Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude expérimentale du grazing par du zooplancton de petite taille (Brachionus calyciflorus, Rotifera et Bosmina sp., Cladocera)

Sadir, Youssef

Award date:
1997

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.

Download date: 02. May. 2026

SECRETARIAT BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
Rue de Bruxelles, 61
B - 5000 NAMUR

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

ETUDE EXPERIMENTALE DU GRAZING PAR DU ZOOPLANCTON DE PETITE TAILLE (*Brachionus calyciflorus,* Rotifera et *Bosmina* sp., Cladocera)

Mémoire présenté pour l'obtention du Diplome d'Etudes Complémentaires en Eco-Technologie des Eaux Continentales

Youssef SADIR

Juin 1997

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Télex 59222 Facnam-b - Téléax 081/23.03.91

ETUDE EXPERIMENTALE DU GRAZING PAR DU ZOOPLANCTON DE PETITE TAILLE (*Brachionus calyciflorus*, Rotifera et *Bosmina* sp., Cladocera)

SADIR Youssef

Résumé

L'étude a porté sur la mesure du "broutage" d'algues planctoniques par le rotifère (*Brachionus calyciflorus*) et le cladocère (*Bosmina* sp.), qui sont des représentants importants du zooplancton fluvial. Une première partie du travail a consisté à mesurer l'activité de filtration de *Bosmina* sp. par des incubations, en laboratoire et sur le terrain, à l'aide d'algues microscopiques marquées au ^{14}C. Un bon accord général entre les deux types de mesures a été obtenu, avec une gamme d'activités de filtration comprise entre 1,6 et 25 µl $ind^{-1}h^{-1}$, pour une concentration en nourriture allant de 0,15 à 11,8 mg C l^{-1}. Les valeurs mesurées en rivières sont en général inférieures à celles mesurées en laboratoire. La seconde partie du travail est une approche expérimentale de la mesure du broutage à partir de pigments algaux (chlorophylles ***a*** et caroténoïdes) déterminée par HPLC. Les expériences ont consisté à mettre des lots d'animaux élevés en laboratoire en présence de suspensions algales constituées de Chlorophycées, de Cryptophycées ou de Diatomées en culture pure, et à doser les pigments dans la suspension algale et les animaux à la fin d'incubations. La comparaison des quantités de pigments retrouvées en fin d'incubation avec les quantités de pigments dans des témoins sans animaux n'a pas permis de tirer des conclusions définitives quant à la conservation ou la dégradation des chlorophylles et des caroténoïdes. Néanmoins, la chlorophylle ***a*** semble être entièrement dégradée en phéophytine ***a*** et en pyrophéophytine ***a*** (sans production de phéophorbides) chez *Brachionus*. La valeur trouvée pour l'expérience avec des algues vertes est en accord avec celle obtenue au cours de mesures antérieures avec les mêmes algues marquées au ^{14}C. Chez les bosmines mises en présence d'algues vertes, l'activité de broutage évaluée d'après la formation de phéopigments (phéophytines et phéophorbides) est dans la gamme des résultats des mesures avec des algues radioactives (17 ng C ind^{-1} h^{-1}, soit 2.8 µl ind^{-1} h^{-1}) pour une concentration en nourriture saturante. En conclusion, l'intérêt de l'approche en HPLC pour l'étude du broutage par le zooplancton de petite taille est discuté.

Mémoire de Diplôme d'Études Complémentaires en Eco-technologie des Eaux Continentales
Juin 1997
Promoteur: Prof. J.-P. Descy
Co-promoteur: Prof. J.-C. Micha

Remerciements

Arrivé au terme de ce travail, j'aimerais remercier sincèrement toutes les personnes sans l'aide desquelles il n'aurait jamais pu être mené à bien.
Mes plus vifs remerciements vont au Professeur J.-C. Micha, qui m'a ouvert les portes de son unité et mis à ma disposition l'ensemble du matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.
Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur J.-P. Descy pour ses conseils judicieux et sa constante disponibilité malgré ses énormes occupations.
Un grand merci à Véronique Gosselain, pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail.
Je remercie également le Professeur E. Depiereux pour ses conseils précieux quant à l'analyse des résultats.
Un merci particulier à Célia.Joaquim-Justo pour son aide et sa collaboration.
Je tiens à formuler ma reconnaissance à tous mes amis et collègues du Laboratoire d'Ecologie, Patricia, "prince" Laurent, Bertrand, David, Jérome, Marc, Michaël, Laurence, Marie-Anne, Gersande, Yves "le grand", Françoise, Gisèle, Muriel, Gino, les deux Claire, Philippe, François, Sana, Jean-Daniel, le père Dédé (André), Eric, Clint, Fabrice, Pierre et les deux Jacques.
Mes pensées vont enfin à toute ma famille, pour le soutien qu'elle n'a jamais cessé de me manifester

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction 1

2. Synthèse bibliographique

1. Le phytoplancton en rivière 4

1.1. Données taxinomiques et successions 4
1.2. Les pigments caractéristiques du phytoplancton 5

2. Le zooplancton fluvial 9

2.1. Généralités 9
2.2. Le genre *Brachionus* 10
2.3. Le genre *Bosmina* 10

3. Les relations trophiques au sein du phytoplancton et du zooplancton en milieu fluvial 11

3.1. Généralités 11
3.2. Etude du grazing chez les Crustacés Cladocères 12
3.3. Modulation de l'activité de grazing 13

3.3.1. Taille et morphologie des espèces 13
3.3.2. Effet de la température 14
3.3.3. Quantité et qualité nutritionnelle 14
3.3.4. Autres facteurs 15

3.4. Comparaison de l'impact du grazing de différents groupes zooplanctoniques sur le phytoplancton 16

4. Les méthodes classiques d'études du grazing 17

4.1. Méthode des comptages 17
4.2. Utilisation de radiotraceurs 18
4.3. Utilisation de la fluorescence intestinale 19

5. L'interêt de l'HPLC dans l'étude des pigments 21

6. Dégradation des pigments 22

3. Objectif de l'étude 25

4. Matériel et méthodes

1. Introduction 26

2. Extraction, séparation et dosage des pigments en HPLC 26

2.1. Extraction des pigments à partir du matériel algal 26
2.1.1. Suspension algales 26
2.1.2. Suspensions animales 27
2.2. Le système utilisé 27
2.3. Identification et quantification des pigments 28
2.3.1. Identification des pigments 28
2.3.2. Quantification des pigments 29

3. Cultures d'algues et de zooplancton 30

3.1. Mise en culture des algues et suivi 30
3.2. Estimation de la densité algale 32
3.3. Culture des animaux 32
3.3.1. *Brachionus calicyflorus* 33
3.3.2. *Bosmina coregoni* 33

4. Etude de la stabilité et/ou de la dégradation des pigments marqueur 33

4.1. Objectif de l'étude 33
4.2. Protocole expérimental 34
4.2.1. *Brachionus calyciflorus* 34
4.2.2. *Bosmina sp.* 35

5. Etude de l'activité d'ingestion de *Bosmina* sp. à l'aide d'algues marquées 35

5.1. Description de la méthodologie 35
5.2. Etude de la dynamique d'ingestion de *Bosmina* sp. 36
5.2.1. Introduction 36
5.2.2. Marquage et préparation de la nourriture algale 36
5.2.3. Préparation et conditionnement final des algues 36
5.2.4. Conditionnement des animaux 37
5.2.5. Déroulement de l'expérience 37
5.2.6. Traitement des algues 38
5.2.6. Traitement des résultats 38

6. Etude du grazing *in situ* 38

6.1. Approche quantitative (méthode de Haney) 38
6.1.1. Préparation des algues 38
6.1.2. Dérouleement de l'expérience *in situ* 39
6.1.3. Traitement des algues et des animaux 39
6.1.4. Expression des résultats 40

5. Résultats et discussion

1. Etude de la dynamique d'ingestion de Bosmina sp. à l'aide de nourriture algale marquée 41

1.1. Etude *"in vitro"* 41
1.2. Etude *"in situ"* 42

2. Relation pigments marqueurs et biomasse des groupes phytoplanctoniques 43

3. Etude de la stabilité et /ou de la dégradation des pigments 44

3.1. Nutrition de *Brachionus calyciflorus* avec *Dictyosphaerium ehrenbergianum* 44
3.2. Nutrition de *Brachionus calyciflorus* avec *Cyclotella pseudostelligera* 46
3.3. Nutrition de *Brachionus calyciflorus* avec *Cryptomonas ozolini* 47
3.1. Nutrition de *Bosmina* sp. avec *Chlamydomonas reinhardii* 47

6. Conclusions et perspectives

1. Introduction

Les écosystèmes aquatiques, tels que nos grandes rivières, jouent un rôle important dans l'équilibre naturel de la biosphère. L'étude de leur fonctionnement apparaît donc comme essentielle dans la perspective d'une compréhension globale de la dynamique des biocénoses aquatiques.

Le phytoplancton, constitue l'un des principaux producteurs primaires en milieu fluvial. Via la photosynthèse, processus aboutissant à la synthèse de composés carbonés, ces organismes autotrophes fournissent une partie de carbone organique nécessaire aux hétérotrophes. Le développement du phytoplancton en milieu aquatique résulte de l'équilibre entre un terme de production (taux de photosynthèse) et des termes de disparition. Ceux-ci peuvent être liés à des facteurs abiotiques (lumière, température, débit et sédimentation) et des facteurs biotiques (mortalité naturelle, grazing*) (e.a **Descy,** 1987; **Herzig & Dubinsky**, 1992; **Köhler**, 1993, 1995; **Descy**, 1993; **Admiraal** *et al.*, 1994; **Gosselain** *et al.,* 1996).

Le zooplancton fluvial regroupe l'ensemble des organismes animaux (rotifères, micro-crustacés et protozoaires) qui constituent le deuxième niveau trophique. Ils se nourrissent directement ou indirectement aux dépens des organismes phytoplanctoniques et assurent partiellement le recyclage des substances nutritives. Ces différentes communautés zooplanctoniques, que nous allons détailler par la suite, se développent plus au moins bien dans les eaux courantes selon leur temps de génération et le temps de séjour de la masse d'eau.

L'étude des relations trophiques phyto-zooplancton a fait l'objet de nombreuses recherches que ce soit en lacs, en estuaires, ainsi qu'en milieu marin. Dans de nombreux cas, il s'est avéré que dans ces milieux le zooplancton limite quantitativement le phytoplancton et modifie la composition de la communauté algale. Contrairement aux eaux lacustres, le grazing dans les grandes rivières, telles que la Meuse, est encore à l'heure actuelle peu étudié.

L'objectif du présent travail est d'étudier en conditions expérimentales le grazing de cellules phytoplanctoniques par du zooplancton de petite taille, *Brachionus calyciflorus* un rotifère et *Bosmina sp.* un cladocère en vue d'une meilleure compréhension de l'impact de ces espéces en mileu naturel sur le phytoplancton. Deux approches différentes seront utilisées : le marquage de la nourriture algale par incorporation du ^{14}C et le dosage des pigments marqueurs en HPLC (pour High Performance Liquid Chromatography).

L'utilisation des pigments photosynthétiques en tant que biomarqueurs des communautés phytoplanctoniques et de leur devenir n'est pas neuve. Elle est utilisée depuis l'introduction de l'HPLC il y'a quinze ans. Cette technique de séparation rapide et sensible a ouvert de nouvelles possibilités quant à la caractérisation de la composition planctonique et à l'étude des voies de disparition des algues (sénescence ou consommation par le zooplancton) au sein des écosystèmes aquatiques (voir la revue de **Millie** *et al.,* 1993).

* Le grazing est le terme couramment utilisé pour désigner l'activité de broutage de la communauté zooplanctonique sur la communauté phytoplanctonique.

Les données de la littérature concernant la validité de l'utilisation des pigments marqueurs en tant qu'indicateurs de la nutrition du zooplancton sont nombreuses et controversées. En outre, il est admis aujourd'hui que les pigments chlorophylliens, lors de leur passage au travers l'intestin du zooplancton, se dégradent partiellement en composés non fluorescents, non détectés par la technique H.P.L.C. (**Head & Harris**, 1996), ce qui a conduit éventuellement à des sous-estimations du grazing évalué d'après l'analyse des contenus digestifs. En ce qui concerne les caroténoïdes, il semble qu'ils soient mieux conservés que les chlorophylles au sein du zooplancton, mais les expériences visant à démontrer leur stabilité et/ou leur dégradation sont pratiquement inexistantes et sont restreintes à quelques éléments du zooplancton (**Quiblier-Lloberas,** 1994).

La première partie du mémoire consiste en une analyse bibliographique des communautés phytoplanctoniques, zooplanctoniques et les relations trophiques liant ces deux compartiments en milieu fluvial. Nous analyserons également l'essentiel des données de la littérature concernant l'activité du grazing pour d'autres organismes zooplanctoniques. Nous aborderons le problème de la dégradation et de la stabilité des pigments au sein du contenu stomacal du zooplancton, comme l'ont proposé certains auteurs. Nous verrons plus en détail les possibilités d'utilisation des pigments comme traceurs, non seulement de la communauté algale planctonique, mais aussi de l'ingestion de ces mêmes organismes par le zooplancton herbivore.

La deuxième partie du mémoire sera consacrée à un développement des modes opératoires utilisés lors du déroulement de ce travail. Une troisième partie sera consacrée à l'interprétation et à la discussion des résultats obtenus, suivie par une conclusion générale tenant compte des contraintes rencontrées durant nos travaux et des perspectives de développement. Celui-ci étant d'une part, l'espèce la plus fréquente dans les échantillons prélevés en Meuse Belge tout en étant représentative du groupes des rotifères.

2. **Synthèse bibliographique**

1. Le phytoplancton en rivière

1.1. Données taxinomiques et successions

Le phytoplancton comprend l'ensemble des organismes végétaux en suspension dans la colonne d'eau, qui constituent la source alimentaire de base des milieux aquatiques. On le restreint généralement aux algues microscopiques phototrophes qui vivent, soit en colonies, soit isolées et dont la taille varie entre 1 et 500 micromètres. Leur croissance est contrôlée par la lumière, la température et la disponibilité en nutriments.

Nous présentons ci-dessous les principaux groupes phytoplanctoniques rencontrés en eaux douces. Ces informations sont tirées de **Kirk** (1983) et **Rowan** (1989).

- **Les Cyanobactéries** (anciennement appelées algues bleues ou Cyanophycées) forment une classe de l'embranchement des Schizophytes qui regroupe Cyanophycées et Bactéries. Ce sont des organismes procaryotiques vivant dans de nombreux milieux, soit en colonies soit solitaires, et souvent capables de supporter des conditions extrêmes. Elles se séparent des bactéries par la présence de la chlorophylle ***a***, de pigments caroténoïdes caractéristiques de ce groupe (myxoxanthophylle, echinénone et zéaxanthine). A l'inverse des autres groupes algaux, les thylacoïdes contenant les pigments sont dispersés dans le cytoplasme cellulaire.
- **Les Chromophytes** constituent un embranchement regroupant une dizaine de classes d'algues ayant des caractères communs. Leur couleur jaune-brun est due à l'abondance de pigments caroténoïdes. Quelques-uns de ces derniers ne se rencontrent que dans certaines classes, faisant d'eux de bons marqueurs taxinomiques. On peut citer les classes suivantes :

  - **Les Bacillariophycées** ou diatomées sont des organismes unicellulaires prédominants dans tous les milieux aquatiques et caractérisés par leur paroi siliceuse bivalve. Elles possèdent de la chlorophylle ***a***, des chlorophylles c_1 et c_2 et divers caroténoïdes (fucoxanthine, diatoxanthine et diadinoxanthine). Leur classification est basée sur l'ornementation et la forme des valves siliceuses. On distingue deux grandes catégories : les Centrophycidées et les Pennatophycidées;

  - **Les Cryptophycées** sont des algues unicellulaires d'eau douce et marine à pigments jaune-rouge-bleu et possèdent, en plus des chlorophylles ***a*** et c_2, une xanthophylle caractéristique: l'alloxanthine;

  - **Les Euglénophycées** sont des unicellulaires vivant principalement en eau douce, surtout dans des eaux riches en matières organiques. Ils possèdent des chlorophylles ***a*** et ***b***, et présentent une hétérotrophie facultative; l'un des caroténoïde majeur est la diadinoxanthine;

  - **Les Chrysophycées** sont des organismes unicellulaires à kyste siliceux. Ils possèdent de la chlorophylle ***a*** et de la chlorophylle ***c***, et de la fucoxanthine comme caroténoïde important;

- **Les Dinophycées** sont le plus souvent des organismes solitaires, libres, nageant à l'aide de deux flagelles. Ils sont présents en eau douce et marine et présentent une grande diversité en milieu marin. Ils possèdent les chlorophylles ***a***, ***c*** et présentent parfois des biliprotéines rouges ou bleues proches des phycocyanines et des phycoérythrines, caractéristiques respectivement des algues rouges et bleues. Leurs pigments caractéristiques sont la diadinoxanthine, la dinoxanthine et de façon très constante la péridinine;
- **Les Chlorophytes** ou algues vertes sont bien représentées en eau douce et la classe dominante est celle des chlorophycées. Elles possèdent les chlorophylles ***a***, ***b*** et plusieurs caroténoïdes (violaxanthine, néoxanthine et lutéine).

La communauté phytoplanctonique en milieu fluvial présente une variation temporelle assez marquée qui dépend de l'interaction de différents facteurs abiotiques (débit, lumière, température, abondance de substances nutritives) et biotiques (mortalité naturelle, grazing par le zooplancton). **Descy** *et al.* (1987), travaillant dans la Meuse, notent que les fluctuations du débit d'écoulement des masses d'eau, superposées à d'autres facteurs physiques et biologiques, contribuent de façon significative au déterminisme de la communauté phytoplanctonique. Celle-ci est caractérisé par la présence, au cours du printemps, de petites diatomées centriques unicellulaires qui sont remplacées durant l'été par de plus grandes formes (dont la taille dépasse 20 µm) filamenteuses ou coloniaires (**Descy**, 1987; **Gosselain** *et al.*, 1994).

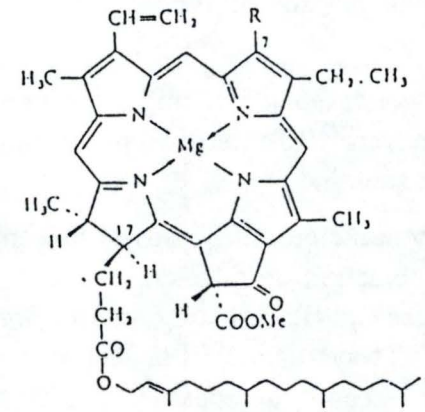
Dans le même contexte, d'autres auteurs notent que le bloom phytoplanctonique en eau courante est souvent marqué par la dominance de diatomées centriques qui se développent surtout au printemps, au moment où les conditions de lumière et de température deviennent favorables, alors que les algues vertes émergent surtout en début d'été. Ceci a été observé dans la plupart des rivières des régions tempérées: Sacramento (**Greenberg**, 1964), Tamise (**Lack**, 1971), Loire (**Champ**, 1980), Meuse (**Descy**, 1987), Rhin (**Admiraal** *et al*,. 1994), Seine (**Garnier** *et al.*, 1995).

Les autres groupes algaux (Dinophycées, Cryptophycées, Cyanobactéries Euglénophycées et Chrysophycées), présentent un moindre développement d'une façon générale.

1.2. Les pigments caractéristiques du phytoplancton

Les informations synthétisées dans ce paragraphe sont tirées de **Kirk** (1983), **Rowan** (1989) et des mémoires de **Polet** (1992) et **Métens** (1994) ainsi que de la thèse doctorale de **Quiblier-Lloberas** (1994).

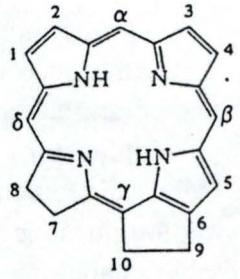
Les pigments sont des molécules capables d'absorber la lumière dans le domaine du visible (400-700 nm). La chlorophylle ***a***, constitue le pigment essentiel à la photosynthèse et se retrouve chez toutes les algues. En plus de celui-ci, il existe différents assemblages de pigments accessoires, conséquences de l'adaptation des groupes à des environnements particuliers. Ils ont éventuellement d'autres fonctions que la photosynthèse. Parmi eux se trouvent des traceurs des différents groupes algaux. Trois groupes de pigments du point de vue chimique existent chez les algues autotrophes : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines.



A

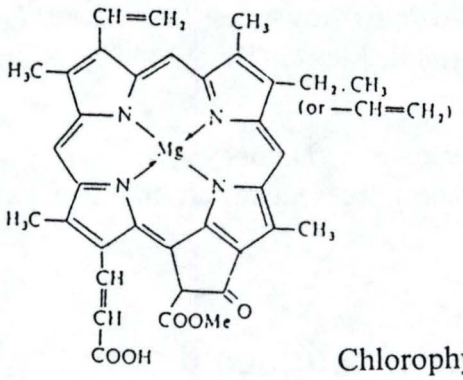
Chlorophyll *a*: R = CH_3

Chlorophyll *b*: R = CHO



C

B



Chlorophyll *c*

Fig. 1 : Structure des chlorophylles ***a*** *et* ***b*** *(A),* ***de la chlorophylle c*** *(B) et du noyau tétrapyrrole (C) d'après* ***Rowan*** *(1989).*

Les pigments chlorophylliens recouvrent les chlorophylles ***a***, ***b*** et ***c***, leurs précurseurs de synthèse et leurs produits de dégradation (les chlorophyllides, les phéophorbides et les phéophytines). La distinction entre les principales formes de pigments chlorophylliens est basée sur la présence de la chaîne phytol et sur la présence ou l'absence de l'atome de magnésium. Les phéophytines et les phéophorbides sont regroupés sous le nom de phéopigments.

En fin, d'autres formes dérivées **Jackson** (1976) sont:

- les épimères et les allomères, qui sont des dérivés oxydés ou hydroxylés (suite à l'extraction avec des alcools et à l'exposistion à l'air)

- les composés pyro-, qui ont perdu le radical -COO-CH_3 au niveau du carbone 10

Les phéophytines peuvent être produites in vitro ou in vivo par acidification. L'hydrolyse de la liaison ester de la chaîne phytol conduisant aux chlorophyllides ou aux phéophorbides.

La structure de la molécule de chlorophylle ***a*** se présente sous forme d'un atome de magnésium chélaté au centre d'un anneau de 4 pyrroles, auxquels vient s'ajouter une chaîne aliphatique de 18 carbones: chaîne phytol. Étant donné que cette molécule est omniprésente dans toutes les cellules phytoplanctoniques, elle est souvent utilisée comme estimateur de la biomasse algale dans les écosystèmes aquatiques (e.a **Lorenzen,** 1967). La chlorophylle b est très proche de la chl ***a*** alors que la chlorophylle c est une chlorophyllide (Fig. 1).

Les caroténoïdes sont les pigments les plus répandus et constituent une large gamme de composés allant des carotènes, qui sont de simples hydrocarbures, jusqu'aux xantophylles. Ces derniers représentent la forme oxydée des carotènes. Les caroténoïdes contiennent une longue chaîne linéaire avec de doubles liaisons conjuguées et sont composés de 40 atomes de carbone (Fig. 2). Ils sont toujours localisés dans la cellule à proximité des molécules de chlorophylle. Comme on l'a déja cité au début de cette section, certains jouent un rôle dans la photosynthèse elle-même à côté des chlorophylles, alors que d'autres remplissent d'autres fonctions, telles que la protection contre les fortes lumières (**Kirk**, 1983; **Foote & Denny**, 1994). Les caroténoïdes ont une action de protection contre plusieurs maladies. En effet, il a été démontré que ceux-ci préviennent la formation du cancer chez la souris, et augmentent la réponse immunitaire chez le rat (**Bendich**, 1989 in **Chen & Chen**, 1992).

Nous présentons au tableau-1, les principaux pigments caroténoïdes repris de la littérature et rencontrés dans diverses catégories d'algues.

Les phycobilines, pigments bleus (phycocyanines) ou rouges (phycoérythrines), sont présents chez les algues bleues (cyanobactéries) et rouges (rhodophycées), ainsi que chez les cryptophycées. Ils sont associés par liaison covalente à des protéines, d'où le nom de biliprotéines. Malgré leur caractère hydrophile, ce qui nécessite une méthode d'étude un peu différente des autres pigments qui sont hydrophobes, ils sont de bons marqueurs potentiels de la présence de cyanobactéries ou de cryptophycées au sein du peuplement phytoplanctonique.

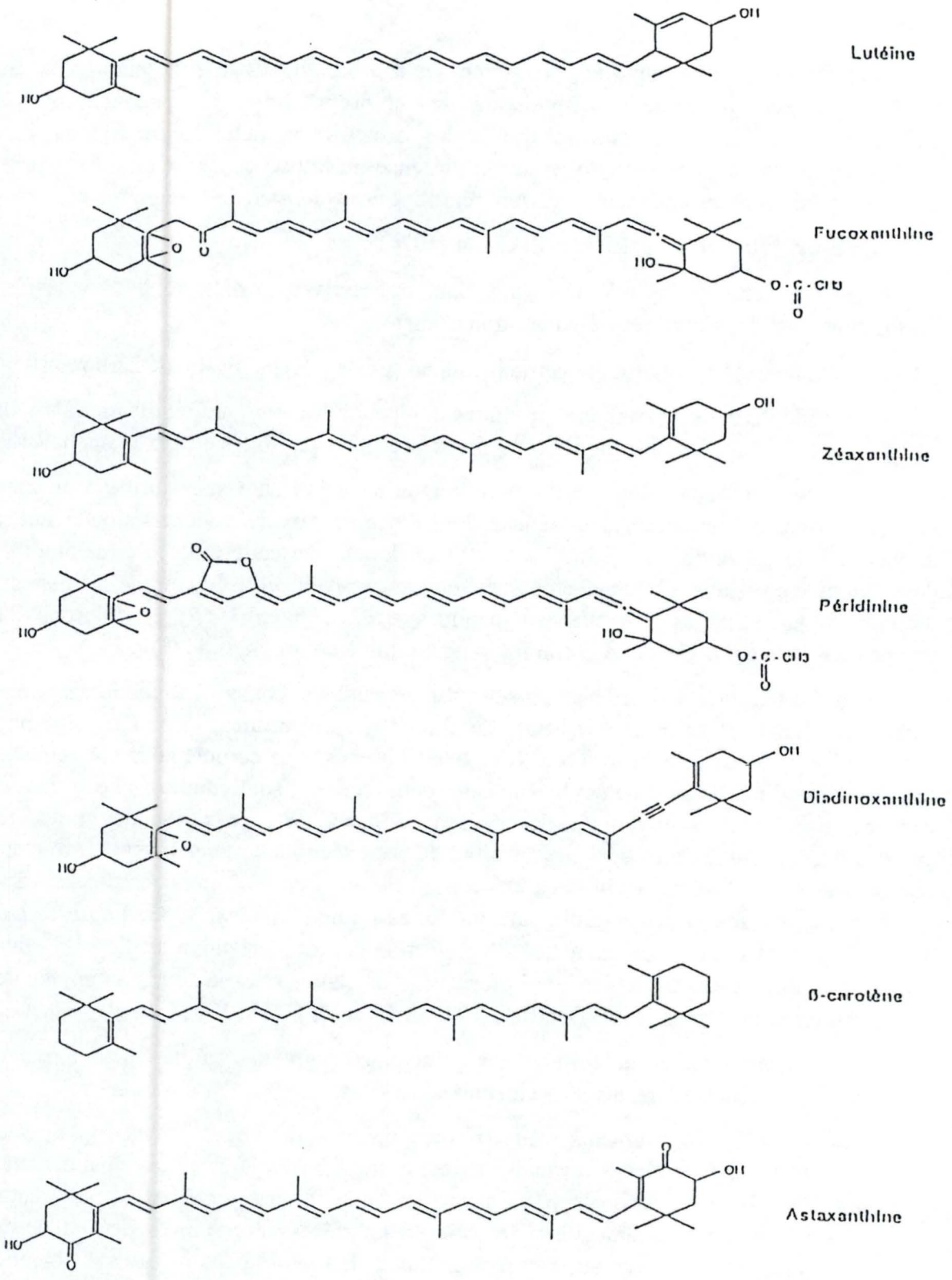
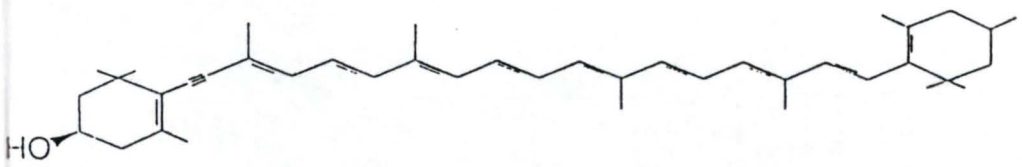
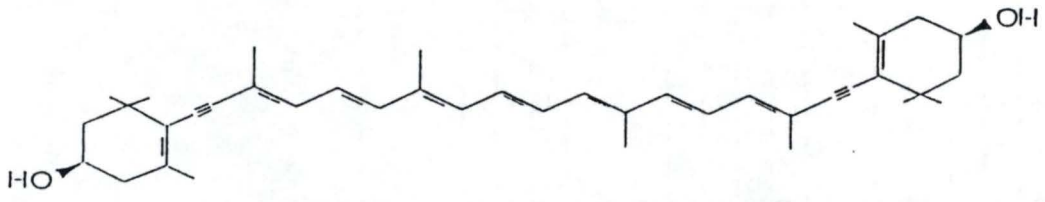


*Fig. 2: Structure des caroténoïdes d'après [**Kirk**, 1983 et **Rowan**, 1989].*



Diatoxanthine



Alloxanthine

Fig. 2: Structure des caroténoïdes (suite).

Pigments	Chloro-phytes	Bacillariophycées	Chrysophycées	Dinophycées	Cyanobactéries	Euglénophycées	Cryptophycées
Chlorophylles							
Chlorophylle a	+	+	+	+	+	+	+
Chlorophylle b	+	-	-	-	-	+	-
Chlorophylle c	-	+	+	+	-	-	+
Caroténoïdes							
Carotènes							
α-carotène	+	-	+	-	-	-	+
β-carotène	+	+	+	+	+	+	-
Xanthophylles							
Lutéine	+*	-	-	-	-	-	-
Fucoxanthine	-	+*	+	-	-	-	-
Péridinine	-	-	-	+*	-	-	-
Echinénone	-	-	-	-	+*	-	-
Diadinoxanthine	-	+*	+	+	-	+	-
Dinoxanthine	-	-	-	+	-	-	-
Diatoxanthine	-	+	+	-	-	-	-
Violaxanthine	+	-	-	-	-	-	-
Néoxanthine	+	-	-	-	-	+	-
Zéaxanthine	+	-	-	-	+*	-	-
Myxoxanthophylle	-	-	-	-	+*	-	-
Alloxanthine	-	-	-	-	-	-	+*

*Tableau 1 : Distribution des pigments chlorophylliens et caroténoïdes chez les algues [d'après **Rowan**, 1989]*

(-): pigment absent

(+): pigment présent mais non considéré comme spécifique

(+) pigment présent, considéré comme spécifique*

L'utilisation des pigments comme marqueurs des relations trophiques remonte aux années 60, avec le développement des méthodes fluorimétriques facilitant la détection des chlorophylles et phéopigments. Cependant, ces méthodes sont limitées et ne permettent l'utilisation des pigments que dans des approches approximatives, que ce soit pour des mesures de biomasse, de productivité phytoplanctonique ou encore de grazing. Depuis une dizaine d'année, avec l'avènement de techniques chromatographiques plus performantes, il est devenu possible d'utiliser ces molécules sous un angle plus spécifique et de pouvoir évaluer l'impact sélectif du grazing du zooplancton sur le phytoplancton.

Vu que la distribution des pigments au sein des groupes algaux est variable, le choix de pigments marqueurs doit être fait avec certitude. En effet, Il faut remarquer que certains caroténoïdes, tels que l'alloxanthine, la péridinine et la lutéine sont spécifiques d'une seule classe d'algues, tandis que d'autres (chlorophylle ***a***, ß-carotène etc) sont largement distribués dans les différentes classes algales, faisant d'eux des marqueurs moins spécifiques. Il faut souligner aussi que les pigments marqueurs n'apportent pas de détail concernant le type des cellules phytoplanctoniques (taille, morphologie ...) au sein d'une même classe, ce qui nécessite une observation microscopique supplémentaire ou d'autres techniques, telles que: le comptage de particules (Coulter counter) ou la cytométrie de flux. Ceci rejoint l'idée de **Gieskes** (1991) qui montre que l'analyse d'échantillons marins en H.P.L.C (présence de la divinyl-chlorophylle b) suivi d'une observation microscopique des cellules, indique la présence de prochlorophytes et de chlorophycées, alors que d'autres auteurs n'utilisant que le dosage des pigments, l'ont attribué à la seule présence de chlorophycées.

Plus récemment, des travaux portant sur l'étude de la composition et de la dynamique du peuplement phytoplanctonique que ce soit en milieu marin, en lacs ou encore en rivière ont permis de préciser l'intérêt des pigments marqueurs. **Descy & Métens** (1996) notent en Meuse une bonne corrélation entre l'évolution des concentrations en fucoxanthine et en lutéine, et les biomasses de Diatomées et de Chlorophycées respectivement (Fig. 3). De même **Gieskes & Kraay** (1983) démontrent que les Cyanobactéries et les Cryptophycées peuvent être suivies par le dosage de la zéaxanthine et l'alloxanthine qui en font de bon marqueurs spécifiques. Nous présentons au tableau 1 la répartition des principaux pigments chlorophylliens et caroténoïdes pouvant être utilisés comme marqueurs spécifiques de différentes classes algales.

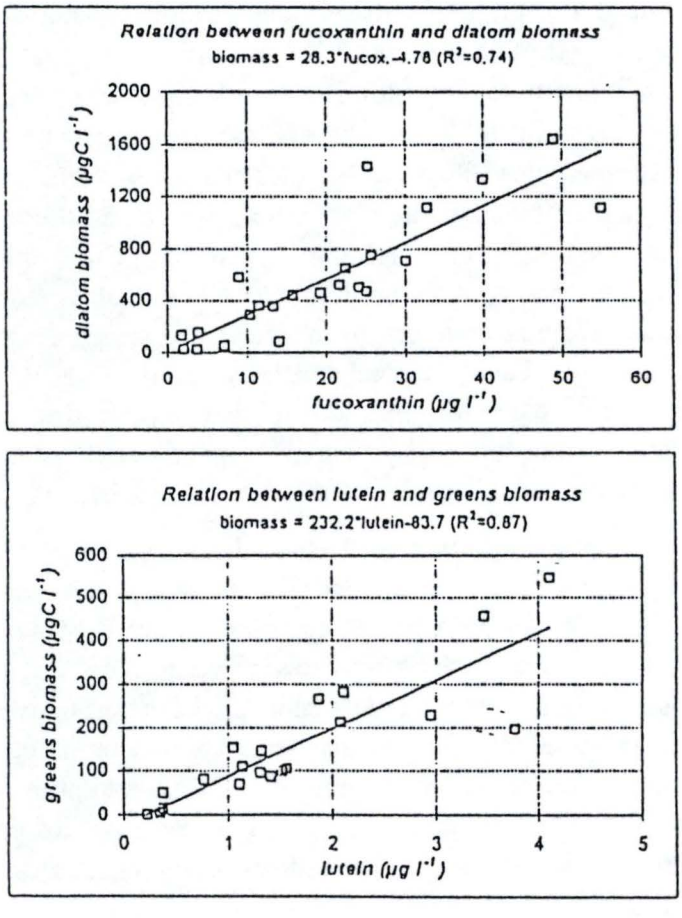


*Fig. 3: Évolution des concentrations en fucoxanthine et en lutéine et la biomasse respectivement des diatomées et des chlorophycées dans la rivière de la Meuse Belge (**Descy & Métens**, 1996).*

2. Le zooplancton fluvial

2.1. Généralités

En milieu fluvial comme en milieu lacustre, le zooplancton constitue un maillon-clé de la chaîne trophique. Il est représenté, pour une très large fraction, de rotifères et constitue une ressource nutritive majeure pour les poissons adultes et juvéniles (**Brooks & Dodson**, 1965). Par son activité de broutage sur le phytoplancton et le bactérioplancton, il est susceptible de constituer un des principaux facteurs de contrôle des biomasses algales et bactériennes dans les eaux continentales.

Ces organismes zooplanctoniques assurent aussi une fonction importante dans les transferts de matière et d'énergie. En méttant à part le microzooplancton constitué de divers protozoaires, le zooplancton des milieux aquatiques est représenté par trois groupes principaux : les rotifères, les crustacés cladocères et copépodes.

Les rotifères sont des organismes planctoniques dont la taille varie entre 100 et 600 micromètres. Ils possèdent un appareil rotateur sous forme d'une couronne ciliaire, qui permet à l'animal, de se déplacer et de se nourrir de substances en suspension dans la colonne d'eau à l'aide de vibrations ciliaires (**DeRidder**, 1960).

L'écologie des crustacés a été étudiée en milieu naturel et également en conditions expérimentales. Leur mode de nutrition par "filtration" est attribué au jeu des pattes thoraciques, dans le cas des cladocères, ou grâce à leurs antennes et maxillipèdes, dans le cas des copépodes. En effet, les cladocères peuvent non seulement filtrer les particules alimentaires présentes dans le milieu mais aussi sélectionner celles-ci en fonction de leur taille, de leur goût.etc suivant leur exigences alimentaires (**Geller & Müller**, 1981).

En milieu fluvial, comme la Meuse, les rotifères paraissent les mieux adaptés aux contraintes liées à l'écoulement de la masse d'eau. Leur temps de génération est très court, ce qui leur permet d'établir rapidement des populations importantes. Ce sont surtout les genres *Brachionus, Keratella* et *Polyarthra* qui représentent les éléments principaux du zooplancton Mosan. Les densités maximales mesurées dans la plupart des cas varient de quelques dizaines à quelques milliers d'ind l^{-1}, alors que la population des microcrustacés est relativement faible, ne dépassant pas les 170 ind l^{-1}. Leur taille dépasse rarement les 0,8 millimètres (**Viroux**, comm. pers.). **Amoros** (1984) souligne que la présence en quantité importante de micro-crustacés résulte de leur entraînement par les courants à partir de zones plus calmes. Toutefois, **Pace** *et al.* (1992) indiquent que les pertes irrémédiables de la biomasse zooplanctonique par advection est un facteur important en milieu fluvial.

Bien que la composition du zooplancton fluvial soit différente de celle du zooplancton lacustre, il est capable de jouer un rôle considérable dans le contrôle du développement du phytoplancton. **Viroux** (accepté), **Gosselain** *et al.*, (sous presse, a et b) ajoutent que, dans la Moselle et la Meuse, les rotifères forment des populations importantes et peuvent en effet limiter le développement du phytoplancton quantitativement et qualitativement. Toutefois, ces organismes sont habituellement considérés par de nombreux auteurs comme des consommateurs inefficaces par rapport aux crustacés et c'est certainement la raison pour laquelle le grazing est communément considéré comme une cause négligeable dans les processus de disparition du phytoplancton en eau courante.

2.2. Le genre *Brachionus*

Appartenant à l'ordre des Monogononta, qui regroupe plusieurs espèces planctoniques, *Brachionus calyciflorus* constitue une espèce modèle et représentative du groupe des rotifères. Ces derniers animaux dominent le plus souvent le zooplancton fluvial (e.a **Pourriot** et *al.*, 1982; **Marneffe & Thomé** 1989). Cette espèce se reproduit généralement par voie parthénogénétique pour autant que les conditions soient favorables. Dans le cas contraire, la reproduction se fait par voie sexuée.

Vu son temps de génération très court, en conditions optimales, cette espèce s'établit de façon importante et peut manifestement jouer un rôle considérable dans le contrôle de la communauté phytoplanctonique. L'impact trophique de cette espèce sur le phytoplancton que se soit *in situ* ou en laboratoire a été de nombreuses fois étudié. En voici-ci quelques exemples repris de la littéraure indiquant son effet sur le phytoplancton.

En Meuse, **Gosselain** et *al.* (1996) souligne que les rotifères représentés principalement par le genre *Brachionus,* contribuent pour une large part au contrôle de la communauté phytoplanctonique. Le taux de filtration maximal mesuré *in situ* varie entre 2.85 et 14.15 $\mu l\ ind^{-1}\ h^{-1}$. De même **Rothhaupt** (1995) travaillant sur la même espèce note que les taux de filtration et d'ingestion individuels mesurés en conditions expérimentales sont respectivement de 30 $\mu l\ h^{-1}$ et 18.5 ng C h^{-1}.

L'abondance des rotifères du genre *Brachionus* a été également signalée dans l'estuaire de la rivière Rhode par **Allan** et *al.* (1976, in **Heinbokel** *et al.* 1988). Ces auteurs rapportent que ces organismes montrent une abondance similaire aux copépodes (10^5 ind l^{-1}) et sont capables de réduire rapidement la biomasse phytoplanctonique.

2.3. Le genre *Bosmina*

Crustacé rattaché à la sous-classe des Entomostracés dont font partie les cladocères, *Bosmina* est le seul genre représentatif de la famille des Bosminidés qui regroupe plusieurs espèces morphologiquement distinctes. Contrairement aux milieux lacustres où *Bosmina sp.* a été relativement étudiée, en milieu fluvial, nous ne disposons jusqu'à présent, que de peu de données relatives à sa dynamique et son l'activité de grazing.

En conditions favorables, la reproduction est parthénogénétique alors que durant les périodes stressantes, cette espèce se reproduit par voie sexuée (**Kankaala**, 1983). Malgré sa taille proche de celle des rotifères et donc peu représentative des cladocères, elle peut, par sa compétitivité et son pouvoir sélectif, manifester un impact réel sur le phytoplancton (**DeMott**, 1982; **Bleiwas & Stokes**,1985).

Matveev (1985) observe en laboratoire, qu'en présence d'une culture d'algues plurispécifiques prélevées au lac Glubokoye (Russie), *Bosmina coregoni* est plus compétitive que *Bosmina longirostris* puisqu'elle atteint des densités plus élevées. De plus, **Masson & Abdul-Hussein** (1991) estiment que la densité de la population de *Bosmina sp.* est bien corrélée à celle de la population phytoplanctonique.

Connor & Jones (1993) soulignent que les densités estivales maximales atteintes par *Bosmina sp.*, en milieu fluvial, varient de 250 à 400 ind l^{-1}. Au vu des ces chiffres, il est manifeste qu'elle peut, de par son activité de broutage, jouer un rôle important dans la réduction de la biomasse phytoplanctonique. De même, **Sellner** *et al.* (1993) travaillant dans l'estuaire du Potamac, constatent que pendant la même saison, *Bosmina sp.* représente 58% du zooplancton herbivore et son taux d'ingestion quotidien est estimé entre 20 et 24% de la biomasse algale.

En Meuse, comme nous l'avons déjà signalé, l'analyse des échantillons prélevés révèle une abondance remarquable de *Bosmina coregoni* par rapport aux autres cladocères. Les densités estimées pour cette espèce durant l'année 1996 varient entre 208 et 800 ind.l^{-1}.

3. Les relations trophiques au sein du phytoplancton et du zooplancton en milieu fluvial

3.1. Généralités

Les organismes zooplanctoniques consomment une partie appréciable du phytoplancton, mais il est bien connu que les taux de grazing varient selon les lieux et les saisons. Dans cette section nous essayerons d'analyser le lien trophique entre consommateurs (zooplancton) et producteurs autotrophes (phytoplancton) en milieu fluvial et/ou en lac si nécessaire.

Deux paramètres sont couramment utilisés pour estimer l'impact du grazing de la communauté zooplanctonique sur la communauté phytoplanctonique :

- l'activité de filtration (F) correspond au volume de suspension algale filtré par individu et par unité de temps; l'unité classique utilisée est le µl $ind^{-1}h^{-1}$.
- l'activité d'ingestion (I) correspond quant à elle à la biomasse algale ingérée par le zooplancton. Ce terme peut être exprimé en ng C ind^{-1} h^{-1} .

espéce consommatrice	type de nourriture	biomasse (mgC l^{-1})	filtration maximale $\mu l\ ind^{-1}\ h^{-1}$	référence
Rotifères				
Brachionus calicyflorus	Dictyosphaerium ehrenbergianum	0.12 (+)	15.2	Joaquim-Justo, 1992
"	"	0.12 (+)	15	Gosselain *et al* ., 1996
"	"	7.02 (+)	1.05	Mourelatos *et al*., 1990
Polyarthra dolichoptera	Chlamydomonas reinhardii	0.28 (+)	2.36	Bogdan *et al* ., 1980
Keratella cochlearis	"	"	8.13	"
"	Dictyosphaerium ehrenbergianum	0.12 (+)	7	Gosselain et al., 1994
Cladocères				
Bosmina sp.	Chlamydomonas sp.	0.25 (+)	240	DeMott, 1982
Bosmina longirotstris	"	*in situ*	364	Lair, 1991b
Bosmina sp.	chlorella pyrenoïdosa	*in situ*	2.3	Mourelatos & Lacroix, 1990
Daphnia sp.	"	*in situ*	12.7	"
Ceriodaphnia	"	*in situ*	13.7	"
Diaphanosoma	"	*in situ*	12.9	"
Daphnia galeata	Chlamydomonas	*in situ*	867	Haney, 1973

Tableau 2. Quelques valeurs indicatives d'activité de filtration de certaines espèces de rotifères de cladocères. (+: mesure effectuée en laboratoire)

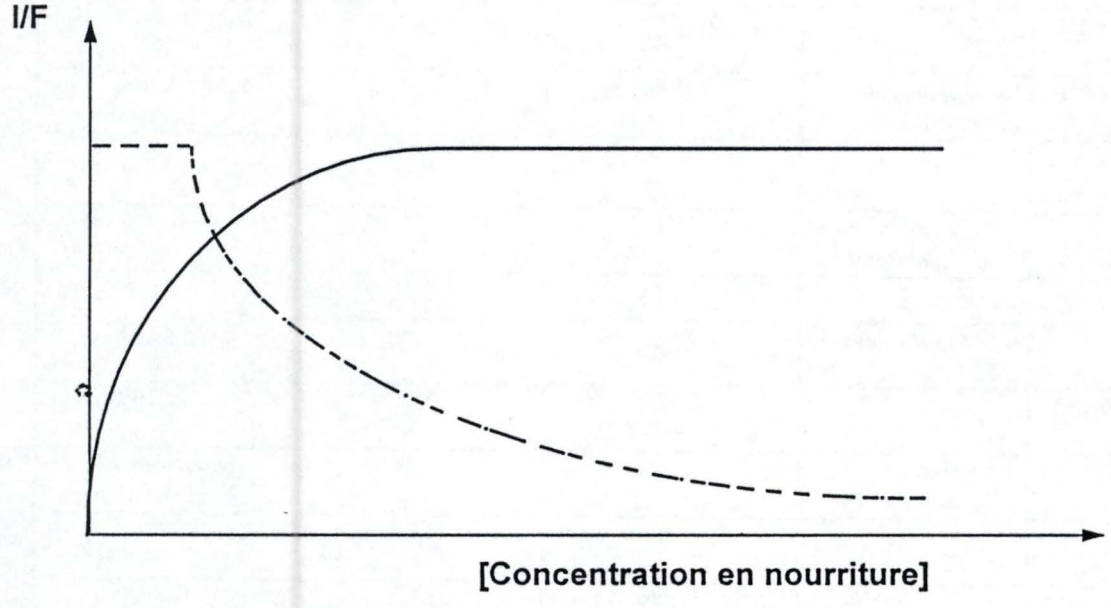


Fig 4 : Evolution descriptive des paramètres nutritionnels du zooplancton; taux de filtration (– – –) et le taux d'ingestion (—) en fonction de la concentration en nourriture.

Ces deux paramètres sont indissociablement liés et présentent, selon le modèle décrit par **Rothhaupt** (1990) une évolution caractéristique (Fig. 4) : à de faibles biomasses algales, l'activité de filtration est élevée; elle décroît progressivement pour devenir presque nulle aux biomasses élevées. Par contre, l'activité d'ingestion augmente graduellement en fonction de la biomasse algale pour atteindre un plateau correspondant à l'ingestion maximale. **Gosselain** *et al.* (1996) retrouvent en conditions expérimentales le même type d'évolution chez *Brachionus calyciflorus*. En effet, l'activité de filtration varie de 10 à 15 $\mu l\ ind^{-1}\ h^{-1}$ pour une gamme concentration algale allant de 0,4 à 9 ng C ml^{-1}.

On citera pour mémoire le taux d'assimilation (A), qui correspond à la quantité de nourriture ingérée par l'animal et réellement convertie en biomasse par son métabolisme. Il est surtout utilisé dans des études de production secondaire. Pour cette raison, ce terme est sans intérêt dans le contexte qui nous préoccupe.

Des mesures des activités de filtration et d'ingestion prises dans la littérature sont présentées au tableau 2. Les valeurs déterminées *in situ* et/ou en laboratoire donnent des indications sur l'impact trophique du zooplancton sur le phytoplancton. On peut également remarquer, à partir de ce tableau, l'importance de l'activité de broutage chez les cladocères puisqu'ils présentent des valeurs de filtration nettement supérieures à celles des rotifères.

3.2. Etude du grazing chez les crustacés cladocères

Les cladocères constituent un maillon très important dans bon nombre de chaînes trophiques dulcicoles. Par rapport aux rotifères, des cladocères comme les daphnies, vu leur taille suffisamment grande, leur capacité de filtration élevée et la large gamme de taille de particules ingérées, peuvent exercer un impact considérable sur les populations phytoplanctoniques. Nous verrons, à la lumière des exemples exposés ci-après, l'impact de ces animaux sur le développement du phytoplancton.

DeMott (1982), **Bleiwas & Stokes** (1985) ont étudié la sélectivité du grazing en conditions expérimentales chez des crustacés cladocères. Ils constatent que *Daphnia sp.* et *Bosmina sp.* sélectionnent de manière différente les particules nutritives présentes dans leur milieu de nutrition et peuvent donc altérer de façon plus au moins importante la composition de la communauté phytoplanctonique.

Elser & Goldman (1991) n'ont constaté un impact important du zooplancton sur le phytoplancton que suite à l'introduction dans des échantillons issus du milieu naturel, d'un crustacé cladocère généraliste, *Daphnia sp.*

Dans le même sens, **Lathrop & Carpenter** (1992) considèrent que les fluctuations saisonnières de la communauté phytoplanctonique résultent de l'intensité du grazing exercée quand les grands cladocères (les Daphnies par exemple) sont présentes. Le taux d'ingestion estimé pour ces organismes peut atteindre 65 % de la biomasse algale consommée par jour.

Une expérience de grazing menée par **Adrian** (1991) en laboratoire sur *Daphnia pulex* (nourrie par des cultures d'algues pures) montre que l'activité de filtration maximale mesurée pour cette espèce est de l'ordre de 1300 µl ind^{-1} h^{-1}, dépassant nettement (100 fois) celle mesurée pour les rotifères.

Quant au genre *Bosmina*, il est bien rapporté dans la littérature que par sa sélectivité de broutage, elle peut affecter la composition phytoplanctonique. Les valeurs de l'activité de filtration mesurées varient entre 0,4 et 480 µl ind^{-1} h^{-1} (**Haney**, 1971; **DeMott**, 1982). De même, **Lair** (1991a) indique que lors d'une expérience de grazing dans le lac Aydat, l'activité de filtration mesurée chez *Bosmina sp.* est de 264 µl ind^{-1} h^{-1}. Sa contribution à la diminution journalière de la biomasse algale est estimée à 12,70 %. Par ailleurs **Bleiwas & Stokes** (1990) notent que l'activité maximale mesurée en milieu lacustre, pour cette même espèce, est évaluée à 44 µl ind^{-1} h^{-1}.

Queimaliños & Modenutti (1993) soulignent l'impact sélectif de *Bosmina longirostris* par rapport à *Polyarthra vulgaris* dans un milieu lacustre. En effet, ils observent une décroissance drastique des espèces phytoplanctoniques de taille inférieure à 15 µm, en présence de *Bosmina* qui représente 70 % du zooplancton.

3.3. Modulation de l'activité de grazing

De nombreux travaux ont été effectués afin d'évaluer l'effet des variations de la température, de la morphologie des espèces, de la quantité et de la qualité de phytoplancton comestible par le zooplancton herbivore (e.a. **Murtaugh**, 1985; **Chow-Frazer & Knoechel**, 1985; **Ghiralov**, 1985; **Vanderploeg**, 1990; **Hartman & Kunkel**, 1991; **Bern**, 1994). Nous présentons dans les lignes suivantes les différents facteurs en laboratoire ou *in situ* pouvant influencer l'ingestion chez le zooplancton herbivore.

3.3.1. Taille et morphologie des espèces

Souvent, le diamètre des particules nutritives pour un organisme zooplanctonique est principalement déterminé par sa morphologie. Les cladocères, qui comportent des espèces de taille variable, ont accès à une plus grande variété de calibre de particules. Il n'empêche qu'une préférence est marquée également pour les plus petites particules, de diamètre proche de 15 µm (**Brooks & Dodson**, 1965).

Geller & Müller (1981) mettent les variations de sélectivité du broutage chez onze espèces de crustacés cladocères en relation avec la morphologie de leur appareil de filtration. Ces auteurs distinguent des espèces avec des appendices munis de soies plus fines, moyennes ou grandes. Il semble que l'abondance relative de ces organismes dépende de l'état trophique du milieu. Ainsi dans un environnement eutrophe, ce sont surtout les espèces les plus sélectives, munies de soies plus fines, qui s'établissent, alors que celles munies de soies plus grandes dominent en milieu oligotrophe.

Geller & Müller (1981) démontrent, en conditions expérimentales, que l'activité de filtration chez trois espèces de crustacés cladocères, *Daphnia sp.*, *Diaphanosoma brachyurum* et *Ceriodaphnia sp.* varie en fonction de la taille des particules nutritives. Celle-ci est maximale lorsque le diamètre des particules comestibles avoisine les 10 µm.

Un autre paramètre qui peut plus au moins influencer le processeur filtreur est la longueur du corps. En effet, **Mourelatos & Lacroix** (1990) ont étudié *in situ* l'effet de la longueur du corps, de la température, du taxon étudié et de la concentration en chl ***a*** sur l'activité d'ingestion chez quatre espèces de cladocères. Il est possible d'établir pour chaque espèce une relation entre l'ingestion et la longueur du corps. La variation expliquée par la régression est de 44 à 57 %. La taille des individus peut avoir également un effet sur la prise de la nourriture disponible dans le milieu. En effet, **Mourelatos** *et al.* (1990) démontrent que l'activité de filtration, mesurée chez des individus de grande taille de l'espèce *Brachionus calyciflorus,* était trois fois plus élevée que celle mesurée chez les juvéniles de la même espèce.

Il ressort de ces données qu'il est difficile de considérer les résultats comme comparables et indicatifs des variations observées. La raison en est que les protocoles de mesure employés sont souvent différents.

3.3.2. Effet de la température

La température est un autre facteur écologique non négligeable pouvant influencer l'activité du grazing chez le zooplancton.

Gosselain *et al.* (1996) observent en conditions expérimentales, chez le rotifère *Brachionus calicyflorus* une augmentation du taux maximal d'ingestion de 3,04 à 8,31 ng C ind^{-1} h^{-1} pour des valeurs de température comprises entre 15 et 25 °C. De même, **Mourelatos & Lacroix** (1990) notent que les taux de filtration de cladocères du lac de Créteil, varient au cours d'un cycle saisonnier de 23 à 34,1 % pour des températures allant de 10 à 22 °C.

Toutefois, **Chow-Frazer & Knoechel** (1985) n'observent, en milieu naturel, aucun effet statistiquement significatif de la température (12 à 22 °C) sur la variation de l'activité de filtration de quatre espèces de crustacés cladocères.

3.3.3. Quantité et qualité nutritionnelle

La qualité, la quantité et l'accessibilité des particules nutritives peuvent modifier la dynamique des populations. La disponibilité en particules nutritives est un paramètre qui peut profondément toucher les communautés de brouteurs zooplanctoniques. Ainsi, la sélectivité du broutage sera plus marquée dans un milieu riche en phytoplancton que dans les milieux pauvres (**Sanderson**, 1992).

Murtaugh (1985) et **Ghiralov** (1985) constatent une augmentation du taux de mortalité, de l'âge de maturité et une diminution de la fécondité chez quatres espèces de crustacés cladocères quand ils réduisent la quantité d'algues dans leur milieu de culture. Dans le même ordre d'idées, **Hart** (1992) souligne que le crustacé cladocère *Daphnia gibba* est incapable de se reproduire si la concentration en algues dans le milieu est trop faible. Par contre, **Quiblier-Lloberas** (1994) n'observe aucune corrélation entre la fécondité et les taux d'ingestion et de filtration chez des crustacés planctoniques.

DeMott (1982) note une régulation différente du taux d'ingestion de *Daphnia sp.* et de *Bosmina sp.* selon la concentration en nourriture dans le milieu de culture (*Chlamydomonas reinhardti* et *Aerobacter aerogenes*). Pour de faibles concentrations en algues du milieu, il observe que le taux d'ingestion chez *Bosmina sp.* est de 1,6 à 4,8 fois plus élevé que celui observé chez *Daphnia sp.* **Gulati** *et al.* (1991) observent, chez *Bosmina longirostris*, un doublement du taux de filtration chaque fois que la concentration en algues du milieu diminue de moitié, alors que chez *Bosmina coregoni*, le doublement du taux de filtration n'est observé que lorsque la concentration en algues est cinq fois inférieure à celle de départ.

La qualité nutritive des particules en suspension dans la colonne d'eau peut également influencer la dynamique d'ingestion. Cela pourrait être lié à une meilleure digestibilité, à un meilleur rendement d'assimilation et à la composition biochimique des particules.

Edmonson (1965) montre qu'il existe une relation entre le taux de reproduction du zooplancton et les espèces algales ingérées, suggérant que la valeur énergétique des algues pour le zooplancton est non uniforme. De même, **Friedman** (1980) observe, chez des copépodes, un rejet de particules capturées au contact des chémorécepteurs situés au niveau de la bouche. Il explique cela par la mauvaise qualité des particules présentes.

D'autres indications montrent l'existence d'algues difficilement ingérées par les organismes zooplanctoniques. Les limites peuvent être d'ordre chimique et/ou physique. Ce sont surtout les cyanobactéries qui ont été les plus citées (**Arnold**, 1971). Ces organismes, de par leur toxicité, peuvent avoir un effet inhibiteur sur le taux de croissance et la reproduction du zooplancton (**Porter**, 1975). Ils provoquent aussi un colmatage de l'appareil de filtration, phénomène observé surtout chez les cladocères (**Fulton**, 1988; **Vanderploeg** *et al.*,1990; **Burns**, 1968; **Gliwicz & Siedlar,** 1980).

Porter (1975) montre aussi que certaines algues entourées d'une gangue mucilagineuse sont considérées comme indigestes par le zooplancton et peuvent même être excrétées entièrement après leur passage au travers l'intestin.

3.3.4. Autres facteurs

La variation de l'intensité de broutage peut être liée à d'autres facteurs, tels que l'état physiologique de l'animal, l'âge, les variations nycthémérales. **Peters** (1984) note que des femelles ovigères peuvent présenter des taux d'ingestion différents par rapport aux mâles. De même, **Quiblier-Lloberas** (1994) montre que les activités de filtration et d'ingestion chez le copépode calanoïde *Acanthodiaptomus denticornis* sont de 1,6 à 14,4 fois plus élevées pour les adultes que pour les formes copépodites.

Gawler & Angeli (1987) notent que, dans le lac Léman, le taux de broutage mesuré à minuit est plus élevé qu'à midi. Ceci résulte non seulement des migrations verticales du zooplancton, mais aussi d'une intensification du taux de filtration par unité de biomasse. Cependant **Person** (1985) n'observe aucune augmentation de taux de filtration chez différentes espèces du genre *Daphnia* pendant la nuit.

Par contre **Haney & Hall** (1975) ont suggéré que les variations nycthémérales du taux de filtration du zooplancton relèvent, comme les migrations, d'activités circadiennes. Par ailleurs, **Hart** (1986) note l'absence conjointe de migrations et de variations nycthémérales du broutage dans un réservoir turbide (Secchi : 0,3 mètres) où la lumière ne pénètre qu'une faible fraction de la colonne d'eau.

Toutefois, comme tous les auteurs n'ont pas expérimenté avec la même espèce et dans les mêmes milieux, une certaine confusion règne toujours quant à la variation de l'activité de broutage.

3.4. Comparaison de l'impact du grazing de différents groupes zooplanctoniques sur le phytoplancton

Les différents groupes d'organismes zooplanctoniques peuvent avoir un impact plus au moins important sur la communauté phytoplanctonique. L'intensité de l'impact du grazing varie selon les milieux étudiés et suivant le comportement nutritionnel du zooplancton. Cependant, si les travaux concernant l'analyse de ce processus biologique en eaux stagnantes sont relativement nombreux, il n'en est pas de même pour les grandes rivières.

De Ruyter van Steveninck *et al.* (1992) et **Admiraal** *et al.* (1994) estiment que dans le Rhin, où le zooplancton est composé en majeure partie de rotifères (1728 ind^{-1} l^{-1}) ainsi que de crustacés cladocères (65 ind l^{-1}), le grazing représente l'une des causes majeures de la diminution de la biomasse phytoplanctonique; le taux de disparition est évalué de 10 à 28% par jour.

De même, en Meuse belge, **Gosselain** *et al.* (1996) notent que les taux de grazing maximum enregistrés durant l'année 1994 (32% du volume d'eau filtré par jour) sont attribués aux rotifères (atteignant des densités de 1600 ind^{-1} l^{-1}). Dans le même contexte, **Sautour** *et al.* (1996), travaillant dans l'estuaire de la Gironde en France, montrent une influence très marquée du zooplancton composé par des copépodes de grande taille. L'impact de grazing est estimé en début d'été 21 % de la productivité primaire quotidienne.

Dans le lac Pavin, **Quiblier-Lloberas** (1994) a étudié au cours d'un cycle saisonnier l'impact du grazing du zooplancton sur le phytoplancton. Celui-ci est estimé a partir du calcul des taux d'ingestion des principaux organismes zooplanctoniques via le dosage par H.P.L.C. de la chlorophylle ***a*** et de ses dérivés dans les animaux. Les résultats montrent que la fraction comprise entre 85 et 315 µm, composée essentiellement de nauplii et de rotifères, présente une contribution au broutage global souvent plus élevée que celle des autres groupes zooplanctoniques.

La contribution des seuls rotifères pourrait atteindre à elle seule 40 %. Outres ces organismes, les cladocères, présents en faible densité pendant la période printanière, deviennent numériquement les plus abondants au cours de l'été et limitent de façon significative le phytoplancton. Leur participation au broutage de la communauté zooplanctonique s'élève en août à 36 %.

Mourelatos (1988) souligne que l'impact de grazing maximal journalier, dans le lac de Créteil, est observé chez les cladocères. Cependant, **Lair** (1991a), dans une étude comparative de l'impact du grazing des différents éléments du zooplancton sur le phytoplancton dans le lac Aydat, constatent que ce sont les rotifères qui présentent les taux de filtration les plus élevés (5 à 70 % de la masse d'eau filtrée par jour), par rapport à ceux déterminés pour les cladocères.

Gilbert & Bogdan (1984) et **DeMott** (1985) observent en conditions expérimentales un impact de grazing sélectif exercé par *Bosmina longirostris* (cladocère) et *Polyarthra vulgaris* (rotifère), respectivement sur *Cryptomonas sp.* (Cryptophycées) et sur *Chlamydomonas sp.* (Chlorophycées). En effet, *Polyarthra vulgaris* se nourrit de préférence de cellules dont la taille est supérieure à 12 µm (Chlorophycées), alors que les cellules de taille avoisinant les 7 µm (Cryptophycées) disparaissent lorsque *Bosmina longirostris* est dominante.

4. Les méthodes classiques d'étude du grazing

Différentes méthodes ont été utilisées *in situ* ou en conditions semblables en laboratoire pour la détermination des taux d'ingestion et de filtration, deux estimateurs de l'impact nutritionnel du zooplancton sur le phytoplancton. Néanmoins, la quantification de ces paramètres se heurte à de nombreux problèmes d'ordre méthodologiques. **Peters** (1984) a réalisé une synthèse sur les différentes méthodes relatives à l'étude du grazing, et présente leurs avantages et leurs limites.

Trois grands types de méthodes de mesure sont habituellement utilisés:

4.1. Méthode de comptage

Le principe de cette technique est basée sur le dénombrement de populations phytoplanctoniques après incubation dans des enceintes, en absence et en présence de zooplancton (**Porter,** 1972). La durée de l'expérience est généralement de 4 à 24 heures. Bien qu'elle permet une évaluation du broutage sur les différentes classes de taille phytoplanctonique, sa mise en oeuvre est relativement longue et elle est non exempte d'erreurs.

En effet, le confinement des animaux par la création d'un micro-environnement différent du milieu naturel et leur manipulation après la durée d'incubation, sont susceptibles d'influencer leur comportement alimentaire, et par conséquent induisent des erreurs dans l'évaluation du broutage (**Roman & Rublee**, 1980).

Gliwicz (1975) ajoute que cette méthode ne permet pas d'étudier le broutage spécifique sauf si on trie les animaux avant de les placer dans l'enceinte. Ceci malheureusement pourrait perturber les organismes zooplanctoniques et par conséquent risque de conduire à des erreurs dans l'évaluation du grazing.

Les activités de filtration et d'ingestion sont calculées comme suit:

$$I\ (n\ ind^{-1}\ h^{-1}) = \frac{n\ du\ témoin\ -\ n\ des\ tubes\ avec\ zooplancton}{N * t}$$

$$F\ (\mu l\ ind^{-1}\ h^{-1}) = I/C_m$$

où N: densité animale; n : nombres de cellules algales; t : durée de l'expérience en h; C_m est la concentration moyenne en algues, soit $(C_0+C_t)/2$.

4.2. Utilisation de radiotraceurs

La méthode utilisant les radio-isotopes élaborée selon la technique proposée par **Haney** (1971) permet d'effectuer des mesures de broutage , à partir d'enceintes immergées *in situ*, après ajout au sein du peuplement naturel d'une population préalablement marquée à l'aide d'un radiotraceur. Ce dernier sera ensuite mesuré dans les animaux ayant ingéré des algues marquées simultanément à l'ingestion des algues du milieu. C'est une technique d'application courante qui permet d'évaluer l'impact global du zooplancton sur le phytoplancton pendant une durée très courte et dans le même lieu de capture. Toutefois, une courte durée d'isolement des organismes de leur milieu reste nécessaire. L'évaluation de la contribution des taxons de zooplancton dominants sera possible par un tri des différents animaux à l'issue des expériences; cela nécessite de la part du manipulateur une bonne connaissance taxonomique. Une durée maximale de 4 h pour la séparation des différentes espèces est requise, afin d'éviter toute perte du matériel radioactif (**Mourelatos** *et al.*, 1990).

espéces étudiées	k (h^{-1})	référence
Crustacés copépodes		
Temora longirconis	0,06	**Sautour *et al*,** 1996
Paracalanus parvus	0,09	"
Clanus helgolandicus	0,03	"
Acanthodiaptomus denticornis	0,036	**Quiblier-Lloberas,** 1994
Calanus firmarchicus	0,025	**Pasternak,** 1994
Crustacés cladocères		
Evadne sp.	0,04	**Sautour *et al*,** 1996
ensemble de cladocères	0.09	**Quiblier-Lloberas,** 1994
Rotifères	0,06	**Quiblier-Lloberas,** 1994

Tableau 3: Quelques valeurs indicatives du taux d'excrétion intestinal de zooplancton d'eaux douce et marine

En effet, le confinement des animaux par la création d'un micro-environnement différent du milieu naturel et leur manipulation après la durée d'incubation, sont susceptibles d'influencer leur comportement alimentaire, et par conséquent induisent des erreurs dans l'évaluation du broutage (**Roman & Rublee**, 1980).

Gliwicz (1975) ajoute que cette méthode ne permet pas d'étudier le broutage spécifique sauf si on trie les animaux avant de les placer dans l'enceinte. Ceci malheureusement pourrait perturber les organismes zooplanctoniques et par conséquent risque de conduire à des erreurs dans l'évaluation du grazing.

Les activités de filtration et d'ingestion sont calculées comme suit:

$$I\ (n\ ind^{-1}\ h^{-1}) = \frac{n\ du\ témoin\ -\ n\ des\ tubes\ avec\ zooplancton}{N * t}$$

$$F\ (\mu l\ ind^{-1}\ h^{-1}) = I/C_m$$

où N: densité animale; n : nombres de cellules algales; t : durée de l'expérience en h; C_m est la concentration moyenne en algues, soit $(C_0+C_t)/2$.

4.2. Utilisation de radiotraceurs

La méthode utilisant les radio-isotopes élaborée selon la technique proposée par **Haney** (1971) permet d'effectuer des mesures de broutage , à partir d'enceintes immergées *in situ*, après ajout au sein du peuplement naturel d'une population préalablement marquée à l'aide d'un radiotraceur. Ce dernier sera ensuite mesuré dans les animaux ayant ingéré des algues marquées simultanément à l'ingestion des algues du milieu. C'est une technique d'application courante qui permet d'évaluer l'impact global du zooplancton sur le phytoplancton pendant une durée très courte et dans le même lieu de capture. Toutefois, une courte durée d'isolement des organismes de leur milieu reste nécessaire. L'évaluation de la contribution des taxons de zooplancton dominants sera possible par un tri des différents animaux à l'issue des expériences; cela nécessite de la part du manipulateur une bonne connaissance taxonomique. Une durée maximale de 4 h pour la séparation des différentes espèces est requise, afin d'éviter toute perte du matériel radioactif (**Mourelatos** *et al.*, 1990).

La mise en oeuvre de cette méthode nécessite deux conditions essentielles:

- afin de respecter les conditions naturelles dans le milieu, l'introduction du traceur ne doit pas augmenter significativement la concentration du seston naturel au sein de la chambre de broutage. Pour cela, la quantité d'algues marquées ne doit pas dépasser 10% de la biomasse algale prévisible dans le milieu (**Lair & Oulad Ali**, 1990).
- le temps d'incubation des animaux en présence de la nourriture marquée, ne doit en aucun cas dépasser la durée nécessaire à leur transit intestinal (Gut Passage Time), ce qui pourrait conduire à une élimination du traceur par excrétion, et par conséquent à une sous-estimation du taux d'ingestion.

Les formules de calcul des activités de filtration et d'ingestion sont comme suit :

$$F = \frac{activité\ du\ zooplancton}{activité\ du\ phytoplancton} * V * t$$

où F: l'activité de filtration (ml l^{-1} h^{-1}); V: le volume de la chambre de Haney et t: le temps d'incubation

Le taux de grazing (G) peut être exprimé en % du volume d'eau filtrée par jour :

$$G = F * 24 * 100$$

$$I = F * C$$

où C: la Biomasse algale consommable (µg C ml^{-1}) et I est l'ingestion (µg C ind^{-1} h^{-1})

4.3. Utilisation de la fluorescence intestinale

Dans le but de résoudre les problèmes liés au confinement des animaux posés par les deux techniques précédentes, **Mackas & Bohrer** (1976) ont utilisé cette méthode pour la première fois. Elle consiste en la mesure de la fluorescence des pigments chlorophylliens et leur produits de dégradation sur des animaux prélevés du milieu naturel. C'est donc une mesure de la biomasse algale dans le système digestif des animaux zooplanctoniques.

La quantité de nourriture algale ingérée par le zooplancton, est évaluée en multipliant le taux d'évacuation intestinal mesuré en laboratoire par le contenu digestif en pigment.

$$I = k.\ G./N$$

où G : la quantité de pigment en ng, I : l'ingestion en ng pigments ind^{-1} h^{-1}, et k est le taux d'évacuation intestinal en h^{-1} appelé aussi "gut clearance rate".

espéces étudiées	k (h^{-1})	référence
Crustacés copépodes		
Temora longirconis	0,06	**Sautour *et al*,** 1996
Paracalanus parvus	0,09	"
Clanus helgolandicus	0,03	"
Acanthodiaptomus denticornis	0,036	**Quiblier-Lloberas,** 1994
Calanus firmarchicus	0,025	**Pasternak,** 1994
Crustacés cladocères		
Evadne sp.	0,04	**Sautour *et al*,** 1996
ensemble de cladocères	0.09	**Quiblier-Lloberas,** 1994
Rotifères	0,06	**Quiblier-Lloberas,** 1994

Tableau 3: Quelques valeurs indicatives du taux d'excrétion intestinal de zooplancton d'eaux douce et marine

Le taux d'évacuation ou d'excrétion intestinal, est déterminé par la formule décrite selon le modèle exponentiel décroissant (**Mackas & Bohrer**,1976; **Bautista & Harris** 1992).

$$C_t = C_0 . e^{-k\,t}$$

où C_t: la concentration totale en pigments en ng, dans l'intestin de l'animal au temps (t), C_0: la concentration en pigments dans le tube digestif de l'animal au temps (0), k : le taux d'évacuation intestinal et t le temps en minutes.

La détermination du paramètre *k* doit se faire préalablement pour chaque espèce composant le zooplancton, au cours d'expériences où les animaux sont placés dans de l'eau filtrée; la mesure de la décroissance de la fluorescence de la chlorophylle a dans les contenus digestifs permet de déterminer le taux d'excrétion *k*.

Celui-ci est considéré comme constant pour une même espèce donnée, et varie d'une espèce à l'autre dans une gamme allant de 10 h^{-1} à 0.7 h^{-1} (tableau 3).

Comme on l'a cité au début de cette section, cette technique ne peut être utilisée pour l'estimation du grazing du zooplancton, que si les conditions suivantes sont respectées :

1. il doit y avoir au cours du transit digestif, une conversion totale de la chlorophylle en phéopigments, sans destruction de pigments chlorophylliens.

2. le taux d'ingestion doit être égal au taux d'excrétion, et ne doit pas varier au cours du temps.

Le point 1 est très controversé, ainsi que nous le discutons plus loin. Quant à la deuxième condition, il semble qu'elle soit respectée pour une gamme de concentration en nourriture relativement grande. Les taux d'ingestion diminuent cependant en dessous d'un seuil de concentration en nourriture appelé ILL (Incipient Limiting Level). Malgré les incertitudes quant à la conservation des pigments, de nombreux auteurs ont utilisé cette quantification des contenus digestifs pour évaluer le grazing (**Nelson**, 1986, **Quiblier-Llobéras** 1994). Enfin, l'utilisation des caroténoïdes comme marqueurs de différentes catégories d'algues planctoniques a permis d'approcher la sélectivité du broutage (**Quiblier-Llobéras** *et al.*, 1996)

5. L'intérêt de l'H.P.L.C. dans l'étude des pigments

Classiquement, l'identification des groupes phytoplanctoniques est basée en grande partie sur l'observation microscopique. Malgré les avantages de cette technique, elle peut prendre énormément de temps, et nécessite de la part du manipulateur une grande compétence en taxonomie. De plus, elle ne permet pas de caractériser l'état physiologique des algues et peut être variable d'un auteur à l'autre. La spectroscopie d'absorption et la fluorescence *"in vivo"* ont été également utilisées pour l'évaluation de la biomasse phytoplanctonique, en se basant sur le dosage de la chlorophylle a (**Richards**, 1952; **Strickland & Parsons** 1968; **Jeffrey & Humphrey** 1975). La seconde méthode (fluorescence) est sensible, rapide et est souvent préférée à la spectroscopie d'absorption. Cependant, soumis à l'interférence de pigments accessoires, le dosage de la chlorophylle a via ces deux méthodes peut éventuellement conduire à des erreurs dans les mesures (**Bianchi** *et al.* 1995; **Latassa *et al.***, 1996). Ceci rejoint l'idée de **Webb** *et al.* (1992) démontrant que les concentrations en chlorophylle ***a*** obtenues par dosage spectrophotométrique étaient plus élevées que celles obtenues par H.P.L.C. La raison en est que le dosage de la chlorophylle ***a*** en spectrophotométrie, malgré les précautions prises, tenant compte de la présence de pigments accessoires, est toujours sujet à leur interférence.

Depuis une dizaine d'années, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse s'est révélée la méthode standard de référence pour la séparation, l'identification, et la quantification des pigments algaux (**Gieskes & Kraay**, 1983a; **Mantoura & Llewellyn**, 1983; **Burkill** *et al.*, 1987; **Welschmeyer** *et al.*, 1991; **Yacobi** *et al.*, 1991; **Millie** *et al.*, 1993; **Brotas & Plante-Cuny**, 1996).

L'HPLC a permis une séparation rapide des chlorophylles, de leurs produits de dégradation et des caroténoïdes sur un grand nombre d'échantillons d'algues pures ou mélangées. Cette technique couplée à la spectroscopie d'absorbance et/ou de fluorescence a également porté de plus amples informations quant à la composition et l'état physiologique de la communauté planctonique au cours du temps. Dans le même contexte **Soma** *et al.* (1993) ont utilisé l'HPLC pour estimer la variation saisonnière de la communauté phytoplanctonique dans deux lacs du Japon. En effet, les concentrations des pigments marqueurs des différentes classes algales (Diatomées, Cryptophycées et algues vertes), a bien reflété la tendance observée du nombre d'algues évalué par comptage dans le milieu.

Un autre avantage de l'HPLC est la détection des bactéries photosynthétiques présentes dans des échantillons complexes. En effet, **Hurley**, (1991); **Hurley & Watras** (1991, in **Millie** *et al.*, 1993) travaillant en lacs, ont détecté par HPLC cinq bactériochlorophylles (a, b, c, d, et e) indiquant la présence de bactéries photosynthétiques. La non identification de ces organismes peut compromettre les mesures basées sur le dosage de la chl a et de ses dérivés. De plus, en se basant uniquement sur l'absorption, ces bactériochlorophylles peuvent être confondues avec des xanthophylles et par conséquent, conduire à une mauvaise caractérisation de la communauté planctonique.

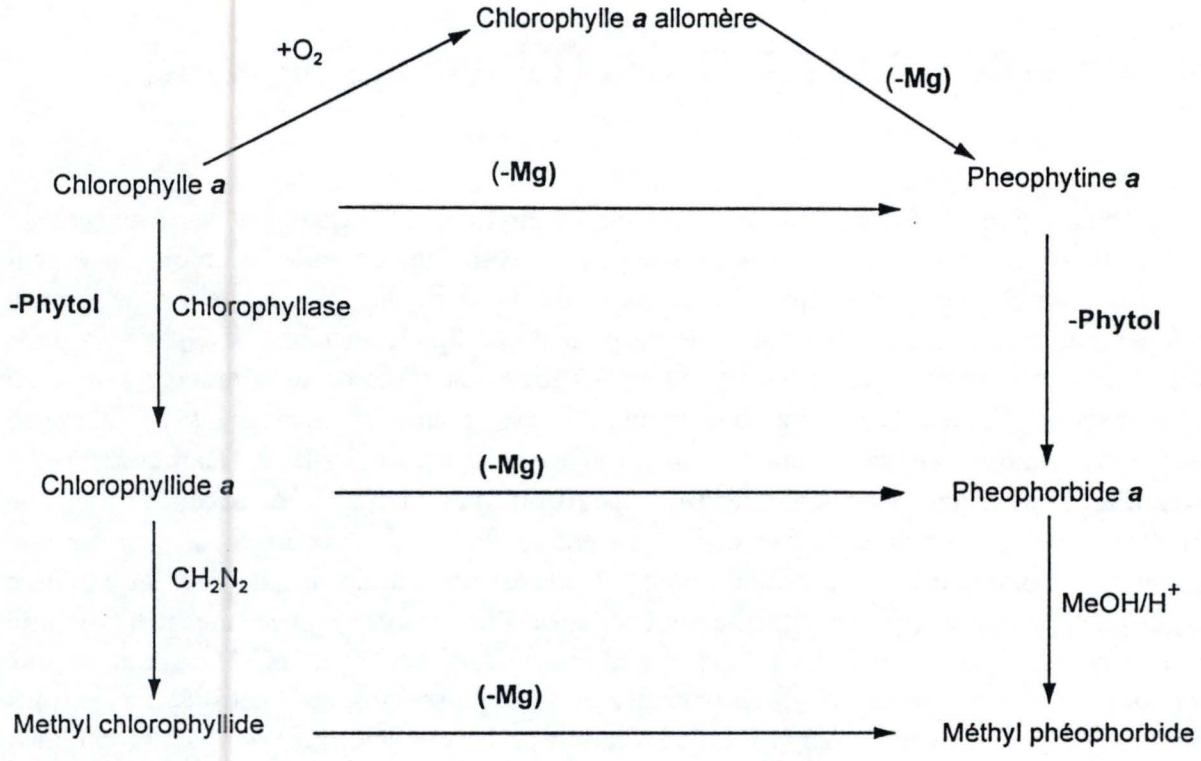


*Fig. 5a: Les principales voies de dégradation des pigments chlorophylliens d'après (**Carpenter** & **Berquist** 1985).*

D'autres intérêts de cette technique est la surveillance de la qualité de l'eau, qui peut être détériorée par la présence d'algues toxiques telles que les cyanobactéries ou par l'eutrophisation. Celles-ci peuvent être également contrôlées au cours du temps et dans l'espace, par l'analyse en HPLC d'échantillons provenant de plusieurs endroits.

L'analyse par HPLC des caroténoïdes et des chlorophyllles incorporés dans des sédiments lacustres ou marins permet de reconstruire l'histoire de la dynamique phytoplanctonique (**Leavitt,** 1993).

6. Dégradation des pigments

Un problème dont il est souvent question aujourd'hui est celui de la stabilité et/ou de la dégradation des pigments lors du transit intestinal du zooplancton. Bien que l'opinion ne soit pas unanime à cet égard, il nous paraît indispensable de vérifier le degré de conservation des pigments marqueurs pour leur utilisation dans l'étude de transfert de la matière organique d'origine phytoplanctonique.

Nous décrivons ci-dessous une synthèse des différents travaux effectués en laboratoire afin de déterminer l'origine de la dégradation des pigments chlorophylliens et caroténoïdes. Celle-ci pourrait avoir selon la plupart des auteurs plusieurs sources, telles que : la photo-oxydation, la sénescence, la biodégradation, le passé nutritionnel des animaux ou encore l'ingestion par le zooplancton (e.a. **Bianchi *et al.***, 1995; **Penry & Frost** 1991; **Mayzaud & Razouls** 1992; **Head & Harris**,1996).

D'après la littérature, les pigments chlorophylliens sont plus dégradés que les caroténoïdes. En effet, les chlorophylles s'isomérisent facilement suite à l'action de la chaleur, de la lumière et de solvant d'extraction. Les alcools, comme le signale **Svec** (1991), peuvent aussi être une source d'oxydation et d'allomérisation des chlorophylles. Les principales voies de dégradation des pigments chlorophylliens sont présentées à la Fig 5a. Il est donc vivement conseillé pour une meilleure extraction des pigments de travailler à l'obscurité et à basse température.

L'action de certaines enzymes telles que la chlorophyllase, dont l'activité est maximale pendant la phase de sénescence de cellules végétales, entraîne par déphytolation la formation de chlorophyllides (**Owens & Falkowski**, 1982; **Brown** *et al.* 1991 in **Head & Harris** 1996). Ces auteurs démontrent aussi la présence d'un autre système enzymatique nommé 'Magnesium-release enzyme', qui entraîne par démétalisation la formation de phéopigments.

L'apparition des phéopigments, en particulier des phéophorbides suite à l'ingestion par le zooplancton a été de nombreuses fois évoquée.

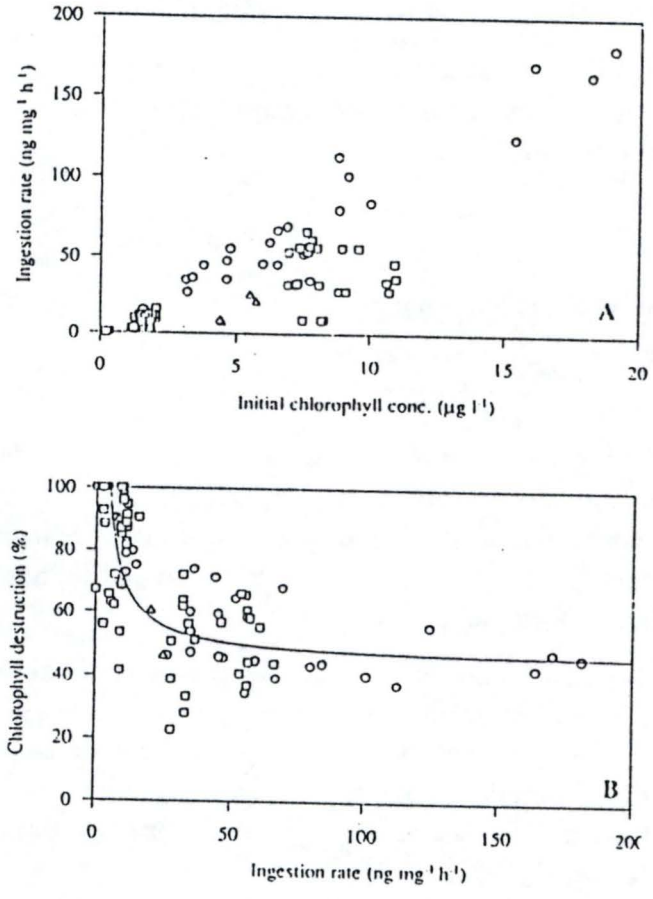


*Fig. 5b: Pourcentage de destruction de la chlorophylle a en fonction de la concentration en nourriture (A) et en fonction du taux d'ingestion (**Head & Harris**, 1996).*

Shuman & Lorenzen (1975) montrent aussi l'existence de phéopigments au sein des produits d'excrétion du zooplancton. Ces auteurs constatent également que pour chaque molécule de chlorophylle ***a*** consommée par le crustacé copépode *Calanus* sp., il se forme une molécule de phéopigments au sein de ses pelotes fécales. Par ailleurs, **Welschmeyer & Lorenzen** (1985b), **Penry & Frost** (1991) et **Head & Harris** (1992, 1996) indiquent que l'efficacité de conversion de la chlorophylle ***a*** en phéopigments n'est jamais à 100 %.

Outre les problèmes relatifs à la dégradation de la chlorophylle ***a*** en phéophorbides et en phéophytines, se pose un second problème lié à la transformation de la chlorophylle ***a*** en matières non-fluorescentes après leurs passage à travers l'intestin. Des travaux expérimentaux effectués par **Head & Harris** (1992) et **Quibliers-Lloberas** *et al.* (1994) le démontrent. Ces auteurs observent que la chlorophylle ***a*** ingérée peut aussi être dégradée en produits "incolores", non détectés par H.P.L.C. **Head & Harris** (1996) démontrent que la destruction de la chlorophylle ***a*** ingérée par le copépode *Calanus sp.* varie en fonction du taux d'ingestion et de la concentration en nourriture dans le milieu (Fig. 5b).

Cette dégradation se fait selon deux processus différents : le premier aboutit à la formation de phéopigments, et le second mène à l'apparition de produits incolores. Ce dernier processus résulte de l'action d'une enzyme appelée C.B.E (pour Chlorophyll bleaching enzyme) existant à la fois chez l'animal et les algues ingérées, et dont l'activité varie en fonction du taux d'ingestion.

En ce qui concerne les caroténoïdes, en particulier les xanthophylles, indicateurs de différentes classes algales, ils sont généralement considérés comme plus stables que les chlorophylles. Ces composés peuvent être utilisés comme indicateurs du grazing de phytoplancton pour autant qu'ils soient conservés au cours du transit intestinal. Ci-dessous, nous présentons une synthèse des différents processus de dégradation des caroténoïdes observés en milieu naturel ou en laboratoire.

Paerl *et al.* (1983), **Gieskes & Kraay** (1983) et **Millie** *et al.* (1993) montrent que l'altération de la myxoxantophylle et de la zéaxanthine, analysées sur des échantillons de cyanobactéries issus du milieu naturel, résultent essentiellement de l'adaptation physiologique à l'intensité lumineuse. De même **Hurley & Amstrong** (1991) soulignent l'importance de la lumière et de l'oxygène en milieu lacustre sur la dégradation des pigments caroténoïdes. En effet, la dégradation est plus importante dans la partie oxygénée de la colonne d'eau que dans les couches plus profondes, pauvres en oxygène. Selon **Leavitt** (1993), la dégradation des caroténoïdes révélée au sein des sédiments peut résulter d'une oxydation rapide dans la colonne d'eau, ou du grazing de phytoplancton par du zooplancton ou encore d'une perte des doubles liaisons dans les sédiments le plus profonds.

Reste à vérifier la conservation ou la transformation des pigments caroténoïdes au cours du transit digestif du zooplancton. Celle-ci ne fait pas l'unanimité des auteurs et dépend de l'espèce considérée. C'est surtout chez des organismes de grande taille (copépodes et grands cladocères) que ce phénomène a été le plus souvent étudié. Quant à la destruction de ces molécules, elle est toujours évoquée et constitue actuellement un débat très animé.

En effet, **Repeta & Gagosian** (1984) constatent au sein des pelotes fécales du zooplancton et autres organismes supérieurs, l'apparition d'un produit plus polaire que la fucoxanthine, le fucoxanthinol résultant de la transformation de la fucoxanthine suite à l'hydrolyse d'une fonction ester au cours du transit intestinal. Dans le même ordre d'idées, **Nelson** (1986, 1989), observe au sein des excrétats d'organismes macro-zooplanctoniques (crabes) l'apparition de produits dégradés qu'il identifie également comme du fucoxanthinol ou du péridinnol. Cependant, il n'observe aucun de ces dérivés de caroténoïde chez des copépodes.

Toutefois, **Head & Harris** (1992) notent que 100 % de la fucoxanthine, 9 à 82 % de la chlorophylle a et 70 à 100 % de la chlorophylle c sont détruites par le copépode *Calanus sp.*, nourri avec des diatomées. Ces auteurs notent également la transformation chimique partielle de la diadinoxanthine lors du transit digestif.

Par ailleurs, **Kleppel** (in **Milllie** *et al.*, 1993) note que l'analyse des pigments révélés au sein du contenu stomacal des copépodes montre que la fucoxanthine, la zéaxanthine et la lutéine, marqueurs respectivement de Diatomées, Cyanobactéries et de Chlorophycées sont conservées entre 85 et 100%, alors que la péridinine, marqueur de dinoflagellés, est conservée à 60%. Cependant, **Kleppel & Pieper** (1984) n'observent au sein des mêmes animaux aucune trace de produits de dégradation des xanthophylles (péridinine, fucoxanthine et néoxanthine). De même **Quiblier-Lloberas** (1994) ne note la présence d'aucune forme dégradée des xanthophylles suite à leur ingestion par le cladocère *Daphnia magna.*

3. Objectif de l'étude

Considérant l'intérêt offert par l'utilisation des pigments algaux Quant à l'étude du comportement alimentaire du zooplancton et de l'évaluation du grazing comme l'ont proposé certains auteurs (**Kleppel** *et al.,* 1988; **Nelson,** 1986; **Quibliers-Llobéras** *et al.,* 1994), nous nous sommes appliqués à tester la validité des pigments caroténoïdes et chlorophylliens pour l'étude de grazing par du zooplancton de petite taille.

Les résultats de la littérature concernant les études de grazing via les pigments, ont été surtout réalisés sur du zooplancton marin de grande taille (comme les copépodes) ou encore, comme dans le cas de l'étude du lac Pavin (**Quibliers-Lloberas** *et al.*, 1994), par diverses catégories de zooplancton. Une validation a été réalisée par ce dernier auteur, mais essentiellement sur des pigments dans les contenus stomacaux de *Daphnia magna.*

Au regard de ces résultats, et vu que les données de la littérature concernant le devenir des pigments chez le rotifère *Brachionus calyciflorus* et/ou le cladocère *Bosmina sp.*(espèces choisies dans notre travail) sont pratiquement inexistantes, nous avons tenté une approche expérimentale qui devrait permettre de vérifier la stabilité ou la dégradation des pigments, suite à l'ingestion d'algues par ces animaux.

Le degré de conservation des pigments peut être estimé sur base de la comparaison entre le contrôle et la quantité de pigments dans la suspension finale et les contenus stomacaux des animaux. Si le degré de conservation des pigments est suffisant, il est alors possible d'utiliser les pigments comme indicateurs de broutage des algues ingérées.

Nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur *Brachionus calyciflorus*, qui constitue un matériel biologique dont la culture est bien maîtrisée, et dont la dynamique d'ingestion est déjà étudiée en laboratoire, à l'aide des algues marquées. Dans un second temps, le suivi de l'évolution des pigments est réalisé chez *Bosmina sp.*

Parallèllement, des mesures des taux d'ingestion sont réalisées à différentes concentrations en algues (marquées préalablement au ^{14}C). Celles-ci sont réalisées seulement chez *Bosmina sp.* Nous avons par contre, utilisés pour *Brachionus calyciflorus* les valeurs d'ingestion obtenues en conditions expérimentales par **Gosselain** *et al.* (1996). Ceux-ci vont nous servir de référence pour approcher les mesures de l'ingestion obtenues via l'utilisation des pigments.

Des mesures des taux de filtration et de taux d'ingestion, ont été également réalisées *in situ* par d'autres chercheurs utilisant des algues marquées. Durant la période où *Bosmina sp.* a été fréquente dans les échantillons prélevés en Meuse, nous avons réalisé des tris en laboratoire pour la mesure du taux d'ingestion de cette espèce, en vue de le comparer à celui mesuré expérimentalement.

4. Matériel et méthodes

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous développerons les différents modes opératoires utilisés lors du déroulement de ce travail.

2. Extraction, séparation et dosage des pigments en HPLC

L'analyse des pigments algaux en HPLC au sein de notre unité a débuté en 1994. Nous avons choisi de travailler avec le protocole décrit par **Wright** *et al.* (1991) adapté par l'EPA (pour Environenmental Protection Agency). Ce protocole, qui comporte un gradient ternaire, a permis la séparation de la plupart des pigments caroténoïdes et chlorophylliens à partir de cultures unispécifiques. Nous allons développer dans cette section la méthodologie liée au dosage des pigments algaux dans des échantillons zoo- et phytoplanctoniques, depuis l'extraction jusqu'à l'analyse des chromatogrammes.

2.1. Extraction de pigments à partir de matériel algal

En vue de minimiser toute dégradation précoce des pigments, nous avons travaillé à basse température et sous faible lumière, depuis la filtration des échantillons, jusqu'à l'extraction des pigments, (**Svec**, 1991; **Godwin**, 1992; **Downes** *et al.*, 1993).

2.1.1. Suspensions algales

10 ml de chaque culture d'algues en cours de croissance sont prélevés trois fois au moyen d'une pipette, puis sont filtrés sous vide sur filtre GF/C (diamètre 25 mm ou 47 mm pour les grands volumes). Ces filtres sont immédiatement placés au congélateur en vue d'une extraction ultérieure. La procédure d'extraction standard est la suivante (Protocole selon **Jim Hurley, USA**) :

10 ml d'acétone 90 % eau sont ajoutés sur le filtre supportant les algues. Le filtre est placé dans une fiole à scintillation de 20 ml. Il faut noter que pour les cultures d'algues vertes, relativement réfractaires à l'extraction acétonique, les filtres sont préalablement broyés pendant 2 min au Potter. Les fioles sont ensuite placées dans un bain à ultrasons (Branson, modèle 2210) dans de la glace pilée, pour une première sonication de 15 min. Les fioles sont mises au congélateur ou au frigo pendant au moins une nuit, puis soniquées une deuxième fois pendant 15 min. L'extrait est ensuite passé sur filtre de type Gelman Acrodisc puis mis dans des fioles à scintillation brunes de 5 ml avant d'être injecté dans le chromatographe.

2.1.2. Suspensions animales

Les animaux, mis en suspension dans un faible volume d'eau de Volvic, sont filtrés sous vide sur filtre GF/C (25 mm de diamètre). Les filtres sont placés dans des fioles à scintillation de 20 ml puis mis immédiatement au congélateur. Les filtres supportant la fraction zooplanctonique sont additionnés de 2 ml d'acétone 90 %. La procédure d'extraction est dès lors la même que pour les suspensions algales.

2.2. Le système utilisé

L'appareillage se compose d'un "Multisolvent Delivery System Waters 600" équipé d'un injecteur automatique "Waters 717 plus Autosampler" et de deux détecteurs disposés en série: un détecteur d'absorbance UV/visible "Tunable Absorbance Detector Waters 486" réglé sur 436 nm, et un détecteur en fluorescence "Scanning Fluorescence Detector Waters 470" permettant quant à lui d'améliorer la détection des chlorophylles et de leurs produits de dégradation. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés par le logiciel Millenium 2010 version 2.0 de Waters.

Pour une meilleure élution des pigments, le protocole utilisé a permis d'optimiser les performances de la phase mobile polaire par utilisation d'un gradient ternaire; il a permis la séparation des différents pigments chlorophylliens et caroténoïdes sur un intervalle de temps de 25 minutes. Le débit constant est de 1 ml min^{-1} et le gradient est linéaire (tableau 4).

Dans tous les processus chromatographiques en phase liquide, la séparation est le resultat d'interactions entre l'extrait et la colonne (phase stationnaire). Le choix de celle-ci (dimension, taille et nature des particules...etc) est, entre autre, un elément important pour le succès d'une analyse chromatographique. La séparation des pigments est réalisée à l'aide d'une colonne de type Nova-Pak C_{18} (Dimension 4,6*250 mm, taille des particules : 4 µm; porosité : 60 Å).

Temps (min)	Solvant A	Solvant B	Solvant C	Débit ml.min^{-1}	Gradient
0	100	0	0	1	injection
2	0	100	0	1	linéaire
2.6	0	90	10	1	linéaire
13.6	0	65	35	1	linéaire
20	0	31	69	1	linéaire
22		100	0	0	linéaire
25	100	0	0	0	linéaire
30	100	0	0	0	Equilibration

*Tableau 4. Gradient analytique adapté de **Wright** et al., (1991).*

Solvant A : Solution 80:20 vv de méthanol : ammonium acétate 0.5 M (pH 7,2)

Solvant B : Solution 90:10 vv d'acétonitrile : eau Milli-Q

Solvant C : acétate d'éthyle 100%

2.3. Identification et quantification des pigments

2.3.1 Identification des pigments

Dans un premier temps, l'identification des pigments a été réalisée sur des échantillons d'algues pures maintenues en culture en laboratire, et dont la composition pigmentaire est déja bien mentionnée dans la littérature (Fig.6). Pour les autress pigments, nous nous sommes basées sur l'utilisation de standards externes (K_8 et T_4 fournis gracieusement par **J. Hurley** Madison, USA). Le T_4 (standard de phéophytine a) est obtenu par acidification de la chlorophylle a pure. Le K_8 est obtenu à l'aide d'un mélange de sept pigments purifiés (Fig.7). La composition et la concentration des différents pigments constituant le K_8 sont présentés dans le tableau 5.

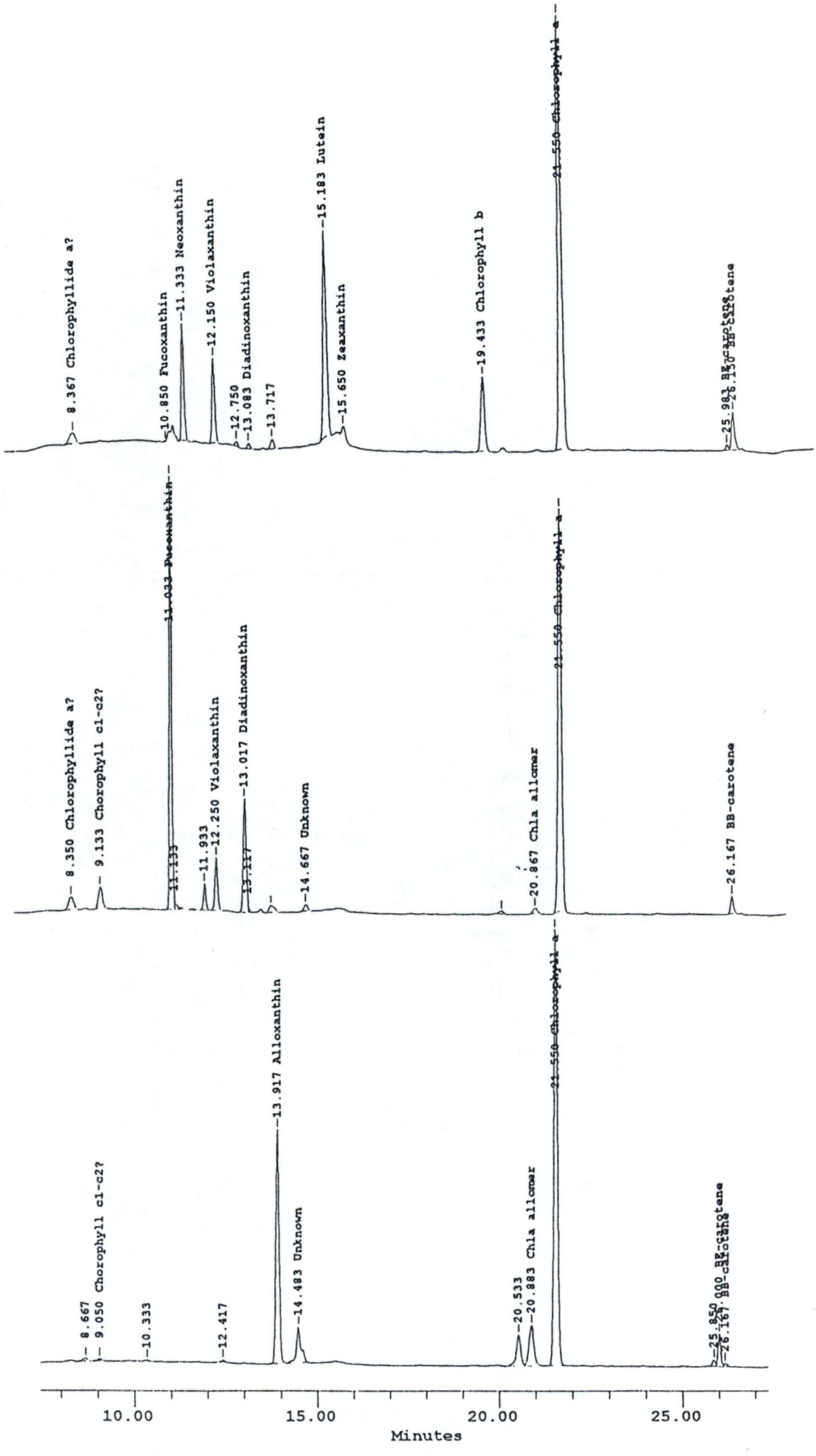


Fig. 6: Profils chromatographiques obtenus en absorbance de D. ehrenbergianum (Chlorophycée), C. pseudostelligera (Diatomée) et C. ozolini (Cryptophycée).

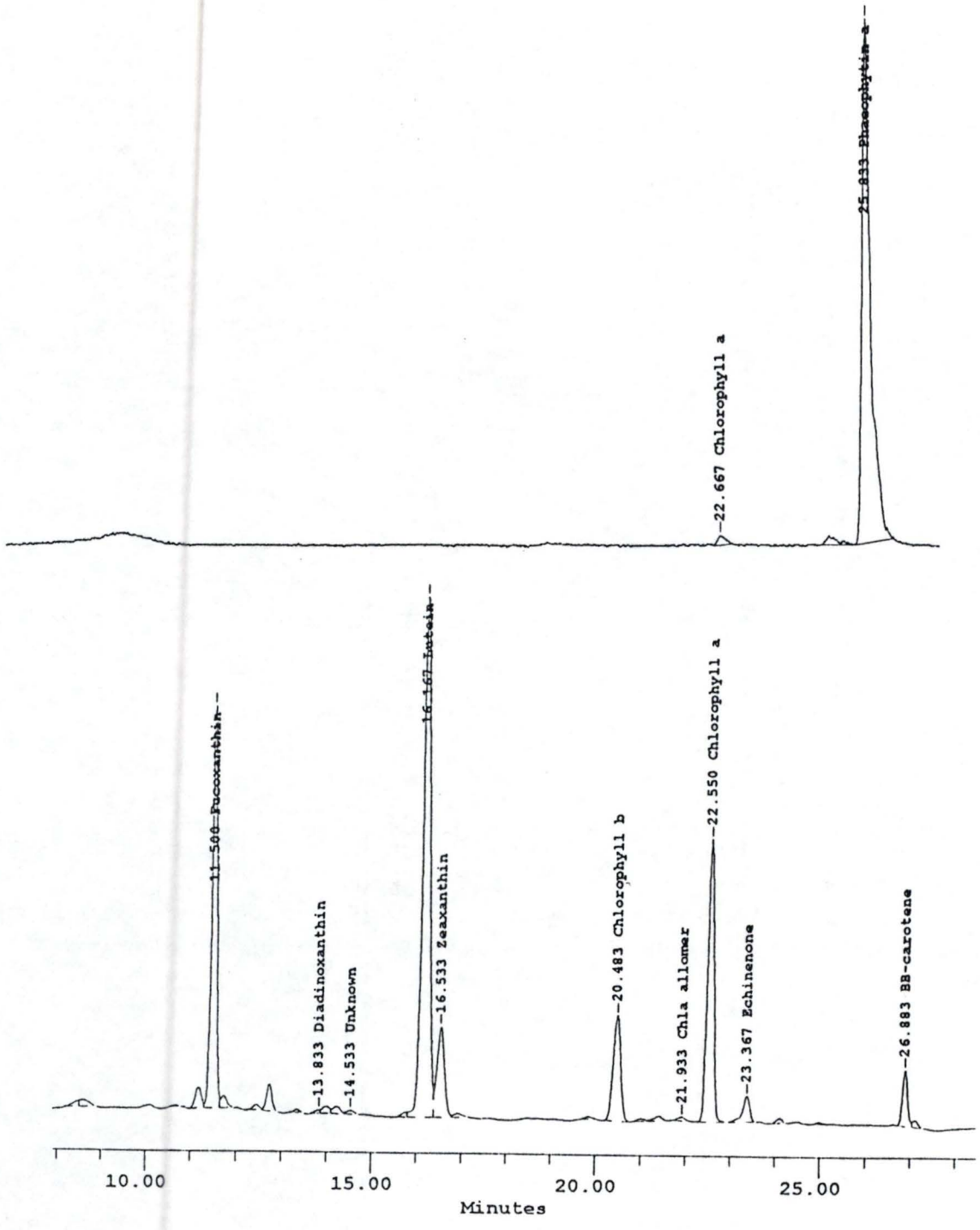


Fig. 7 : Profils chromatographiques des standards K8 obtenus en absorbance (c) et T4 obtenus en fluorescence (d).

Pigments	ng ou pmoles μl^{-1}
Chlorophylle a	12.34
Chlorophylle b	5.37
Fucoxanthine	10.43
Lutéïne	8.51
Zeaxanthine	1.75
Echinénone	5.30
B-carotène	1.12

Tableau 5. Composition et concentration des différents pigments standards dans le K_8

Cette procédure nous a permis de préciser le profil d'élution des différents pigments. La detection des chlorophylles et de de leurs produits de dégradation est realisée en fluorescence. La longueur d'onde d'excitation retenue est 412 nm, l'émission est mesurée à 674 nm. En absorbance, à 436 nm, nous détectons les caroténoïdes en sus des pigments chlorophylliens. Ces deux longueurs d'ondes ont été choisies pour optimiser la détection des phéopigments.

2.3.2. Quantification des pigments

La quantification se fait de la façon suivante : Pour les pigments présents dans les srtandards K_8 et T_4, la quantification se fait suivant la droite de callibration correspondante. celle-ci se fait simplement par injection de 10, 20 et 40 µl de chaque standard à partir de fioles différentes (pour éviter l'évaporation quand le septum est percé par l'injecteur automatique). Pour les caroténoïdes non présents dans le K_8, la quantification se fait par rapport à la fucoxanthine suivant la formule suivante :

$$Cp = a \,.\, (Ep' / Ep) \,.\, Ap'$$

où, Cp est la concentration en pigment (ng / pmole), a est le coefficient angulaire de la droite de calibration de la fucoxanthine, E'p le coefficient d'absorption spécifique de la fucoxanthine, Ep est le coefficient d'extinction spécifique du pigment et Ap est la surface du pic de pigment.

Pour les composés chlorophylliens, la quantification se fait en fluorescence pour des raisons de sensibilité et de spécificité. Ces composés sont quantifiés soit suivant la droite-étalon (Chl a, Chl b, phéophytine a), soit par rapport à la chlorophylle a (chlorophyllides, chloropylles c), soit par rapport à la phéophytine a (pour les dérivés de la phéophytine a et les phéophorbides).

La concentration en pigments dans un extrait est calculée en tenant compte du volume injecté, du volume de l'extrait et du volume de la suspension filtrée.

3. Culture d'algues et de zooplancton

3.1. Mise en culture des algues et suivi

Quatres espèces algales ont été maintenues en culture en laboratoire: deux espèces d'algues vertes (Chlorophycées) : *Dictyosphaerium ehrenbergianum* **Näg.** (diamètre de l'ordre de 4 µm) et *Chlamydomonas reinhardii*, la diatomée *Cyclotella pseudostelligera* **Hustedt** (cellules cylindriques de 8-10 microns de diamètre et 5,4 microns de haut) et la Cryptophycée *Cryptomonas ozolini*. La culture d'algues est réalisée dans des flacons en verre stérilisés à l'autoclave. Les cultures d'algues vertes reçoivent de l'air comprimé de façon continue et sont agitées (seulement pour *Dictyosphaerium*) à l'aide d'un barreau magnétique. Les cultures de *Cyclotella* sont également agitées en continu, sans ajout de l'air comprimé. Quant aux de cultures de *Cryptomonas*, elles sont laissées sans agitation ni air comprimé.

Ces cultures d'algues ont été réalisées sur un milieu de culture adapté du milieu de **Bold**. La culture d'algues se fait dans un incubateur à une température de 22 °C et dont l'éclairement quotidien est contrôlé (phase claire de 16 h et phase obscure de 8 h). Pour les diatomées et les cryptophycées, contrairement aux algues vertes, le milieu de culture est additionné d'extrait de sol, pour favoriser une meilleure croissance des cellules. La composition de l'extrait de sol est décrite dans le tableau 6. Nous avons procédé à un repiquage hebdomadaire sur du milieu frais pour les algues vertes et tous les 15 jours pour les diatomées et les cryptohycées. Pour le repiquage des ces cellules phytoplanctoniques, un faible volume (1 ml) de la culture en phase exponentielle de croissance est prélevé en conditions stériles, à l'aide d'une seringue de 3 ml, puis additionné de milieu frais préalablement filtré sur filtre stérile de type Stérivex_GP (0,22 µm).

Composants	Solution stock (g /400 ml d'eau distillée)	Volume de solution stock/litre de milieu
Nitrate de sodium ($NaNO_3$)	10	10
Chlorure de calcium ($CaCl_2$. $2H_2O$)	1	10
Sulfate de magnésium ($MgSO_4.7H_2O$)	3	10
Hydrogéno-phosphate de potassium (K_2HPO_4)	3	10
Dihydrogéno-phosphate de potassium (KH_2PO_4)	7	10
Chlorure de sodium (NaCl)	1	10
Vitamine B_{12}	$60*10^{-6}$	0.1
$Na_2SiO_3.5H2O$	8.5*	1

Tableau 6. Composition de base du milieu de Bold utilisé pour la culture des cellules phytoplanctoniques. (: pour la culture des diatomées seulement).*

Protocole de préparation de l'extrait de sol et des oligo-éléments

a/ Extrait de sol

Deux cuillères à café de sol non recemment fertilisé sont mises à ébulution en présence d'un litre d'eau distillée, additionnée d'une pincée de $CaCO_3$, durant 2 h. Le mélange est mis à décanter pendant une journée avant d'être mis à ébulution pour une deuxième fois pendant 2 h. Après une deuxième décantation de 24 h, le mélange est filtré sur filtre GF/C puis mis dans une bouteille en verre. L'extrait de sol est stérilisé à l'autoclave puis conservé au frigo.

b/ Oligo-éléments

La solution stock d'oligoéléments est préparée comme suit : Pour 1000 ml d'eau distillée, sont additionnés les constituants suivants:

- 750 mg Na_2EDTA
- 97 mg $FeCl_3.6H_2O$
- 41 mg $MnCl_2.4H2O$
- 5 mg $ZnCl_2$
- 2 mg $COCl_2.6H_2O$
- 4 mg $Na_2MoO_4.H_2O$

Après mélange et dissolution des différents sels, 6 ml de cette solution sont ajoutés à un litre de milieu frais.

3.2. Estimation de la densité algale

Pour estimer la biomasse des cellules phytoplanctoniques, nous avons utilisé deux méthodes différentes :

- Mesure de la chlorophylle ***a*** à 665 nm d'un extrait dans du méthanol pur : entre 10 et 20 ml de la culture d'algues en cours de croissance sont prélevés en conditions stériles puis sont filtés sur filtre GF/C (25 mm ou 47 mm de diamètre). Les filtres sont ensuite placés dans des tubes en verre et additionnés de 5 ml de méthanol pur. L'extraction se fait par immersion des tubes dans un bain marie à 65 °C, pendant 3 min.

Les tubes sont mis à décanter quelques minutes et trois ml du surnagant sont prélevés après pour la mesure de l'absorbance au spectrophotomètre. La biomasse est exprimée en terme de µgChla l^{-1} et est calculée selon la formule suivante, dérivée de **Marker & Jinks** (1982).

$$\mu gChla\ /l = (DO*13*5)/Vf$$

où DO est la densité optique (calculée à partir de la transmittance) et Vf le volume de la culture filtrée en litre.

- Mesure par HPLC en vue de réaliser des intercalibrations entre les pigments marqueurs des algues et les biomasses correspondantes.

Une estimation de la biomasse algale en carbone peut être obtenue en utilisant un rapport C:Chl ***a*** de 25, classique pour des algues en culture (**Vollenweider**, 1974).

Le suivi de la croissance des algues, en particulier, les algues vertes, nous a permis de calculer le taux d'accroissement journalier des algues, et de mesurer l'évolution de la biomasse algale dans le temps, notamment lors du marquage des algues avant le déroulement des expériences de grazing.

3.3. Culture des animaux

Deux représentants du zooplancton ont été étudiés au cours de ce travail : le crustacé cladocère *Bosmina sp.*, et le rotifère *Brachionus calyciflorus*. Ces animaux ont été isolés de la Meuse, puis ont été mis en élevage artificiel au laboratoire d'Ecotoxicologie de l'Université de Liège (**C. Joaquim-Justo**). Durant toute la durée de nos expériences, ces animaux ont été maintenus en culture au sein de notre laboratoire.

3.3.1. *Brachionus calyciflorus*

Le milieu de culture utilisé est de l'eau de Volvic (couramment utilisée dans les laboratoires de Microbiologie et d'Ecotoxicologie pour le culture et l'élevage des organismes tests, (**Joaquim-Justo**, 1992). L'élevage est réalisé dans des boites en plastiques Costar de 300 ml. La culture se fait dans un incubateur à 22 °C illuminé de façon continue. L'éclosion des oeufs se déroule de 24 à 48 heures plus tard. Les Rotifères sont nourris tous les jours (de préférence deux fois par jour) par des cellules de *D. ehrenbergianum* préalablement centrifugées, de façon à atteindre une concentration saturante 3.10^5cellules ml^{-1}. Afin d'éviter une contamination du milieu de culture, suite aux algues sédimentées et aux individus morts, un renouvellement du mileu d'élevage est réalisé trois fois par semaine. Pour ce faire, les Rotifères sont filtrés sur filtre 37 µm de vide de maille, puis sont rincés à l'eau de Volvic et enfin remis en suspension dans un volume de 20 ml dans une boîte de Pétri. Ils sont ensuite attirés à la lumière sous binoculaire puis prélevés à l'aide d'une micropipette avant d'être transférés dans de nouveaux pots d'élevage.

3.3.2. *Bosmina* sp.

Le même milieu de culture que celui des Rotifères est utilisé pour les Bosmines. L'élevage est réalisé dans des gobelets en plastique de 250 ml. Afin de renouveler le milieu de culture, les animaux sont filtrés sur filet de 83 µm de vide de maille. Les animaux subissent ensuite la même procédure de repiquage que celle citée précedement pour les Rotifères. Après avoir réalisé que *Dictyosphaerium.* est faiblement ingérée par les Bosmines à l'issue des expériences de grazing par la méthode au ^{14}C, nous avons opté pour une autre espèce d'algue verte, la chlrophycée, *Chlamydomonas reinhardii* qui d'après certains auteurs, est bien ingérée par ces cladocères.

4. Etude de la stabilité et /ou de la dégradation des pigments marqueurs

4.1. Objectif de l'étude

Le but est d'évaluer le degré d'altération des pigments chlorophylliens et caroténoïdes au cours du transit digestif des animaux zooplanctoniques.

On sait, que lors de l'ingestion, les algues sont broyées dans le mastax des Rotifères ou dans l'appareil buccal des crustacés : une partie de ce matériel broyé peut retourner dans la suspension sans être ingérée (sloppy feeding).

Ce qui est ingéré est soumis à une attaque par les enzymes digestives, en conditions acides; bien que la digestion ait pour cible les principaux constituants cellulaires (lipides, protéines et sucres), les pigments peuvent subir une transformation (ex: la dégradation de la chlorophylle ***a*** en phéophytine et en phéophorbide) ou une destruction (ex. clivage du noyau tétrapyrole des chlorophylles).

Les résidus de la digestion sont évacués dans les excréments. Comme les Rotifères et les cladocères ne produisent pas de pelotes fécales cohérentes, le matériel non ingéré se retrouvant dans la suspension est mélangé au matériel non ingéré, sans possibilité de séparation. Dès lors, la seule possibilité d'approcher une éventuelle altération des pigments est de comparer le contenu en pigments d'une suspension témoin sans animaux avec celui de la suspension avec animaux, après un temps suffisant pour qu'une fraction significative des algues ait été consommée.

4.2. Protocole expérimental

4.2.1. *Brachionus calyciflorus*

Les Rotifères à raison de 500 individus par pot, ont été acclimatés à l'obscurité pendant 24 h dans des pots différents, en présence d'une culture d'algue à saturation (5 mg C l^{-1}). Ensuite les animaux sont transférés dans des pots d'incubation de même concentration en algues dans un volume final de 200 ml. L'incubation s'est déroulée également à l'obscurité pendant des temps respectivement de 3, 6, 9 et 12 heures. Des pots de même concentration en algues et sans animaux sont utilisés comme témoins pour la comparaison de la composition pigmentaire avec la suspension finale.

A la fin de chaque incubation, les animaux sont récupérés sur un tamis de 37 µm de vide de maille, et anesthésiés à l'eau carbonatée pendant 2 minutes. Ils sont ensuite rincés à l'eau de Volvic pour éliminer les algues non ingérées, qui restent éventuellement accrochées au animaux. Les Rotifères sont ensuite filtrés sur filtre GF/C (25 mm de diamètre). Les filtres sont placés dans des fioles à scintillation de 20 ml et immédiatement mis au congélateur.

L'extraction des filtres contenant les animaux est réalisée comme indiquée dans la section 2.1 de la 3ème partie. Les suspensions algales "test et témoins" sont filtrées sur filtre GF/C (47 mm de diamètre) trois fois pour avoir un triplicat au niveau de la mesure en HPLC. Les filtres supportant les algues sont placés dans des fioles à scintillation de 20 ml qui sont directement mises au congélateur. L'extraction de ces filtres est effectuée selon le protocole décrit dans la section 2.1. de la 3ème partie.

Après extraction des pigments dans les animaux et dans les suspensions algales, la détection est réalisée en HPLC. La mesure est effectuée trois fois à chaque temps d'incubation de façon à évaluer la variabilité de la mesure des pigments. Théoriquement, s'il n'y a pas de dégradation pour un pigment x, la quantité totale de ce pigment dans la suspension test additionnée de celle dans les animaux, devrait être égale à la quantité du même pigment dans le témoin.

4.2.2. *Bosmina* sp.

Le protocole utilisé pour les Rotifères a été également appliqué aux Bosmines à quelques détails près. Ces animaux à raison de 250 individus ont été incubés une seule fois en présence de *Chlamydomonas reinhardii* à concentration saturante (5 mg C l^{-1}). L'incubation s'est déroulée pendant des temps de 2, 4, 6 et 8 heures.

5. Etude de l'activité d'ingestion de *Brachionus calyciflorus* et de *Bosmina* sp. à l'aide d'algues marquées

5.1. Description de la méthodologie

Cette étude est entreprise en collaboration avec l'équipe de recherche du laboratoire d'Ecotoxicologie de l'Université de Liège (**C. Joaquim-Justo**), dans le cadre du programme de recherche F.R.F.C.

Les expériences ont été menées de manière à pouvoir déterminer les activités d'ingestion et de filtration de *Bosmina sp.* et, par extension, l'impact du broutage de cette espèce sur le phytoplancton en Meuse. Le matériel utilisé est choisi en adéquation avec ce que l'on peut trouver en conditions naturelles dans le milieu étudié. Deux méthodes ont été utilisées : le marquage de la nourriture algale au ^{14}C et le dosage par H.P.L.C. des pigments marqueurs des relations trophiques.

Quant à l'étude de la dynamique d'ingestion de *Brachionus calyciflorus* à l'aide d'algues marquées, nous avons utilisé les résultats déja obtenus par **Gosselain** *et al.* (1996). En effet, ces résultats vont nous servir comme référence à celles que nous obtiendrons via, l'approche basée sur le dosage des pigments, durant les expériences de grazing.

5.2. Etude de la dynamique d'ingestion de *Bosmina* sp.

5.2.1. Introduction

Deux algues ont été utilisées pour cette étude : *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, matériel bien connu et déjà utilisé pour *B. calicyflorus*, et *Chlamydomonas reinhardii*, utilisé notamment par **DeMott** (1982).

5.2.2. Marquage et préparation de la nourriture algale

Dans le cas de *D. ehrenbergianum*, les algues, en phase exponentielle de croissance, sont marquées deux jours avant l'expérience par ajout de 250 µCi de $NaH^{14}CO_3$ dans 250 à 500 ml de culture. Juste avant le marquage, la densité des algues est recontrôlée par comptage à la cellule de Bürker de façon à utiliser une culture qui ne dépasse pas 12.10^6 cellules ml^{-1} au moment de la préparation des algues. Nous avons prélevé 1 ml juste après le marquage pour s'assurer de l'activité du traceur.

Afin d'absorber le carbone radioactif provenant de la respiration des algues, nous relions la sortie de gaz du flacon de culture à un flacon contenant une solution de KOH.

Pour *C. reinhardii*, un test préalable est réalisé afin de déterminer le temps optimum de marquage de la culture. Celui-ci est estimé à 24 heures (Fig.8); au-delà de cette durée, une décroissance de l'activité est observée. La procédure ensuite appliquée pour la préparation des algues est la même que pour *D. ehrenbergianum*.

5.2.3. Préparation et conditionnement final des algues

Cette manipulation se déroule la veille ou le jour de l'expérience. Un volume adéquat de la suspension algale est centrifugé à 2600 tours min^{-1} pendant 10 min et rincé avec du milieu frais; cette opération est réalisée trois fois. De cette façon, on élimine le milieu radioactif. Un comptage immédiat ou une mesure de Chl ***a*** au spectrophotomètre est ensuite réalisé sur l'échantillon concentré ainsi obtenu afin de déterminer le volume nécessaire pour chaque point d'expérience. Pour les expériences avec *D. ehrenbergianum*, les algues sont resuspendues dans du milieu frais pour avoir un volume final constant de 5 ml, dans des tubes à essai entourés de papier aluminium. Ceux-ci sont ensuite conservées à l'obscurité et à l'abri de la lumière, jusqu'au lancement de l'incubation. Pour les *C. reinhardii*, les volumes adéquats sont préparés au moment du lancement de l'expérience.

5.2.4. Conditionnement des animaux

Les Bosmines sont préacclimatées la veille de l'expérience, en présence de la même espèce algale qui va servir à la mesure du taux d'ingestion. Le matin de l'expérience, la densité des individus est vérifiée par comptage au binoculaire, et la quantité nécessaire est prélevée, de façon à atteindre une densité expérimentale de 5 à 7 ind ml^{-1}. Une phase supplémentaire d'acclimatation, de minimum une heure, est réalisée, dans 50 ou 30 ml d'une suspension d'algues non marquées, de densité identique à la densité de l'expérience, juste avant celle-ci. Nous attirons l'attention sur le fait que, dans le cas de *C. reinhardii*, les acclimatations ont été réalisées avec des biomasses supérieures à celles de l'expérience.

5.2.5. Déroulement de l'expérience

Les expériences sont menées à différentes densités algales, comprises, pour *D. erhenbergianum* entre 6.10^5 et $1,2.10^6$ cell ml^{-1} soit une gamme comprise entre 0,15 et 11,8 mg C l^{-1}, (10^6 cellules = 5,9 µg C) et pour *C. reinhardii* dans une de biomasse comprise entre 0,1 et 2 mg C l^{-1} (1 cellule = ~110 pg C). La durée de l'incubation des animaux en présence de la nourriture marquée qui doit être inférieur au temps du transit intestinal, est comprise entre 5 10 min (DeMott, 1982). Dans le cas de *D. ehrenbergianum*, l'expérimentation est réalisée dans un volume final de 50 ml constitué de 45 ml d'eau de Volvic dans lesquels sont mis en suspension, un à un, les animaux, et de 5 ml de suspension algale radioactive.

Une première expérience avec *C. reinhardii* est réalisée dans des tubes de 30 ml (Volvic + algues marquées). Dans l'espoir de réduire le stress éventuel du au prélèvement des animaux, la méthodologie suivante à été appliquée pour la seconde expérience : au moment de l'experience, la suspension contenant les algues "froides" est retirée des tubes par trois retraits successifs des ¾ du volume au moyen d'un fin tuyau muni à son extrémité d'un filet à plancton de maille adéquate, suivi d'une dilution par un volume équivalent d'eau de Volvic. La quantité d'algues non radioactives dans les tubes à l'issue de cette manipulation est estimée à 5 %. L'ajout des algues marquées correspond au temps zéro de l'expérience.

A la fin de l'incubation, les animaux sont isolés par filtration sur du filet à plancton de 83 µm de vide de maille, puis sont anesthésiés pendant 2 min dans de l'eau gazeuse et ensuite tués au formol à 0.9 % durant 2 min. Les animaux sont ensuite repris, sous binoculaire, un à un et transférés dans un bain de rinçage d'eau de Volvic, puis placés dans 3 fioles à scintillation, à raison de 30 individus par fiole. Les animaux sont incubés pendant deux heures à 50°C après un ajout de 500 µl de Lumasolve (LUMAC; produit détruisant le matériel tissulaire). Finalement 300 µl d'HAc et 4,5 ml de liquide scintillant (Aqualuma) sont ajoutés avant lecture de l'activité (dpm) dans un compteur à scintillation Beckman LS 6000 SC.

Des expériences témoins sont réalisées avec des animaux tués préalablement à l'incubation en présence d'algues marquées.

5.2.6. Traitement des algues marquées

Au moment du lancement de l'expérience, deux fois 1 ou 2 ml de milieu de chaque fiole d'incubation sont prélevés et filtrés sur filtres Millipores HA 0,45 µm de 25 mm de diamètre. Les filtres sont rincés avec de l'eau distillée (20-25 ml) avant et après rinçage avec de l'HCl (2 ml 0.1 N). Ils sont ensuite déposés dans des fioles à scintillation où sont ajoutés 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma) pour la lecture de l'activité au compteur à scintillation.

5.2.7. Traitement des résultats

L'activité de filtration se calcule selon la formule suivante:

$$F(\mu l\ ind^{-1}\ h^{-1}) = \frac{\text{Activité des animaux (dpm ind}^{-1}) - \text{Activité des témoins (dpm ind}^{-1})}{\text{Activité algale (dpm ml}^{-1}) * \text{temps (h)}} * 1000$$

L'activité d'ingestion est exprimée en quantité de carbone algal ingéré par le zooplancton, en ng C $ind^{-1}\ h^{-1}$.

I = F * biomasse algale (µg C ml^{-1})

6. Étude du grazing *in situ*

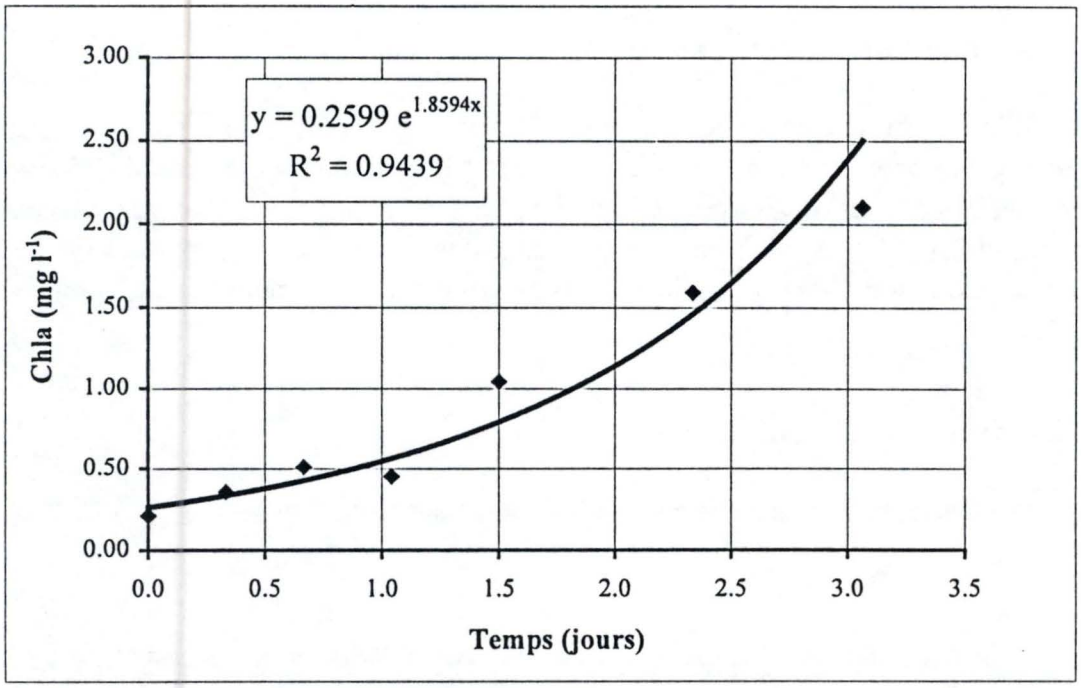
6.1. Approche quantitative (méthode de Haney)

Cette méthode permet d'effectuer des mesures quantitatives du taux de broutage de la communauté zooplanctonique sur la communauté phytoplanctonique. L'impact du broutage de l'ensemble du zooplancton est exprimé en pourcentage du volume d'eau filtré par jour. La contribution de chaque taxon au grazing total est également possible par la réalisation de tris ultérieurs des organismes en laboratoire.

6.1.1. Préparation des algues

La nourriture algale est préparée comme pour une mesure de grazing en laboratoire. Le marquage et le conditionnement sont réalisés comme indiqué aux sections 5.2.2. à 5.2.4.

a.



b.

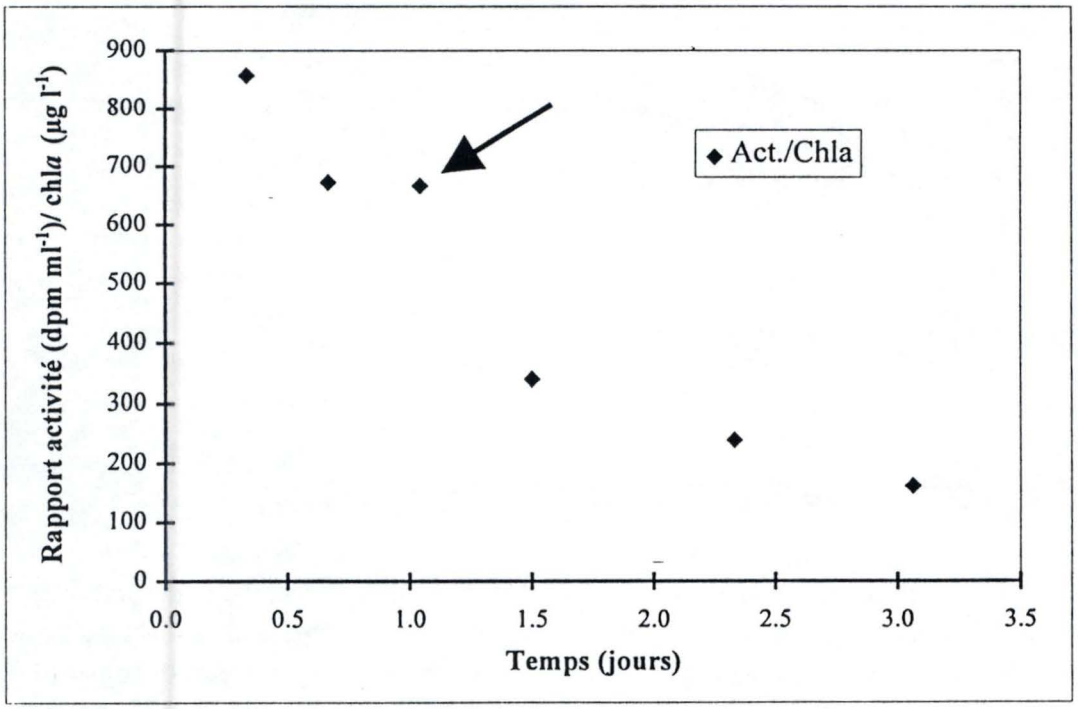


Fig. 8:

a - Courbe de croissance de Chlamydomonas reinhardii

b - Rapport de l'activité ^{14}C (dpm ml^{-1}) des algues sur la concentration en Chl **a** *au cours du temps. La flèche indique le temps optimal de marquage, au-delà duquel on observe une dilution isotopique*

La densité des algues marquées est déterminée par comptage à la cellule de Bürker la veille de l'expérience. Les échantillons d'algues marquées sont additionnés de milieu frais, de façon à atteindre un volume final de 15 ml puis sont emballés par du papier aluminium, au frigo, jusqu'au moment de la manipulation.

Les algues marquées utilisées comme traceur de l'ingestion, sont utilisées dans une proportion ne dépassant pas les 10 % de la biomasse phytoplanctonique. Celle-ci est estimée avant le déroulement de l'expérience.

6.1.2. Déroulement de l'expérience *in situ*

La mesure de grazing sur le terrain est réalisée à l'aide d'une "Chambre de Haney" (**Haney**, 1971) d'un volume de 6,5 litres. 15 ml de la nourriture algale marquée sont injectés dans un compartiment spécial; les algues marquées sont libérées dans la chambre lors de la fermeture de celle-ci par un envoi d'un messager coulissant, après l'immersion de la bouteille.

Après une incubation de courte durée (5 à 10 minutes), le contenu de la chambre est complètement recueilli sur filtres de 37 µm ou parfois 63 µm de vide de maille. Les animaux retenus par le filtre sont plongés dans un bain d'eau gazeuse pendant 2 minutes, puis transférés soit dans une fiole à scintillation pour tri ultérieur des organismes. Les fioles sont conservées dans de l'azote liquide puis au congélateur dès retour au laboratoire.

Nous avons récupéré à la fin de chaque incubation, 10 ml du milieu filtré qui vont servir à la mesure de l'activité des algues. 500 µl de la suspension de départ ont aussi été prélevés par mesure de sécurité afin de pouvoir éventuellement trouver, par calcul, la valeur d'activité des algues dans le milieu d'incubation. Le traitement des algues et des animaux se fait de la même manière que pour les expériences menées en laboratoire.

6.1.3. Traitement des algues et des animaux

Les fioles destinées à la mesure du grazing spécifique sont décongelées juste avant tri. L'échantillon décongelé est versé sur une boîte de Pétri et éventuellement dilué par de l'eau de Volvic si la charge en matière est importante. Les individus, après identification, sont prélevés un à un à l'aide d'une micropipette en verre, puis placés en nombre connu dans des boîtes de pétri contenant de l'eau de Volvic pour le rinçage. Les animaux sont ensuite placés dans des fioles à scintillation de 5 ml, additionnés de 500 µl de Lumassolve puis incubés pendant 2 (h) à 50 °C. les fioles contenant les animaux sont additionnées de 300 µl d'acide acétiques et 4.5 ml de liquide scintillant avant la mesure de l'activité au compteur à scintillation.

6.1.4. Expression des résultats

Les activités de filtration sont calculés de la même façon que pour les expériences en laboratoire. C'est à dire suivant la formule suivante :

$$F = \frac{\textit{Activité des animaux(dpm)} - \textit{activité bruit de fond (dpm)}}{\textit{(Activités des algues - activité bruit de fond) (dpm ml}^{-1}\textit{)}} * \frac{1}{t(h)} * \frac{1}{N}$$

où N est le nombre d'aniamux et t le temps d'incubation dans la chambre de Haney (Filtration finale comprise).

5. Résultats et discussion

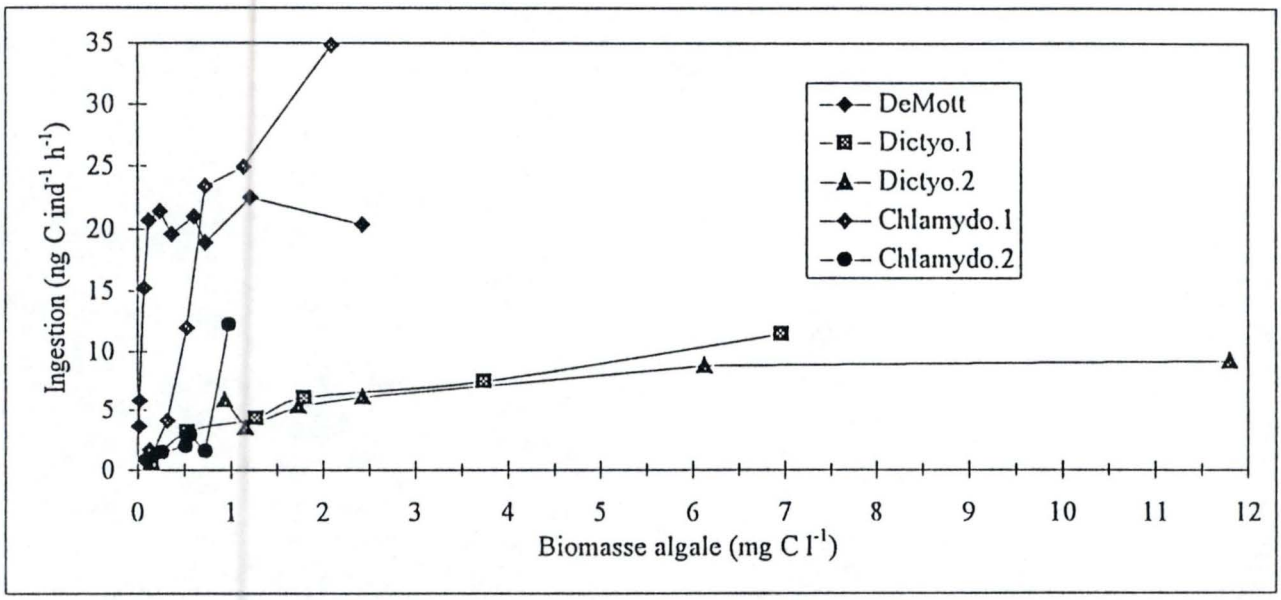


Fig. 11: Evolution de l'activité d'ingestion de Bosmina *sp., en fonction de la biomasse de* Dictyosphaerium *et de* Chlamydomonas *(Chlorophycées)*

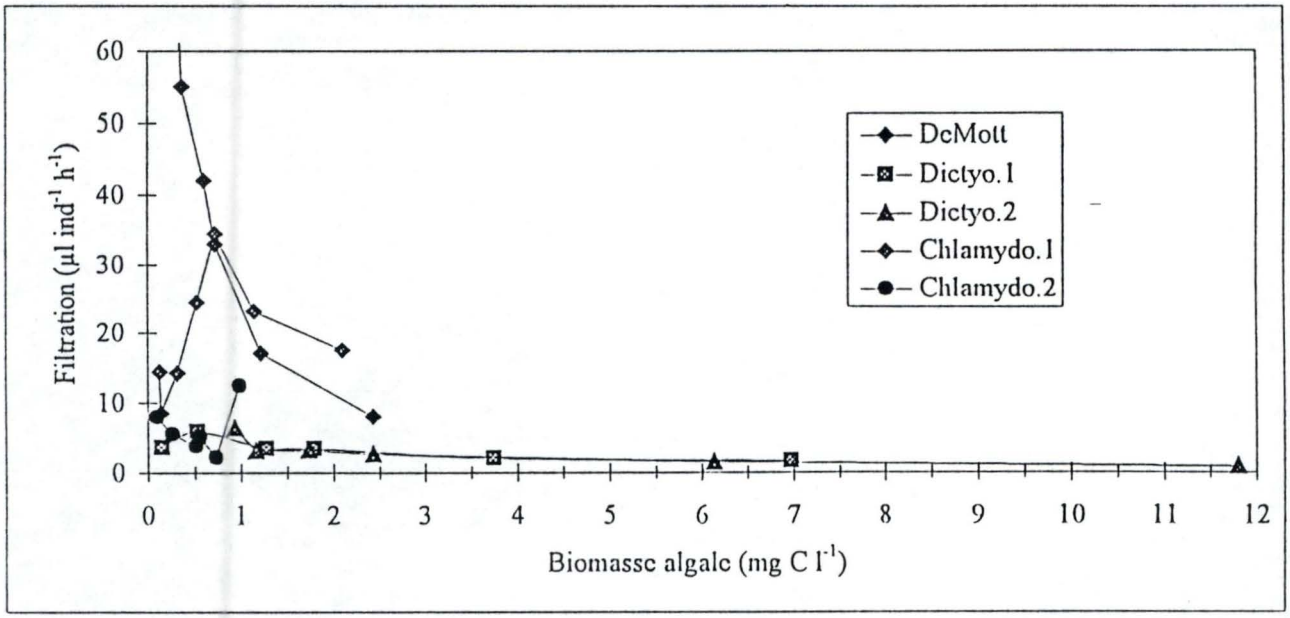


Fig. 12: Evolution de l'activité de filtration de Bosmina *sp., en fonction de la biomasse de* Dictyosphaerium *et de* Chlamydomonas *(Chlorophycées).*

1. Etude de la dynamique d'ingestion de *Bosmina* sp. à l'aide de nourriture algale marquée

1.1. Etude "*in vitro*"

Dans cette section, nous présentons une synthèse des résultats de mesure des activités de filtration et d'ingestion réalisées *in vitro* chez *Bosmina* sp., suivie de commentaires sur ces résultats.

Dans un premier temps, nous présentons les valeurs obtenues avec l'espèce algale *Dictyosphaerium ehrenbergianum* et dans un second temps, celles obtenues avec *Chlamydomonas reinhardii*.

Les activités de filtration et d'ingestion sont illustrées graphiquement par les figures 11 et 12. Dans ces figures nous avons également intégré les résultats obtenus pour la même espèce de cladocère par **DeMott** (1982).

A l'analyse de la figure 11, nous avons constaté que pour une gamme de biomasse en algues (*Dictyosphaerium*) comprises entre 0,15 et 11,8 mg C l^{-1}, l'activité d'ingestion augmente progressivement en fonction de la concentration en algues. Elle varie entre 0,53 et 11,39 ng C ind^{-1} h^{-1}. Quant à l'activité de filtration, elle présente une relation inverse; elle est maximale (6 µl ind^{-1} h^{-1}) pour de faibles biomasse en algues (0.15 mg C l^{-1}), puis diminue progressivement jusqu'à des valeurs faibles (0.78 µl ind^{-1} h^{-1}) aux densités plus élevées en algues.

Si les activités de filtration mesurées pour *Bosmina* sp. durant cette première expérience sont comparées à celles mentionnées dans la littérature (Tableau 5), il semble bien que nos valeurs soient de l'ordre des activités minimales mesurées pour la même espèce de cladocère.

Il nous a semblé intéressant, suite à ces observations, de réaliser des mesures d'activité de filtration de *Bosmina* sp. en présence d'une autre espèce d'algues vertes (*Chlamydomonas*) dans une gamme de concentrations comprises entre 0.5 et 2 mg C l^{-1}, c'est-à-dire dans des conditions se rapprochant de celles de **DeMott** (1986).

Les valeurs des activités d'ingestion et de filtration obtenues pour *Bosmina sp.*, nourrie cette fois-ci avec *Chlamydomonas,* sont les suivantes :

L'activité d'ingestion varient entre 1.6 et 34.8 ng C ind^{-1} h^{-1} pour des concentrations en algues comprises entre 0.13 et 2 mg C l^{-1}. Elle est maximale aux faibles biomasses, puis augmente progressivement en fonction de la concentration en nourriture. L'activité de filtration donne des valeurs qui sont comprises entre 17.5 et 8.5 µl ind^{-1} h^{-1} pour la même

Espèce zooplanctonique	Type de nourriture	Méthode	Source	Filtration (µl ind^{-1} h^{-1})
B. longirostris	*Chlamydomonas sp. (traceur)*	Haney 6 min-lac	**Lair** (1991a)	221
B. longirostris	*C. vulgaris bactéries*	Haney 6-8 min Lac	**Hart & Jarvis** (1983)	100
"	*C.reinhardti Aerobacter*	*in vitro* 5 à 10 min	**DeMott** (1982)	350 8
Bosmina sp.	*S. acutus*	*in vitro*	**DeMott** (1990)	60
Bosmina sp	*C. vulgaris Cosmarium impressulum (C.imp)*	Haney min	**Bleiwass & Stokes**, (1990)	372 240
B. longirostris *B. coregoni*	*Levures (6 µm)*	Haney 5-10 min.-Lac	**Knoechel & Holtby** (1986)	175 12.5-37.5
B. coregoni	*Scenedesmus accutus* *bactéries natives* *Billes de latex*	*In situ*. 7 min. Lac	**Jarvis, Hart & Combrink** (1987)	40 60 3 à 90
Bosmina sp.	*C. vulgaris* *C. impressulum*	Haney- 5 min. lac	**Bleiwass & Stokes** (1990)	37 240
Bosmina sp.	*S. acutus* *C. sphaeroides*	*in vitro*	**DeMott** (1990)	60 180
Bosmina sp.	*Chlamydomonas sp.*	*in situ*- lac-6 min.	**Lair** (1991b)	F min : 15 Fmax : 107 Fmoy : 264

Tableau 5 : Quelques valeurs de mesure de l'activité de filtration de Bosmina sp.

gamme de concentrations en algues. Cette activité est maximale aux biomasses les plus faibles en algues puis diminue graduellement aux biomasses élevées.

Après avoir comparé nos résultats avec ceux obtenus par **DeMott** (1986) pour *Bosmina in vitro*, nous avons pu constater que nos valeurs sont plutôt dans la gamme inférieure de celles obtenues par cet auteur.

Afin d'expliquer les faibles valeurs obtenues au cours de nos expériences, deux hypothèses peuvent être évoquées :

- si une biomasse algale de 2 mg C l^{-1} correspond à l'ILL (Incipient Limiting Level) pour *Bosmina* sp., il est probable que l'ensemble des mesures effectuées *in vitro* soient proches de la saturation, ce qui expliquerait que les activités de filtration mesurées soient peu élevées;

- plusieurs auteurs ont mis en évidence la sélectivité de broutage chez les bosmines. Cette sélectivité, comme le souligne **Jarvis** (1986), peut être fonction de la taille des cellules phytoplanctoniques ou encore fonction de leur "goût" (**DeMott**, 1986). Il est donc possible que la qualité de la nourriture fournie aux bosmines soit sub-optimale.

1.2. Etude "*in situ*"

Les échantillons destinés à la mesure de l'activité de filtration de *Bosmina* sp ont été prélevés aux stations de Monsin (basse Meuse belge), la Plante (Haute Meuse belge) et en Moselle et en Sarre durant les années 1994; 1995 et 1996, uniquement aux dates où cette espèce était présente en quantité suffisante. Le tableau ci-dessous présente le détail des résultats de mesures sur des bosmines à partir d'une incubation réalisée en Moselle.

Moselle : Sierck-les-Bains - 02/08/94

Activités brutes :

Act. algues dpm (2 ml)	Act. zoo dpm
1811	117.88
1880	178.58
1880	143.10
1878	112.87

Bruit de fond (à soustraire) : 40 dpm

N°.d'incubation	temps min.	Chl*a* µg l^{-1}	C algal µgC ml^{-1}	Act. algues dpm ml^{-1}	Act. zoo dpm	nbre ind.	Act. zoo dpm $ind.^{-1}$	filtration µl $ind.^{-1}$ h^{-1}	ingestion ngC $ind.^{-1}$ h^{-1}
1	8.17	32.66	0.9798	886	77.88	70	1.11	9.23	9.04
2	8.25	32.66	0.9798	920	138.58	80	1.73	13.69	13.41
2	8.25	32.66	0.9798	920	103.10	80	1.29	10.19	9.98
3	7.83	32.66	0.9798	919	72.87	50	1.46	12.15	11.91
							moy. :	**11.31**	**11.09**
							Ecart-type	2.00	1.96
							C.V. (%)	17.66	17.66

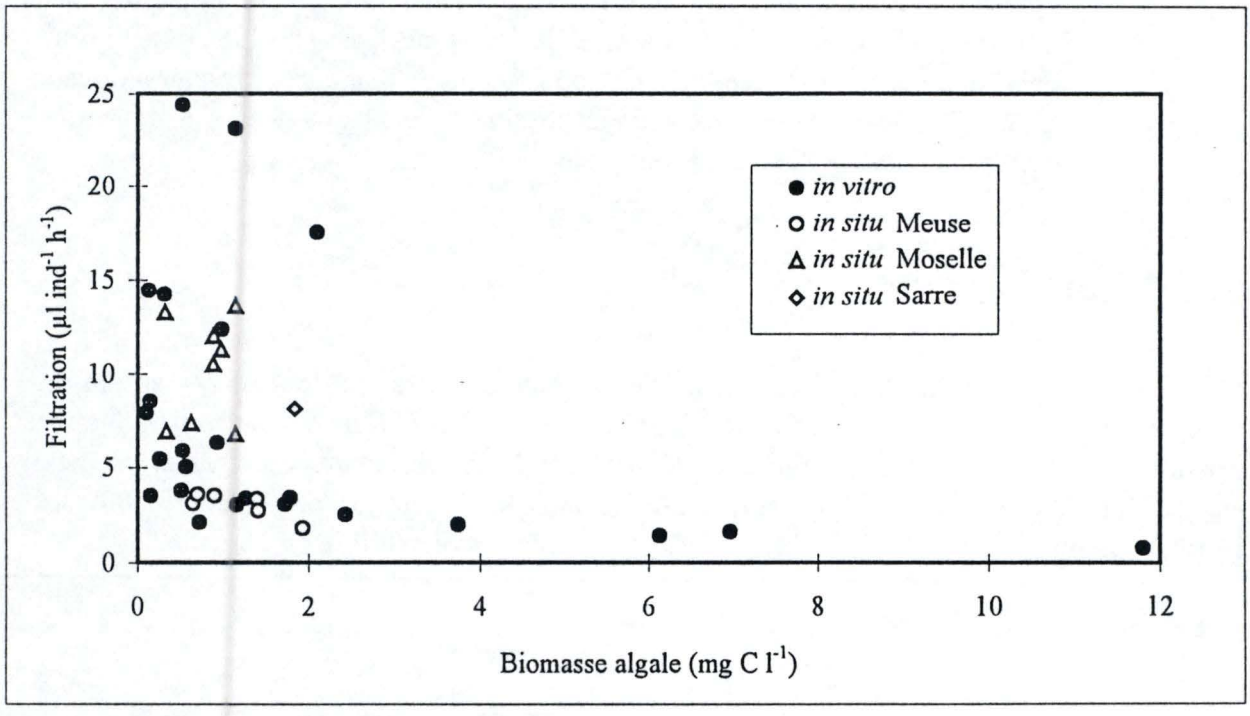


*Fig. 13: Résultats des mesures "*in situ*" et "*in vitro*" de l'activité de filtration de* Bosmina sp.

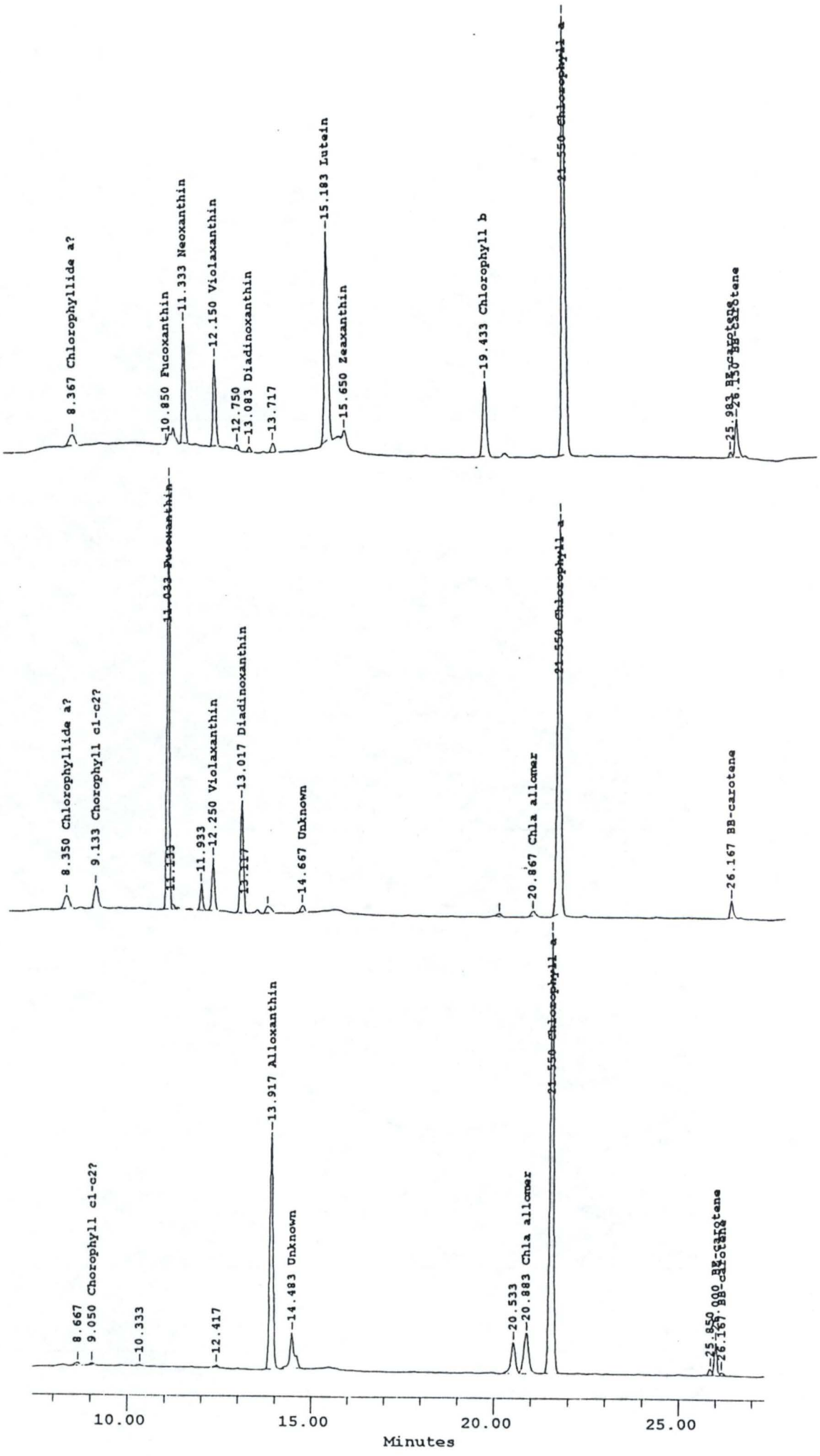
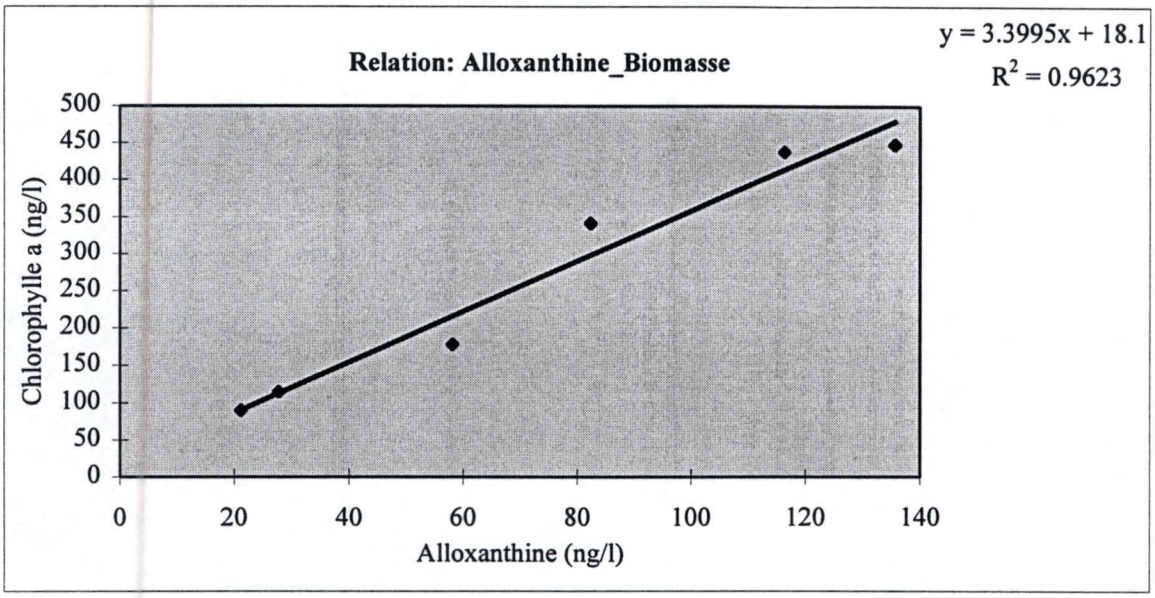
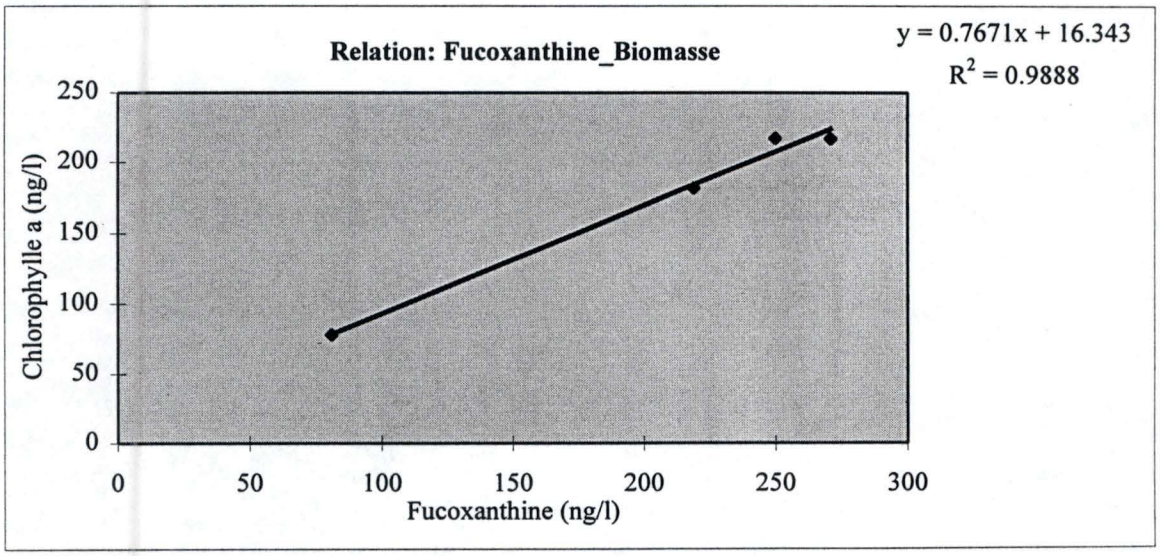


Fig. 9 : Profils chromatographiques obtenus en absorbance de D. ehrenbergianum (Chlorophycée), C. pseudostelligera (Diatomée) et C. ozolini (Cryptophycée).





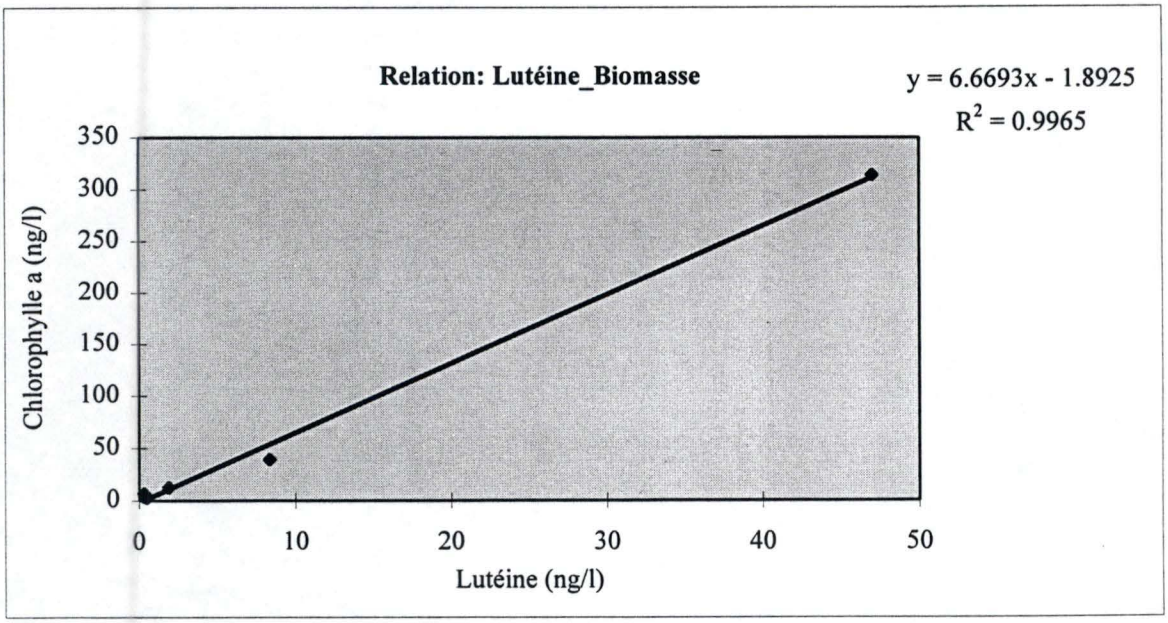


*Fig. 10: Relation entre les caroténoïdes marqueurs et la chlorophylle **a** dans les 3 cultures d'algues. De haut en bas: Cryptomonas (Cryptophycées), Cyclotella (Diatomée) et Dictyosphaerium (Algues vertes).*

L'ensemble des résultats de mesures in situ et in vitro de l'activité de filtration de *Bosmina* sp. sont présentés à la fig. 13. Les valeurs de filtration obtenues en Meuse varient entre 1,81 et 3,5 µl ind^{-1} h^{-1} pour gamme de biomasses comprises entre 0,65 et 1,88 mg C l^{-1}. Elles sont systématiquement inférieures à celles mesurées en Moselle et Sarre, qui sont situées entre 5 et 15 µl ind^{-1} h^{-1}, pour des gammes de biomasses algales similaires. Rappelons toutefois que la fraction consommable du phytoplancton naturel n'est pas connue avec précision, ce qui peut affecter la position des points sur le graphique. Par contre, dans le cas des expériences en laboratoire, toute la biomasse algale est consommable par les cladocères, et les marquages sont plus importants, puisque les animaux ingèrent uniquement de la nourriture radioactive, ce qui donne une meilleure précision de mesure.

Enfin, malgré la dispersion habituelle dans ce genre de mesures, on peut constater un bon accord général entre les mesures de laboratoire et de terrain. Le fait que les activités de filtration mesurées en rivières sont plus basses qu'en conditions expérimentales est peut-être le résultat d'un colmatage partiel de l'appareil filtreur des crustacés par les matières en suspension abondantes dans ces milieux.

Nous comparons plus loin ces données avec celles obtenues par les expériences de broutage réalisées en utilisant les pigments algaux comme biomarqueurs.

2. Relations pigments marqueurs et biomasses des groupes phytoplanctoniques

Dans une étude préliminaire d'étude des pigments algaux, au cours d'un suivi régulier de la croissance des différentes cultures d'algues, nous avons identifié et dosé les pigments de ces cultures pures, en particulier les xanthophylles (Fig.9), suivant la technique de séparation en HPLC décrite dans la deuxième partie de ce travail.

La figure 9, représente les chromatogrammes en absorbance de différents échantillons des quatres espèces d'algues. Les profils pigmentaires des deux espèces de chlorophycées (*Dictyosphaerium* et *Chlamydomonas*) sont semblables et montrent comme pigments caractéristiques la néoxanthine, la violaxanthine, la lutéine et la chlorophylle b. *Cyclotella pseudostelligera* (diatomée) présente les chlorophylles c_1-c_2, la fucoxanthine et la diadinoxanthine. Enfin, les cryptophycées (*Cryptomonas ozolini*) comportent l'alloxanthine comme caroténoïde majeur.

Puisque, dans nos expériences, les algues sont utilisées séparément, nous avons mesuré leur biomasse par la teneur en chlorophylle a, transformée ensuite en carbone à l'aide d'un facteur de conversion de 25 µg de C /µg de chlorophylle ***a***. De plus, nous avons voulu vérifier que les concentrations en caroténoïdes habituellement considérés comme marqueurs des trois types d'algues (lutéine, fucoxanthine, alloxanthine) permettaient également une estimation de biomasse. Pour ce faire, nous avons étudié les corrélations caroténoïdes-Chla: les relations obtenues sont montrées à la fig. 10, ci-contre.

A l'analyse de cette figure, nous avons mis en évidence une bonne corrélation entre l'alloxanthine et la biomasse des Cryptophycées, la lutéine et la biomasse des Chlorophycées ainsi que la fucoxanthine et la biomasse des diatomées

3. Étude de la stabilité et/ou de la dégradation des pigments

Dans cette section, nous présentons une synthèse des différentes expériences de grazing réalisées et un traitement global des résultats obtenus. Les résultats détaillés concernant la quantification des différents pigments durant chaque expérience sont présentés en tableaux en annexe 1. Nous avons repris pour chaque culture d'algues, les pigments caroténoïdes, les phéopigments et la chlorophylle ***a*** native et totale (ou chlorines ***a*** totales). Il est important de noter que les chlorophylles sont exprimées en picomoles (pmole), alors que les caroténoïdes sont exprimés en nanogrammes (ng).

Nous présentons dans l'ordre, les expériences réalisées avec *Brachionus calyciflorus* suivies de celle réalisée avec *Bosmina* sp. Enfin, nous proposons une méthode de calcul du taux d'ingestion chez les deux espèces zooplanctoniques considérées. Les profils chromatographiques des suspensions algales contrôle et test sont présentés en annexe 2.

3.1. Nutrition de *Brachionus calyciflorus* avec *Dictyosphaerium ehrenbergianum.*

Rappelons que la densité des rotifères utilisée est de 500 ind/200ml. Durant l'ensemble des expériences, la concentration en algues de chaque culture est ajustée de façon à atteindre le niveau de saturation.

La figure a2.1 (annexe 2) permet de visualiser les modifications qualitatives de la suspension algale induite par l'ingestion des algues et leur excrétion par les rotifères. Les profils en absorbance des suspensions algales (test et témoins) et des animaux sont qualitativement semblables. On remarque cependant l'apparition dans la suspension-test de produits dégradés de la chlorophylle ***a,*** surtout de la phéophytine ***a*** et de la pyrophéophytine **a**, bien mises en évidence en fluorescence. Par contre, il semble que très peu de phéophorbides soient formées. Il est à noter aussi que la phéophytine **a** n'est pas absente des suspensions algales contrôles, sans doute suite à la présence d'algues sénescentes.

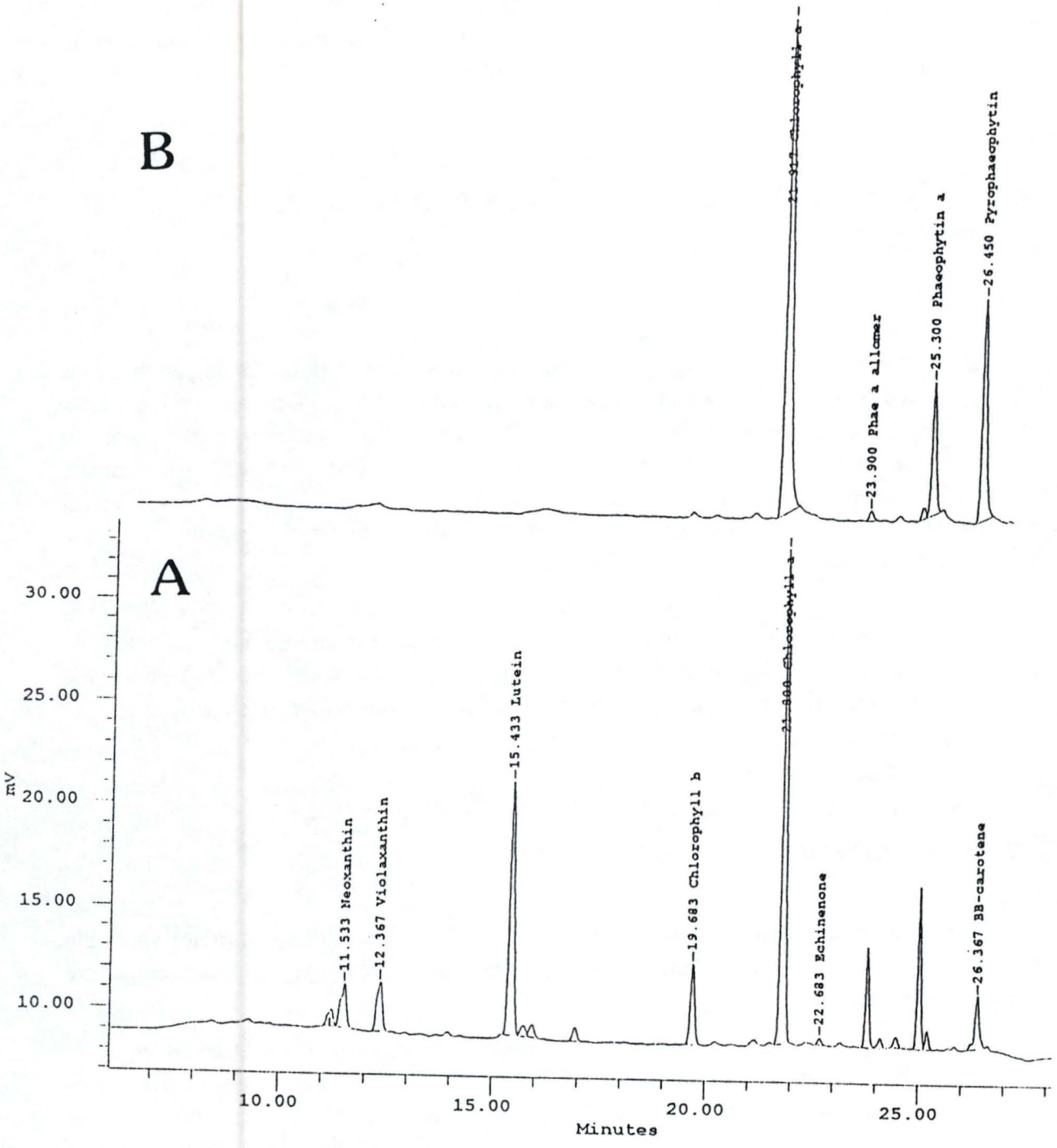


Fig. 14: Chromatogrammes obtenus en absorbance (A) et en fluorescence (B) de Brachionus calyciflorus nourri avec Cyclotella à saturation (après 12 h).

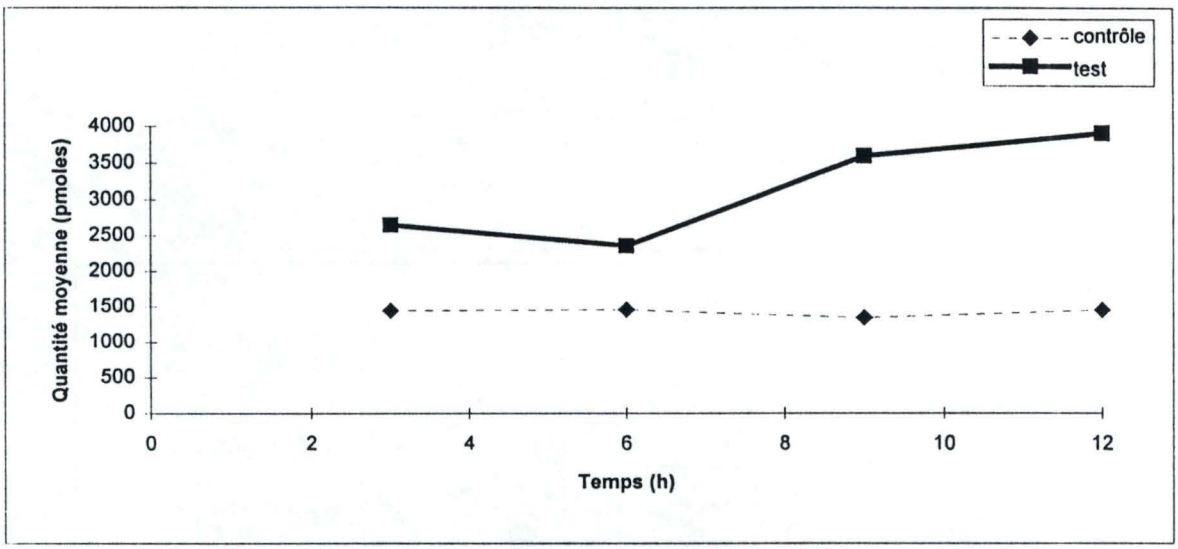


Fig. 16: Evolution des phéophytines en fonction du temps (expérience de broutage avec Brachionus calyciflorus nourri avec Dictyosphaerium à concentration saturante). Le test comprend aussi les phéophytines produites dans les animaux

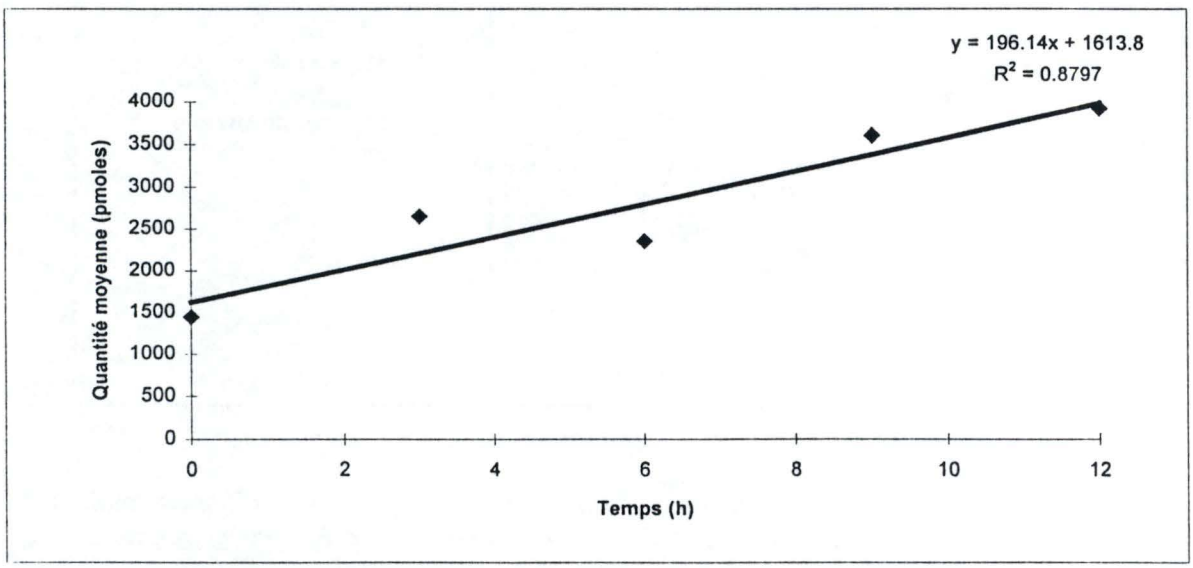


Fig. 17: Régression linéaire de la quantité de phéophytine en fonction du temps (expérience de broutage avec Brachionus nourri avec Dictyosphaerium à concentration saturante).

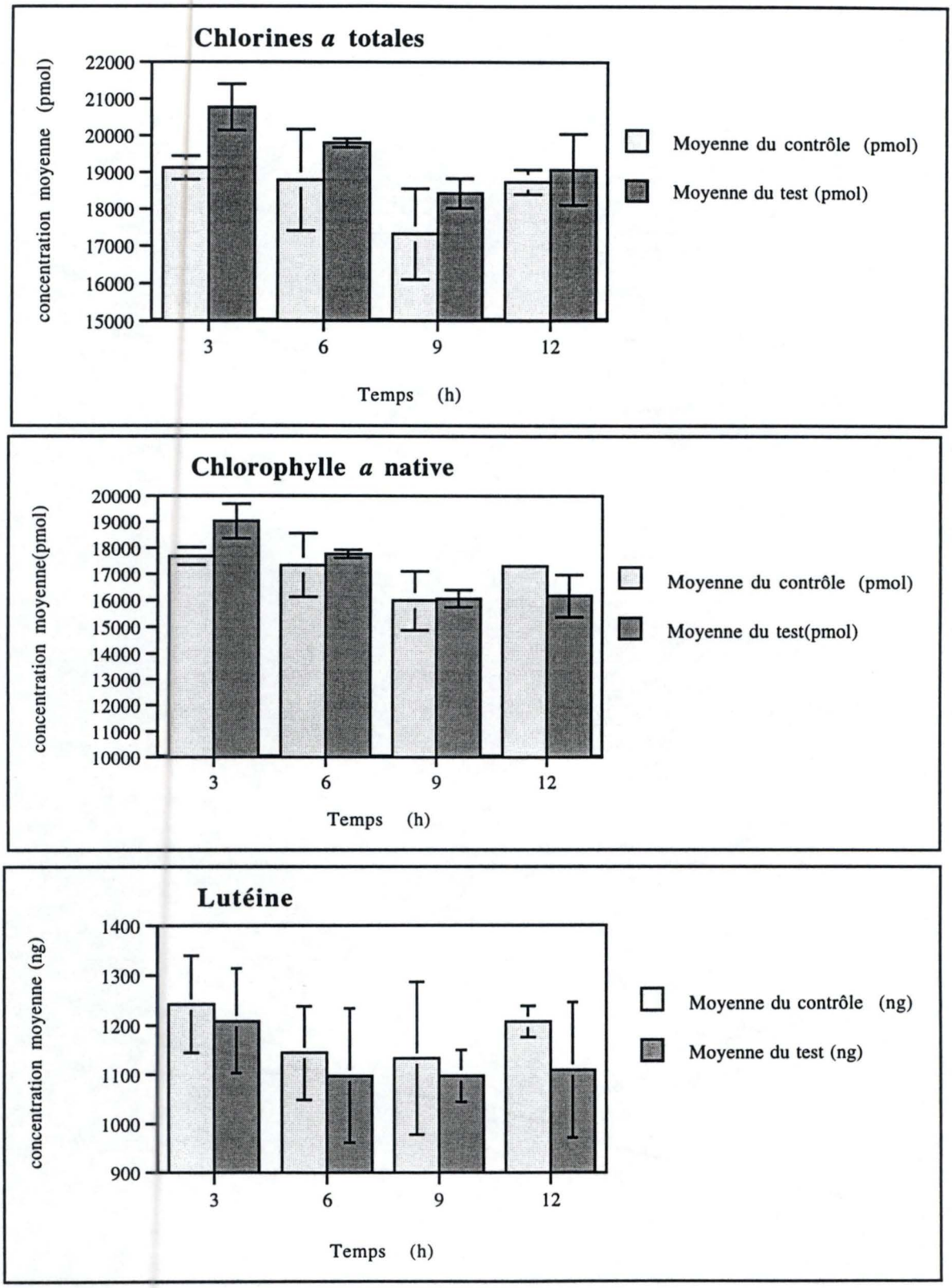


*Fig. 15 : Évolution des quantités de pigments (Lutéine, Chlorophylle **a** et Chlorines totales) dans les suspensions test et contrôle (expérience de broutage avec B. calyciflorus nourri avec Dictyosphaerium à concentration saturante).*
Les écarts types correspondent à trois prélèvements sur les suspensions algales en fin d'expérience.

Dans les animaux (Fig. 14 a, b), on retrouve tous les pigments de la suspension, avec une plus grande abondance relative de produits de dégradation des chlorophylles, alors que les chlorophylles a et b sont toujours présentes. De petits pics non identifiés apparaisent en tête de gradient et pourraient correspondre à des dérivés de caroténoïdes (ils ne sont pas détectés en fluorescence). Les phéophytines sont en proportions relatives plus importantes dans cette fraction animale.

L'évolution quantitative des pigments au cours du temps dans les suspensions contrôles et tests est montrée à la fig. 15.

En ce qui concerne l'évolution des pigments chlorophylliens au cours du temps, nous avons comparé la quantité des chlorines totales (somme de la chlorophylle ***a*** et des phéopigments) dans la suspension contrôle avec celle dans la suspension test additionnée de celle dans les contenus digestifs des animaux (suspension finale). En ce qui concerne les caroténoïdes, nous nous ne reprenons que la lutéine, principal marqueur de cette nourriture algale, en vue de déceler une éventuelle dégradation.

Pour des raisons non déterminées, la quantité de pigment dans la suspension finale est supérieure à celle des témoins, dans le cas des Chlorines ***a*** totales. Une possibilité d'explication est une erreur dans le dosage des témoins (sans doute des erreurs sur les volumes filtrés).

Nous avons constaté au cours du temps, une décroissance des quantités de chlorophylle ***a*** et de lutéine dans la suspension finale. Cependant, vu la variation des témoins, il est impossible de conclure à une évolution de la teneur en pigments suite à l'ingestion des algues par les rotifères.

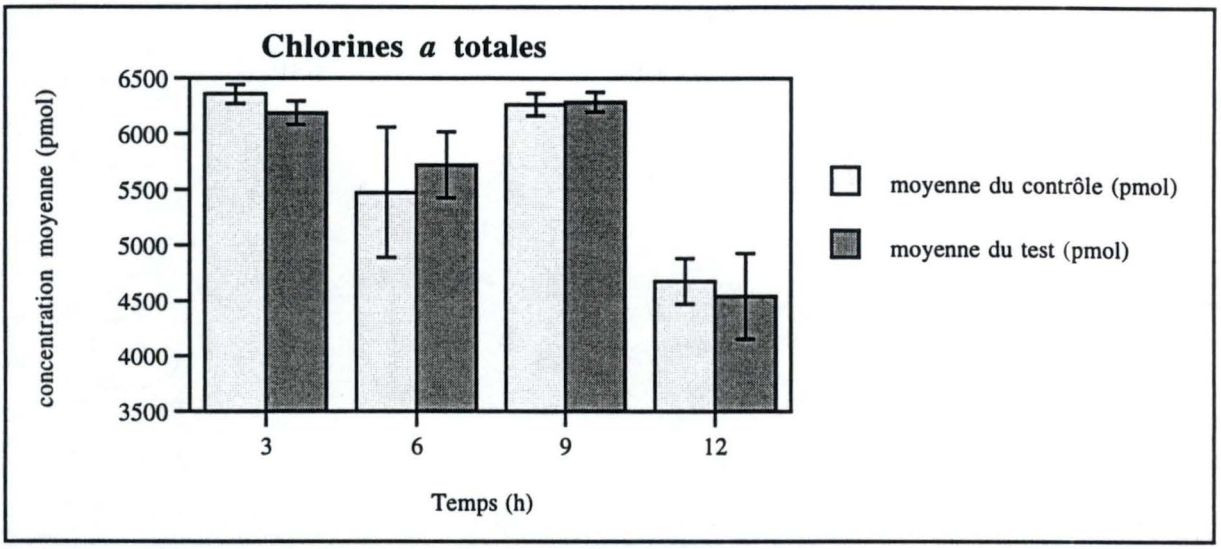
Nous avons également constaté une augmentation assez régulière des phéophytines (Fig. 16) au cours du temps. Comme ces dérivés de la chlorophylle ***a*** sont formés suite à l'ingestion par le zooplancton (la concentration en phéophytine **a** dans les témoins reste stable), on peut utiliser l'évolution de la quantité de phéophytines comme traceur de l'ingestion des algues par les rotifères. La régression de la quantité de phéophytines en fonction du temps (Fig. 17) donne une excellente valeur de coefficient de détermination (r^2= 0.88). En considérant que la formation des phéophytines résulte de la transformation de la chlorophylle ***a*** des algues ingérées, et qu'il n'y a pas de destruction des pigments chlorophylliens comme le suggère l'évolution des chlorines totales, on peut estimer la quantité d'algues ingérées de la façon suivante:

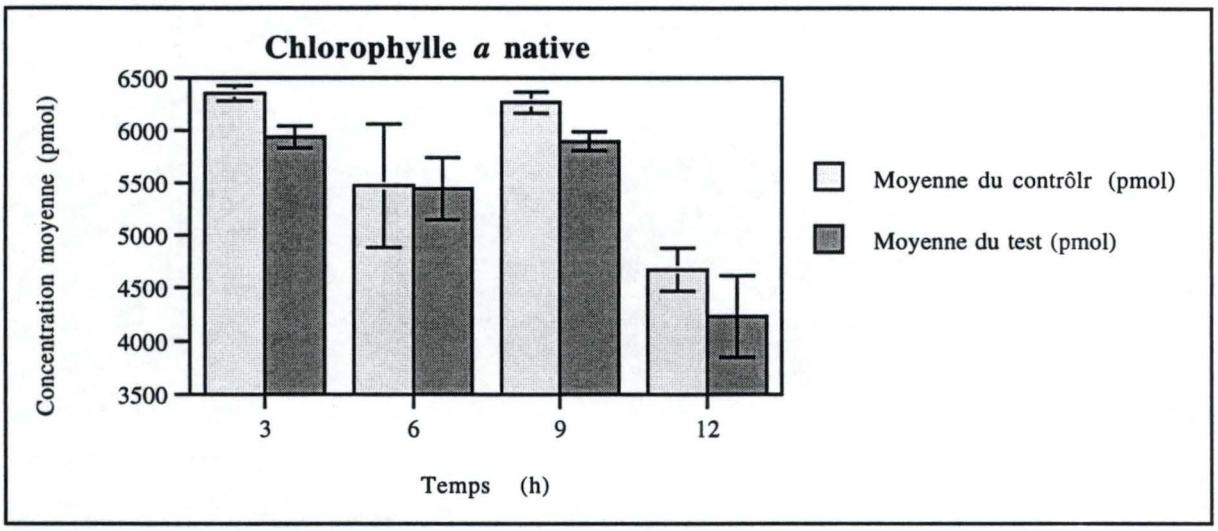
- x pmoles de phéophytines produites = x pmoles de chlorophylle ***a*** ingérées;

- la conversion de pmoles en ng Chl ***a*** est effectuée en multipliant le nombre de moles de Chl ***a*** par son poids moléculaire (893,5), puis on transfome en biomasse exprimée en carbone (Chl ***a*** x 25)

- calcul du taux d'ingestion individuel en divisant par le temps et par le nombre de rotifères.

La valeur obtenue est de 8,7 ng C par rotifère et par heure pour une concentration en nourriture algale saturante.





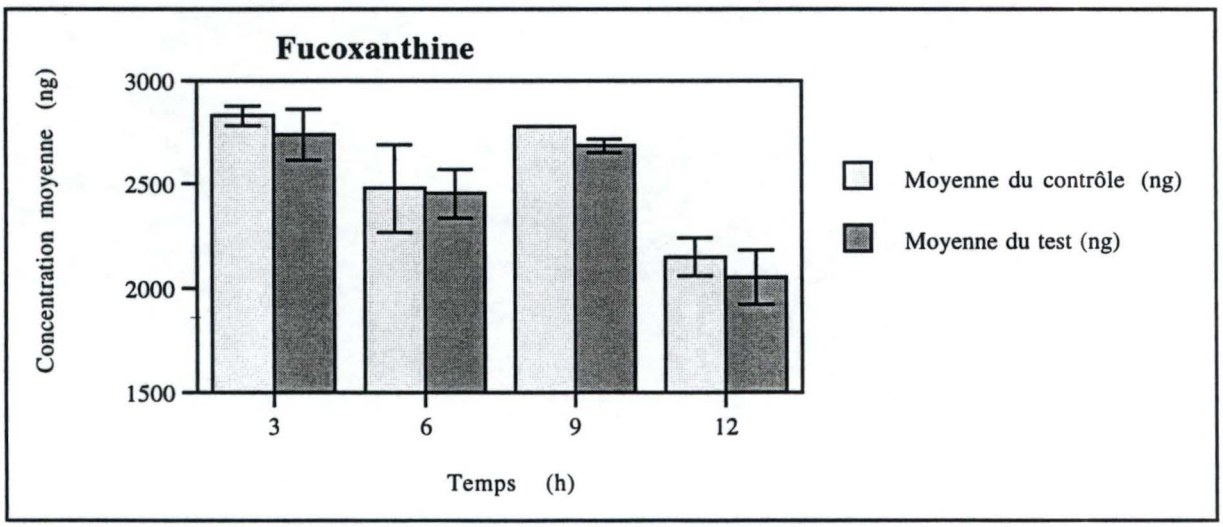


*Fig. 19 : Évolution des quantités de pigments (Fucoxanthine, Chlorophylle **a** et Chlorines totales) dans les suspensions tests et contrôles (expérience de broutage avec B. calyciflorus nourri avec Cyclotella à concentration saturante).*
Les écarts types correspondent à trois prélèvements sur les suspensions algales en fin d'expérience.

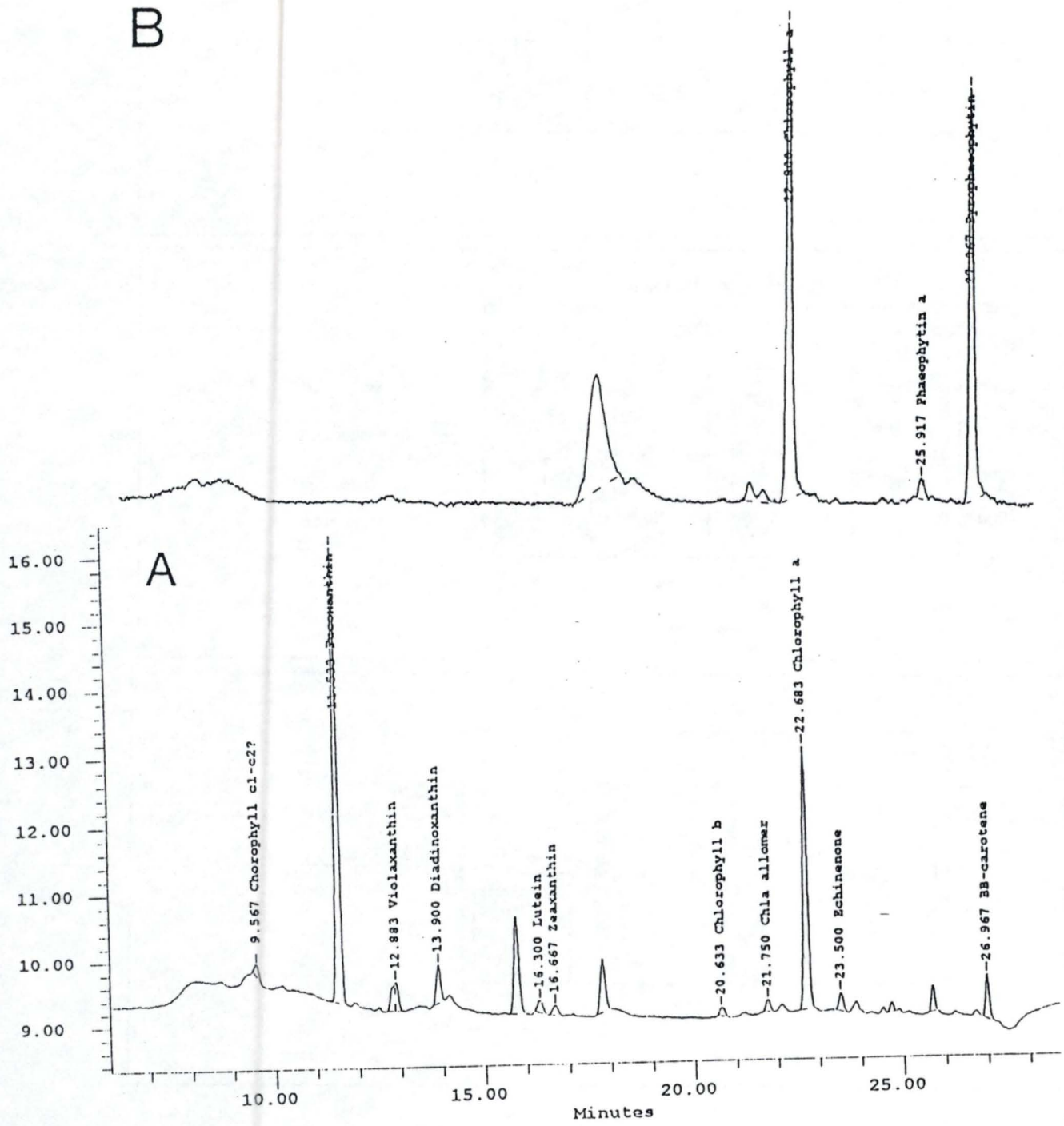


Fig. 18: Chromatogrammes obtenus en absorbance (A) et en fluorescence (B) de Brachionus calyciflorus nourri avec Cyclotella à saturation (après 12 h).

Nous avons comparé ces résultats avec ceux trouvés dans la littérature. Il semble que nos valeurs soient du même ordre de grandeur que celles obtenues en conditions expérimentales sur *Brachionus calyciflorus*, nourri avec *Dictyosphaerium* marquée au ^{14}C par **Gosselain** *et al.* (1996).

Nous avons voulu également calculer l'ingestion à partir de la quantité de pigments dans la fraction contenant les animaux, supposée ne contenir comme pigments ceux qui sont présents dans les tubes digestifs.

En se basant sur une valeur du taux d'excrétion k, chez *Brachionus* de 0.3 h^{-1}, on calcule l'ingestion en multipliant le contenu digestif en chlorines ***a*** totales par cette valeur de k. Cette estimation donne une valeur de 195 ng C ind^{-1} h^{-1}, qui est manifestement trop élevée au vu des valeurs de la littérature. On peut suspecter que le dosage des pigments dans les rotifères est affecté d'une forte contamination par des algues non ingérées, restant associées aux animaux.

3.2. Nutrition des *Brachionus calyciflorus* avec *Cyclotella pseudostelligera*

L'expérience de grazing de la diatomée *Cyclotella* a été réalisée dans les mêmes conditions qu'avec l'algue verte, mais à une biomasse de 3 mg C l^{-1}.

La comparaison des chromatogrammes des suspensions témoins et tests (fig. a 2.2 annexe 2) nous montre une bonne concordance des pics des différents pigments. De plus, les pigments caractéristiques de cette nourriture, la fucoxanthine, la diadinoxanthine et la diatoxanthine, sont retrouvés dans la fraction animale, avec des traces de lutéine qui proviennent de résidus d'algues vertes ingérées avant l'expérience. Il semble en effet que la mise à jeun des rotifères dans de l'eau filtrée pendant 2 à 3 h est insuffisante pour la vidange complète des contenus digestifs; un dosage réalisé sur des animaux préalablement nourris avec des algues vertes, a montré des quantités mesurables de lutéine, de chlorophylle ***a*** et de phéophytines. Les produits dégradés de la chlorophylle ***a***, la phéophytine ***a*** et la pyrophéophytine ***a*** ne se retrouvent que dans cette dernière fraction (Fig. 18), étant totalement absentes des suspensions tests.

En ce qui concerne l'évolution des pigments au cours du temps (fig. 19), les grandes variations de quantités de pigments ne permettent pas de discuter ces résultats plus avant. Il y a manifestement eu des problèmes dans la préparation des suspensions algales, peut-être dûs à la formation d'agrégats ou de filaments, fréquents dans les cultures de diatomées. Enfin, l'absence de phéopigments dans la suspension ayant contenu des rotifères pendant 12 h indique que les animaux ne se sont pas nourris: ceci peut-être aussi lié à la formation d'agrégats dans les suspensions algales.

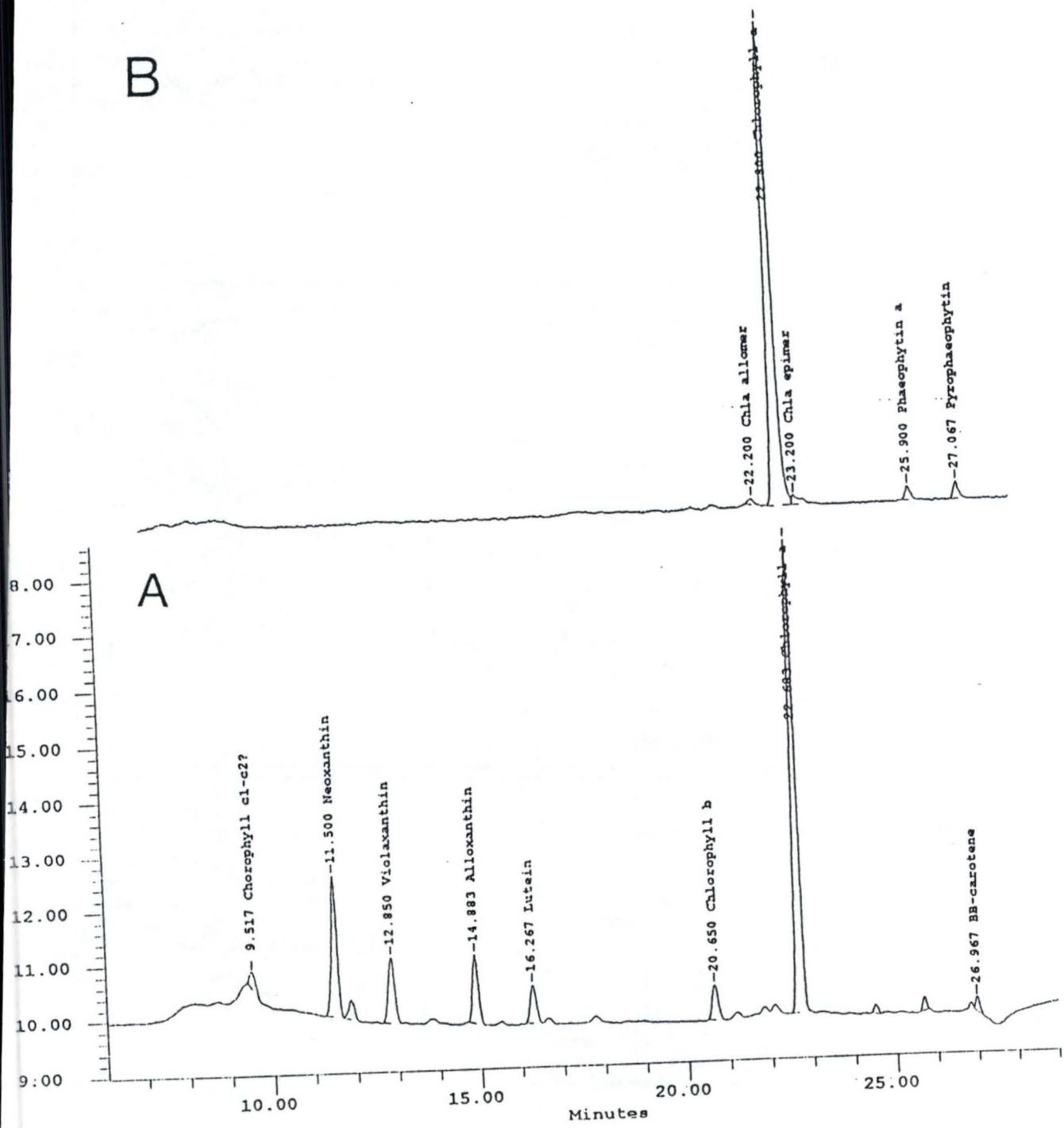


Fig. 20: Chromatogrammes obtenus en absorbance (A) et en fluorescence (B) de Brachionus calyciflorus nourri avec Cryptomonas à saturation (après 12 h).

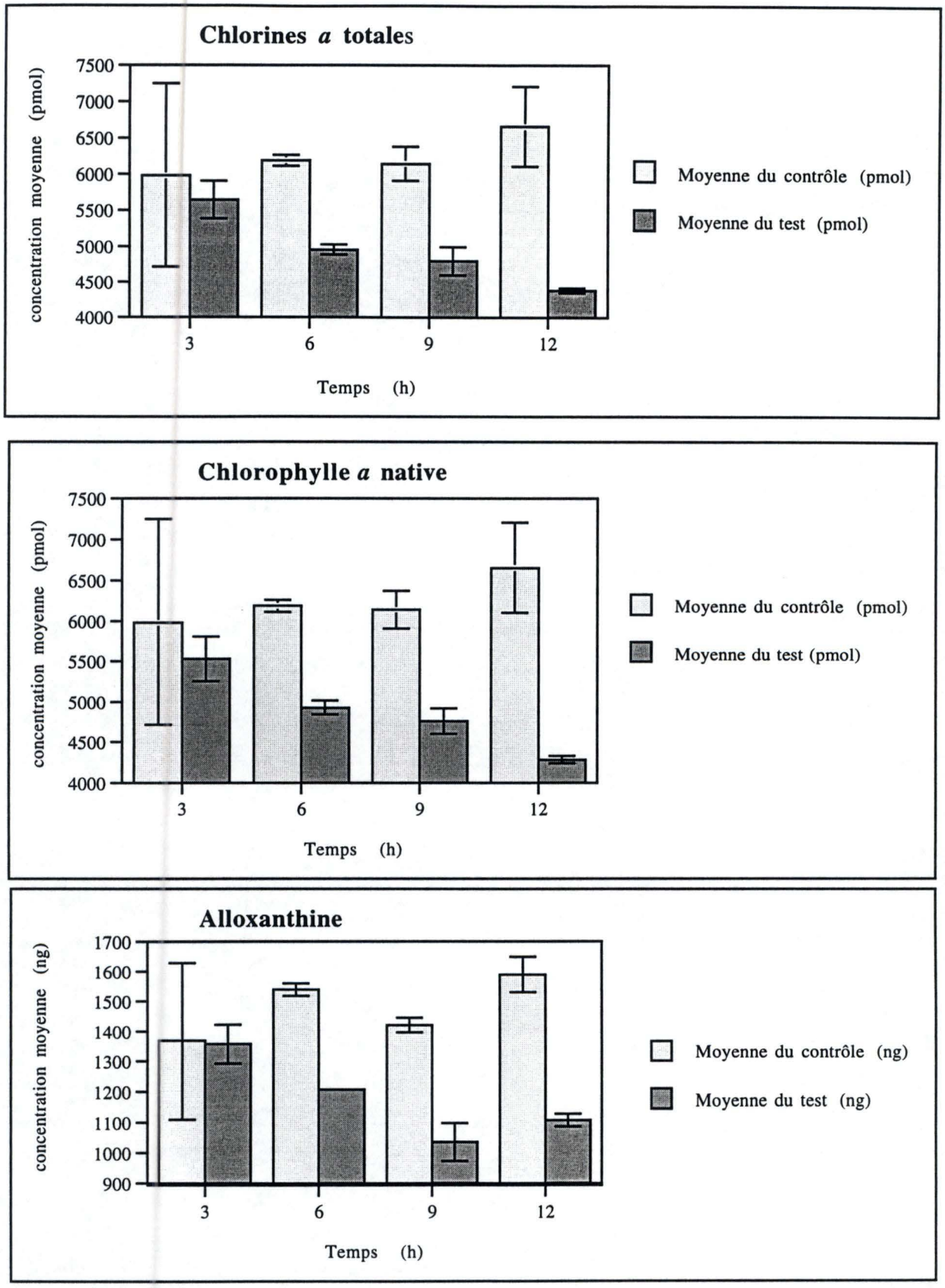


*Fig. 21 : Évolution des quantités de pigments (alloxanthine, Chlorophylle **a** et Chlorines totales) dans les suspensions test et contrôle (expérience de broutage avec B. calyciflorus nourri avec Cryptomonas à concentration saturante).*
Les écarts types correspondent à trois prélèvements sur les suspensions algales en fin d'expérience.

3.3. Nutrition de *Brachionus calyciflorus* avec *Cryptomonas ozolini*

L'expérience de nutrition des rotifères avec *Cryptomonas* a été réalisée à une biomasse de 3 mg C l^{-1} en principe saturante. De nouveau, la comparaison des suspensions test et témoins (fig. a 2.3 annexe 2) montre des profils pigmentaires identiques en absorbance, avec l'alloxanthine et la chlorophylle c_2, caractéristiques des Cryptophycées.

Nous avons également à l'issue de cette expérience observés des produits dégradés de la chlorophylle ***a*** produits suite à l'ingestion de la nourriture (Fig. 20). Ce sont aussi de la phéophytine ***a*** et de la pyrophéophytine ***a*** mais pas de phéophorbides. Cependant, ces phéopigments ne sont mis en évidence qu'au niveau des animaux mais sont absents dans la suspension "test". On peut donc mettre en doute l'ingestion des cryptophycées par les rotifères, bien que l'alloxanthine soit présente dans la fraction animale. Cependant cette fraction contenait aussi en proportion importante des pigments d'algues vertes provenant de "repas" antérieurs, selon toute vraisemblance.

En suivant le devenir des pigments au cours du temps (fig. 21), nous avons constaté une diminution nette des quantités de chlorines totales, de la chlorophylle ***a*** et de l'alloxanthine. Bien que les témoins soient encore variables, ces diminutions sont assez régulières et semblent bien significatives.

Une explication peut concilier ces observations: il est possible que les Cryptophycées, cellules assez grandes (environ 20 µm de diamètre), ne soient pas ingérées en entier par les rotifères mais déchirées dans leur mastax.

Si c'est le cas, le matériel subcellulaire transite dans le tube digestif et est excrété, mais les résidus sont trop petits pour être retenus par le filtre GF/C, dont la porosité est de 1,2 µm. De plus, les chloroplastes isolés sont probablement plus facilement détruits au cours de la digestion que des cellules entières.

3.4. Nutrition de *Bosmina* sp. avec *Chlamydomonas reinhardii*

Rappelons que la densité des Bosmines utilisées au cours de cette expérience est de 250 ind/200 ml, en présence de *Chlamydomonas* à une biomasse de 6 mg C l^{-1}.

De nouveau, l'analyse chromatographique des suspensions d'algues (test et témoin) et des animaux, montrent tous les pigments spécifiques des algues vertes (Fig. a 2.4 annexe 2). Cependant, de nombreux pics supplémentaires apparaissent dans la fraction animale (Fig. 22).

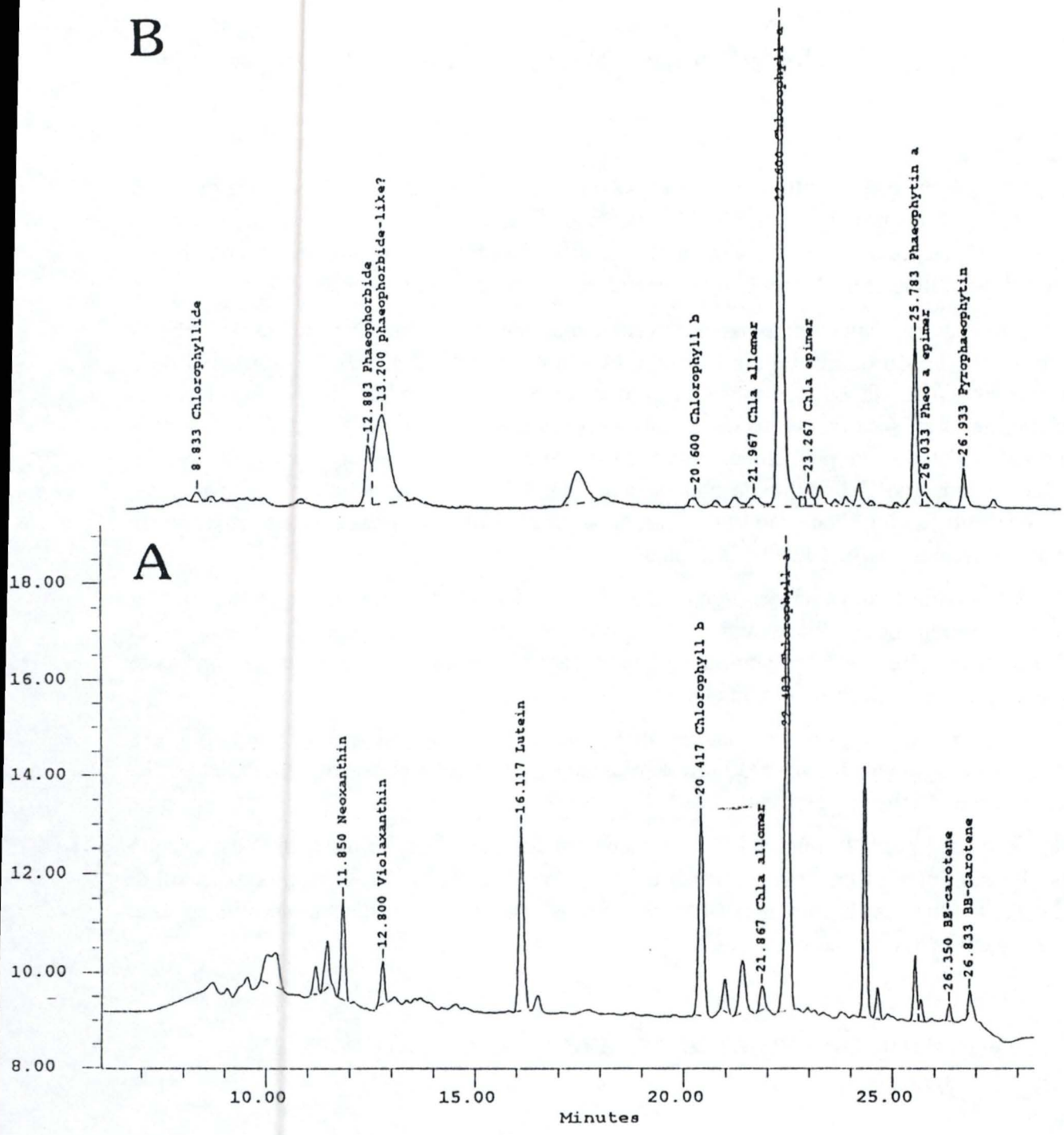
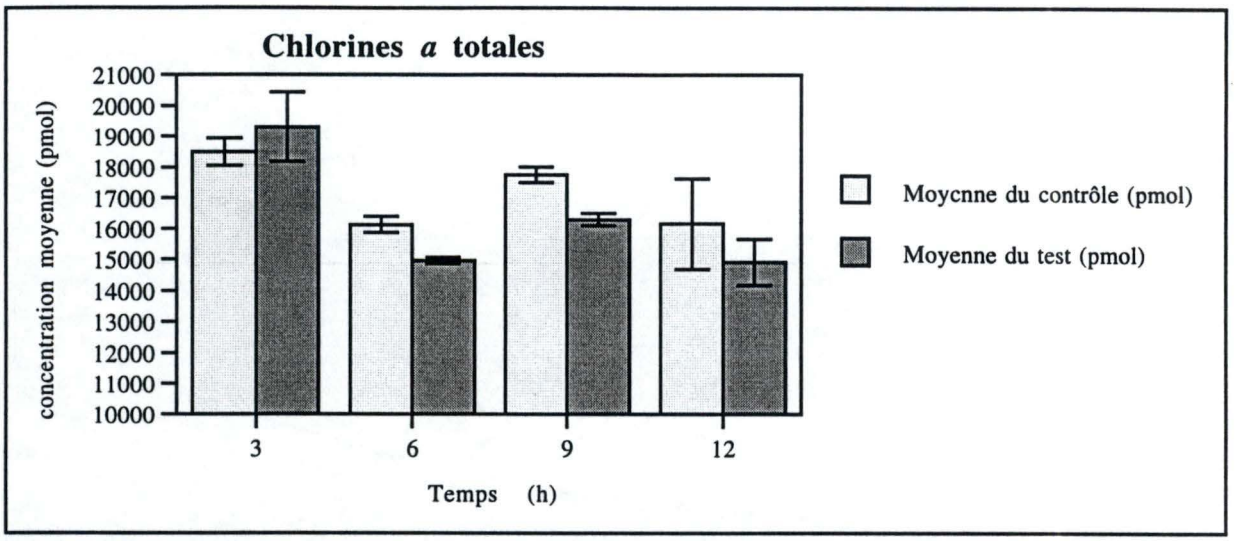
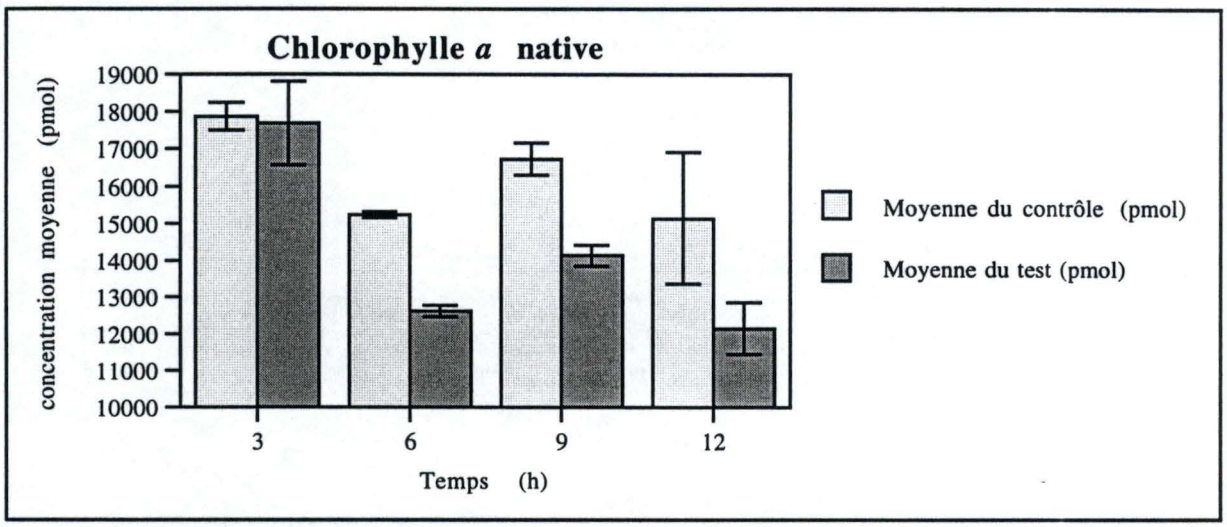


Fig. 22: Chromatogrammes obtenus en absorbance (A) et en fluorescence (B) de Bosmina sp. nourrie avec Chlamydomonas à saturation (après 8 h).





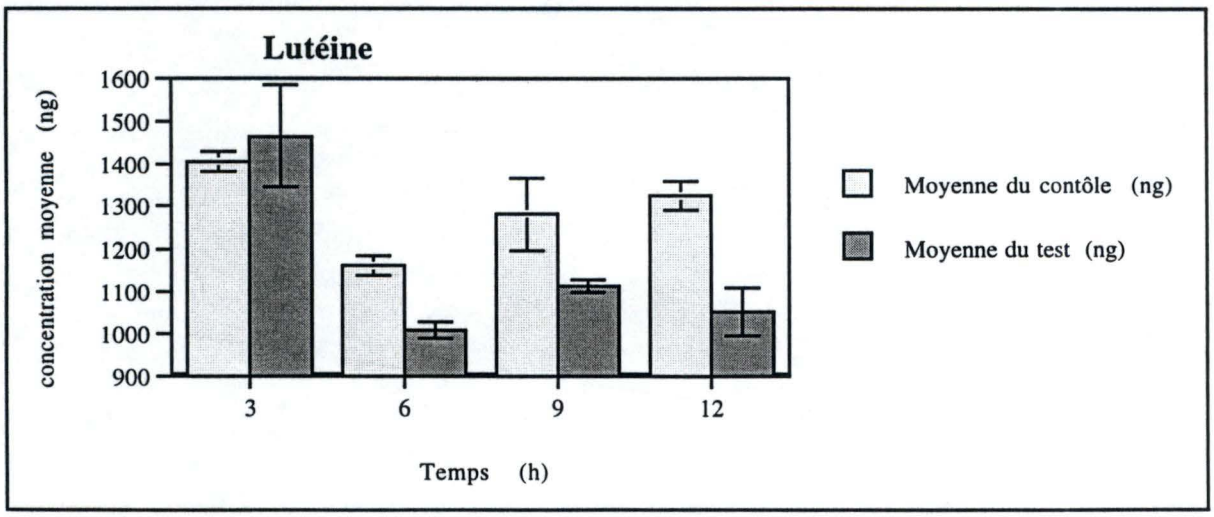


*Fig. 23 : Évolution des quantités de pigments (Lutéine, Chlorophylle **a** et Chlorines totales) dans les suspensions test et contrôle (expérience de broutage avec Bosmina sp. nourri avec Chlamydomonas à concentration saturante).*
Les écarts types correspondent à trois prélèvements sur les suspensions algales en fin d'expérience.

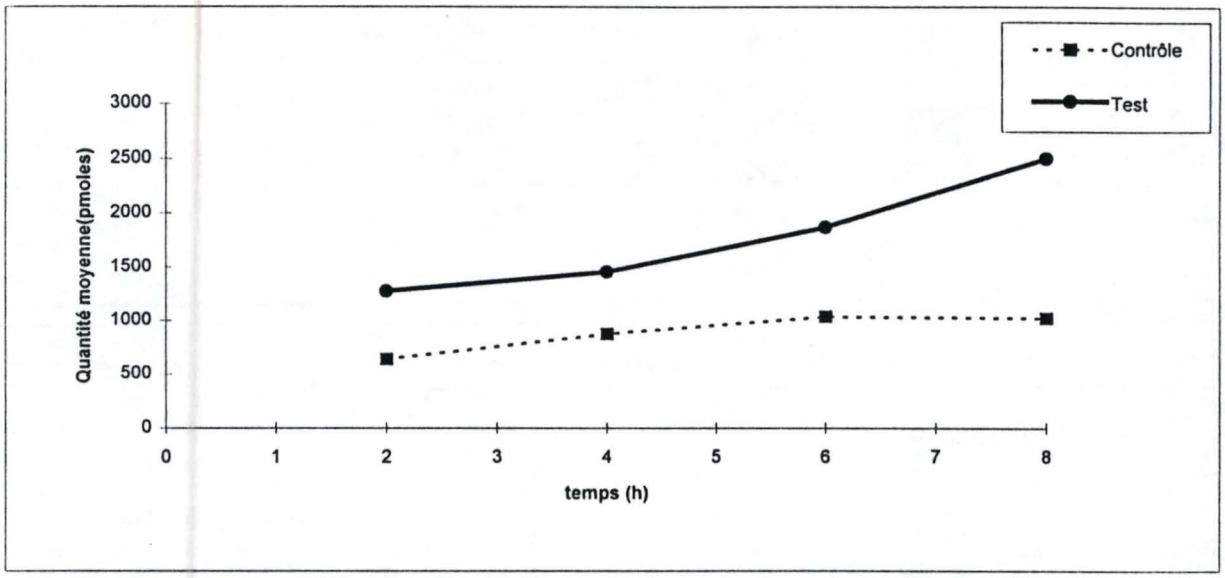


Fig. 24: Evolution des phéopigments totaux en fonction du temps (expérience de broutage avec Bosmina sp nourri avec Chlamydomonas à concentration saturante). Le test comprend aussi les phéopigments produits dans les animaux.

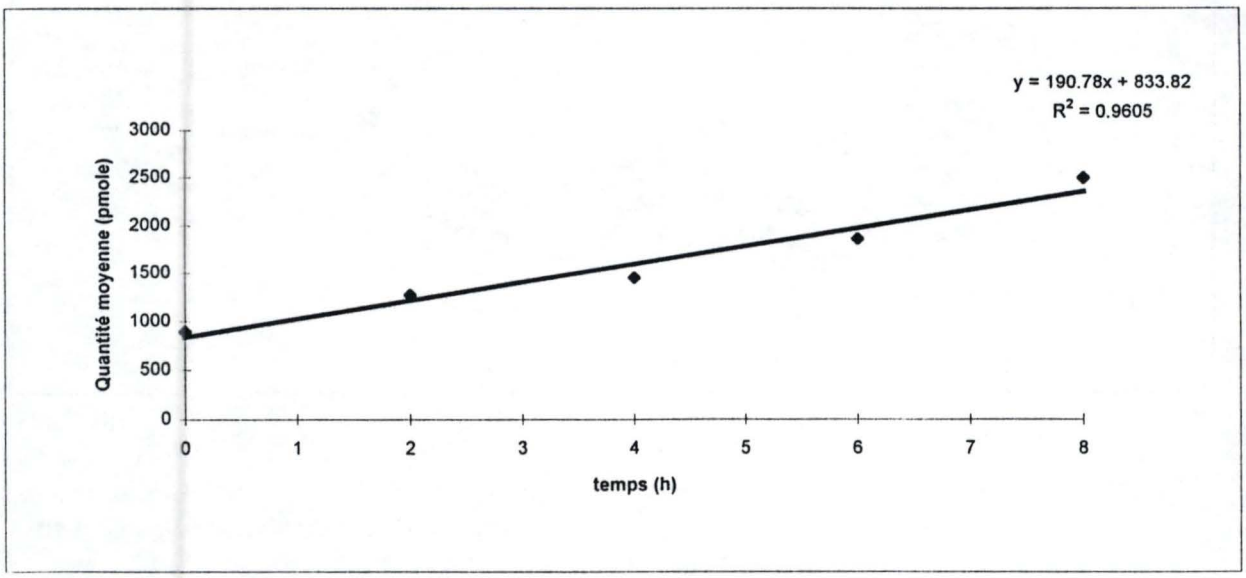


Fig. 25: Régression linéaire de la quantité de phéopigments en fonction du temps (expérience de broutage avec Bosmina sp. nourri avec Chlamydomonas à concentration saturante).

Il s'agit en particulier de phéophytine ***a*** et de pyrophéophytine ***a***, bien mises en évidence en fluorescence, et de phéophorbides qui se trouvent en quantité élevée par rapport aux phéophytines.

Ces phéopigments sont détectés à la fois dans les animaux et dans la suspension finale; de nombreux petits pics aussi dans les chromatogrammes en fluorescence sont sans doute des produits de dégradations des chlorophylles. Quant aux xanthophylles, principalement la lutéine, l'analyse du profil pigmentaire obtenu en absorbance dans les animaux montre peut-être la présence de produits de dégradation (deux pics de produits non fluorescents en tête de gradient, avant la néoxanthine).

Le suivi des pigments en fonction du temps présente encore malheureusement des variations trop grandes des quantités de pigments dans les témoins (Fig. 23), sauf peut-être au niveau des chlorines totales qui indiquent probablement une conservation des chlorophylles au cours du transit digestif chez *Bosmina*.
Sur base de cette hypothèse, on peut utiliser l'évolution de la quantité de phéopigments produite au cours du temps (Fig. 24) comme moyen direct pour l'évaluation de l'ingestion par ce cladocère.
La régression entre la quantité de phéopigments produits dans les supensions tests et le temps donne un coefficient de détermination de 0.96 (Fig. 25).
En effectuant le même raisonnement que pour le calcul de l'ingestion par *Brachionus*, le taux d'ingestion estimé d'après la formation de dérivés de la chlorophylle ***a*** est de 17 ng C par Bosmine et par heure. Cette valeur est dans la même gamme que celles trouvées au cours de nos expériences utilisant des algues marquées au ^{14}C.
Cependant, le taux d'évacuation intestinal n'étant pas connu avec précision, nous ne pouvons estimer l'activité de broutage à partir du contenu digestif.

Au cours de ce travail, notre but était d'explorer les possibilités d'utilisation des pigments algaux en tant que marqueurs du broutage par du zooplancton de petite taille. Notre choix s'est porté sur le rotifère *Brachionus calyciflorus* et le cladocère *Bosmina* sp., ces deux espèces étant importantes dans le zooplancton fluvial, qui fait l'objet de recherches au laboratoire depuis quelques années.

Afin de valider l'utilisation des pigments, il est important de suivre leur devenir au cours du transit intestinal. Or les données de la littérature concernant la conservation ou la dégradation des pigments caroténoïdes sont peu nombreuses et restreintes à quelques éléments du zooplancton, tels que des copépodes marins ou des grands cladocères du genre *Daphnia* (**Quiblier-Lloberas,** 1994 et **Head & Harris**, 1992,1996).

Au cours de nos expériences de broutage du phytoplancton par les genres précités, nous nous sommes heurté à certains problèmes, qui peuvent être résumés comme suit:

- les difficultés de l'élevage et de la manipulation de ces animaux, vu leur petite taille (quelques centaines de µm);

- les problèmes liés au choix de la nourriture, à l'acclimatation, et au comportement alimentaire des animaux;

- la faisabilité réduite de l'analyse des contenus digestifs d'animaux trop petits pour être prélevés individuellement; ceci a pu conduire à une contamination par la suspension algale, malgré toutes les précautions prises.

Suite à ce constat, il semble nécessaire d'améliorer la méthodologie dans son ensemble. Notamment, nous pourrions échapper au problème lié à la contamination du zooplancton par les algues, en passant par des rinçages appropriés (dont la nature reste à explorer).

Néanmoins, à l'issue de nos expériences de broutage, les résultats obtenus s'avèrent intéressants et peuvent être résumés ainsi :

- chez *Brachionus calyciflorus*, la chlorophylle ***a*** des algues ingérées semble être uniquement dégradée en phéophytine ***a*** et en pyrophéophytine ***a***. Ce dernier pigment, comme le souligne **Head** and **Harris** (1994) est un bon indicateur de grazing de matières d'origines phytoplanctoniques chez des copépodes marins; il semble que la dégradation de la chlorophylle ***a*** n'a pas abouti à la formation de produits "incolores".

- ceci autorise à utiliser la production de phéopigments au cours du temps dans le milieu comme moyen de mesure du grazing global, comme d'autres auteurs l'ont utilisé (**Shuman & Lorenzen,** 1975). La méthode pourrait être appliquée en incubant les rotifères avec un assemblage algal naturel, ce qui permettrait peut être de réaliser des mesures in situ ou en laboratoire dans des enceintes, à des périodes où les rotifères dominent le zooplancton. Des précautions sont néanmoins à prendre en fonction du type de matériel algal ingéré (en cas de rupture des cellules à l'ingestion par exemple). Dans le cas de nos expériences sur *Brachionus calyciflorus*, la mesure du taux d'ingestion suivant ce raisonnement donne environ les valeurs de 8,7 ng C par rotifère par heure.

Cettevaleur est en accord avec celles obtenues pour la même espèce nourrie avec des algues marquées au ^{14}C (**Gosselain** *et al.*, 1996).

Enfin, chez une espèce de cladocère du genre *Bosmina* isolée de la Meuse, les dérivés dégradés de la chlorophylle ***a*** sont des phéophorbides en plus des phéophytines. Sous l'hypothèse qu'il n'y a pas eu de destruction des pigments chlorophylliens suite à l'ingestion, la production de phéopigments totaux au cours du temps peut être utilisée comme moyen pour l'estimation de broutage par ce cladocère. De nouveau, la valeur d'activité de broutage obtenue à partir de la cinétique d'apparition de ces dérivés est comparable aux résultats obtenus avec la méthode au ^{14}C. Pour ce cladocère, nos mesures basées sur des incubations des animaux en présence d'algues marquées, in situ et en laboratoire, sont d'un apport intéressant au vu des données de la littérature, qui sont très réduites pour cette petite espèce.

Pour terminer, il nous paraît important de réinsister sur l'intérêt de l'utilisation de biomarqueurs comme les pigments algaux dans l'étude du broutage par le zooplancton "herbivore". Cependant, comme nous l'avons souligné plus haut, l'application de cette méthodologie au petit zooplancton pose de sérieux problèmes méthodologiques, en particulier par les risques de contamination de la fraction animale par des algues non ingérées. Néanmoins, on peut observer que, dans nos expériences, des caroténoïdes provenant d'algues ingérées ont été retrouvés de façon systématique dans la fraction animale, et qu'ils restent donc des outils intéressants d'étude de la sélectivité du broutage, une fois les problèmes de contamination résolus. La validation d'une étude du régime alimentaire basée sur les pigments algaux pourrait être réalisée par des expériences parallèles utilisant des algues marquées par différents radioisotopes (^{14}C, ^{32}P, ...)

6. Conclusions et perspectives

Références bibliographiques

Admiraal, W., Breebaart, L., Tubbing, G.M.J., Van Zanten, B., de Ruijter Van Setevenink, E.D. & Bijkerk, R. (1994) : Seasonal variation in composition and production of planktonic communities in the lower River Rhine. *Freshwater Biol.*, 32 : 519-531.

Adrian, R. (1991) : Filtering and feeding rates of cyclopoid copepods feeding on phytoplankton. *Hydrobiologia*, 210 : 217-223.

Amoros, C. (1984) : Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales Françaises : volume 5 : Crustacés Cladocères. *Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon.*, 53 (3) : 63 pp.

Arnold, D.E. (1971) : Ingestion, assimilation, survival and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green. *Limnol. Oceanogr.*, 16 : 906-920.

Bautista, B. & Harris, R.P. (1992) : Copepod 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 : 41-50.

Bern, L. (1994) : Particle selection over a broad size range by crustacean zooplankton. *Freshwater. Bio.*, 32 : 105-112.

Bianchi, T.S., Lambert, C. & Biggs, D.C. (1995) : Distribution of chlorophyll ***a*** and phaeopigments in the Northwestern Gulf of Mexico : A comparison between fluorometric and high-performance liquid chromatography measurements. *Bulletin of Marine Science*, 56 (1) : 25-32.

Bleiwas, A. H. & Stokes, P.M. (1985) : Collection of large and small particles by *Bosmina. Limnol. Oceanogr.*, 30 : 1090-1092.

Bleiwas, A H. & Stokes, P.M. (1990) : Filtering rates of *Diaptomus minutus*, *Bosmina spp.*, *Diaphanosom sp.*, *Holopedium gibberum*, and zooplancton community grazing rates in some acidic and circumneutral Ontario lakes. *Can. Fish. Aquat. Sci.*, 47 : 495-504.

Brooks, J.L. & Dodson S. I. (1965) : The effect of a marine planktivore on lake plankton theory of size, competition, and predation. *Science*, 150 : 28-35.

Brotas, V. & Plante-Cuny, M.-R. (1996) : Identification et quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes des sédiments marins: un protocole d'analyse par HPLC. *Oceanologia Acta*, 19 (6) : 623-634.

Burkill, P.H., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A. & Owens, N.J.P. (1987) : Microzooplankton grazing and selectivity of phytopklanton in coastal waters. *Mar. Biol.*, 93 : 581-590.

Burns, C.W. (1968) : Direct observations of mechanisms regulating feeding behaviour of *daphnia* in lakewater. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.*, 53 : 83-100.

Carpenter, S.R. & Bergquist, A.M. (1985) : Experimental tests of grazing indicators based on chlorophyll-a degradation products. *Arch. Hydrobiol.*, 3 : 303-317.

Champ, P. (1980) : Biomasse et production primaire du phytoplancton d'un fleuve : La Loire au niveau de la centrale nucleaire de Saint-Laurent-des-Eaux. *Acta. Ecol.*, 1 : 111-130.

Chen, B.H. & Chen, Y.Y. (1992) : Determination of carotenoids and chlorophylls in water convolvulus (*Ipomoea aquatica*) by liquid chromatography. *Food chemistry*, 45 : 129-134.

Chow-Frazer, P. & Knoechel, R. (1985) : Factors regulating *in situ* filtering rates of Cladocera. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42 : 567-576.

Connor T.E. & Jones, C.R. (1993) : Population dynamics of *Bosmina longirostris* in a tidal Freshwater Ecosystem. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 25 : 984-987.

DeMott, W. R. (1982) : Feeding selectivities and relative ingestion rates of *Daphnia* and *Bosmina*. *Limnol Oceanogr.*, 27 (3) : 518-527.

DeMott, W. R. (1986) : The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. *Oecologia*, 69 : 334-340.

DeMott, W. R. (1990) : Retention efficiency, perceptual bias, and active choice as mechanisms of food selection by suspension-feeding zooplankton.- In Ed R.N. Hughes (Ed) : Behavioural mechanisms of food selection, NATO ASI series, Vol. G 20, Berlin : 569-594.

De Ridder, M. (1960) : Les rotifères. *Les naturalistes Belges*, 41 : 349-369.

De Ruyter Van Steveninck, E.D., Admiraal, W., Breebaart, L., Tubbing, G.M.J. & Van Zanten, B. (1992) : Plankton in the River Rhine : structural and functional changes observed during downstream transport. *J. Plankton Res.*, (14) 10 : 1351-1368.

Descy, J.-P. (1987) : Phytoplankton composition and dynamics in the river Meuse. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 78 : 225-245.

Descy, J.-P. (1993) : Ecology of the phytoplankton of the River Moselle : effects of disturbances on community structure and diversity. *Hydrobiologia*, 249 : 111-116.

Descy, J.-P. & Métens, A. (1996) : Biomass-pigment relationships in potamoplankton. *J. Plankton Res.*, 18 (9) : 1557-1566.

Descy, J.-P., Servais, P., Smitz, J.S., Billen, G. & Everbecq, E. (1987) : Phytoplankton biomass and production in the river Meuse (Belgium). *Wat. Res.*, 21 : 1557-1566.

Downes, M.T., Hirstich, L. & Vincent, W.F. (1993) : Extraction of chlorophylls and carotenoids from Antartic benthic mats for analysis by HPLC. *J. Applied Phycology*, 5 : 623-628.

Edmonson, W.T. (1965) : Reproduction rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. *Ecological Monograpph.*, 3 : 5 61-111.

Elser, J.J., Goldman, C.R. (1991) : Zooplankton effects on phytoplankton in lakes of contrasting trophic status. *Limnol. Oceanogr.*, 36 (1) : 64-90.

Foote, C.S. & Denny, R.W. (1994) : Chemistry of singlet oxygen. Quenching by B-carotene. *Journal of American chemical society.*, 90 : 6223-6235.

Friedman, M. (1980) : Comparative morphology and functional significance of copepod receptors and oral structures. *Am. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp.*, 185 pp.

Fulton, R.S. (1988) : Grazing on filamentous algae by herbivorous zooplancton. *Freshwater Biol.*, 20 : 263-271.

Garnier, J., Billen, G. &, Coste, M. (1995) : Seasonal succession of diatom and chlorophyceae in the drainage network of the Seine river : observation and modeling. *Limnol. Oceanogr.*, 40 (4) : 750-765.

Gawler, M. & Angeli, N. (1987) : Intensité du broutage dans le lac Léman en relation avec la structure de tailles des particules: variations nychtémérales. *Naturaliste Can.* (*Rev. Ecol. Syst.*), 114 : 405-412.

Geller, W. & Müller, H. (1981) : The filtration apparatus of cladocera: filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia* (Berl), 49 : 316-321.

Ghiralov, A.M. (1985) : Dynamic and structure of cladoceran populations under conditions of food limitation. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 21: 323-332.

Gieskes, W.W.C. & Kraay, G.W. (1983) : Unknown chlorophyll ***a*** derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by H.P.L.C. analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 28 : 757-766.

Gilbert, J.J. & Bogdan, K.G. (1982) : Seasonal patterns of feeding by natural populations of *Keratella*, *Polyarthra* and *Bosmina* : Clearence rates, selectivities and contributions to community grazing. *Limnol. Oceanogr.*, 27 (5) : 918-934.

Gliwicz, Z.M. (1975) : Effect of zooplankton grazing on photosynthetic activity and composition of zooplankton. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 19 : 1490-1497.

Gliwicz, Z.M. & Siedlar, E. (1980) : Food size limitation and algae interfering with food collection in *Daphnia. Arch. Hydrobiol.*, 88 : 155-177.

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. Sn Diego, 167 pp.

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. *Hydrobiologia*, 289 : 179-191.

Gosselain, V., Viroux, L. & Descy, J.-P. (sous presse, a) : Can a small-bodied grazers community control phytoplankton in rivers? *Freshwater Biology*

Gosselain, V., Joaquim-Justo, C., Viroux, L., Mena, M., Métens, A., Descy, J.-P. & Thomé, J.-P. (1996) : Laboratory and *in situ* grazing rates of freshwater rotifers and their contribution to community grazing rates. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 113 : 353-361.

Gosselain, V., Descy, J.-P., Viroux, L., Joaquim-Justo,C., Hammer, A., Métens, A. & Schweitzer, S. (sous presse, b) : Grazing by large river zooplankton: a key to summer potamoplankton decline? Thecase of the Meuse and Moselle rivers in 1994 and 1995. *Hydrobiologia.*

Greenberg, A.E. (1964) : Plankton of the Sacramento river. *Ecology*, 45: 40-49.

Gulati, R.D., Vuik, C., Siewertsen, K. & Postema, G. (1991) : Clearance rates of *Bosmina* species in response to changes in trophy and food concentration. *Verh. Int. Ver. Limnol*, 24 : 754-750.

Haney, J.F. (1971) : An *in situ* method for measurement of zooplancton grazing rates. *Limnol. Oceanogr.*, 16 : 970-977.

Haney, J.F. (1973) : An *in situ* examination of the grazing activities of natural zooplanktoncommunitites. *Arch. Hydrobiol.*, 72 (1) : 87-132.

Haney, J.F. & Hall, D.J. (1975) : Diel vertical migration and filter feeding activities of *Daphnia. Arch. Hydrobiol.*, 75 : 413-441.

Hart, R.C. (1986) : Aspect on the feeding ecology of turbid water zooplankton. *In situ* studies of community filtration rates in silt-laden lake le Roux. Orange River. South Africa. *J. Plankton Res.*, 8 : 401-426.

Hart, R.C. (1992) : Experimental studies of food and suspended sediment effects on growth and reproduction of six planctonic cladocerans. *J. Plankton. Res.*, 14 (10) : 1425-1448.

Hartmann, J.H. & Kunkel, D.D. (1991) : Mechanism of food selection in *Daphnia. Hydrobiologia*, 225 : 129-154.

Head, E.J.H. & Harris, L.R. (1992) : Chlorophyll and carotenoid transformation and destruction by *Calanus* spp. grazing on diatom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86 : 229-238.

Head, E.J.H. & Harris, L.R. (1994) : Feeding selectivity by copepods grazing on natural mixtures of phytoplankton determined by HPLC analysis of pigments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 110 : 75-83.

Head, E.J.H. & Harris, L.R. (1996) : Chlorophyll destruction by *Calanus* spp. grazing on phytoplankton : Kinetics, effects of ingestion rate and feeding history and mechanistic interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 135 : 223-235.

Heinbokel, J.F., Coats, D.W., Henderson, K.W. &. Tyler M.A. (1988) : Reproduction rates and secondary production of three species of the rotifer genus *Synchaeta* in the estuarine Potomac River. *J. Plankton Res.*, 10 : 659-674.

Herzig, R. & Dubsinky, Z. (1992) : Photoacclimation, photosynthesis and growth in phytoplankton. *Israel Journal of Botany*, 41 : 199-211.

Hurley, J.P. (1991) : Identification of bacteriochlorophylls in lakes via reverse-phase HPLC. *Limnol. Oceanogr.*, 36 (2) : 307-315.

Hurley, J.P. & Armstrong, D.E (1991) : Pigment preservation in lake sediments. A comparison of sedimentary environments in Trout lake, Wisconsin. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 48 : 472-486.

Jakson, A.H. (1976) : Structure, properties and distributions of Chlorophylls.- In chemistry and biochemistry of plant pigments, *2nd Edition, Vol. 1, Ed.* T.W.

Jarvis, A.C. (1986) : Zooplankton community grazing in a hypertrophic lake (Hartbeespoort Dam, South Africa). *J. Plankton Res.*, 8 (6) : 1065-1078.

Jarvis, A.C., Hart, R.C. & Combrink, F. (1987) : Cladoceran filtration rate - body length relations: model improvements developed for a *Microcystis*-dominated hypertrophic reservoir. *J. Plankton Res.* : 115-131.

Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. (1975) : New spectrophotometric equations for determining chlorophylls ***a, b,*** c_1 and c_2 in higher plant, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 167 : 191-194.

Joaquim-Justo, C. (1992) : Influence du taux de "grazing" sur la dynamique de transfert des PCBs chez une espèce de rotifère zooplanctonique, *Brachionus calyciflorus* Pallas. Mémoire de licence, Université de Liège, 55 pp.

Kankaala, P. (1983) : Resting eggs, seasonal dynamics, and production of *Bosmina longirostris maritima.* in the northern Baltic proper. *J. Plankton. Res.*, 5 (1) : 53-69.

Kirk, J.T.O. (1983) : Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press, Cambridge, 369 pp.

Kleppel, G.S. & Pieper, R.E. (1984) : Phytoplankton pigment in the gut content of planktonic copepods from coastal waters of southern California. *Mar. Biol.*, 78 : 193-198.

Kleppel, G.S., Frazel, D., Pieper, R.E. & Holliday, D.V. (1988) : Natural diets of zooplankton of southern California. *Mar. Ecol Prog. Ser.*, 49 : 231-241.

Knoechel, R. & Holtby, L.B. (1986) : Cladoceran filtering rate: body length relationships of bacterial and large algal particles. *Limnol. Oceanogr.*, 31 : 195-200.

Köhler, J. (1993) : Growth, production and losses of phytoplankton in the Lowland River Spree. I. Population dynamics. *J. Plankton Res.*, 15 (3) : 335-349.

Köhler, J. (1995) : Growth, production and losses of phytoplankton in the Lowland River Spree : carbone balance. *Freshwater Biol.*, 34 : 501-512.

Lack, T.J. (1971) : Quantitative studies on the phytoplankton of the rivers Thames and Kennet at Reading. *Freshwater. Biol.*, 1: 213-224.

Lair, N. (1991a) : Comparative grazing activities of the rotifer and crustacean communities in an eutrophic lake. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 24 : 924-927.

Lair, N. (1991b) : Grazing and assimilation rates of natural populations of planktonic cladocerans in a eutrophic lake. *Hydrobiologia,* 215 : 51-61.

Lair, N. & Oulad Ali, H. (1990) : Grazing and assimilation rates of natural populations of planktonic rotifers *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata* and *Kellicotia longispina* in a eutrophic lake (Aydat, France). *Hydrobiologia*, 194 : 119-131.

Latassa, M., Bidigare, R.R., Ondrusek, M.E. & Kennicutt II, M.C. (1996) : HPLC analysis of algal pigments : a comparison exercise among laboratories and recommendations for improved analytical performance. *Marine Chemistry* , 51 : 315-324.

Lathrop, R.C. & Carpenter, S.R. (1992) : Zooplankton and their relationship to phytoplankton. - In Kitchell, J.F. (ed.): Food Web Management : A Case Study of Lake Mendota. Springer-Verlag, New York : 126-150.

Leavitt, P.R. (1993) : A review of factors that regulate carotenoid deposition and fossil pigment abundance. *J. of Paleolimnology*, 9 : 109-127.

Leavitt, P.R., & Carpenter, S.R. (1990) : Regulation of pigment sedimentation by photo-oxidation and herbivore grazing. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47 : 1166-1176.

Lorenzen, C.J. (1967) : Determination of Chlorophyll and Phaeopigments : Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12 : 343-346.

Mackas, D. & Bohrer, R. (1976) : Fluorescence analysis of zooplankton gut contents and investigation of diel feeding patterns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 25 : 77-85.

Mantoura, R.F.C. & Llewellyn A. (1983) : The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigment and their breakdown products in natural waters by reverse-phase H.P.L.C. *Analytica. Chimica. Acta.*, 151 : 279-314.

Marker, A.F.H. & Jinks, S. (1982) : The spectrophotometric analysis of chlorophyll a and phéopigments in acetone, ethanol and methanol.- In : "The measurement

of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods". *Arch. Hydrobiol., Beih. Ergebn. Limnol.*, 16 : 3-18.

Marneffe, Y. & Thomé, J.P. (1989) : Modalités et voies de transfert de micropolluants organochlorés (P.C.B) dans le plancton de l'écosystème mosan. Mémoire de Licence, Université de Liège, 60 pp.

Masson, C.F. & Abdul-Hussein, M.M. (1991) : Population dynamics and production of *Daphnia hyalina* and *Bosmina longirostris* in a shallow, eutrophic reservoir. *Freshwater Biol.*, 25 : 243-260.

Matveev, V. (1985) : Delayed density dependance and competitive ability in two cladocearns. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 21 : 453-459.

Mayzoud, P. & Razouls, S. (1992) : Degradation of gut pigment during feeding by a subantarctic copepod : Importance of feeding history and digestive acclimation. *Limnol. Oceanogr.*, 37 (2) : 393-404.

Métens, A. (1994) : Intérêt des pigments phytoplanctoniques dans l'étude des communautés algales et dans la compréhension de leur relations trophiques avec le zooplancton. Mémoire de Licence, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 68 pp.

Millie D. F., Paerl H. W., Hurley J. P. & Kirkpatrick G. J. (1993) : Microalgal pigments assessment using High-Performance Liquid Chromatography : A synopsis of organismal and ecological applications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50 : 2513-2527.

Mourelatos, S. (1988) : Broutage du phytolancton par le zooplancton dans un lac peu profond. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, 193 pp.

Mourelatos, S. & Lacroix, G. (1990) : *In situ* filtering rates of Cladocera : effect of body length, temperature and food concentration. *Limnol. Oceanogr.*, 35 (5) : 1101-1111.

Mourelatos, S., Pourriot, R., Rougier, R. (1990) : Taux de filtration du rotifère *Brachionus calyciflorus*: comparaison des méthodes de mesures; influence de l'âge. *Vie & Milieu,* 40 (1) : 39-43

Murtaugh, P.A. (1985) : The influence of food concentration and feeding rate on the gut residence time of *Daphnia*. *J. Plankton Res.*, 7 (3) : 415-420.

Nelson, J.R. (1986) : Phytoplankton carotenoids as organic tracers in marine particulate organic matter. Thèse doctorale, Université de Californie, San Diego, 309 pp.

Nelson, J.R. (1989) : Phytoplankton pigment in macrozooplankton feces : variability in carotenoid alterations. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 52 : 129-144.

Owens, T.G. & Flakowski, P.G. (1982) : Enzymatic degradation of chlorophyll ***a*** by marine phytoplankton *in vitro*. *Phytochemistry*, 21 : 979-984.

Pace, M.L., Findlay, S.E.G. & Lints, D. (1992) : Zooplankton in advective environments: The Hudson River community and a comparative analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49 (5) : 1060-1069.

Pasternack, A.F., (1994) : Gut fluorescence in herbivorous copepods: an attempt to justify the method. *Hydrobiologia*, 292/293 : 241-248.

Penry, D.L. & Frost, B.W. (1991) : Chlorophyll ***a*** degradation by *Calanus pacificus* : Dependance on ingestion rate and digestive acclimation to food resources. *Limnol. Oceanogr.*, 36(1) : 147-159.

Person, G. (1985) : Community grazing and the regulation of *in situ* clearence and feeding rates of planktonic crustaceans in lakes in the Kuokkel area, northern Sweden. *Arch. Hydrobiol.* 70 : 197-238.

Peters, R.H. (1984) : Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. - In Downing, J.A & Rigler, F.H. : A Manual on Methods for the Estimation of Secondary Production in Freshwaters. Blackwell Scientific Publications, Oxford : 336-412.

Polet, J. (1992) : Caractérisation de la composition pigmentaire du phytoplancton de la Meuse; possibilité d'utilisation des pigments comme biomarqueurs. Mémoire de Licence, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 79p.

Porter, K.G. (1972) : A method for the *in situ* study of zooplankton grazing effects on species composition and standing crop. *Limnol. Oceanogr.*, 17 (6) : 913-977.

Porter, K.G. (1975): Viable gut passage of gelatinous green algae ingested by *Daphnia. Verh. Int. Ver. Limnol.*, 19 : 28-40

Pourriot, R., Benest, D., Champ, P., Rougier, C. (1982) : Influence de quelques facteurs du milieu sur la composition et la dynamique saisonière du zooplancton de la Loire. *Acta. Oecol. Gener.* 3 (3) : 353-371.

Queimaliños, C.P. & Modenutti, B.E. (1993) : Experimental analysis of the rotifer-cladoceran effect on phytoplankton. *Verh. Int. Verein. Limnol.* 25 : 943-946.

Quiblier-Lloberas, C., (1994) : Relations trophiques phyto-zooplancton en milieu lacustre : Interêt des pigments comme marqueurs organiques. Thèse doctorale, Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 195 pp.

Quiblier-Lloberas, C., Bourdier, G., Amblard, C. & Pepin D. (1994) : Separation of phytoplanktonic pigments by HPLC for the study of phyto-zooplankton trophic relationships. *Aquatic Sciences*, 56 (1) : 29-39.

Quiblier-Lloberas, C., Bourdier, G., Amblard, C. & Pepin D. (1996) : A qualitative study of zooplankton grazing in an oligo-mesotrophic Lake using

phytoplanktonic pigments as organic markers. *Limnol. Oceanogr.*, 41 (8) : 1767-1779.

Repeta, D.J., & Gagosian, R.B. (1984) : Formation reactions and recycling of carotenoids and chlorins in the Peru upwelling region. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51 : 1001-1009.

Richards R. (1952) : The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. A spectrophtometric method for estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.*, 11 : 156-171.

Roman, M.R. & Rublee, P.A. (1980) : Containment effects in copepod grazing experiments. *Limnol. Oceanogr.*, 25 : 982-990.

Rothhaupt, K O. (1990) : Changes of the fonctional responses of the rotifers *Brachionus rubens* and *Brachionus calyciflorus* with particle size. *Limnol. Oceanogr.*, 35 (1): 16-23.

Rothhaupt, K O. (1995) : Algal nutrient limitations affects rotifer growth rate but not ingestion rate. *Limnol. Oceanogr.*, 40 (7) : 1201-1208.

Rowan, K.S. (1989) : Photosynthetic pigment of algae. Cambridge University Press, Cambridge, 315 pp.

Roy, S., Chanut, J.-P., Gosselin, M. & Sime-Ngando T. (1996) : Characterisation of phytoplankton communities in the lower St.Lawrence Estuary using HPLC detected pigments and cell microscopy. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 142 : 55-73.

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, 90 pp.

Sautour, B., Artigas, F., Herbland, A. & Laborde, P. (1996) : Zooplankton grazing impact in the plume of dilution of the Gironde estuary (France) prior to the spring bloom. *J. Plankton Res.*. 18 (6) : 835-853.

Shuman, R. & Lorenzen, C.J. (1975) : Quantitative degradation of chlorophyll by a marine herbivore. *Limnol. Oceanogr.*, 20 (4) : 581-586.

Sellner, K.G., Brownlee, D.C., Bundy, M.H., Brownlee, S.G., Braun, K.R. (1993) : Zooplankton grazing in a Potomac River Cyanobacteria bloom. *Estuaries*, 16 : 859-872.

Soma, Y., Imaizumi, T., Yagi, K.I. & Kasuga S.I. (1993) : Estimation of algal succession in lake water using HPLC analysis of pigments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50 : 1142-1146.

Strickland, J.D.H. & Parson, T.R. (1968) : A practical handbook for seawater analysis. *Ottawa. Fish. Res. Bd. Can. Bull.* 167 : 311 pp.

Svec, W.A. (1991) : The distribution and extraction of the chlorophylls. - In Sheer, H. (ed.) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton, 59-88.

Vanderploeg, H.A. (1990) : Feeding mechanism and particle selection in suspension-feeding zooplankton.- In Wotton, R.S. (ed.): The Biology of Particles in Aquatic Systems, CRC Press, Boca Raton, 183-212.

Viroux, L. (accepté) : Zooplankton development in two large lowland rivers, the Moselle (France) and the Meuse (Belgium), in 1993. *J. Plankton Res.*

Vollenweider, R.A. (1974) : A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook, Blackwell Scientific publications, Oxford, 12, 225 pp.

Webb, D.J., Burnison, B.K., Trimbee, A.M. & Prepas, E.E. (1992) : Comparison of chlorophyll *a* extraction with ethanol and dimethyl sulfoxyde/acetone, and a concern about spectrophotometric phaeopigment correction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 : 2331-2336.

Welschmeyer, N.A., & Lorenzen, C.J. (1985) : Chlorophyll budgets: zooplankton grazing and phytoplankton growth in a temperate fjord and the central pacific gyres. *Limnol. Oceanogr.*, 30 : 1-21.

Welschmeyer, N.A., Goeriske, R., Strom, S. & Peterson, W. (1991) : Phytoplankton growth and herbivory in the Subarctic Pacific : A chemotaxonomic analysis. *Limnol. Oceanogr*; 36 : 1631-1649.

Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjornland, T., Repeta, D. & Welschmeyer, N. (1991) : Improved HPLC method for analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 77: 183-196.

Yacobi, Y.Z., Mantoura, R.F.C., & Llewellyn, C.A. (1991) : The distribution of chlorophylls, carotenoids and their breakdown products in Lake Kinneret sediments. *Freshwater Biol.* 26 : 1-10.

Annexe 1

	V d'extrait (ml)	V injecté (ml)	V filtré (ml)	Lutéine(ng)	phéophytine *a* (pmol)	Chlorophylle *a* (pmol)	Chlorine *a* totale (pmol)
Rotifère 3h	**2**	**100**	**-**	**75**	**881**	**772**	**1653**
Test 1 3h	10	40	65	1235	1763	19085	
Test 2 3h	10	40	68	2595	1738	19628	
Test 3 3h	10	40	65	1093	1803	18313	
Moyenne				**1641**	**1768**	**19008**	**20776**
Ecart-type				***829***	***33***	***661***	
Control 1 3h	10	40	65	1355	1420	18073	
Control 2 3h	10	40	68	1180	1440	17530	
Control 3 3h	10	40	65	1193	1470	17450	
Moyenne				**1243**	**1443**	**17684**	**19128**
Ecart-type				***98***	***25***	***339***	
Roti 6h	**2**	**100**	**-**	**74**	**897**	**764**	**1661**
Test1 6h	10	40	68	1223	2023	17868	
Test 2 6h	10	40	65	953	2030	17828	
Test 3 6h	10	40	65	1118	2070	17595	
Moyenne				**1098**	**2041**	**17763**	**19804**
Ecart-type				***136***	***26***	***147***	
Controle 1 6h	10	40	65	1195	1595	18078	
Controle 2 6h	10	40	68	1203	1515	17993	
Controle 3 6h	10	40	65	1035	1255	15938	
Moyenne				**1144**	**1455**	**17336**	**18791**
Ecart-type				***95***	***178***	***1212***	
Rotif 9h	**2**	**100**	**-**	**82**	**1224**	**884**	**2108**
Test 1 9h	10	40	68	1155	2480	16333	
Test 2 9h	10	40	65	1053	2310	15698	
Test 3 9h	10	40	65	1085	2343	16113	
Moyenne				**1098**	**2378**	**16048**	**18425**
Ecart-type				***52***	***90***	***322***	
Controle 1 9h	10	40	65	1233	1290	15605	
Controle 2 9h	10	40	68	1210	1460	17248	
Controle 3 9h	10	40	65	955	1273	15103	
Moyenne				**1133**	**1341**	**15985**	**17326**
Ecart-type				***154***	***104***	***1122***	
Rotif 12h	**2**	**100**	**-**	**79**	**999**	**849**	**1848**
Test 1 12h	10	40	66	1000	2808	15490	
Test 2 12h	10	40	68	1065	2805	15963	
Test 3 12h	10	40	65	1263	3118	17048	
Moyenne				**1109**	**2910**	**16167**	**19077**
Ecart-type				***137***	***180***	***799***	
Controle 1 12h	10	40	66	1178	1398	17175	
Controle 2 12h	10	40	66	1240	1463	17045	
Controle 3 12h	10	40	68	1203	1468	17658	
Moyenne				**1207**	**1443**	**17293**	**18735**
Ecart-type				***31***	***39***	***323***	
Rotifères à jeun	**2**	**100**	**-**	**13**	**60**	**174**	

Tableau 1 : Quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes (expérience de broutage avec Brachionus *nourri avec* Dictyosphaerium*)*

	V d'extrait (ml)	V injecté (µl)	Alloxanthine (ng)	phéophytine a pmol	Chlorophylle a native	Chlorine totale a
Rotifère 3h	**2**	**100**	**22**	**45**	**321**	**366**
test susp 3h 1	10	40	1285	165	5213	5377
test susp 3h 2	10	40	1411	86	5706	5792
test susp 3h 3	10	40	1379	103	5673	5776
Moyenne			**1358**	**118**	**5530**	**5648**
Ecart-type			***65***	***41***	***276***	
Controle 3h 1	10	40	1541	0	6913	6913
Controle 3h 2	10	40	1070	0	4538	4538
Controle 3h 3	10	40	1498	0	6490	6490
Moyenne			**1370**	**0**	**5980**	**5980**
Ecart-type			***260***	***0***	***1267***	
Rotif 6h	**2**	**100**	**35**	**66**	**389**	**454**
test susp 6h 1	10	40	1204	62	4867	4928
test susp 6h 2	10	40	1212	0	5031	5031
test susp 6h3	10	40	1207	0	4898	4898
Moyenne			**1208**	**21**	**4932**	**4952**
Ecart-type			***4***	***36***	***87***	
Controle 6h 1	10	40	1555	0	6158	6158
Controle 6h 2	10	40	1514	0	6130	6130
Controle 6h 3	10	40	1545	0	6275	6275
Moyenne			**1538**	**0**	**6188**	**6188**
Ecart-type			***21***	***0***	***77***	
Rotif 9h	**2**	**100**	**19**	**38**	**335**	**373**
test susp 9h 1	10	40	967	0	4584	4584
test susp 9h 2	10	40	1050	0	4816	4816
test susp 9h 3	10	40	1089	87	4894	4981
Moyenne			**1035**	**29**	**4765**	**4794**
Ecart-type			***63***	***50***	***161***	
Control 9h 1	10	40	1449	0	6330	6330
Controle 9h 2	10	40	1407	0	5880	5880
Controle 9h 3	10	40	1406	0	6215	6215
Moyenne			**1421**	**0**	**6142**	**6142**
Ecart-type			***24***	***0***	***234***	
Rotif 12h	**2**	**100**	**57**	**109**	**586**	
test susp 12h 1	10	40	1084	100	4259	4359
test susp 12h 2	10	40	1114	87	4335	4422
test susp 12h 3	10	40	1124	110	4253	4363
Moyenne			**1107**	**99**	**4282**	**4381**
Ecart-type			***21***	***98***	***46***	
Controle 12h 1	10	40	1542	0	6040	6040
Controle 12h 2	10	40	1571	0	6828	6828
Controle 12h 3	10	40	1658	0	7100	7100
Moyenne			**1590**	**0**	**6656**	**6656**
Ecart-type			***60***	***0***	***550***	

Tableau 2 : Quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes (expériences de broutage avec Brachionus *nourri avec* Cryptomonas*),*

	V d'extrait (ml)	V injecté (µl)	Fucoxanthine ng	Chl*a* native (pmol)	Phéophytine *a* (pmol)	Chlorines *a* tot, (pmol)
Rotifères 3h	**2**	**100**	**110**	**77**	**171**	**249**
test susp 3h 1	10	40	2728	5823		5823
test susp 3h 2	10	40	2866	6024		6024
test susp 3h 3	10	40	2625	5971		5971
Moyenne			**2740**	**5939**		**5939**
Ecart-type			***121***	***104***		***104***
Controle 3h 1	10	40	2778	6308		6308
Controle 3h 2	10	40	2844	6318		6318
Controle 3h 3	10	40	2868	6440		6440
Moyenne			**2830**	**6356**		**6356**
Ecart-type			***47***	***74***		***74***
Rotif 6h	**2**	**100**	**111**	**86**	**188**	**274**
test susp 6h 1	10	40	2567	5606		5606
test susp 6h 2	10	40	2331	5105		5105
test susp 6h3	10	40	2463	5634		5634
Moyenne			**2453**	**5448**		**5448**
Ecart-type			***119***	***298***		***298***
Controle 6h 1	10	40	2447	5453		5453
Controle 6h 2	10	40	2707	6067		6067
Controle 6h 3	10	40	2288	4894		4894
Moyenne			**2480**	**5471**		**5471**
Ecart-type			***211***	***586***		***586***
Rotif 9h	**2**	**100**	**118**	**117**	**193**	**310**
test susp 9h 1	10	40	2725	6071		6071
test susp 9h 2	10	40	2667	5963		5963
test susp 9h 3	10	40	2666	5898		5898
Moyenne			**2686**	**5977**		**5977**
Ecart-type			***33***	***88***		***88***
Control 9h 1	10	40	2786	6313		6313
Controle 9h 2	10	40	2784	6335		6335
Controle 9h 3	10	40	2767	6152		6152
Moyenne			**2779**	**6267**		**6267**
Ecart-type			***10***	***100***		***100***
Rotif 12h	**2**	**100**	**144**	**92**	**212**	**305**
test susp 12h 1	10	40	1910	3826		3826
test susp 12h 2	10	40	2084	4287		4287
test susp 12h 3	10	40	2166	4589		4589
Moyenne			**2053**	**4234**		**4234**
Ecart-type			***131***	***384***		***384***
Controle 12h 1	10	40	2052	4440		4440
Controle 12h 2	10	40	2166	4768		4768
Controle 12h 3	10	40	2237	4815		4815
Moyenne			**2152**	**4674**		**4674**
Ecart-type			***93***	***204***		***204***

Tableau 3: Quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes (expérience de broutage avec Brachionus *nourri avec* Cyclotella*)*

	V d'extrait (ml)	V injecté (µl)	Lutéine (ng)	phéophytine a pmol	héphorbide n	Chl*a* native (pmol)	Chlorines a tot,	Phéopigments totaux
Bosmines 2 h	**2**	**100**	**45**	**256**	**84**	**344**	**684**	**340**
test susp 2h 1	10	40	1578	384	549	18976	20592	933
test susp 2h 2	10	40	1476	379	685	17074	18822	1064
test susp 2h 3	10	40	1340	396	407	17017	18504	803
Moyenne			**1465**	**386**	**547**	**17689**	**19306**	**933**
Ecart-type			***119***	***9***	***139***	***1115***	***1125***	
Controle 2h 1	10	40	1428	207	601	18083	18892	809
Controle 2h 2	10	40	1412	219	278	18082	18579	497
Controle 2h 3	10	40	1381	302	301	17424	18027	603
Moyenne			**1407**	**243**	**394**	**17863**	**18499**	**636**
Ecart-type			***24***	***52***	***180***	***380***	***438***	
Bosm 4h	**2**	**100**	**34**	**380**	**59**	**227**	**666**	**440**
test susp 4h 1	10	40	992	482	584	12446	14178	1066
test susp 4h 2	10	40	1004	442	617	12660	14385	1060
test susp 4h3	10	40	1029	448	468	12753	14334	916
Moyenne			**1008**	**457**	**557**	**12619**	**14965**	**1014**
Ecart-type			***19***	***21***	***78***	***157***	***108***	
Controle 4h 1	10	40	1142	313	725	15261	16299	1038
Controle 4h 2	10	40	1156	312	609	15332	16253	921
Controle 4h 3	10	40	1187	313	347	15164	15823	659
Moyenne			**1162**	**312**	**560**	**15252**	**16125**	**873**
Ecart-type			***23***	***1***	***194***	***84***	***262***	
Bosmi 6h	**2**	**100**					**675**	**390**
test susp 6h 1	10	40	1102	713	696	14214	16298	1409
test susp 6h 2	10	40	1129	728	698	14388	16489	1426
test susp 6h 3	10	40	1107	993	601	13827	16095	1594
Moyenne			**1112**	**811**	**665**	**14143**	**16294**	**1476**
Ecart-type			***15***	***158***	***56***	***287***	***197***	
Control 6h 1	10	40	1198	948	341	16443	17732	1289
Controle 6h 2	10	40	1279	650	346	16526	17521	996
Controle 6h 3	10	40	1368	301	517	17219	18037	818
Moyenne			**1282**	**633**	**401**	**16729**	**17763**	**1034**
Ecart-type			***85***	***324***	***100***	***426***	***259***	
Bosmin 8h	**2**	**100**					**675**	**415**
test susp 8h 1	10	40	1049	1283	338	12529	14826	1622
test susp 8h 2	10	40	1112	1387	1041	12596	15698	2427
test susp 8h 3	10	40	998	1324	889	11348	14236	2213
Moyenne			**1053**	**1331**	**756**	**12158**	**14920**	**2087**
Ecart-type			***57***	***52***	***370***	***702***	***736***	
Controle 8h 1	10	40	1343	521	997	13228	14745	1517
Controle 8h 2	10	40	1285	293	278	15490	16060	571
Controle 8h 3	10	40	1344	574	394	16718	17685	967
Moyenne			**1324**	**462**	**556**	**15145**	**16163**	**1018**
Ecart-type			***34***	***149***	***386***	***1770***	***1473***	

Tableau 4: Quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes (expérience de broutage avec Bosmina *sp. nourrie avec* Chlamydomonas*)*

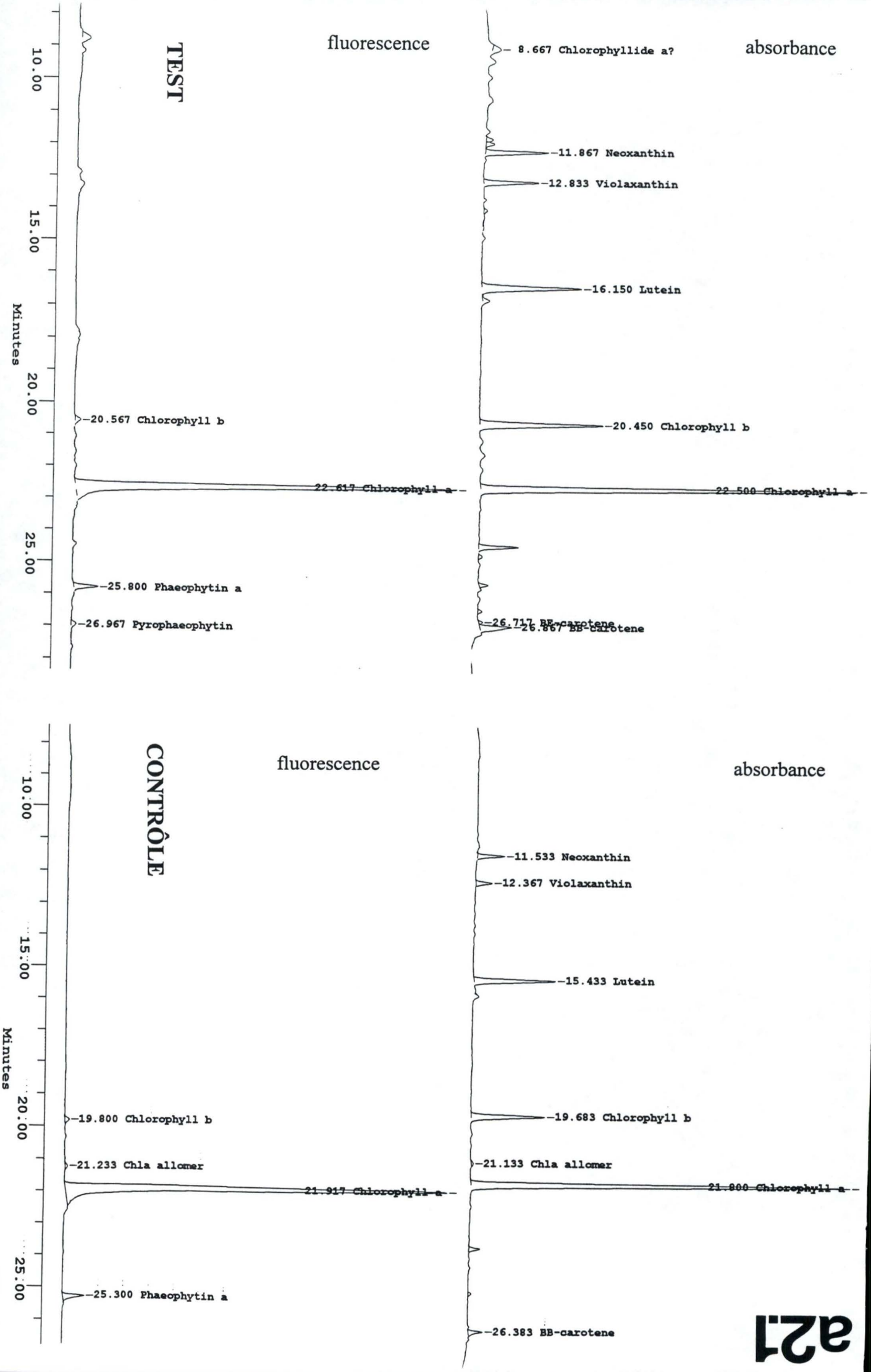
Annexe 2

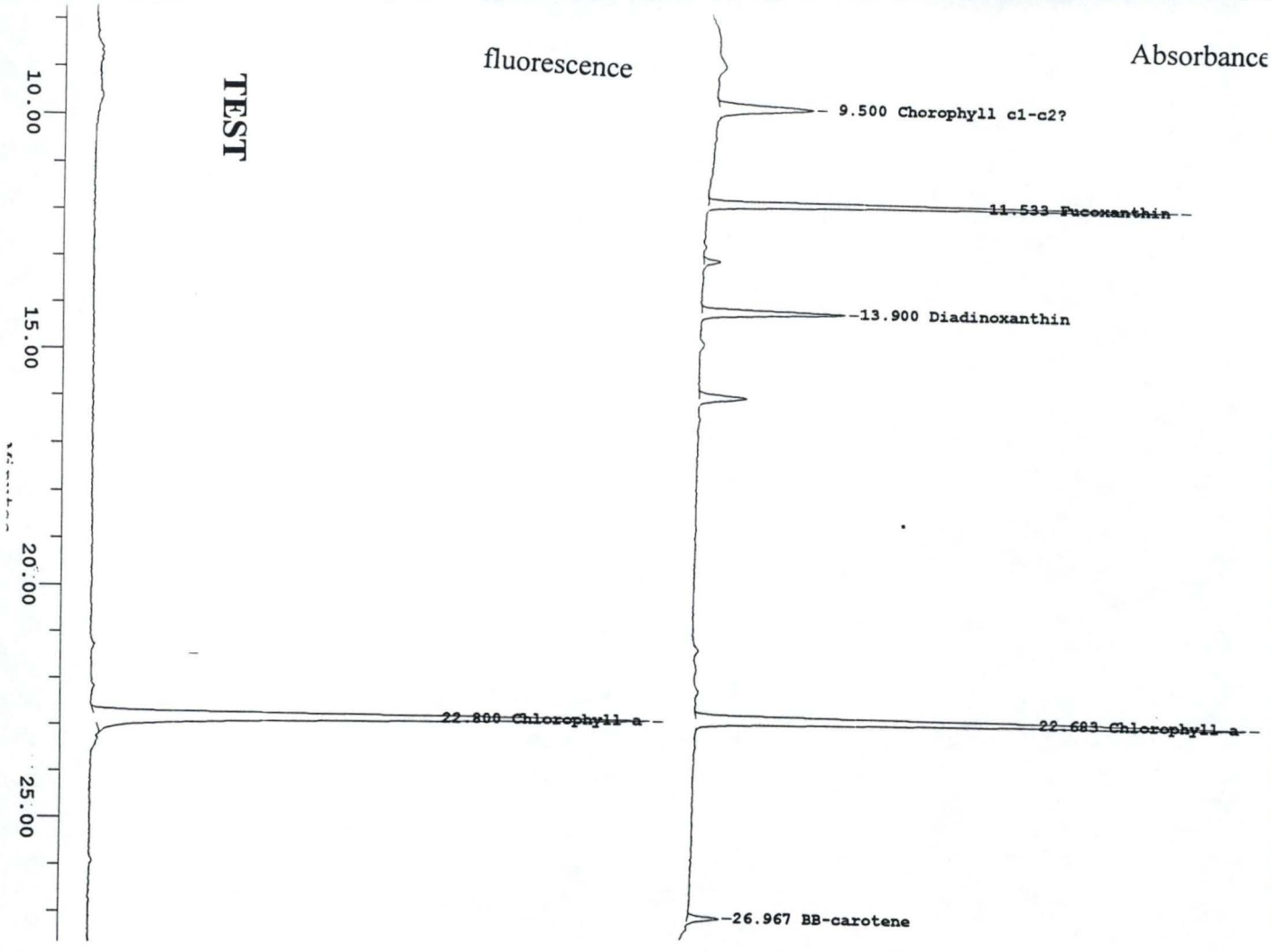
Fig. a2.1: Profils chromatographiques des suspensions algales contrôles et test obtenus en absorbance et en fluorescence (expérience de broutage avec Brachionus calyciflorus nourri avec Dictyosphaerium à saturation).

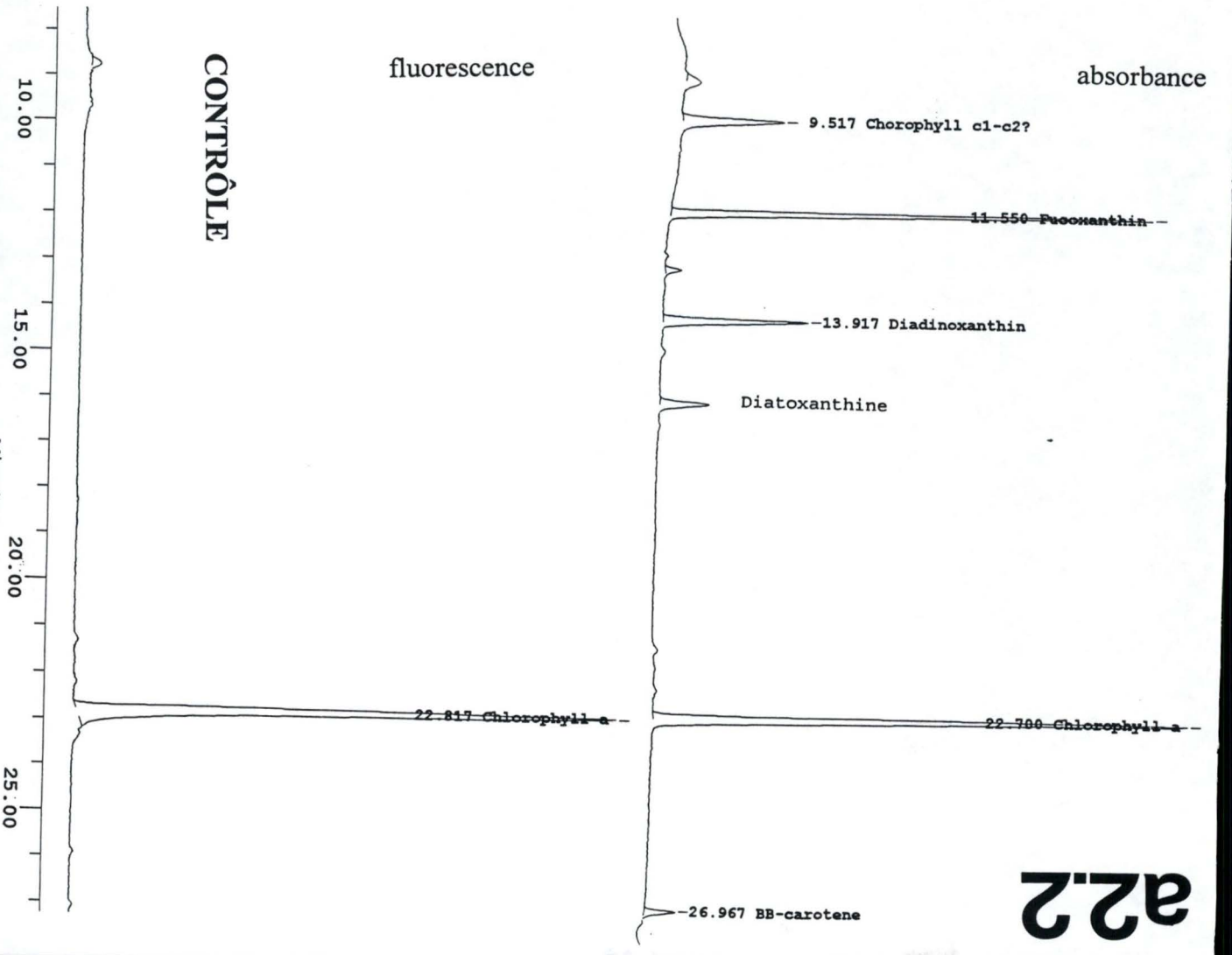
Fig. a2.2: Profils chromatographiques des suspensions algales contrôles et test obtenus en absorbance et en fluorescence (expérience de broutage avec Brachionus calyciflorus nourri avec Cyclotella à saturation).

Fig. a2.3: Profils chromatographiques des suspensions algales contrôles et test obtenus en absorbance et en fluorescence (expérience de broutage avec Brachionus calyciflorus nourri avec Cryptomonas à saturation).

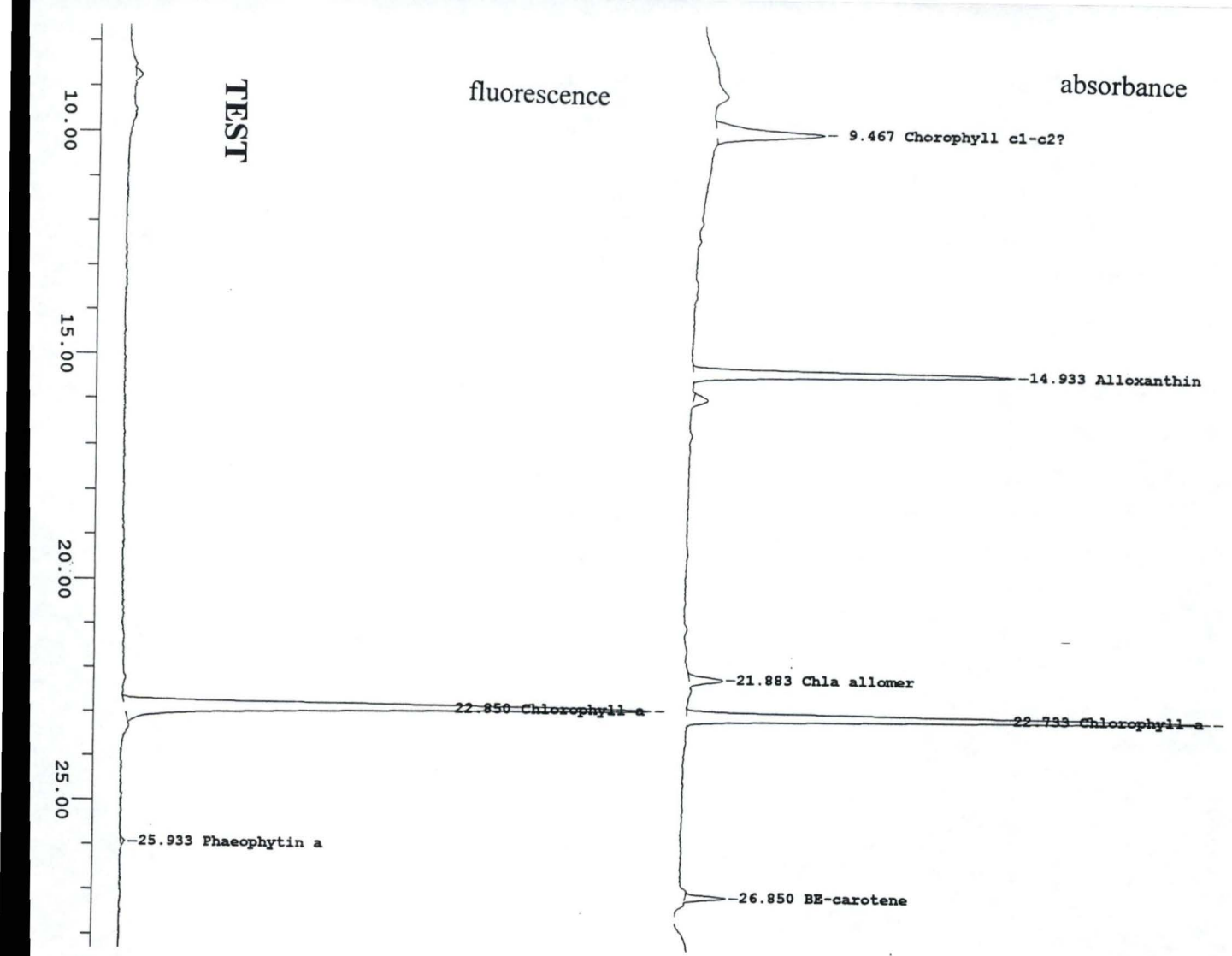
Fig. a2.4: Profils chromatographiques des suspensions algales contrôles et test obtenus en absorbance et en fluorescence (expérience de broutage avec Bosmina sp. nourri avec Chlamydomonas à saturation).

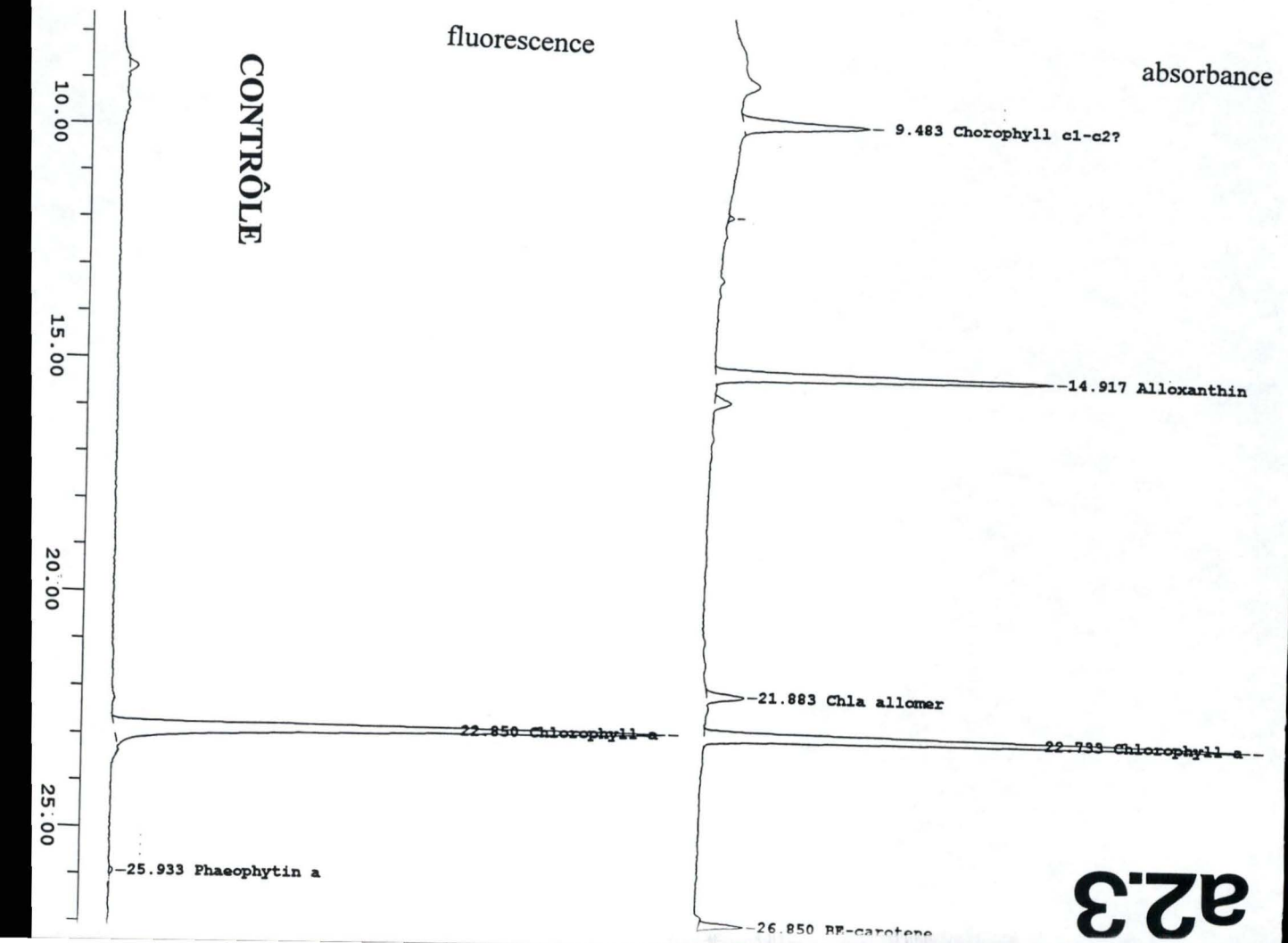

TEST
fluorescence
absorbance
Minutes
10.00
15.00
20.00
25.00
8.667 Chlorophyllide a?
11.867 Neoxanthin
12.833 Violaxanthin
16.150 Lutein
20.567 Chlorophyll b
20.450 Chlorophyll b
22.617 Chlorophyll a
22.500 Chlorophyll a
25.800 Phaeophytin a
26.967 Pyrophaeophytin
26.717 BB-carotene
26.867 BB-carotene
CONTRÔLE
fluorescence
absorbance
Minutes
10.00
15.00
20.00
25.00
11.533 Neoxanthin
12.367 Violaxanthin
15.433 Lutein
19.800 Chlorophyll b
19.683 Chlorophyll b
21.233 Chla allomer
21.133 Chla allomer
21.917 Chlorophyll a
21.800 Chlorophyll a
25.300 Phaeophytin a
26.383 BB-carotene


TEST
fluorescence
Absorbance
10.00
15.00
20.00
25.00
9.500 Chorophyll c1-c2?
11.533 Fucoxanthin
13.900 Diadinoxanthin
22.800 Chlorophyll a
22.683 Chlorophyll a
26.967 BB-carotene

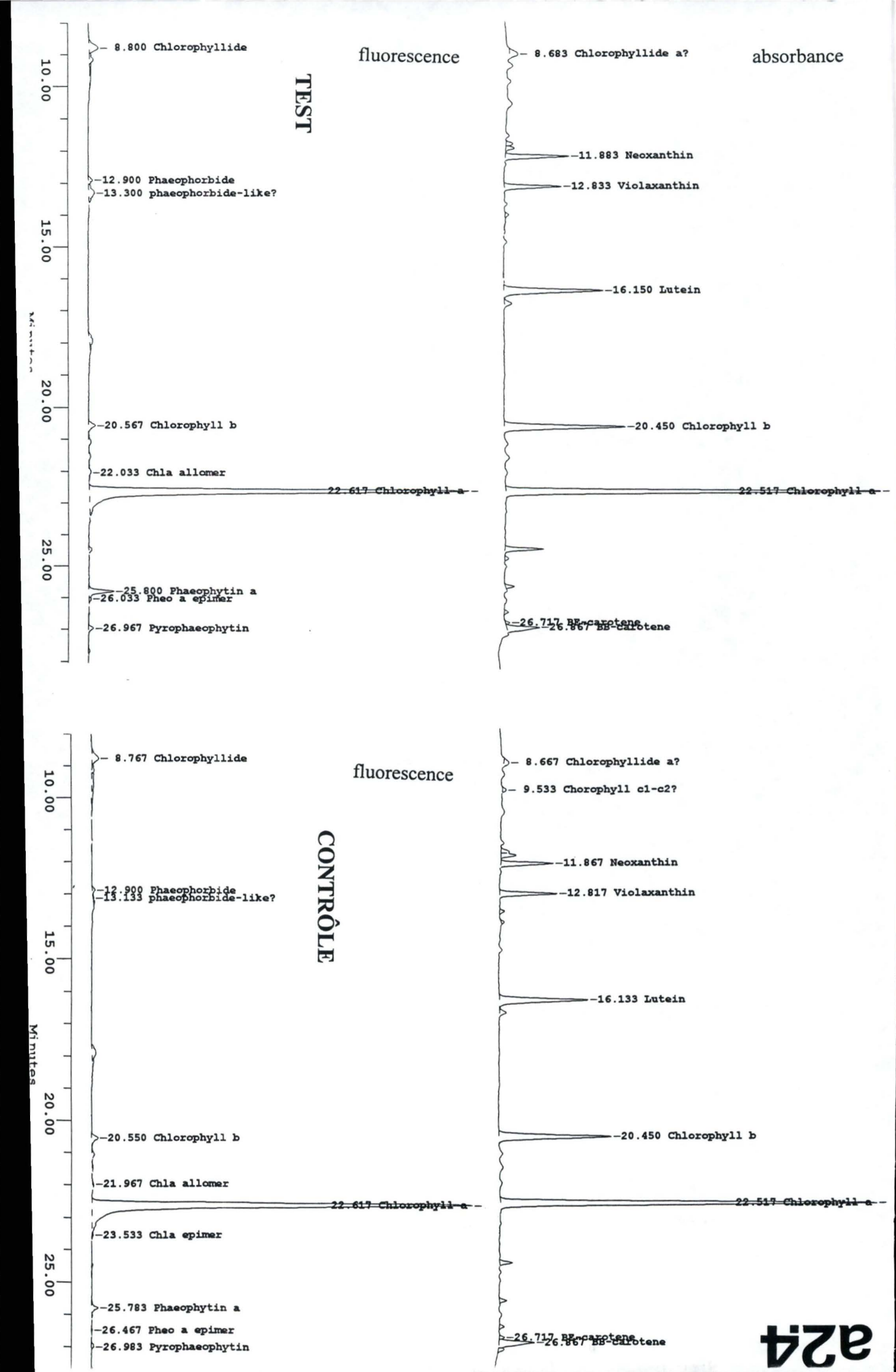

CONTRÔLE
fluorescence
absorbance
10.00
15.00
20.00
25.00
9.517 Chorophyll c1-c2?
11.550 Fucoxanthin
13.917 Diadinoxanthin
Diatoxanthine
22.817 Chlorophyll a
22.700 Chlorophyll a
26.967 BB-carotene

a2.2


TEST
fluorescence
absorbance
10.00
15.00
20.00
25.00
9.467 Chorophyll c1-c2?
14.933 Alloxanthin
21.883 Chla allomer
22.850 Chlorophyll a
22.733 Chlorophyll a
25.933 Phaeophytin a
26.850 BE-carotene


CONTRÔLE
fluorescence
absorbance
10.00
15.00
20.00
25.00
9.483 Chorophyll c1-c2?
14.917 Alloxanthin
21.883 Chla allomer
22.850 Chlorophyll a
22.733 Chlorophyll a
25.933 Phaeophytin a
26.850 BE-carotene

a2.3


TEST
fluorescence
absorbance
8.800 Chlorophyllide
8.683 Chlorophyllide a?
11.883 Neoxanthin
12.833 Violaxanthin
12.900 Phaeophorbide
13.300 phaeophorbide-like?
16.150 Lutein
20.567 Chlorophyll b
20.450 Chlorophyll b
22.033 Chla allomer
22.617 Chlorophyll a
22.517 Chlorophyll a
25.800 Phaeophytin a
26.033 Pheo a epimer
26.967 Pyrophaeophytin
26.717 BE-carotene
26.867 BB-carotene
10.00
15.00
20.00
25.00
CONTRÔLE
fluorescence
8.767 Chlorophyllide
8.667 Chlorophyllide a?
9.533 Chorophyll c1-c2?
11.867 Neoxanthin
12.817 Violaxanthin
12.900 Phaeophorbide
13.133 phaeophorbide-like?
16.133 Lutein
20.550 Chlorophyll b
20.450 Chlorophyll b
21.967 Chla allomer
22.617 Chlorophyll a
22.517 Chlorophyll a
23.533 Chla epimer
25.783 Phaeophytin a
26.467 Pheo a epimer
26.983 Pyrophaeophytin
26.717 BE-carotene
26.867 BB-carotene
10.00
15.00
20.00
25.00
Minutes