle des Cryptophycées et l'alloxanthine. Si certaines relations sont encore insatisfaisantes, nous avons montré qu'un comptage inadéquat du phytoplancton (pour les besoins de notre étude) en était la source principale.

En collaboration avec d'autres membres du laboratoire, nous avons tenté d'évaluer, *in situ*, le broutage des algues par le zooplancton au moyen de la méthode de Haney (qui consiste à mettre le zooplancton du milieu en présence d'algues marquées). Si les résultats sont bien corrélés à la biomasse des rotifères, il semblerait que ces mesures pourraient ne pas évaluer toujours le broutage réel au moment de la mesure, mais plutôt un broutage potentiel.

D'autre part, la méthode par dilution de Landry et Hassett (basée sur une incubation de 24 h *in situ* du plancton dilué de façon croissante), bien qu'adaptée aux mesures des pigments algaux, et donc permettant d'évaluer une sélectivité dans l'interaction zoo-phytoplancton, n'a pas donné des résultats fiables, et ce principalement pour des raisons de variabilité. Des essais complémentaires ont permis de mettre en évidence l'intérêt d'un dosage du contenu digestif du zooplancton pour une approche plus fiable de la sélectivité du broutage. Enfin, une assez bonne relation entre la densité du zooplancton et un produit de dégradation de la chlorophylle *a* (la phaeophytine *a*) a montré l'intérêt éventuel de l'étude de ce produit comme indicateur du

broutage. Un suivi des produits de dégradation des chlorophylles dans les échantillons de plancton demanderait cependant l'utilisation systématique de la détection en fluorescence, plus sensible que la détection en absorbance.

Il reste cependant encore beaucoup à faire pour améliorer la technique analytique.

- Il faudrait arriver à détecter, en absorbance, la péridinine, afin de vérifier sa relation avec les Dinophycées. Nous pourrions aussi aborder la quantification des chlorophylles *c*: ceci demandera sans doute une modification du gradient d'élution utilisé.

- La quantification en fluorescence me semble indispensable pour pouvoir étudier les relations trophiques entre le zoo- et le phytoplancton, par le suivi des chlorophylles et de leurs produits de dégradation. Elle passe nécessairement par l'obtention de standards pour tous les phaeopigments.

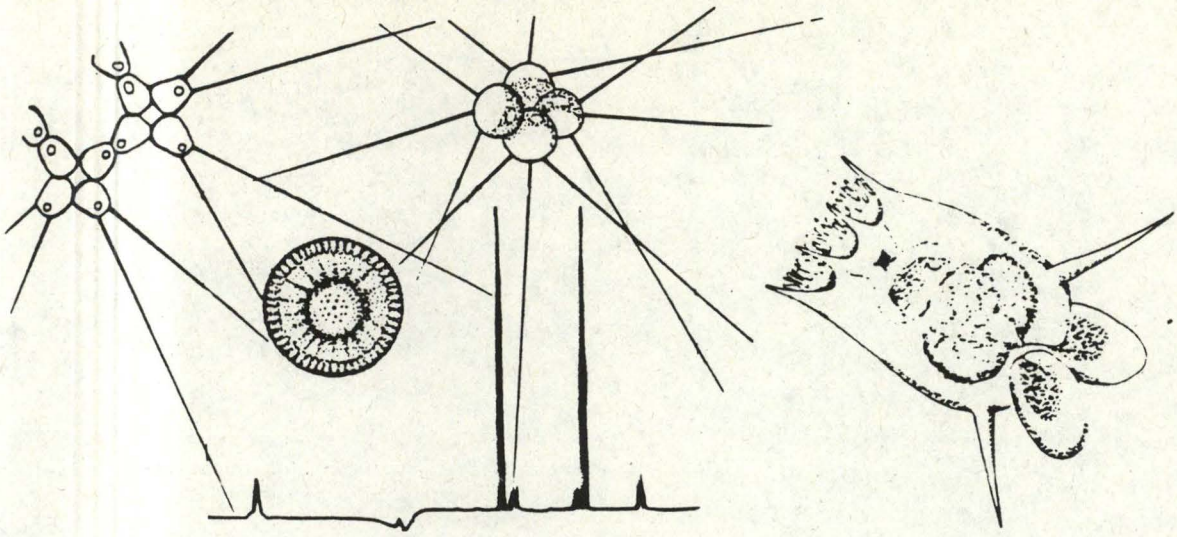
- Il serait bon aussi de reconsidérer le protocole d'extraction employé afin d'augmenter l'extraction des pigments les plus polaires, comme les phaeophorbides et les chlorophylles *c*.

Une amélioration des comptages phytoplanctoniques et de l'estimation de la biomasse algale est incontournable si on désire étudier les relations pigments - biomasses. On peut espérer une validation plus étendue de ces relations en mesurant systématiquement les dimensions de toutes les algues et colonies d'algues comptabilisées et ce, au grossissement le plus adéquat.

L'établissement de meilleures relations pigment-biomasse permettrait par la suite d'avoir une idée précise des communautés phytoplanctoniques en place en un temps relativement réduit par rapport à une analyse microscopique de ce même plancton. Cependant la microscopie restera nécessaire pour évaluer les gammes de tailles en présence, qui sont un caractère particulièrement important dans l'étude du broutage.

La méthode de Haney permet une évaluation quantitative et *in situ* du « grazing ». Il est nécessaire, compte tenu de ses limites d'application, d'entrevoir l'utilisation d'autres types d'algues marquées plus proches des communautés phytoplanctoniques en place dans le milieu naturel au moment de la mesure. Parallèlement, des expérimentations en laboratoire seront nécessaires afin d'établir les relations entre l'ingestion, la filtration de composants du zooplancton et la concentration en nourriture.

L'analyse des contenus digestifs chez le zooplancton ouvre la voie à l'étude de la sélectivité du broutage, à la condition de pouvoir séparer efficacement et rapidement les fractions zooplanctonique et phytoplanctonique. Ce type d'approche ne va cependant pas sans l'étude du degré de conservation des pigments caroténoïdes marqueurs dans le zooplancton.



Bibliographie

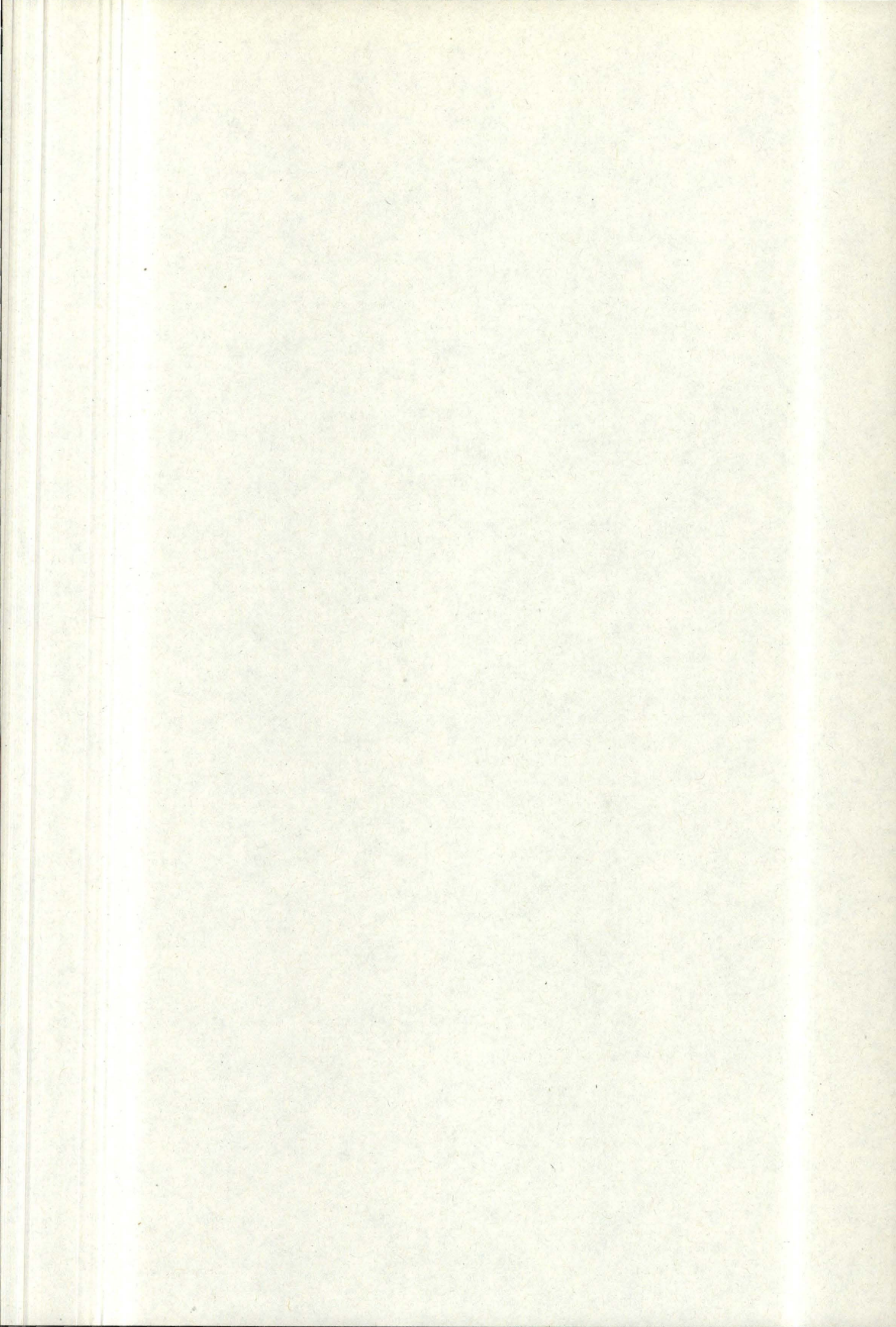
Bibliographie

1. **Anderson J. M. & Barrett J.**, 1986. Light-harvesting pigment-protein complexes of algae. -In: Staehelin L. A. & Arntzen C. J. (Eds.) Photosynthesis III. Photosynthetic Membranes & Light Harvesting Systems. Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 19, Springer Verlag, Berlin: pp 269-285.
2. **Arfi R. & Guiral D.**, 1994. Chlorophyll budget in a productive tropical pond: algal production, sedimentation, and grazing by microzooplankton and rotifers. *Hydrobiologia*, 272: pp 239-249.
3. **Barlow R. G., Mantoura R. F. C., Gough M. A., & Fileman T. W.**, 1993a. Phaeopigment distribution during the 1990 spring bloom in the northeastern Atlantic. *Deep Sea Research I*, 40(11/12): pp 2229-2242.
4. **Barlow R. G., Mantoura R. F. C., Gough M. A., & Fileman T. W.**, 1993b. Pigment signature of the phytoplankton composition in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom. *Deep Sea Research II*, 40: pp 459-477.
5. **Bautista B. & Harris R. P.**, 1992. Copepods gut contents, ingestion rates and grazing impact on phytoplankton in relation to size structure of zooplankton and phytoplankton during a spring bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 82: pp 41-50.
6. **Bidigare R. R., Kennicutt M. C., & Brooks J. M.**, 1985. Rapid determination of chlorophylls and their degradation products by HPLC. *Limnol. Oceanogr.*, 30(2): pp 432-435.
7. **Bourdier G.**, 1991. Quelques réflexions à propos de l'intérêt des marqueurs organiques en limnologie. -In Vernet P. (Ed.) Hommage à F.A. Forel (3^e CILEF), Morges, Suisse: pp 59-66
8. **Bowles N. D., Paerl H. W. & Tucker J.**, 1985; Effective solvents and extraction periods employed in phytoplankton carotenoid and chlorophyll determination. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: pp. ***
9. **Brown M. R. & Jeffrey S.W.**, 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acid, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161: pp 91-113.
10. **Brown S. B., Houghton J. D., & Handry G. A. F.**, 1991. Chlorophyll breakdown. -In: Sheer H. (Ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton: pp 465-489.
11. **Brunet C., Brylinskiand J. M. & Frontier S.**, 1992. Productivity, photosynthetic pigments and hydrology in the coastal front of the Eastern English channel. *J. Plankton Res.*, 14: pp 1541-1552.
12. **Buma A. G. J., Gieskes W. W. C. & Thomsen H. A.**, 1992. Abundance of Cryptophyceae and chl *b* containing organisms in the Weddell-Scotia confluence area in the spring of 1988. *Marine Biology*, 12: pp 43-52.
13. **Canjura F. L. & Shwartz S.**, 1991. Separation of chlorophyll compounds and their polar derivatives by high performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39: pp 1102-1105.
14. **Chen B. H. & Chen Y. Y.**, 1992. Determination of carotenoids and chlorophylls in water convolvulus (*Ipomoea aquatica*) by Liquid Chromatography. *Food Chemistry*, 45: pp 129-134.

15. Chisholm S.W., Olson R.J., Zettler E.R., Waterburg J., Goerike R. & Welschmeyer N., 1988. A novel free living Prochlorophyte occurs at high cell concentrations in the oceanic euphotic zone. *Nature*: May 1988.
16. Chisholm S.W., Olson R.J., & Myentsh £C., 1988. The oceanography report on flow cytometry. -In Oceanography Status and Prospect. *EOS*, 69: 562pp
17. Craft N. E., 1992. Carotenoid reverse phase HPLC methods: references compendium. -In. Parker L. (Ed.) Carotenoids part A. Chemistry, Separation, Quantitation & Antioxydation., Methods in Enzymology, Vol 213, Academic Press, Inc. San Diego: pp 185-205.
18. Descy J.-P. & Gosselain V., 1994. Development and ecological importance of phytoplankton in a large lowland river (River Meuse, Belgium). -In Descy J.-P., Reynolds C.S & Padisak J.(Eds.) Phytoplankton in Turbid Environments: Rivers and Shallow Lakes, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. *Hydrobiologia* 289: pp 139-155.
19. Downes M. T., Hirstich L. & Vincent W. F., 1993. Extraction of chlorophylls and carotenoids from Antarctic benthic mats for analysis by H.P.L.C. *Journal of Applied Phycology*, 5: pp 623-628.
20. Falkowski A.G., 1992. Molecular ecology of phytoplankton photosynthesis. -In Falkowski and Woodhead (Eds.) Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea, Plenum Press, New York: pp 47-67.
21. Fawley M. W., 1992. Phoytosynthetic pigments of *Pseudoscurfieldia marina* and selected green flagellates and ultraphytoplankton: implications for the systematics of Micromonadophyceae (Chlorophyta), *J. Phycol.*, 28: pp 26-31.
22. Francis G. W., 1992. Preparative HPLC of carotenoids. -In. Parker L. (Ed.) Carotenoids part A. Chemistry, Separation, Quantitation & Antioxydation. Methods in Enzymology, Vol 213, Academic Press, Inc. San Diego: pp 246-251.
23. Frankel D.S., Olson R.J., Frankel S.L. & Chisolm S.W., 1989. Use of a neural net computer system for analysis of flow cytometric data of phytoplankton populations. *Cytometry*, 10: pp 540-550
24. Franscesc P., 1994. Prediction of planktonic protistan grazing rates. *Limnol. Oceanogr.*, 39(1): pp 195-206.
25. Gallegos C. L., 1989. Microzooplankton grazing on phytoplankton in Rhode River, Maryland: non linear feeding kinetics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 57: pp 23-33.
26. Goericke R & Welschmeyer N. A., 1993. The marine Prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research I*, 40(11/12): pp 2283-2294.
27. Gieskes W.W.C. & Kraay G.W., 1983. Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis of pigments. *Marine Biology*, 75: pp 179-185.
28. Gieskes W.W.C., Kraay G.W., Nontji A., Seiapermana D & Sutomo, 1988. Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of euphotic zone of the Banda Sea (Indonesia). A mathematical analysis of algal pigment fingerprints. *Netherlands Journal of Sea Research*, 22(2) : pp 123-137.
29. Gifford D. J., 1988. Impact of grazing by microzooplankton in the Arm of Halifax Harbour, Nova Scotia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 47: pp 249-258.
30. Goodwin T.W., 1992. Distribution of carotenoids. -In. Parker L. (Ed.) Carotenoids part A. Chemistry, Separation, Quantitation & Antioxydation. Methods in Enzymology, Vol 213, Academic Press, Inc. San Diego: pp 167-174.

31. Gosselain V., Descy J-P., & Everbecq E., 1994. The phytoplankton community of the River Meuse, Belgium: Seasonal dynamics (year 1992) and the possible incidence of zooplankton grazing. -In Descy J.-P., Reynolds C.S & Padiasak J. (Eds.) Phytoplankton in Turbid Environments: Rivers and Shallow Lakes, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. *Hydrobiologia* 289: pp 179-191.
32. Haney J. F., 1971 An *in situ* method for the measurement of zooplankton grazing rates. *Limnol. Oceanogr.* 16: pp 970-977.
33. Haney J. F., 1973 An *in situ* examination of the grazing activities of natural zooplankton communities. *Arch. Hydrobiol.* 72(1): pp 87-132.
34. Hari R.K., Patel T.R. & Martin A.M., 1994. An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis and applications in food industries. *Food Reviews International*, 10(1): pp 49-70.
35. Haugan J. H. & Liaaen-Jensen S., 1994. Algal Carotenoids 54. Carotenoids of Brown Algae (Phaeophyceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 22(1): pp 31-41.
36. Head E. J. H., 1992a. Gut pigment accumulation and destruction by arctic copepods *in vitro* and *in situ*. *Marine Biology*, 112: pp 583-592.
37. Head E. J. H., 1992b. Comparison of the chemical composition of particulate material and copepod faecal pellets in the gulf of St Lawrence. *Marine Biology*, 112: pp 593-600.
38. Head E. J. H. & Harris L. R., 1992. Chlorophyll and carotenoid transformation and destruction by *Calanus* spp. grazing on diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86: pp 226-238.
39. Head E. J. H., Hargrave B. T. & Subba Rao, 1994. Accumulation of a pheophorbide *a*-like pigment in sediment traps during late stages of a spring bloom: A product of dying algae? *Limnol. Oceanogr.*, 39(1): pp 176-181.
40. Herzig R. & Dubinsky Z., 1992. Photoacclimatation, photosynthesis and growth in phytoplankton. *Israel Journal of Botany*, 41: pp 199-211.
41. Hoff A. J. & Ames J., 1991. Visible absorption spectroscopy of chlorophylls. -In Sheer H. (Ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton: pp 723-738.
42. Hynninen P. H., 1991. Chemistry of chlorophylls: modifications. - In Sheer H. (Ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton: pp 145-206.
43. Johnson G., Sakshaug E. & Vernet M., 1992. Pigment composition, spectral characterisation and photosynthetic parameters in *Chrysochromulina polylepis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 83: pp 241-249.
44. Kirk J. T. O., 1986. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. University Press, Cambridge: 401 pp.
45. Klaveness D., 1988 Ecology of the Cryptomonadina: A First Review. -In Sandgren C. D. (Ed.) Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge: pp 105-133.
46. Klein B., & Riaux Gobin C., 1991. Algal pigment diversity in coastal sediments from Kerguelen (Sub-Antarctic islands) reflecting local dominance of green algae, euglenoids and diatoms. *Polar Biology*, 11: pp 439-448.

47. Kobayashi M., Kakizona T., Nishio N. & Nagai S., 1992. Effect of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Fermentation and Bioengineering*, 74(1): pp 61-63.
48. Lachance P. A., 1994. Micronutrients in cancer prevention. *ACS Symposium Series*, 546: pp 50-64.
49. Landry M. R. & Hassett R. P., 1982. Estimating the impact of grazing by microzooplankton. *Marine Biology*, 67: pp 283-288.
50. Latassa M., Estrada M. & Delgado M., 1992. Plankton - pigment relationships in the Northwestern Mediterranean during stratification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 88: pp 61-73.
51. Leakey R.J.G., Burkill P.H. & Sleigh M.A., 1994. A comparison of fixatives for the estimation of abundance and biovolume of marine planktonic ciliate populations. *J. Plankton Res.* 16(4): pp 375-389.
52. Letelier R. M., Bidigare R. R., Hebel D. V., Ondrusek M., Winn C. D. & Karl D. M., 1993. Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 38(7): pp 1420-1437
53. Lorenzen C.J., 1967: Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12: pp 343-346.
54. Mac Clatchie S., 1992. Time-series measurement of grazing rates of zooplankton and bivalves. *J. Plankton Res.*, 14(2): pp 183-200.
55. Mac Clatchie S., Jaquier P., Kawachi R. & Pilditch C., 1991. Grazing rates of *Nyctiphanes australis* (Euphausiacea) in the laboratory and Otago Harbour, New Zealand, measured using three independent methods. *Continental Shelf Research*, 11(1): pp 1-22.
56. Mac-Manus B. G., Ederington-Cantrell M. C., 1992. Phytoplankton pigments and growth rates, and microzooplankton grazing in a large temperate estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 87: pp 77-85.
57. Mantoura R. F. C. & Llewellyn A., 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase HPLC. *Analytica Chimica Acta*, 151: pp 297-314.
58. Matile P., 1992., Chloroplast senescence. -In Baker N. R. & Thomas H. (Eds.) Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants. Elsevier Science Publishers: pp 413-440.
59. Merete G., Metzger P.L. & Synnove L.J., 1993. Algal Carotenoids 52. Secondary Carotenoids of Algae 3; Secondary Carotenoids in the natural bloom of *Euglena sanguina*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 21(8): pp 757-763.
60. Merete G., Metzger P.L. & Synnove L.J., 1994. Algal Carotenoids 53. Secondary Carotenoids of Algae 4; Secondary Carotenoids in the Green Alga *Botryococcus braunii*, race L, new strain. *Biochem. Syst. Ecol.*, 22(1): pp 25-29.
61. Millie D. F., Paerl H. W., Hurley J. P. & Kirkpatrick G. J., 1993. Algal pigment determinations in aquatic ecosystems: Analytical evaluations, applications, and recommendations. *Current Topics in Bot. Research*, 1: pp 1-13.
62. Millie D. F., Paerl H. W., Hurley J. P. & Kirkpatrick G. J., 1993. Microalgal Pigment Assessments Using High-Performance Liquid Chromatography: A Synopsis of Organismal And Ecological Applications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: pp 2513-2527.



63. **Mínguez-Mosquera M. I. & Hornero-Méndez D.**, 1994. Changes in Carotenoid Esterification during the Fruit Ripening of *Capsicum annum* Cv. Bola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: pp 640-644.
64. **Paranjape M. A.**, 1987. Grazing by microzooplankton in the eastern Canadian Arctic in summer 1983. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 40: pp 239-246.
65. **Parsons T.R. & Strickland J.D.**, 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments with revised equations of ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.* 21: pp 155-163.
66. **Péchar L.**, 1987. Use of acetone:methanol mixture for extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll *a* in phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 78: *Algol stud.*, 46: pp 99-117.
67. **Perressinotto R.**, 1992. Mesozooplankton size selectivity and grazing impact on the phytoplankton community of the Prince Edward Archipelago (Southern Ocean). *Mar Ecol. Prog. Ser.*, 79: pp 243-258.
68. **Pfander H.**, 1992. Carotenoids: An overview. -In Parker L. (Ed.) Carotenoids Part A. Chemistry, Separation, quantitation and Antioxidation. Methods in Enzymology, vol. 213, Academic Press Inc, San Diego: pp 13-22.
69. **Polet J.**, 1992. Caractérisation de la composition pigmentaire du phytoplancton de la meuse: possibilité d'utilisation des pigments comme biomarqueurs. Mém. de Licence, Fac. Univ. Notre Dame de la Paix, Namur: 79 pp.
70. **Porra R. J.**, 1991. Recent advances and re-assessment in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae. -In Sheer H. (Ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton: pp 31-57.
71. **Quiblier C., Bourdier G., Amblard C., Pépin D. & Communal P.Y.**, 1991. Intérêt de la séparation des pigments par CLHP pour l'étude des relations trophiques phyto-zooplanktoniques. -In Vernet P. (Ed.), Hommage à F.A. Forel (3° CILEF), Morges, Suisse: pp 104-107.
72. **Quiblier-Lloberas C.**, 1994. Relations trophiques phyto-zooplankton en milieu lacustre: intérêts des pigments comme marqueurs organiques. Mémoire de Thèse doctorale, Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand: 195 pp.
73. **Redden A.M, Thompson R.J. & Deibel D.**, 1993. Effects of short- and long-term freezing of chloropigments in cultured diatoms and bivalve digestive gland and faeces as determined by standard fluorometry and HPLC. *Arch. Hydrobiol.*, 129(1): pp 67-87
74. **Richards & Thomson, 1952.** The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. A spectrophotometric method for estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.* 11: pp 156-171.
75. **Sanderson R.**, 1992. A Preliminary Study of the Zooplankton of the River Meuse (Belgium). Master of Science Degree in Natural Resource Management, University of Leicester., 90pp
76. **Sartory D. P.**, 1985. The determination of algal chlorophyllous pigments by High-Performance Liquid Chromatography and spectrophotometry. *Water research*, 19(5): pp 605-610.
77. **Sheer H.**, 1991 Structure and occurrence of chlorophylls. -In Sheer H. (Ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton: pp 3-30.
78. **Seip K.L., Sas H. & Vermij S.**, 1992. Nutrient-chlorophyll trajectories across trophic gradients. *Aquatic Science* 54 (1): pp 58-76.

79. Shioi Y., 1991. Analytical chromatography of chlorophylls. -In Sheer H. (Ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton: pp 31-58.
80. Smayda T.J., 1978. From phytoplankton to biomass. -In Sournia A. (Ed.) Phytoplankton Manual, Monographs on Oceanographic Methodology. Unesco, Paris: pp 273-279.
81. Sournia A., 1978. Phytoplankton Manual, Monographs on Oceanographic Methodology. Unesco, Paris: 337 pp
82. Strom S. L. & Welschmeyer N. A., 1991. Pigment-specific rates of phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the open Subarctic Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 36(1): pp 50-63.
83. Svec W. A., 1991. The distribution and extraction of the chlorophylls. -In Sheer H. (Ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton: pp 59-88.
84. Thurnam D. L., 1994. Carotenoids: functions and fallacies. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53: pp 77-87.
85. Utermöhl H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, 9: 38 pp.
86. Vechtel B., Kahmann U., & Ruppel H. G., 1992. Secondary carotenoids of *Eremosphora viridis* De Bary (Chlorophyceae) under nitrogen deficiency. *Botanica Chimica Acta*, 105(3): pp 133-226.
87. Vincent W. F. & Roy S., 1993. Solar UV-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environ. Rev.*, 1: pp 1-12.
88. Vincent W.F., Downes M.T., Castenholz R.W. & Howard-Williams C., 1993. Community structure and pigment organisation of cyanobacteria-dominated microbial mats in Antarctica. *Eur. J. Phycol.*, 28: pp 213-221.
89. Vincent W. F. & Quesada A., 1994. Ultraviolet radiation effect on cyanobacteria: Implications for Antarctic microbial ecosystems. *Antarctic Research Series*, 62: pp 111-124.
90. Viroux L., 1992. Etude de la dynamique du zooplancton dans la Moselle française et en haute Meuse belge. Mém. de Licence, Fac. Univ. Notre Dame de la Paix, Namur: 81 pp.
91. Webb D. J., Burnison B. K., Trimbee A. M. & Prepas E. E., 1992. Comparison of chlorophyll *a* extraction with ethanol and dimethyl sulfoxide/acetone, and a concern about spectrophotometric phaeopigment correction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: pp 2331-2336.
92. Welschmeyer N.A., Copping A.E., Vernet M. & Lorenzen C.J., 1984. Diel fluctuation in zooplankton grazing rate as determined from the downward vertical flux of phaeopigments. *Marine Biology*, 83: pp 263-270.
93. Welschmeyer N.A. & Lorenzen C.J., 1985. Chlorophyll budgets: zooplankton grazing and phytoplankton growth in the temperate fjords and the central Pacific gyres. *Limnol. Oceanogr.*, 30: pp 1-21.
94. Wilhelm C., Rudolph I. & Renner W., 1991. A quantitative method based on H.P.L.C. aided pigment analysis to monitor structure and dynamics of the phytoplankton assemblage - A study from Lake Meerfelder Maar (Eifel, Germany). *Arch. Hydrobiol.*, 123(1): pp 21-35.
95. Wong C. K., Chan A.L. C. & Tang K. W., 1992. Natural ingestion rates and grazing impact of the marine Cladoceran *Penilia avirostris* Dana in Tolo Harbour, H.-K.. *J. Plankton Res.*, 14(12): pp 1757-1765

96. Wright S. W. , Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Repeta D., & Welschmeyer N.,1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog Ser.*, 177: pp 183-196.
97. Wright S. W. & Jeffrey S. W., 1987. Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 38: pp 259-266.

Annexe 1

Tableau 1

Date	Temp. (°C)	pH	TAC (mg/l)	O2 dissous (mg/l)	conductivité (µS/cm)	Zmax (m)	Irradianceau sol (J/cm2)	K	I moyen sous eau (J/cm2)	Chla classique (µg/l)	débit (m3/s)	COP (µg/l)
23-Mar	7,1	7,84	124	11,9	316	-1,61	169	-2,86	14,8		342	
1-Avr	10,4	7,43	146	11,7	386	-2,67	868	-1,72	126,0	24,0	229	
8-Avr	6,8	7,81	110	11,3	283	-0,99	845	-4,66	45,4	13,3	402	
15-Avr	7,5	7,7	156	12,9	607	-2,06	1852	-2,23	207,8	6,2	351	
22-Avr	9,6	8,24	200	12,7	393	-2,81	2046	-1,64	312,3	4,6	192	1320
29-Avr	12,6	8,29	196	13,3	433	-3,20	2178	-1,44	378,8	29,4	153	1325
6-Mai	14,3	8,32	156	16,1	374	-1,84	507	-2,50	50,7	10,1	122	3875
16-Mai	15,8	7,68	168	11,1	443	-3,84	1700	-1,20	354,8	18,8	105	1985
24-Mai	15,4	8,57		15,7	411	-2,00	1186	-2,30	128,9	62,7	98	2390
27-Mai	14,6	8,38	178	10,8	907	-2,28	835	-2,02	103,5	50,1	110	2262
3-Jun	16,3	8,58	178	13,9	430	-1,91	1268	-2,41	131,6	48,4	90	2537
10-Jun	14,9	8,2	140	11,3		-1,78	1284	-2,58	124,2	40,8	108	2223
17-Jun	17,6	8,82	168	11,7	402	-1,80	2313	-2,56	226,3	114,3	92	4054
24-Jun	20,9	8,81	148	13,2	348	-2,07	3103	-2,22	349,1	113,0	64	4776
1-Jul	22,5	7,97		7	368	-2,07	2999	-2,22	337,4	56,9	53	2826
8-Jul	22,5	7,56		6,2	378	-2,07	858	-2,22	96,5	18,5	44	769
15-Jul	22,9	7,63	190	7,5	413	-2,70	1443	-1,70	211,7	18,8	35	
20-Jul	22,7	7,7	142	9	442	-2,07	1764	-2,22	198,5	44,2	49	2189
11-Aoû	22,7	7,7	163	6,7	396	-1,64	789	-2,80	70,3	42,2	46	2974
18-Aoû	19,3	8,58	171,6	12,9	442	-1,54	1377	-2,99	115,2	71,5	36	3583
25-Aoû	19,4	8,75	190	13,6	412	-1,39	1843	-3,31	139,2	93,7	32	2574
1-Sep	18,3	8,5	170	10,3	368	-1,39	494	-3,31	37,3	98,4	33	2875
8-Sep	16,8	8,45	168	11,3	414	-1,39	398	-3,31	30,1	93,7	42	3791
15-Sep						-1,78	429	-2,58	41,5	77,6	43	2373
22-Sep	13	8,45	160	12,8		-2,20	1240	-2,09	148,3	11,3	90	1531

Tableau 2

H.P.L.C. (µg/l)											
Date	chl. a	chl. b	phaeo. a	phaeo b	fucox.	échin	neox.	zeax.	diadinox.	allox.	lutein
23-Mar	12,47	0,81	0,23	0,23	7,16		0,02		1,04	1,70	0,35
1-Avr	17,09	0,92	1,16	0,12	10,40		0,03		2,04	1,63	0,23
8-Avr	10,63	0,69	0,12	0,12	3,70		0,02		0,58	0,75	0,35
15-Avr	10,16	0,69	0,12	0,12	3,93		0,55		0,58	0,72	0,35
22-Avr	40,77	1,39	0,23	0,35	19,29				3,12		0,35
29-Avr	27,29	1,82	0,52	0,00	11,56	0,07	0,10	0,08	0,89	0,24	0,38
6-Mai	79,02	3,45	3,18	0,20	39,99	0,04	0,36	0,00	3,33	0,85	1,11
16-Mai	57,23	3,90	1,17	0,33	24,16	0,08	0,38	0,17	1,62	1,03	1,56
24-Mai	52,86	3,44	1,22	0,38	25,68	0,04	0,35	0,08	1,55	0,91	1,14
27-Mai	38,88	2,78	1,26	0,65	15,80	0,02	0,21	0,10	1,13	0,85	1,05
3-Jun	58,12	4,62	1,14	0,46	22,48		0,40	0,20	1,48	1,22	1,87
10-Jun	32,17	3,21	0,67	0,36	9,92		0,21	0,16	0,64	0,63	1,43
17-Jun	89,69	8,75	1,43	1,29	30,09		0,43	0,40	1,99	1,09	4,11
24-Jun	96,44	7,39	1,27	0,46	49,03	0,10	0,46	0,35	3,23	1,82	3,47
1-Jul	40,02	4,04	1,96	0,75	13,34	0,06	0,12	0,23	0,98	1,29	2,08
8-Jul	10,05	1,58	1,58	0,50	2,02	0,06	0,09	0,12	0,20	0,40	0,77
15-Jul	40,95	3,26	1,48	0,49	14,07	0,06	0,22	0,14	0,85	1,08	1,52
20-Jul	42,57	4,77	0,95	0,36	9,03		0,46	0,32	0,64	1,19	2,95
11-Aoû	84,48	6,73	2,22	1,55	32,83	0,20	0,44	0,53	1,77	2,47	3,77
18-Aoû	71,43	5,09	1,69	0,65	25,31	0,23	0,14	0,10	1,22	1,54	2,11
25-Aoû	58,12	3,62	1,13	0,42	25,05	0,08	0,20	0,05	1,12	1,37	1,32
1-Sep	72,37	3,86	1,34	0,77	40,27	0,07	0,59	0,14	2,17	1,77	1,48
8-Sep	100,07	5,61	2,82	0,65	55,00	0,13	0,39	0,08	2,75	1,62	1,41
15-Sep	45,38	2,83	0,73	0,61	21,67		0,19	0,03	1,04	1,22	1,31
22-Sep	7,17	0,78	0,29	0,17	1,82	0,02	0,05	0,03	0,11	0,17	0,38

Tableau 3

Date	Zooplancton en 1994 à La PLante (Individus par m3)												
	Dreissena	Crustacea	Nauplii	Cladocera	Copepoda	Rotatoria	Brachionus angularis	B. Calliciflorus	Keratella cochlearis	Polyarthra sp.	Synchaeta sp.	Autres	zoo.tot.
23-Mar													
1-Avr													
8-Avr													
15-Avr													
22-Avr													
29-Avr													
6-Mai													
16-Mai		4866	4000	133	733	253000	12000	196000	1000	22000			257866
24-Mai		14600	12000	333	2267	182000	10000	52000		98000			196600
27-Mai	4000	11417	10000	917	500	136000	2000	32000		76000	2000		151417
3-Jun	110000	4333	4000	200	133	88000	10000	36000	2000	20000			202333
10-Jun	36000	533		333	200	24000		6000	10000	4000			60533
17-Jun	582000	2067	2000	67		18000	2000	10000					602067
24-Jun	4000	867		867		12000	2000	8000	2000				16867
1-Jul	18000	400		400		680000	68000	560000	44000		2000		698400
8-Jul		2734		2267	467	550000	242000	148000	152000	4000	2000		552734
15-Jul	10000	2067	2000	67		386000	198000	60000	96000	18000	2000	12000	398067
20-Jul	2000	1866		1733	133	522000	196000	142000	150000	18000	10000	6000	525866
11-Aoû	32000	33200	20000	6467	6733	1056000	20000	120000	812000	12000	36000	12000	1121200
18-Aoû		1000		600	400	612000	36000	96000	360000	24000	72000	12000	613000
25-Aoû		1917		917	1000	1497000		988000	477000		20000	12000	1498917
1-Sep		1267		1000	267	1580000		1240000	332000	4000		4000	1581267
8-Sep		154		154		668000		288000	344000		36000		668154
15-Sep		67		67		466		43					533
22-Sep		334		67	267	133		133					467

Tableau 4

Date	nbre de rotif. ^par bouteille					graz. Haney		graz. dll. en % de biomasse par jour																								
						% / J	Ecart type	chl a		stat.		chl b		stat.		lut.		stat.		fucox.		stat.		allox.		stat.		échin.		stat.		
23-Mar																																
1-Avr																																
8-Avr																																
15-Avr																																
22-Avr																																
29-Avr																																
6-Mai																																
16-Mai	8	13	20	25	38	51																										
24-Mai	5	9	15	18	27	36																										
27-Mai	4	7	11	14	20	27																										
3-Jun	3	4	7	9	13	18	6,5	6,6																								
10-Jun	1	1	2	2	4	5	1,7	0,4																								
17-Jun	0	2	5	9	14	18	2,4	0,8		1,2										1,1									3,8			
24-Jun	0	1	1	1	2	2																										
1-Jul	0	34	54	68	102	136	6,6	0,7	-11,2	2,9	16,9	NS	-9,5	3,4	16,2	NS	-15,5	3,2	21,8	NS	-7,9	4,0	15,9	NS	-9,5	3,4	16,2	NS				
8-Jul	17	28	44	55	83	110																										
15-Jul	12	19	31	39	58	77	25,1	2,9																								
20-Jul	16	26	42	52	78	104																										
11-Aoû	32	53	84	106	158	211	11,3	1,3	2,0	4,1	6,1	S	-0,8	5,7	12,3	SS	1,5	5,4	9,3	SS	2,1	4,0	6,0	S	2,8	4,7	6,6	S	3,5	8,1	12,7	S
18-Aoû	18	31	49	61	92	122	17,3	4,3																								
25-Aoû	45	75	120	150	225	0	34,4	7,4	1,0	2,5	4,1	S	0,9	1,9		S	0,4	1,4	2,4	S	-0,4	1,6	3,5	NS	2,9	21,3	39,3	SS				
1-Sep	47	79	126	158	237	316	16,8	23,7	14,6	35,6	56,7	S	-49,0	14,0	76,9	SS	-24,9	16,8	58,4	S	10,7	16,0	21,2	SS	2,4	12,0	21,6	SS	-0,4	29,4	59,3	NS
8-Sep	20	33	53	67	100	134	7,4	13,0																								
15-Sep	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09			-0,2	4,7	9,6	NS	-9,3	6,3	21,9	S	3,6	9,6	15,7	SS	0,5	5,0	9,5	NS	-2,4	4,3	10,8	NS				
22-Sep	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03			0,0	2,3	4,7	NS	-0,7	2,7	6,1	NS	0,4	3,1	5,7	NS	2,8	4,7	6,6	SS	2,6	5,1	7,6	SS				

Annexe 2

Evolution temporelle des densités en zooplancton à La Plante en 1994

	16/05	23/05	27/05	03/06	10/06	17/06	24/06	29/06	08/07	15/07	20/07
<i>Brachionus calyciflorus</i>	198000 +/- 26733	52000 +/- 21166	32000 +/- 7303	36000 +/- 8641	6000 +/- 5657	10000 +/- 3266	8000 +/- 3266	560000 +/- 49423	148000 +/- 14236	60000 +/- 8641	142000 +/- 15319
<i>B. urceolaris</i>	22000 +/- 6532	18000 +/- 13466	14000 +/- 6532	18000 +/- 5657	4000 +/- 3266	6000 +/- 3266		4000 +/- 4619			
<i>B. angularis</i>	12000 +/- 8641	10000 +/- 8641	2000	10000 +/- 5657		2000 +/- 4619	2000 +/- 4619	88000 +/- 19866	242000 +/- 26331	198000 +/- 32496	196000 +/- 27905
<i>Keratella cochlearis</i>	1000 +/- 2309			2000	10000 +/- 3266		2000 +/- 3266	44000 +/- 12649	152000 +/- 22390	96000 +/- 16971	150000 +/- 16971
<i>K. quadrata</i>			6000 +/- 3266								
<i>Euchlanis sp.</i>	22000 +/- 11776	98000 +/- 16971	76000 +/- 21166	20000 +/- 7303	4000 +/- 3266				4000 +/- 4619	18000 +/- 5657	18000 +/- 5657
<i>Fillinia sp.</i>			2000 +/- 4619	2000 +/- 5657				2000 +/- 4619	2000 +/- 3266		
<i>Polyarthra sp.</i>								2000	2000 +/- 4619	2000	10000 +/- 5657
<i>Asplanchna sp.</i>		4000 +/- 4619	2000							12000 +/- 5657	6000 +/- 4619
<i>Synchaeta sp.</i>			2000 +/- 4619								
Rotifères totaux:	253000 +/- 35553	182000 +/- 9798	136000 +/- 25508	88000 +/- 16971	24000 +/- 6532	18000 +/- 4619	12000 +/- 8000	680000 +/- 39463	550000 +/- 21417	386000 +/- 46762	522000 +/- 43818
<i>Dreissena nauplii</i>	4000 +/- 3266	12000 +/- 7303	4000 +/- 3266	110000 +/- 20656	36000 +/- 11776	582000 +/- 63750	4000 +/- 5657	18000 +/- 5657		10000 +/- 4619	2000
Copépodites totaux:	733	2267	500	133	200	2000			467	2000	133
Cladocères totaux:	133	333	917	200	333	67	867	400	2267	67	1733
Zooplancton total:	257866 +/- 38713	196800 +/- 3286	151417 +/- 25298	202333 +/- 19866	60533 +/- 16971	602067 +/- 59956	15867 +/- 3266	698400 +/- 44181	552734 +/- 21417	398067 +/- 46989	525866 +/- 43818

	29/07	11/08	18/08	25/08	01/09	08/09	15/09	22/09
<i>Brachionus calyciflorus</i>	104000 +/- 14806	120000 +/- 14806	96000 +/- 11776	988000 +/- 41825	1240000 +/- 97105	288000 +/- 37523	43	
<i>B. urceolaris</i>	2000							
<i>B. angularis</i>	120000 +/- 28659	20000 +/- 15319	36000 +/- 13856					
<i>Keratella cochlearis</i>	222000 +/- 35024	812000 +/- 84581	360000 +/- 49853	477000 +/- 91302	332000 +/- 33307	344000 +/- 34564	423	133
<i>K. quadrata</i>								
<i>Euchlanis sp.</i>	16000 +/- 5657	12000 +/- 5657	24000 +/- 15319		4000			
<i>Fillinia sp.</i>		32000 +/- 4619	12000 +/- 4619					
<i>Polyarthra sp.</i>	2000 +/- 4619	36000 +/- 10328	72000 +/- 20656	20000 +/- 13064		36000 +/- 25298		
<i>Asplanchna sp.</i>		12000 +/- 3266						
<i>Synchaeta sp.</i>	14000 +/- 6532	12000 +/- 6532	12000 +/- 5657	12000 +/- 9238	4000 +/- 6532			
Rotifères totaux:	480000 +/- 45607	1058000 +/- 48990	612000 +/- 64581	1497000 +/- 96967	1580000 +/- 111618	668000 +/- 45724	466	133
<i>Dreissena nauplii</i>	6000 +/- 5657	32000 +/- 16330						
Copépodites totaux:	133	20000 +/- 9798	400	1000	267	154	67	267
Cladocères totaux:	1400	6733	600	917	1000		67	67
Zooplancton total:	487533 +/- 41441	1121200 +/- 35926	613000 +/- 64581	1498917 +/- 96967	1581267 +/- 111618	668154 +/- 45724	533	466

Phytoplancton à la plante - Meuse 1994

Biomasse ($\mu\text{g C/l}$)

Selon Strathmann (1967) et Taguchi (1975) pour les Diatomées

	23-Mar	1-Avr	8-Avr	15-Avr	22-Avr	29-Avr	6-Mai	16-Mai	23-Mai	27-Mai	3-Jun	17-Jun	24-Jun	1-Jul	8-Jul	15-Jul	20-Jul	29-Jul	11-Aoû	18-Aoû	25-Aoû	1-Sep	8-Sep
Chlorophycées			4			273	102	192	182	456	257	544	852	660	359	689	1415	1689	1196	1831	313	824	266
Chrysophycées					32		101	327	172	75		68		32									46
Diatomées	352	574	390	547	1251	1284	1390	1092	1464	586	1184	1730	2904	1277	292	482	1349	1080	2627	3667	1466	2073	4202
Cyanophycées										65	105	57	154	120		263	198	348	568	471	333	307	186
Euglénophycées																							
Cryptophycées - Dinophycées				61	58	18	53	263	195		231	179	121	286	64	76	186	345	157	303	115	65	230
TOTAL	352	574	394	609	1341	1575	1647	1874	2013	1182	1777	2579	4030	2375	715	1510	3148	3464	4548	6273	2227	3269	4930

selectivité du "grazing", par dilution, à partir des pigments marqueurs de communautés.

dilution en hplc pour Co: 100,00 *
 dilution en hplc pour Ct: 50,00 *
 le 25/08/94 G V
 temps d'incubation: 1,00 jour(s) soit: 24,00 heures

Réponses et concentrations en pigments									Réponses, par litre, après incubation in situ.					
pigment	Cc en ng/l	réponse	Réponse initiale calculée, par litre, pour chaque dilution (volume d'eau non filtrée par litre)											
			0,03	0,05	0,08	0,10	0,15	0,20	0,03	0,05	0,08	0,10	0,15	0,20
chl a	100030	1776795							13346950	16410750	26266550	30447000	47124850	40377650
	108864	1933721	5363058	8938430	14301488	17876860	26815290	35753720	10179750	16106200	26643350	31415350	59560850	68341050
	93035	1652542							11554750	17277150	28487700	31498000	48530750	69716350
alloxanthine	1413	45772							341500	315450	863100	1098450	1845650	2125300
	2221	71939	230390	383983	614373	767967	1151950	1535933	340150	367900	759900	804900	2666400	2676150
	3478	112679							318700	410350	668750	786850	2103050	1387600
fucoxanthine	37386	982087							6565000	8925450	15549900	17040050	29795350	33417400
	45786	1202762	3417505	5695842	9113347	11391683	17087525	22783367	6309750	9053550	16978100	20573750	40411650	49142350
	76924	1232656							7224250	11165850	17805100	19387600	32673400	30681150
lutéine	2106	130288							853900	1307350	2563450	2455450	3639600	4748750
	2409	149022	424146	706910	1131056	1413820	2120730	2827640	892250	1220000	2309350	2406950	3793550	5881100
	2341	144836							951850	1176050	2185650	2358450	3464600	4830400
chlb	6803	150034							877400	1235650	1717300	2026450	3241500	5029900
	6679	147296	414435	690725	1105160	1381450	2072175	2762900	876800	1223650	1930800	2045950	3954500	4597700
	5312	117105							756450	1281300	2092150	2239350	2853350	2846550
échinénone	77	1901							0	0	0	0	0	82200
	160	7782	17361	28935	46296	57870	86805	115740	0	0	0	0	0	132450
	158	7678							0	0	0	0	0	91600

selectivité du "grazing", par dilution, à partir des pigments marqueurs de communautés.

$(1/t) \ln(Ct/Co)$							pigment	taux de "grazing" en %	intervale de confiance à 95%
pigment	0,03	0,05	0,08	0,10	0,15	0,20			
chl a	0,91	0,61	0,61	0,53	0,56	0,12	chl a	2,54	1,56
	0,64	0,59	0,62	0,56	0,80	0,65			
	0,77	0,66	0,69	0,57	0,59	0,67			
alloxanthine	0,39	-0,20	0,34	0,36	0,47	0,32	alloxanthine	21,34	18,40
	0,39	-0,04	0,21	0,05	0,84	0,56			
	0,32	0,07	0,08	0,02	0,60	-0,10			
fucoxanthine	0,65	0,45	0,53	0,40	0,56	0,38	fucoxanthine	1,55	1,93
	0,61	0,46	0,62	0,59	0,86	0,77			
	0,75	0,67	0,67	0,53	0,65	0,30			
lutéine	0,70	0,61	0,82	0,55	0,54	0,52	lutéine	1,40	0,99
	0,74	0,55	0,71	0,53	0,58	0,73			
	0,81	0,51	0,66	0,51	0,49	0,54			
chl b	0,75	0,58	0,44	0,38	0,45	0,60	chl b	1,94	1,06
	0,75	0,57	0,56	0,39	0,65	0,51			
	0,60	0,62	0,64	0,48	0,32	0,03			
échinénone	#####	#####	#####	#####	#NOMBRE!	-0,34	échinénone	#VALEUR!	#NOMBRE!
	#####	#####	#####	#####	#NOMBRE!	0,13			
	#####	#####	#####	#####	#NOMBRE!	-0,23			

droites de régression pour la mesure du "grazing".

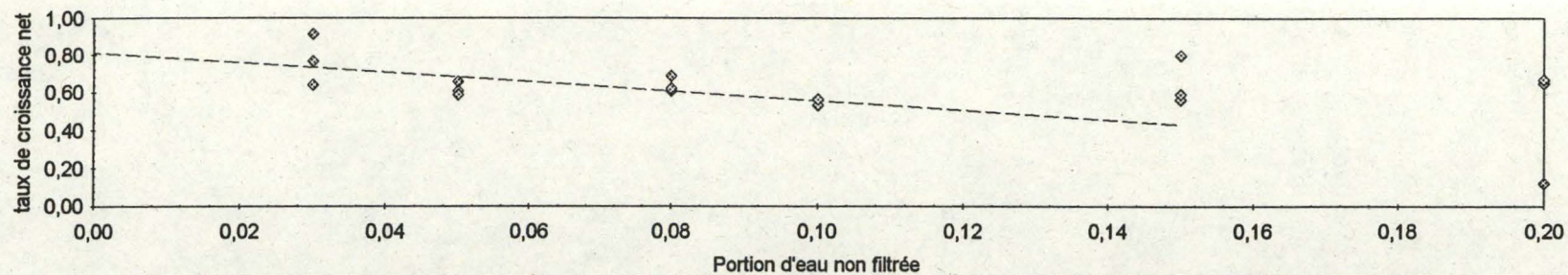
Chl a		Alloxanthine		fucoxanthine		lutéine		chl b		échinénone	
-2,535	0,811	-21,344	1,010	-1,553	0,680	-1,403	0,736	-1,937	0,704	#VALEUR!	#VALEUR!
0,860	0,060	3,975	0,164	1,067	0,075	0,600	0,055	0,643	0,059	#VALEUR!	#VALEUR!
0,465	0,080	0,878	0,097	0,175	0,100	0,296	0,097	0,411	0,104	#VALEUR!	#VALEUR!
8,70	10,00	28,83	4,00	2,12	10,00	5,46	13,00	9,06	13,00	#VALEUR!	#VALEUR!
x	y	x	y	x	y	x	y	x	y	x	y
0,00	0,81	0,00	1,01	0,00	0,68	0,00	0,74	0,00	0,70	0,00	#VALEUR!
0,15	0,43	0,15	-2,19	0,15	0,45	0,15	0,53	0,15	0,41	0,15	#VALEUR!

intervale de confiance de 95% sur G

d.l.	t 1-a/2	chl a	allox.	fucox.	lutéine	chl b	échin.
4,00	2,13	10,37	8,48	10,83	10,42	6,94	#NOMBRE!
7,00	1,90	2,90	18,40	3,25	3,71	2,45	#NOMBRE!
10,00	1,81	1,56	16,77	1,93	2,11	1,69	#NOMBRE!
13,00	1,77	1,40	15,91	1,61	0,99	1,06	#NOMBRE!
16,00	1,75	1,28	14,69	1,23	0,81	1,03	#NOMBRE!

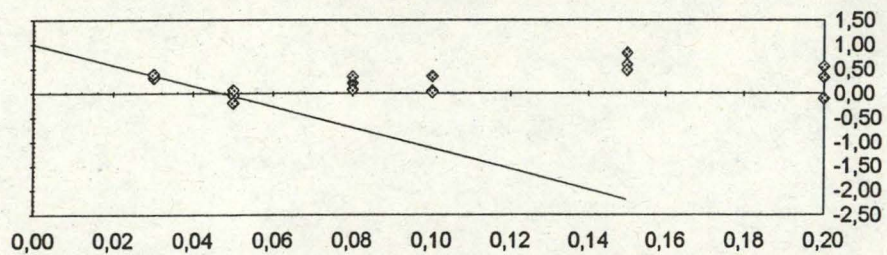
Mesure du "grazing" sur la communauté phytoplanctonique totale. (en fluorescence* et en absorption)

Chl a

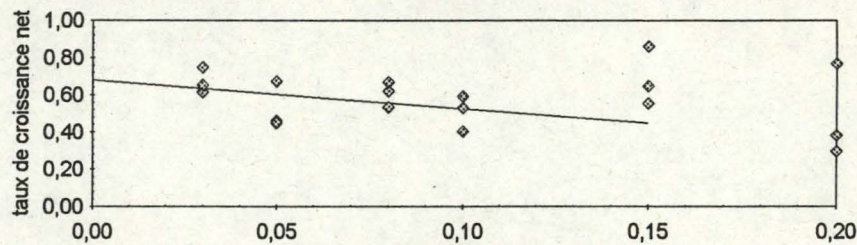


Mesure du grazing par communauté phytoplanctonique: allox. : Cryptophycées, fucox. : Diatomées, chl b et lutéine: Chlorophycées, et échinénone: Cyanophycées.

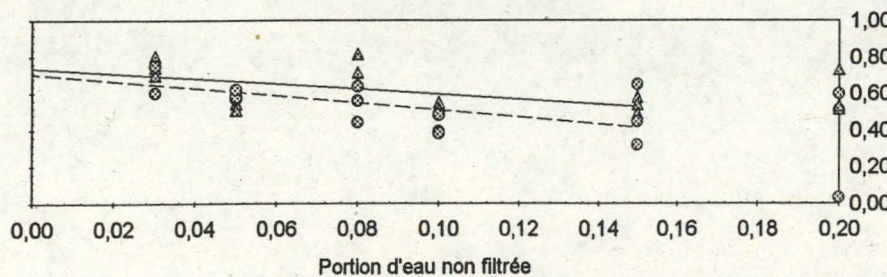
alloxanthine



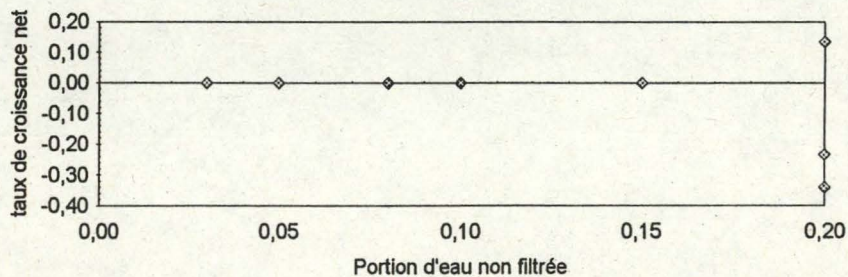
fucoxanthine



lutéine (triangles) et chl b (cercles)



échinénone



PIGMENTS et RELATIONS TROPHIQUES

Acquisition: Arnaud Metens

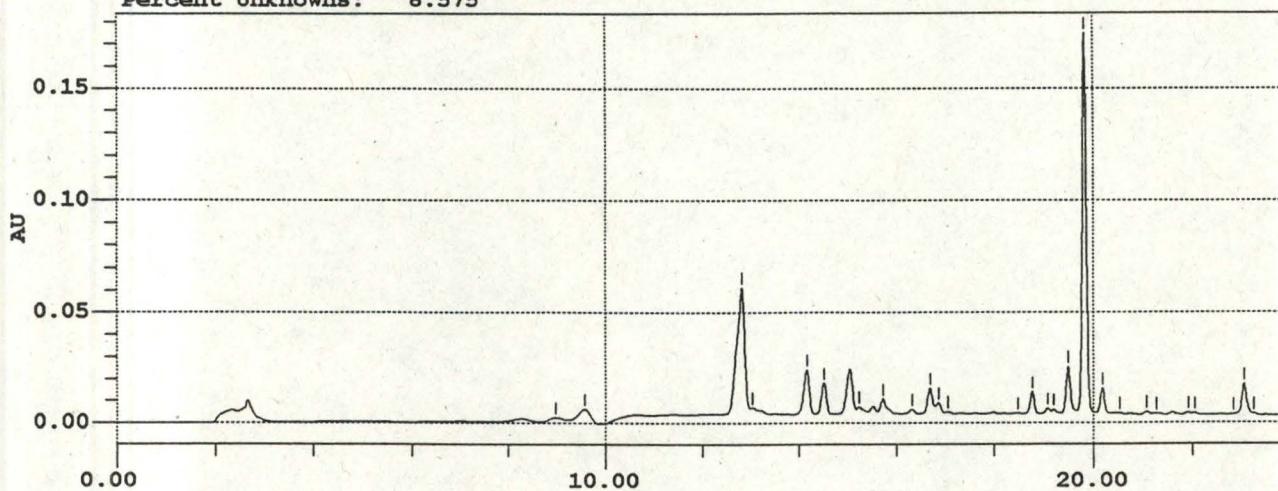
Date
06/10/94 11:22

SampleName
P 2508 GV 150

Volume
100.00

Processing Method
Arn_486

Channel ID: 10831 Run Time: 24.0 Dilution: 50.00000
Percent Unknowns: 8.575



Pigments

#	Name	Retention Time (min)	Amount	Area (uV*sec)	Type	Calc
1	phaeo b			7952	Group	
2	chl a		31.619	1191217	Group	
3	chl b			79090	Group	
4	phaeo a			12016	Group	
5	chlorophyllide b	4.649			Missing	
6	chlorophyllide a	7.063			Missing	
7		8.270		47248	Unknown	
8	chlorophyll c2	8.983		61890	Found	0.326
9	chlorophyll c1	9.580		134845	Found	0.711
10	9' trans neoxanthin	12.581			Missing	
11	fucoxanthin	12.833		654571	Found	11.748
12	9'-cis neoxanthin	13.047		20469	Found	0.146
13		13.200		8232	Unknown	
14	violaxanthin	13.973			Missing	
15	9'-cis-fucoxanthin	14.167		153662	Found	2.758
16	diadinoxanthin	14.517		90854	Found	0.713
17		15.047		163928	Unknown	
18	antheraxanthin	15.233		23776	Found	0.000
19		15.520		20345	Unknown	
20	alloxanthin	15.723		53328	Found	0.776
21	monadoxanthin	16.320		9240	Found	0.000
22	lutein	16.687		75871	Found	0.578
23	lutein like	16.867		30976	Found	0.236
24	zeaxanthin	17.050		2151	Found	0.031
25		17.990		802	Unknown	
26		18.193		1846	Unknown	
27	chlorophyll b allomer	18.490		3506	Found	0.075
28	chlorophyll b	18.777		59766	Found	1.278

PIGMENTS et RELATIONS TROPHIQUES

Acquisition: Arnaud Metens

Date
06/10/94 11:22

SampleName
N 2508 GV 150

Volume
100.00

Processing Method
Arn_486

Pigments

#	Name	Retention Time (min)	Amount	Area (uV*sec)	Type	Calc
29	chlorophyll b epimer	19.080		15100	Found	0.323
30	crocoxanthin	19.203		10056	Found	0.000
31	chlorophyll a allomer	19.493	3.412	128530	Found	3.412
32	chlorophyll a	19.823	20.454	770584	Found	20.454
33	chlorophyll a epimer	20.180	1.151	43382	Found	1.151
34		20.420		6077	Unknown	
35	echinenone	20.554			Missing	
36	phaeophythin b	21.070		4630	Found	0.101
37	phaeophythin b epimer	21.297		2519	Found	0.055
38		21.593		6212	Unknown	
39	phaeophythin a	21.907		6340	Found	0.162
40	phaeophythin a epimer	22.040		5248	Found	0.134
41		22.583		1851	Unknown	
42	BE-carotene	22.843		1956	Found	0.016
43	BB-carotene	23.073		63365	Found	0.523
44	cis-BB-carotene	23.287			Missing	

Processing Method: Arn_486

Millennium v2.00

Date Printed: 3:37:01 pm, October 11, 1994

Method Name: Arn_486
 Date Created: 11-OCT-94
 Method Type: LC
 Comments:

Calculated Custom Field Formulas

Calc (CConst1*CCalRef1[Amount]*Area)/CCalRef1[Area]

Calibration Parameters

Averaging None
 RT Window % 2.00
 Update RT Replace Standards
 CCalRef1 chl a

Peak Integration Parameters

Minimum Area 0 uV*sec
 Minimum Height 200 uV
 Lloff Threshold 10.000 uV/sec
 Touchdown Threshold 10.000 uV/sec
 PeakWidth 5.00 sec

Event Table

#	Start (min)	Event	Stop (min)
1	0.000	Inhibit Integration	2.890
2	11.025	Reverse Horizontal by Time	17.944
3	18.493	Forward Horizontal by Peak	21.130
4	24.400	Inhibit Integration	29.000

Component Table

#	Name	Retention Time (min)	RT Window (min)	Peak Match	Quant By
1	chlorophyllide b	4.649	0.221	Closest	Area
2	chlorophyllide a	7.063	0.371	Closest	Area
3	chlorophyll c2	8.905	0.176	Closest	Area
4	chlorophyll c1	9.592	0.357	Closest	Area
5	9' trans neoxanthin	12.581	0.103	Closest	Area
6	fucoxanthin	12.807	0.148	Closest	Area
7	9'-cis neoxanthin	13.040	0.160	Closest	Area
8	violaxanthin	13.973	0.175	Closest	Area
9	9'-cis-fucoxanthin	14.154	0.142	Closest	Area
10	diadinoxanthin	14.522	0.191	Closest	Area
11	antheraxanthin	15.243	0.253	Closest	Area
12	alloxanthin	15.720	0.250	Closest	Area
13	monadoxanthin	16.309	0.109	Closest	Area
14	lutein	16.677	0.179	Closest	Area
15	lutein like	16.853	0.140	Closest	Area
16	zeaxanthin	17.030	0.118	Closest	Area
17	chlorophyll b allomer	18.481	0.113	Closest	
18	chlorophyll b	18.770	0.434	Closest	
19	chlorophyll b epimer	19.082	0.070	Closest	

Component Table

#	Name	Retention Time (min)	RT Window (min)	Peak Match	Quant By
20	crocoxanthin	19.227	0.090	Closest	Area
21	chlorophyll a allomer	19.485	0.101	Closest	
22	chlorophyll a	19.816	0.656	Greatest Area	
23	chlorophyll a epimer	20.185	0.099	Closest	
24	echinenone	20.554	0.108	Closest	Area
25	phaeophythin b	21.099	0.108	Closest	
26	phaeophythin b epimer	21.291	0.094	Closest	
27	phaeophythin a	21.908	0.275	Closest	
28	phaeophythin a epimer	22.052	0.087	Closest	
29	BE-carotene	22.958	0.177	Closest	Area
30	BB-carotene	23.087	0.100	Closest	Area
31	cis-BB-carotene	23.287	0.100	Closest	Area
32	chl a				Area
33	chl b				Area
34	phaeo a				Area
35	phaeo b				Area

Component Table

#	Fit Type	Weighting	RT Reference
1	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
2	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
3	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
4	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
5	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
6	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
7	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
8	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
9	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
10	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
11	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
12	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
13	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
14	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
15	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
16	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
17			chlorophyll a
18			chlorophyll a
19			chlorophyll a
20	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
21			chlorophyll a
22			
23			chlorophyll a
24	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
25			chlorophyll b
26			chlorophyll a
27			chlorophyll a
28			chlorophyll a
29	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
30	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
31	Linear thru Zero	None	
32	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
33	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
34	Linear thru Zero	None	chlorophyll a
35	Linear thru Zero	None	chlorophyll a

Component Table

#	Curve Reference	Relative Response	Must Peak	Component Type
1			No	Single Peak
2			No	Single Peak
3			No	Single Peak
4			No	Single Peak
5			No	Single Peak
6			No	Single Peak
7			No	Single Peak
8			No	Single Peak
9			No	Single Peak
10			No	Single Peak
11			No	Single Peak
12			No	Single Peak
13			No	Single Peak
14			No	Single Peak
15			No	Single Peak
16			No	Single Peak
17	chl b	1.000	No	Single Peak
18	chl b	1.000	No	Single Peak
19	chl b	1.000	No	Single Peak
20			No	Single Peak
21	chl a	1.000	No	Single Peak
22	chl a	1.000	No	Single Peak
23	chl a	1.000	No	Single Peak
24			No	Single Peak
25	phaeo b	1.000	No	Single Peak
26	phaeo b	1.000	No	Single Peak
27	phaeo a	1.000	No	Single Peak
28	phaeo a	1.000	No	Single Peak
29			No	Single Peak
30			No	Single Peak
31			No	Single Peak
32			No	Named Group
33			No	Named Group
34			No	Named Group
35			No	Named Group

Component Table

#	CCompRef1	CConst1
1	chl a	0.805392731
2	chl a	1.000000000
3	chl a	0.198554913
4	chl a	0.198554913
5	chl a	0.269385004
6	chl a	0.676181102
7	chl a	0.269385004
8	chl a	0.269411700
9	chl a	0.676181102
10	chl a	0.295483871
11	chl a	0.000000000
12	chl a	0.548284118
13	chl a	0.000000000
14	chl a	0.287083338
15	chl a	0.287083338
16	chl a	0.548284118
17	chl a	0.805392731
18	chl a	0.805392731
19	chl a	0.805392731
20	chl a	0.000000000
21	chl a	1.000000000
22	chl a	1.000000000
23	chl a	1.000000000
24	chl a	0.365231200
25	chl a	0.821770334
26	chl a	0.821770334
27	chl a	0.963534361
28	chl a	0.963534361
29	chl a	0.311000452
30	chl a	0.311000452
31		
32	chl a	1.000000000
33	chl a	0.805392731
34	chl a	0.963534361
35	chl a	0.821770334

Table 'Timed Group Table' contains no data.

Named Group Information

Group Name chl a
 Retention Time None
 Peak #1: chlorophyll a allomer
 Peak #2: chlorophyll a
 Peak #3: chlorophyll a epimer

Group Name chl b
 Retention Time None
 Peak #1: chlorophyll b allomer
 Peak #2: chlorophyll b
 Peak #3: chlorophyll b epimer

Group Name phaeo a

Set Retention Time None
Peak #1: phaeophythin a
Peak #2: phaeophythin a epimer

Group Name phaeo b
Set Retention Time None
Peak #1: phaeophythin b
Peak #2: phaeophythin b epimer