

Identification et quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes des sédiments marins: un protocole d'analyse par HPLC

Pigments végétaux
Sédiments
Protocole
HPLC

Plants pigments
Sédiments
Protocol
HPLC

Vanda BROTAS^a et Marie-Reine PLANTE-CUNY^b

^a Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, Edifício C2, Piso 4, 1700 Lisboa, Portugal.

^b Centre d'Océanologie de Marseille, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), URA CNRS n° 41, Station Marine d'Endoume, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

Reçu le 18/07/95, révisé le 21/11/95, accepté le 28/11/95.

RÉSUMÉ

Cette publication a pour but de décrire un protocole d'utilisation de la technique HPLC, adapté de Kraay *et al.* (1992), qui s'est montré très performant pour identifier et quantifier une trentaine de pigments chlorophylliens et caroténoïdes dans des échantillons de sédiments marins côtiers peuplés de microphytes benthiques. Les pigments sont extraits par le méthanol 95 % (tamponné à l'acétate d'ammonium) pendant 10 à 20 min puis filtrés sur GF/F. Les deux solvants d'élution sont : A) 80 % méthanol, 20 % solution 1M d'acétate d'ammonium ; B) 70 % méthanol, 30 % éthylacétate. Les détections sont pratiquées en fluorescence (430 nm, émission > 580 nm) et en absorbance à 436 et 450 nm. On décrit la préparation de différents standards à partir de phéophycées (*Halopteris* et *Cystoseira*). Un premier tableau présente les coefficients d'extinction spécifiques, les pics caractéristiques et les solvants retenus d'après la littérature, pour la calibration par spectrophotométrie de 24 pigments différents. On donne, à titre d'exemple, cinq chromatogrammes concernant les échantillons de trois stations différentes de l'estuaire du Tage. Un deuxième tableau indique l'ordre de séparation de trente-trois pigments, avec les temps de rétention et les différentes performances des trois types de détection. Une discussion aborde les problèmes des solvants d'extraction, du choix de la colonne, de la durée du programme, des solvants d'élution, du choix des systèmes de détection, des standards, des coefficients, et de l'identification des pics.

ABSTRACT

Identification and quantification of chlorophyll and carotenoid pigments in marine sediments. A protocol for HPLC analysis.

A HPLC protocol is described which permits analysis of the pigment composition of coastal and intertidal sediments. The HPLC technique has been extensively applied to phytoplankton pigments for fifteen years. Papers dealing with living benthic microphytic populations have been more rare, due to complexity existing in the sediment surface, where pigments (chlorophylls and carotenoids) from several taxonomic groups of microalgae are mixed with degraded pigments from senescent phytoplankton cells and macrophytic material. The present paper describes in detail a protocol adapted from Kraay *et al.* (1992), which allows a good discrimination of photosynthetic pigments of microphytobenthos communities. The following procedure is recommended. Sediment samples are collected using hand-held cores, during emersion of sites in intertidal zones or by scuba-diving

in submerged zones. Cores are sectioned in slices of 5 mm, weighed and lyophilized. Subsamples of 0.3-3 g are extracted in 95 % methanol buffered with ammonium acetate, during 10-20 min in the dark, at 5 °C; the extract is then filtered with the Sweenex system with GF/F Whatman filters.

Fluorescence excitation is performed at 430 nm and emission is detected beyond 580 nm. Absorbance is detected simultaneously at 436 and 450 nm. A binary solvent system is employed to separate the pigments. Standards for chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and β -carotene were obtained from Sigma; chlorophyllide *a* was prepared from thallus of the Phaeophyta *Halopteris*; pheophytins *a* and *b* and a major pheophorbide *a* were prepared by acidification (HCl 0.4 N, final molarity $3 \cdot 10^{-3}$ M); chlorophylls *c*₁ + *c*₂ and several carotenoids were also obtained from *Halopteris*. The remaining carotenoids were identified by comparison with published chromatograms. Calibration of standards was done spectrophotometrically in acetone or other solvents, subject to the existence of published extinction coefficients. Pigments were dried and redissolved in methanol in order to calculate the HPLC factor. A table of the coefficients used is given.

Five chromatograms of three different intertidal stations from the Tagus estuary are presented as examples; 29 pigments were identified. Chromatograms obtained in fluorescence and absorbance at 436 nm and 450 nm from the same sample are shown to permit comparison between performances of the different types of detection. All chlorophylls, active or degraded, are distinguished in fluorescence. Some of them appear clearly in absorbance at 436 nm, while 450 nm is the best wavelength for identifying carotenoids.

Pigment composition of sediment samples is related to microscopic species identification and cell abundance. Chromatograms obtained with absorbance at 450 nm from a mud sample in a salt-marsh showed high levels of violaxanthin, lutein (due to the abundance of plant detritus), zeaxanthin (corresponding to a population of 20 % cyanobacteria), and neoxanthin, diadinoxanthin and chlorophyll *b* (matching the abundance of euglenophytes: 10 %). A sample from a sandy station presented high levels of chlorophylls *c*₁ and *c*₂, neofucoxanthin and diatoxanthin; cell countings confirmed a major abundance of diatoms (99 %) with a dominance of *Cylindrotheca closterium*. A mud sample from a low-tide station exhibited a great variety of pheophorbides, which is related to the high grazing pressure at this site.

Although no method exists that is perfect for all types of pigments, the one described showed a good capability for analysing the taxonomic composition of microphytobenthos communities.

Oceanologica Acta, 1996, 19, 6, 623-634.

INTRODUCTION

La technique de chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC) pour la séparation, l'identification, et la quantification des pigments végétaux sur des échantillons aquatiques est en évolution constante. Depuis la première application, il y a quinze ans, de la technique HPLC en phase normale à la détermination des pigments chlorophylliens et caroténoïdes du phytoplancton marin ou d'eau douce (Abaychi and Riley, 1979), le nombre des publications sur le sujet connaît un accroissement exponentiel.

En considérant ici seulement les travaux ayant trait à des échantillons de sédiments, marins ou lacustres, les protocoles utilisés sont déjà très variés. À notre connaissance, la première application à des sédiments a été réalisée en 1979 par Brown *et al.* (1981) sur divers échantillons marins, côtiers autant que profonds, et terrestres. Les auteurs ont utilisé la HPLC avec un détecteur fluorimétrique pour doser les chlorophylles *a* et *b* et leurs phéophytines sur des

extraits méthanoliques (95 %) et l'élution par un solvant (méthanol, acétone, eau) sur une colonne en phase inverse. Daemen (1986) a pratiqué une détection fluorimétrique sur des extraits acétoniques de pigments de sédiments d'estuaires. Seuls les résultats concernant les chlorophylles *a* et *b* sont présentés sur un chromatogramme.

À la même époque, Mantoura et Llewellyn (1983) ont publié un protocole mis au point à partir de cultures d'algues planctoniques et d'échantillons d'eaux marines et saumâtres. Ce protocole a eu un très grand succès, et est encore très utilisé. Il préconise une extraction à l'acétone à 90 % et l'utilisation dans l'extrait et dans l'une des deux phases mobiles d'élution, d'un réactif « ion pairing », le tétrabutylammonium acétate ou « solution P », pour améliorer la séparation des composés les plus polaires. Ce protocole a été également appliqué à des échantillons de sédiments marins ou lacustres par Keely et Brereton (1986), Riaux-Gobin *et al.* (1987), Bianchi *et al.* (1988), Furlong et Carpenter (1988), Barlow *et al.* (1990), Hurley et Arm-

strong (1990), Levinton et Mc Cartney (1991), Klein et Riaux-Gobin (1991) et par nous-mêmes (Blanchard *et al.*, 1990 et Plante-Cuny *et al.*, 1993).

King et Repeta (1991), qui s'intéressaient plus particulièrement à l'analyse des pigments de sédiments profonds de la Mer Noire (2129 m) et surtout aux produits de dégradation des chlorophylles *a* et *b* (dont huit produits non polaires qui éluent après les phéophytines), ont mis en œuvre pour la première fois un protocole différent de celui de Mantoura et Llewellyn (1983). Quant à nous, à l'occasion d'un séjour au *Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee* (NIOZ), nous avons utilisé un troisième type de protocole, décrit par Kraay *et al.* (1992), comparable à celui qui est présenté par sept spécialistes in Wright *et al.* (1991). Ce protocole optimise les performances de la phase mobile par utilisation d'un gradient ternaire ; il ne fait plus intervenir le réactif « ion pairing » mais seulement un tampon d'acétate d'ammonium ; il consomme moins de solvant par diminution du débit ; il améliore la séparation des différents pigments chlorophylliens et caroténoïdes en assurant l'élution d'une cinquantaine de composés. Mais il suppose l'utilisation d'un programme à trois solvants (méthanol, tampon ; acétonitrile, eau ; éthylacétate). Nous avons adapté ce protocole à un système à deux solvants et l'avons appliqué aux sédiments.

Le but essentiel de la présente note est d'exposer le protocole, adapté de Kraay *et al.* (1992), que nous utilisons à présent et qui nous a permis d'identifier une trentaine de pigments présents dans des échantillons de sédiments de la zone euphotique plus ou moins densément peuplés de microphytes benthiques. Nous donnons quelques exemples de résultats obtenus sur divers types d'échantillons.

MÉTHODOLOGIE

Description du protocole

Préparation des échantillons

Dans les sédiments marins côtiers, les quantités de pigments, natifs ou dégradés, sont en général très élevées compte tenu de l'intense vie microphytique qui s'y développe et des dépôts qui s'y forment. Nous n'aborderons pas ici les sujets de la stratégie d'échantillonnage et du traitement préliminaire des échantillons, qui ont été exposés ailleurs (Plante *et al.*, 1985 ; Plante *et al.*, 1986 ; Reys *et al.*, 1987 ; Plante-Cuny *et al.*, 1993 ; Brotas *et al.*, 1995).

Pour une station donnée, nous prélevons plusieurs carottes (\varnothing 2,6 cm ou 3,6 cm pour les sédiments intertidaux du Tage) à pied ou en plongée autonome. Les carottes sont découpées en tranches (de 0,5 ou 1 cm d'épaisseur) et mises dans des récipients. Chaque tranche humide est pesée, lyophilisée, repesée à l'état sec pour estimer la teneur en eau du sédiment et rapporter les résultats à un poids de sédiment sec, à un volume de sédiment humide ou encore à une surface. Les récipients sont bouchés, enveloppés dans du papier d'aluminium et conservés à -30°C .

À partir des échantillons lyophilisés on peut prélever une ou plusieurs parties aliquotes de 0,3 à 3 g de sédiment par tranche selon la richesse présumée en pigments végétaux du sédiment, ou bien, mélanger les sédiments de tranches superficielles de plusieurs carottes d'une même station et prendre des parties aliquotes pour obtenir une moyenne physique concernant un type donné de sédiment.

Ces répliqués sont pesés dans des tubes de verre ou de plastique inerte. Les bouchons sont en caoutchouc aux silicons insensible aux solvants.

Extraction

Le méthanol à 95 % tamponné a été choisi comme solvant d'extraction car il s'apparente à la phase mobile retenue pour la chromatographie (solvants A et B). On extrait les pigments par un minimum de 2 ml de méthanol à 95 %, tamponné à 2 % par de l'acétate d'ammonium. Ce tampon améliore la séparation des chlorophylles *c* (recommandation de G. Kraay et de Wright *et al.*, 1991). Les échantillons sont soumis à une agitation mécanique (vortex) puis placés à l'obscurité à 5°C ; 10 à 15 min suffisent pour de petits échantillons. Les extraits sont filtrés sur système Sweenex avec filtres GF/F de 10 mm de diamètre. L'extrait filtré, enveloppé de papier d'aluminium, est bouché et placé à 5°C puis ramené à la température ambiante au moment de l'injection.

Analyses

Colonne, solvants d'élution, programme

Une colonne Bio-Sil C18 HL 90-5S de 150 mm, \varnothing 4,6 mm, particules 5 μm (Biorad) est utilisée. Les solvants du programme binaire, filtrés et dégazés sont : A) 80 % méthanol, 20 % solution 1 M d'acétate d'ammonium dans l'eau ultra-pure, soit une molarité finale de 0,2 M d'acétate d'ammonium et B) 70 % méthanol, 30 % éthylacétate. Nous appliquons un programme à deux solvants, de 34 min au total, qui débute à 0 % de B, atteint 100 % de B en 20 min, se maintient ainsi pendant 7 min, puis revient à 0 % de B en 7 min. Le débit constant est de 1 ml min^{-1} et le gradient est linéaire.

Injection, pompes, détecteurs

L'injection de l'extrait est pratiquée dans une valve Rhéodyne Modèle 7010 et par une boucle de 100 μl . Les deux pompes Altex 110 A, effectuant le mélange des solvants sous haute pression, sont pilotées par un programmeur de gradient Altex 420.

La détection des chlorophylles et de leurs produits de dégradation est assurée par un fluorimètre Schoeffel FS 970 connecté à un enregistreur-intégrateur (Shimadzu CR 1 B). La longueur d'onde d'excitation retenue est généralement 430 nm, l'émission étant mesurée au-delà de 580 nm (La Giraudière *et al.*, 1989). Un détecteur d'absorbance « UV-visible » (Beckman 165) connecté à deux intégrateurs (Shimadzu) permet la quantification des caroténoïdes en sus des pigments chlorophylliens, en utilisant simultanément les longueurs d'onde de 450 nm (perfor-

mante pour les caroténoïdes et les chlorophylles *b* et *c* et 436 nm convenant en principe à tous les pigments et permettant des comparaisons discriminantes avec les mesures à 450 nm et en fluorescence.

Identification et quantification des pigments

Standards

Quelques standards – chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, β -carotène – sont accessibles dans le commerce (Sigma Chemical Company). Les phéophytines *a* et *b* ont été préparées par acidification des chlorophylles *a* et *b* (HCl 0,4 N pour une molarité finale de $3 \cdot 10^{-3}$ M, Riemann 1978) puis neutralisation par du $MgCO_3$.

La chlorophyllide *a* est préparée à partir de thalles d'une phéophycée, *Halopteris* sp. broyés dans de l'acétone à 50 %. On laisse l'extrait à l'obscurité pendant plusieurs heures pour permettre l'action de la chlorophyllase sur la chlorophylle *a* et la transformation totale de celle-ci en chlorophyllide *a*. Comme pour les chlorophylles, en acidifiant une solution acétonique de chlorophyllide *a*, on obtient un phéophorbide *a* (cf. phéo. a_2 in Plante-Cuny et al., 1993, et pic n° 9 cf. infra).

Les algues phéophycées *Halopteris* sp. et *Cystoseira* sp. ont été utilisées pour extraire au méthanol les chlorophylles c_1 et c_2 et les caroténoïdes tels que fucoxanthine et violaxanthine. Nous avons aussi recueilli des pics importants, à partir d'échantillons de sédiments, pour les identifier par spectrophotométrie, par exemple la diadinoxanthine et la diatoxanthine.

Pour obtenir un extrait sec d'un pigment isolé recueilli lors de plusieurs passages sur la colonne HPLC (ou sur une colonne préparative), une procédure décrite par Jeffrey (1968) et par Gieskes et Kraay (1983b et 1984) a été utilisée:

On filtre quelques millilitres d'extrait de pigment dans le solvant sur GF/F avec le système Sweenex. Le filtrat est placé dans un petit erlenmeyer. On ajoute un volume équivalent de diéthyléther puis une quantité dix fois supérieure d'une solution de NaCl 10 %. On agite vigoureusement et on place le flacon à l'obscurité durant quelques minutes. Dans le col de l'erlenmeyer se forme alors un anneau contenant le pigment dissous dans le diéthyléther alors que l'eau du solvant d'origine (acétone 90 %, méthanol 95 % ou solvant A de HPLC) reste dans la solution de NaCl.

L'extrait dans le diéthyléther est pipeté et transféré dans un tube. Le diéthyléther est évaporé à l'aide d'une pompe à vide. Si l'évaporation est incomplète, on rajoute du diéthyléther et quelques grains de NaCl pour extraire le résidu d'eau. Un pigment isolé, ainsi desséché, peut être redissous dans un solvant approprié et étudié par spectrophotométrie.

Pour identifier et quantifier un pigment, on dilue l'extrait sec dans le solvant cité dans la littérature (Foppen, 1971 ; Rowan, 1989 ; Bidigare, 1991 ; cf. Tab. 1), qui peut permettre de reconnaître le spectre. Les coefficients d'extinction spécifiques (α en $l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$; Lorenzen and Jeffrey, 1980) donnés pour les solvants considérés, sont utilisés pour quantifier la concentration en pigments après lecture

de la densité optique à la longueur d'onde du pic pour lequel est donné le coefficient. Les étalonnages au spectrophotomètre sont réalisés le plus souvent dans l'acétone, solvant dans lequel les coefficients sont généralement disponibles. Les extraits acétoniques sont séchés et redissous dans le méthanol 95 % pour injection et calcul de la constante *K* (cf. infra). Nous donnons (tab. 1) une liste des coefficients d'extinction spécifique (α) parmi les plus récemment publiés, puis les pics correspondants à ces coefficients, ainsi que quelques pics de maxima d'absorption permettant d'identifier les pigments dans divers solvants si les coefficients ne sont pas connus.

Quantification, expression des résultats

Les concentrations en pigments-étalons sont calculées d'après la formule générale reprise de Bidigare (1991) :

$$\text{concentration en pigment (mg l}^{-1}\text{) dans l'extrait} = \frac{DO \cdot 1000}{\alpha \cdot L}$$

DO = densité optique lue à la longueur d'onde pour laquelle est connu α dans un solvant donné

α = coefficient spécifique d'extinction ($l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$)

L = longueur du trajet optique (cuve) en cm

Le système d'injection HPLC permet d'introduire un volume connu (volume de la boucle) de l'extrait du pigment dont on a mesuré la concentration par spectrophotométrie. Cette quantité connue de pigment ainsi injectée permet de calculer une constante *K* qui est valable pour l'ensemble des conditions utilisées pour une série de mesures.

K = nombre d'unités d'aires par unité de masse de pigment

La formule de calcul de la concentration d'un pigment donné sera, dans le cas des sédiments :

$$\text{concentration (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} = \frac{A \cdot V}{K \cdot M}$$

concentration en μg de pigment par g de sédiment sec

A = aire du pic en unités arbitraires

V = volume en ml de l'extrait pigmentaire d'un échantillon de sédiment pesé

v = volume en ml de la boucle d'injection

M = masse de l'échantillon de sédiment sec (g)

Pour rapporter la quantité de pigment présente dans l'extrait à un volume de sédiment humide ou à une surface de sédiment, on introduira dans la formule les facteurs de transformation adéquats en revenant au poids de la tranche de carotte humide.

RÉSULTATS

Nous présentons (figs. 1 et 2), cinq chromatogrammes concernant des échantillons de trois stations intertidales différentes de l'estuaire du Tage (marnage 1 à 4 m), étudiées par ailleurs en ce qui concerne la biomasse, la pro-

Tableau 1

Coefficients spécifiques d'extinction α des principaux pigments chlorophylliens et caroténoïdes rencontrés, et pics correspondants à ces coefficients, ou pics de maxima d'absorption.

Specific extinction coefficients α of the main chlorophyllous pigments and carotenoids identified and corresponding peaks, or maximum absorption peaks.

| Pigments | Solvants | α ($l\ g^{-1}cm^{-1}$) | Pics (nm) | Références |
|---|-----------------|---------------------------------|-----------|--|
| <i>Pigments chlorophylliens</i> | | | | |
| chlorophylle <i>a</i> | acétone 90 % | 87,67 | 664,3 | Jeffrey et Humphrey 1975 Riemann 1978 |
| | méthanol 100 % | 77,9 | 665 | |
| chlorophyllide <i>a</i> | acétone 90 % | 128 | 663 | Lorenzen et Downs 1986 |
| phéophytine <i>a</i> | acétone 90 % | 49,5 | 666 | Lorenzen et Downs 1986 |
| phéophytine <i>a</i> | acétone 90 % | 69,8 | 666 | Lorenzen et Downs 1986 |
| chlorophylle <i>b</i> | acétone 90 % | 51,36 | 646,8 | Jeffrey et Humphrey 1975 Riemann 1978 |
| | méthanol 100 % | 44,5 | 642 | |
| phéophytine <i>b</i> | acétone 80 % | 34,8 | 655 | Vernon 1960 |
| chlorophylle <i>c</i> ₁ | acétone 90 % | 44,8 | 630,6 | Jeffrey 1972 |
| chlorophylle <i>c</i> ₂ | acétone 90 % | 40,4 | 630,9 | Jeffrey 1972 |
| chlorophylles <i>c</i> ₁ + <i>c</i> ₂ | acétone 90 % | 42,6 | 630,9 | Jeffrey 1972 |
| phéophorphyrine <i>c</i> ₁ | diéthylether | – | 568 | Wilhem 1987 |
| phéophorphyrine <i>c</i> ₂ | acétone 90 % | – | 574/596 | Jeffrey et Shibata 1969 |
| <i>Caroténoïdes</i> | | | | |
| alloxanthine | éthanol | 262 | 453 | Bidigare 1991 |
| α -carotène | éter de pétrole | 280 | 443-448 | Foppen 1971 Davies 1976 |
| | diéthylether | 208 | 450 | Goodwin 1955 |
| β -carotène | acétone 90 % | 250 | 452 | Johansen <i>et al.</i> 1974 Davies 1976 |
| | éthanol | 262 | 453 | |
| diadinoxanthine | acétone | 223 | 448 | Johansen <i>et al.</i> 1974 Johansen <i>et al.</i> 1974 |
| | méthanol | 225 | 445 | |
| diatoxanthine | acétone | 210 | 448-454 | Johansen <i>et al.</i> 1974 Goodwin 1955 |
| | éthanol | 262 | 449 | |
| fucoxanthine | acétone 90 % | 106 | 449 | Garside et Riley 1968 Jensen 1966 <i>a</i> |
| | éter de pétrole | 160 | 453 | |
| 19'hexanoyloxyfucoxanthine | acétone | – | 445-450 | Wright et Jeffrey 1987 Nelson 1986 |
| | | 187,7 | | |
| lutéine | acétone | – | 445-473 | Renstrom <i>et al.</i> 1981 Davies 1976 |
| | éthanol | 255 | 445 | |
| néoxanthine | acétone | – | 438-466 | Renstrom <i>et al.</i> 1981 Davies 1976 |
| | éthanol | 224,3 | 439 | |
| néofucoxanthine | éthanol | – | 446-447 | Jeffrey 1961 |
| péridine | acétone | 134 | 466 | Jeffrey et Haxo 1968 Johansen <i>et al.</i> 1974 |
| | | 135 | – | |
| prasincoxanthine | éthanol | 160 | 454 | Bidigare 1991 |
| violaxanthine | acétone 90 % | 240 | 440-442 | Jensen 1966 <i>b</i> |
| | éthanol | 255 | 443 | Davies 1976 |
| | méthanol | – | 440 | Davies 1976 |
| zéaxanthine | acétone | 234 | 449-452 | Davies 1976 |

duction primaire et les peuplements des microphytes benthiques (Brotas *et al.* 1995, Brotas et Catarino, sous presse). Ces sédiments sont différents par le niveau altitudinal, les caractéristiques physiques et chimiques, et les peuplements microphytiques.

Sur un total de 80 échantillons analysés en HPLC concernant ces sédiments étudiés en différentes saisons, la figure 1 présente les résultats obtenus sur l'un des plus riches en pigments, où une trentaine de ceux-ci ont été résolus. Ces trois chromatogrammes correspondent aux

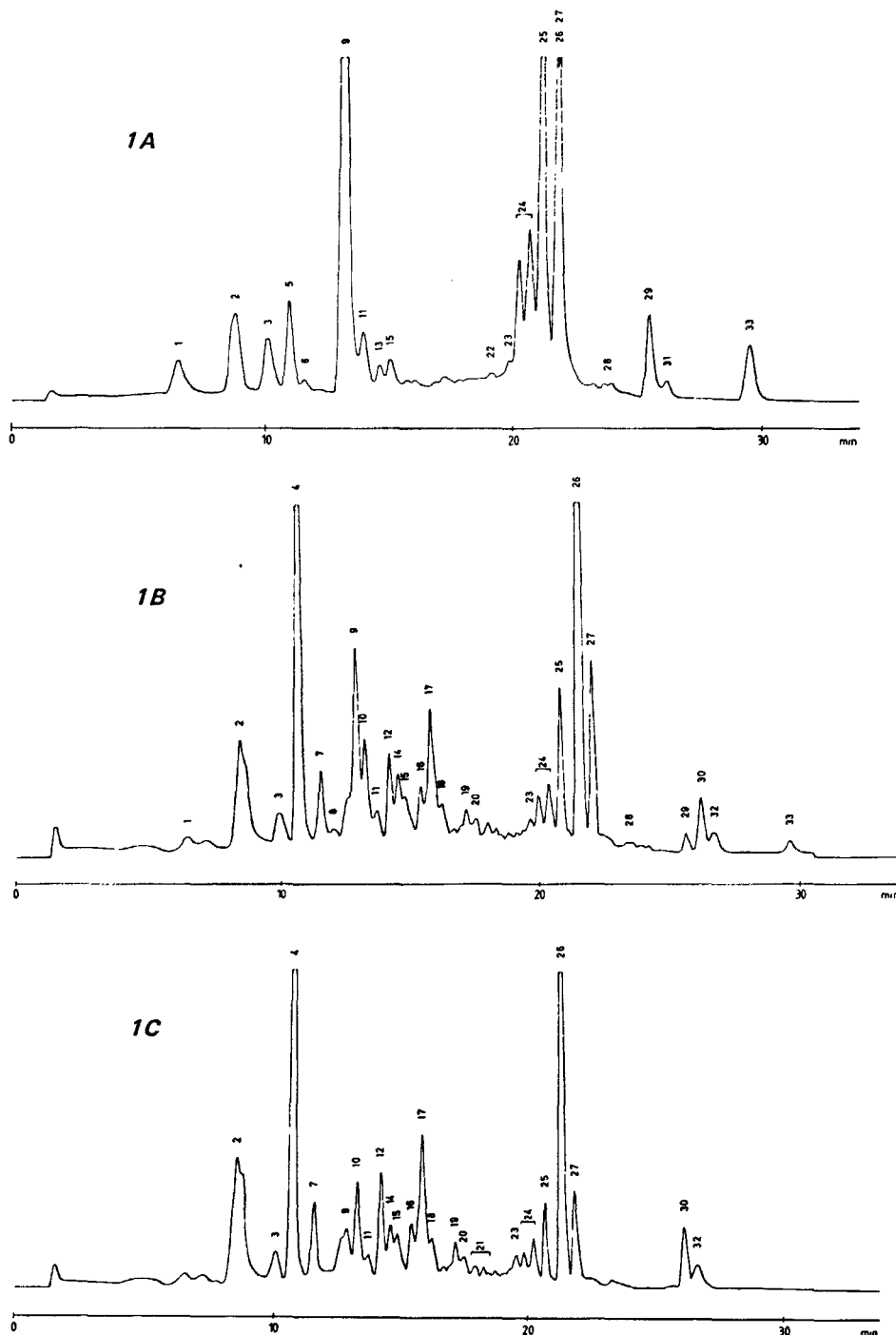


Figure 1

Chromatogrammes HPLC phase-inverse d'un échantillon de sédiment intertidal de l'estuaire du Tage. Station de vase (91 % de particules < 63 μm), située à +1,4 m; poids de l'échantillon sec : 0,94 g.

1A : Fluorescence (excitation à 430 nm ; émission > 580 nm) ; 1B : Absorbance à 436 nm ; 1C : Absorbance à 450 nm. Numérotation des pics conforme au tableau 2.

HPLC chromatograms obtained from Tagus estuary intertidal sediment. Sample of a mud station (91 % of sediment particles < 63 μm), situated at a lower tidal height (+1.4 m). Sample dry weight was 0.94 g.

1A: Fluorescence (excitation 430 nm; emission > 580 nm); 1B: Absorbance at 436 nm; 1C: Absorbance at 450 nm. Peak numbers are according to Table 2.

résultats obtenus en fluorescence (excitation 430 nm, fig. 1 A), en absorbance à 436 nm (fig. 1 B) et 450 nm (fig. 1 C). L'échantillon de sédiment provient d'une vasière située à +1,4 m au-dessus du zéro hydrographique, dont le pourcentage de fraction fine (particules < 63 μm) est de 91 % et la teneur en matière organique de 8,6 %.

Le tableau 2 donne les temps de rétention des différents pigments chlorophylliens et caroténoïdes identifiés, dans les trois cas différents de détection (fluorescence avec excitation à 430 nm, absorbance à 436 et 450 nm). La numérotation suit l'ordre d'apparition des pics.

Certains pics ont été reconnus grâce aux étalons (commerciaux ou fabriqués : Chl *a* + allomères, chlorophyllide *a*, phéophytines *a* + *a'*, phéophorbide *a* (pic n° 9), Chl *b* +

allomère, phéophytines *b*, Chl *c*₁+*c*₂, fucoxanthine, violaxanthine, β -carotène), d'autres comme nous l'avons dit plus haut, par l'étude des spectres, d'autres enfin par comparaison avec les chromatogrammes disponibles dans la littérature (Mantoura et Llewelyn, 1983 ; Repeta et Gagosian, 1983 ; Sartory, 1985 ; Keely et Brereton, 1986 ; Vernet et Lorenzen, 1987 ; Furlong et Carpenter, 1988 ; Hurley et Armstrong, 1990 ; Leavitt et Carpenter, 1990 ; Abele-Eschger, 1991 ; King et Repeta, 1991 ; Klein et Riaux-Gobin, 1991 ; Wright *et al.*, 1991 ; Kraay *et al.*, 1992 ; Bianchi *et al.*, 1993).

La comparaison des trois chromatogrammes (A,B,C fig. 1) permet de différencier clairement les divers pigments chlorophylliens, natifs ou dégradés, seuls à apparaître en fluorescence (spectre 1A ; en particulier six phéophorbides *a*,

Tableau 2

Temps de rétention et ordre d'apparition sur les chromatogrammes pour 33 pigments détectés sur des extraits méthanoliques d'échantillons de sédiments de l'estuaire du Tage. Détection en fluorescence (excitation à 430 nm) et en absorbance à 436 et 450 nm.

Retention time and elution order of 33 pigments from chromatograms of sediment samples from the Tagus estuary, extracted in methanol. Detection by fluorescence (excitation at 430 nm) and absorbance at 436 and 450 nm.

| Fluo. 430 nm exc. | Temps de rétention (min) | | Pigments | n° pics |
|-------------------|--------------------------|----------------|--|---------|
| | Absorb. 436 nm | Absorb. 450 nm | | |
| 1,50 | 1,50 | 1,50 | injection | |
| 6,42 | — | — | chlorophyllide <i>a</i> | 1 |
| 8,65 | 8,49 | 8,52 | chlorophyllide <i>c</i> ₁ + <i>c</i> ₂ | 2 |
| 9,89 | 9,96 | 10,03 | phéophorbide <i>a</i> | 3 |
| — | 10,69 | 10,70 | fucoxanthine | 4 |
| 10,79 | — | — | phéophorbide <i>a</i> | 5 |
| 11,39 | — | — | phéophorbide <i>a</i> | 6 |
| — | 11,59 | 11,62 | néoxanthine | 7 |
| — | 12,09 | — | caroténoïde non identifié | 8 |
| 12,95 | 12,95 | 12,93 | phéophorbide <i>a</i> | 9 |
| — | 13,32 | 13,33 | violaxanthine | 10 |
| 13,75 | 13,75 | 13,77 | phéophorbide <i>c</i> ₂ | 11 |
| — | 14,25 | 14,27 | diadinoxanthine | 12 |
| 14,39 | — | — | phéophorbide <i>a</i> | 13 |
| — | 14,61 | 14,63 | néofucoxanthine | 14 |
| 14,82 | 14,83 | 14,92 | phéophorbide <i>a</i> | 15 |
| — | 15,43 | 15,45 | alloxanthine | 16 |
| — | 15,84 | 15,85 | diatoxanthine | 17 |
| — | 16,27 | 16,28 | caroténoïde non identifié | 18 |
| — | 17,19 | 17,20 | lutéine | 19 |
| — | 17,53 | 17,55 | zéaxanthine | 20 |
| — | — | — | 3 pics non identifiés | 21 |
| 18,79 | 18,77 | 18,78 | allomère chlorophylle <i>b</i> | 22 |
| 19,62 | 19,65 | 19,65 | chlorophylle <i>b</i> | 23 |
| 19,92 | 19,95 | 19,97 | | |
| 20,32 | 20,33 | 20,35 | dérivés Chl <i>a</i> (allomères) 2 pics | 24 |
| 20,79 | 20,81 | 20,82 | allomère principal Chl <i>a</i> | 25 |
| 21,49 | 21,49 | 21,52 | chlorophylle <i>a</i> | 26 |
| 21,99 | 22,01 | 22,03 | Chl <i>a</i> ' | 27 |
| 23,49 | 23,42 | — | | |
| 23,92 | — | — | phéophytine <i>b</i> (3 pics) | 28 |
| 24,19 | — | — | | |
| 25,65 | 25,70 | — | phéophytine <i>a</i> | 29 |
| — | 26,28 | 26,28 | β-carotène | 30 |
| 26,35 | — | — | phéophytine <i>a</i> ' | 31 |
| — | 26,74 | 26,75 | β-carotène | 32 |
| 29,59 | 29,60 | — | phytol chl <i>c</i> ? | 33 |

une phéoporphyrine *c* et les phéophytines *a* et *b*), des caroténoïdes, ces derniers n'étant détectés qu'en absorbance (spectres 1B et 1C). D'autre part, certains pigments chlorophylliens, notamment le phéophorbide *a* à 12,95 min (pic 9), très important en fluorescence (1A), se retrouve assez bien marqué en absorbance à 436 nm (1B) alors qu'il est très atténué à 450 nm (1C). La phéophytine *a* (pic 29) est détectée à 436 nm et non à 450 nm. La détection en absorbance à 450 nm (1C) permet donc, du fait de l'atténuation importante des pics des dérivés chlorophylliens, et par comparaison, de bien les reconnaître sur les autres chromatogrammes et, par ailleurs, d'identifier plus nettement certains caroténoïdes dont les spectres ont souvent des maximums d'absorption vers 450 nm (*cf.* tab. 1).

Sur la figure 2, nous présentons deux chromatogrammes en absorbance à 450 nm pour des échantillons de deux autres stations de l'estuaire du Tage : figure 2 A -station sableuse à +2,0 m (pourcentage de particules < 63 μm égal

à 1,4 % et 0,9 % de matière organique) et figure 2 B -station située dans un marais maritime, sous la canopée de *Spartina maritima* à +3,1 m (pourcentage de particules < 63 μm : 90 % et 10,1 % de matière organique). Ces graphes sont comparables qualitativement à celui de la figure 1 C (450 nm) et quantitativement si l'on tient compte des poids respectifs des échantillons.

Nous constatons la présence des pigments classiques et importants dans les communautés microphytiques : Chl *a*, Chl *c*₁ et *c*₂, fucoxanthine, β-carotène. Pour la station sableuse (fig. 2 A) on remarque l'importance relative très grande de la Chl *c* (pics 2, avec résolution presque complète des pics de Chl *c*₁ et *c*₂), la présence notable de néofucoxanthine (pic 14) et de diatoxanthine (pic 17) et la quasi-absence de lutéine, de zéaxanthine (pics 19 et 20) et de Chl *b* (pic 23). En effet, le peuplement observé sur ce sable est constitué, en nombre de cellules, pour 99 % de diatomées, dont 80 % de *Cylindrotheca closterium*, et pour

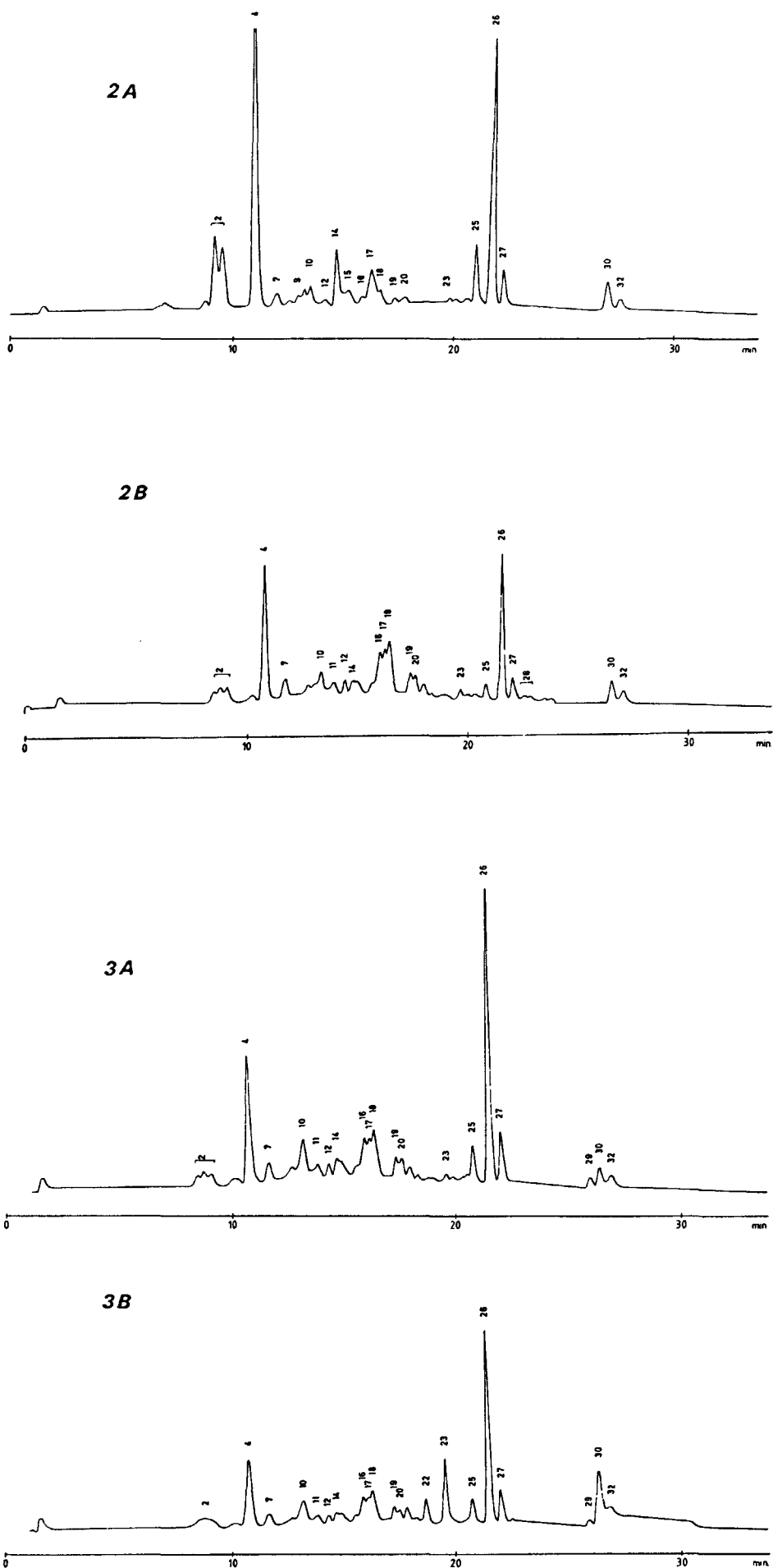


Figure 2

Chromatogrammes HPLC phase-inverse d'échantillons de deux sédiments différents de l'estuaire du Tage avec la même détection en absorbance à 450 nm.

2A : Station sableuse (1,4 % de particules < 63 µm) située à +2,0 m ; poids de l'échantillon sec, 2,62 g.

2B : Station de vase du marais maritime à *Spartina* (90 % de particules < 63 µm) située à + 3,1 m ; poids de l'échantillon sec, 0,72 g.

HPLC Absorbance (450 nm) chromatograms obtained from two different Tagus estuary sediments.

2A: Sandy station (1.4 % of sediment particles < 63 µm) situated at 2.0 m of tidal height ; sample dry weight 2.62 g.

2B: Salt-marsh muddy station under *Spartina* canopy with 90 % of sediment particles < 63 µm, located at a high tidal level (+3.1 m) ; sample dry weight 0.72 g.

Figure 3

Chromatogrammes HPLC phase-inverse d'un échantillon de vase du marais à *Spartina* (cf. fig. 2 B) avec détection à 436 nm en absorbance : avant (3A) et après (3B) adjonction de standards de Chl *b* (pics n° 22 et 23) et de β-carotène (pics n° 30 et 32).

HPLC Absorbance (436nm) chromatograms obtained from the salt-marsh station (cf. Fig. 2 B), before (3A) and after (3B) the addition of standards of Chl b (peaks n° 22 and 23) and β-carotene (peaks n° 30 and 32).

1 % d'euglénophycées. Pour la station du marais maritime (fig. 2 B), où les débris de phanérogames sont abondants et le peuplement microphytique constitué pour 20 % de cyanophycées, 10 % d'euglénophycées et 70 % de diatomées, on remarque l'importance relative de la violaxanthine (pic 10) et de la lutéine (pic 19) indiquant la présence de débris végétaux (Abele-Eschege, 1991 ; Bianchi *et al.*, 1993), de la zéaxanthine (pic 20) pour les cyanophycées, de la néoxanthine (pic 7), de la diadinoxanthine (pic 12) et de la Chl *b* (pic 23) pour les euglénophycées (Rowan, 1989).

Quant à l'échantillon de la figure 1, il provient d'une vasière peuplée à 95 % de diatomées et à 5 % d'euglénophycées, située dans l'infralittoral, où les muges sont reconnus comme des consommateurs directs des microphytes à marée haute (Almeida *et al.*, 1993). Or on note dans cet échantillon l'importance relative, par rapport aux deux autres stations, des phéophorbides, produits de la dégradation poussée des chlorophylles (pics 3, 5, 6, 9, 11, 13 15 et 33). Divers auteurs ont signalé que l'abondance de phéophorbides est l'indice d'une activité importante de broutage (Klein et Sournia, 1987 ; Bianchi *et al.*, 1988 ; Bianchi *et al.*, 1991).

Tous les autres pigments correspondent aux conditions classiques d'un sédiment estuarien ; tout au plus peut-on remarquer, dans tous les cas, deux pigments nettement résolus et assez abondants qui pourraient indiquer la présence de certaines diatomées (néofucocoxanthine, pic 14 ; Jeffrey 1974 ; Mantoura et Llewellyn 1983) et de cryptophycées (alloxanthine, pic 16 ; Gieskes et Kraay, 1983b ; Bjørnland et Liaaen-Jensen, 1989). Ce dernier point est à souligner car les cryptophycées ne sont pas signalées dans la littérature comme appartenant aux communautés de microalgues benthiques. Cependant, la présence d'alloxanthine dans des sédiments côtiers est rapportée par Riaux-Gobin *et al.*, 1987 et Klein et Riaux-Gobin (1991).

DISCUSSION

Sur la méthodologie

Le choix du solvant d'extraction reste encore un sujet controversé. Pour avoir utilisé l'acétone dans d'autres travaux (Plante-Cuny *et al.*, 1993), nous avons pu constater, comme Kraay *et al.* (1992), que l'extraction par le méthanol est beaucoup plus rapide pour l'ensemble des pigments. La deuxième raison de notre choix actuel est que le solvant (méthanol 95 % tamponné à 2 % d'acétate d'ammonium) s'apparente au solvant A de la phase mobile, ce qui évite les distorsions observées en début de chromatogramme avec l'acétone (Zapata et Garrido, 1991). Dans le cas de mesures par spectrophotométrie, le méthanol pose des problèmes d'instabilité du pH lors de l'acidification (Marker, 1977), raison pour laquelle l'acétone lui est souvent préférée. L'éthanol, utilisé par les limnologues dans certains travaux, n'a pas été testé.

Dans le cas des sédiments le choix d'une colonne est primordial. Une colonne plutôt longue et à particules très fines fortement chargées en carbone est recommandée dans certains travaux (Paerl et Millie, 1991 ; Kraay *et al.*, 1992). Les extraits pigmentaires de sédiments sont généralement très riches et complexes et comportent des éléments très

polaires : chlorophyllide *a*, Chl *c*, phéophorbides et certains caroténoïdes. L'un d'eux, en début de spectre, n'a d'ailleurs pas encore pu être identifié (*cf.* figs. 1 B et 1 C, entre chlorophyllide *a* et Chl.*c*).

La durée de notre programme – 34 min – quoique longue, a été retenue pour permettre une bonne résolution de tous les pics.

La composition des deux solvants d'élution, légèrement modifiée par rapport à Gieskes *et al.* (1988), a été adoptée après des essais décevants effectués en tentant de reconstituer dans deux solvants, les mélanges du système ternaire de Wright *et al.* (1991). Une mauvaise séparation des pics observée dans de telles conditions peut s'expliquer par la complexité des mélanges ainsi obtenus (Yost *et al.*, 1981).

L'unanimité semble s'être faite (Wright *et al.*, 1991) sur la non nécessité d'utiliser la « solution P », déjà signalée par Gieskes et Kraay (1986) et Zapata *et al.* (1987) car les colonnes actuelles sont plus efficaces qu'auparavant pour la séparation des composés polaires (Paerl et Millie, 1991). L'acétate d'ammonium, utilisé comme tampon dans le solvant d'extraction et dans le solvant A, associé à une colonne moderne, permet d'aboutir à de très bonnes performances pour la séparation des produits polaires (Zapata *et al.*, 1987 ; Kraay *et al.*, 1992). Les performances de séparation de notre protocole sont parfois inférieures à celles du programme à trois solvants mais cependant, les pics des chlorophylles *c*₁ et *c*₂, bien qu'incomplètement séparés à la base, sont bien distincts. Lutéine et zéaxanthine ne sont pas toujours séparées complètement ; cependant leur quantification est possible.

Au niveau de la détection et de l'identification des pigments, notre équipement s'est avéré satisfaisant même s'il n'a pu atteindre les performances d'un détecteur à barrettes de diodes, système qui tend actuellement à se répandre, mais reste encore peu accessible.

Nous avons choisi pour la détection en fluorimétrie la longueur d'onde d'excitation de 430 nm. Cette longueur d'onde n'est pas optimale pour tous les pigments chlorophylliens mais elle permet de les détecter tous avec plus ou moins d'intensité (Mantoura et Llewellyn, 1983). Riaux-Gobin et Klein (1993) proposent le choix entre 400 et 440 nm. L'excitation à 407 nm mesurée à 670 nm conviendrait particulièrement bien aux phéopigments (Gieskes et Kraay, 1986).

En absorbance, nous avons remarqué que l'utilisation simultanée des deux absorbances, 436 et 450 nm, nous apportait des informations supplémentaires importantes pour l'identification des pics de caroténoïdes. S'il faut ne retenir qu'une longueur d'onde pour les pigments chlorophylliens et les caroténoïdes simultanément, 436 nm est recommandée par Gieskes et Kraay (1983a), Bidigare (1991), Wright *et al.* (1991). Mantoura et Llewellyn (1983) utilisent 440 nm. Par rapport à la longueur d'onde de 450 nm, 436 nm donne à notre avis de moins bons résultats pour les caroténoïdes et les chlorophylles *b* et *c* (*cf.* fig. 1). Pour ces études, la longueur d'onde de 450 nm est recommandée par différents auteurs (Bjerkeng *et al.*, 1988 ; Pennington *et al.*, 1988 ; Zapata et Garrido, 1991 ; Kraay *et al.*, 1992). Pour une approche particulière des phéopigments, les longueurs d'onde de 658 nm (Gieskes et Kraay, 1986) ou 405 nm (Wright *et al.*, 1991) sont parfois rete-

nues. Downs (1989), étudiant plus précisément ces pigments, utilise 410, 440 et 664 nm.

Au sujet des standards et de leur fabrication, il est à noter que parfois, comme le souligne Downs (1989), on recueille de si faibles quantités d'un pigment donné que l'étude en spectrophotométrie est impossible. C'est pourquoi l'on a recours à des comparaisons avec d'autres auteurs.

Quant aux coefficients spécifiques d'extinction, il n'existe pas encore, dans la littérature, de coefficients utilisables pour tous les pigments dans un même solvant. Les coefficients dans le méthanol sont malheureusement assez rares. Pour les caroténoïdes, l'acétone, l'éther de pétrole et l'éthanol sont les plus utilisés.

Notons que, comme nous ne pouvions séparer totalement les pics de Chl c_1 et c_2 , nous avons utilisé le coefficient $42,6 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour Chl $c_1 + c_2$ dans l'acétone à 630,9 nm, d'après Jeffrey (1972) repris par Bidigare (1991). Enfin, il est à remarquer que des erreurs de transcription se glissent dans les citations des auteurs (nature du solvant, pic à considérer, coefficients, etc.). Aussi est-il souvent utile de remonter « à la source ».

Sur les résultats

Grâce à l'utilisation simultanée de la détection en fluorescence d'une part, et en absorbance à deux longueurs d'onde, d'autre part, il nous a été possible d'identifier certains pics qui coéluent. Ainsi, par exemple, pour la Chl b et le β -carotène, nous avons ajouté à des extraits d'échantillons des extraits de standards éventuellement allomérisés (Chl b). En comparant les spectres aux trois longueurs d'onde nous avons pu acquérir une certitude sur la position de la Chl b et de ses allomères, souvent mêlés aux allomères de Chl a , fréquents dans les sédiments, et sur la place de la phéophytine a dans le chromatogramme (pic 29) par rapport au β -carotène (pics 30 et 32). La figure 3 représente les chromatogrammes d'absorbance à 436 nm de l'échantillon de vase de marais à *Spartina* correspondant à la figure 2B, avant (fig. 3A) et après (fig. 3B) adjonction de standards.

On remarque que, par rapport au phytoplancton, les sédiments renferment de nombreuses formes différentes de produits de dégradation des chlorophylles (cf. fig. 1A, fluorescence à 430 nm). Il en est de même pour les dérivés des caroténoïdes bien que ce sujet paraisse moins exploré sauf en ce qui concerne les transformations au cours de la digestion par les organismes brouteurs (Abele-Æschger et Theede, 1991 ; Abele-Æschger *et al.*, 1992).

On notera que, sur les sédiments, les chlorophyllides a et b et les phéophytines a et b sont quantitativement beaucoup moins abondantes que les formes phéophorbides (Klein et Riaux-Gobin, 1991), produits d'une dégradation plus poussée (biodépôts, diagenèse). C'est ce que nous avons déjà observé sur des sédiments du Golfe de Fos (France ; Plante-Cuny *et al.*, 1993). Notre protocole nous a permis de séparer nettement la chlorophyllide a , six formes différentes de phéophorbides a , trois formes de phéophytine b et deux de phéophytine a , une phéoporphyrine et un phytol-chlorophylle c . Ces différentes formes de produits de dégradation peuvent être, par exemple, liées à différentes formes de broutage (Bianchi *et al.*, 1988 ; Harmelin-Vivien *et al.*, 1992).

Dans le domaine phytoplanctonique, beaucoup d'auteurs utilisent la présence ou l'absence de pigments, les combinaisons de pigments, ou des rapports entre pigments, pour en faire des « pigment signatures » ou « fingerprints » ou « biomarkers » de la composition taxinomique du phytoplancton, (Wright et Jeffrey, 1987 ; Williams et Claustre, 1991 ; Barlow *et al.*, 1993). De telles déductions risquent d'être plus difficiles dans le domaine benthique car les peuplements microphytiques vivants y sont souvent moins bien connus et les débris de végétaux allochtones, décomposés ou non, enrichissent les chromatogrammes des pigments de la flore autochtone (débris de macroalgues ou phanérogames, cf. Bianchi et Findley, 1990 ; Bianchi *et al.*, 1993 ; Abele-Æschger et Schramm, 1989 ; Levinton et McCartney, 1991). Cependant quelques auteurs ont abordé ce sujet (Riaux-Gobin *et al.*, 1987 ; Klein et Riaux-Gobin, 1991) et signalent la « signature » de diatomées, chlorophycées, euglénophycées et cryptophycées.

CONCLUSION

Le protocole présenté ici donne de bons résultats sur des sédiments comportant simultanément des microphytes vivants, des cellules sénescents et des débris de macrophytes. Nous avons réussi à séparer et identifier 19 pigments chlorophylliens (dont dix phéophytines et phéophorbides), et dix caroténoïdes.

Nous pensons que ce protocole a prouvé son efficacité pour la caractérisation d'échantillons récoltés à la surface de sédiments situés dans la zone euphotique et qu'il permettra d'approfondir la connaissance des peuplements microphytiques présents sur de tels sédiments en association avec des observations microscopiques. En effet, la signature de groupes taxinomiques tels que diatomées, cyanophycées, euglénophycées a été clairement établie, l'importance des pics de pigments caractérisant ces groupes ayant pu être mise en relation avec des observations au microscope. La question de la présence éventuelle de cryptophycées reste à valider par de nouvelles observations microscopiques à pratiquer éventuellement sur le vivant. L'abondance de débris de macrophytes a pu aussi être évaluée par le dosage de certains caroténoïdes.

En ce qui concerne les produits de dégradation des pigments, de nombreuses formes ont pu être séparées ; leur identification et leur quantification doit être poursuivie. De nouvelles perspectives de recherches, assez nettement différentes de celles qui concernent le phytoplancton, peuvent être envisagées.

Remerciements

Nous remercions G.W. Kraay pour l'initiation et l'aide à l'adaptation de son protocole analytique, les trois arbitres anonymes pour leurs critiques constructives et M. Travers pour la révision critique du manuscrit. Ce travail a été possible grâce à l'aide du programme de coopération franco-portugaise, du Programme National (français) d'Océanologie Côtière et du programme portugais STRIDE de la JNICT.

RÉFÉRENCES

- Abaychi J.K., J.P. Riley** (1979). The determination of phytoplankton pigments by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **107**, 1-11.
- Abele-Ëschger D.** (1991). Potential of some carotenoids in two recent sediments of Kiel bight as biogenic indicators of phytodetritus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **70**, 83-92.
- Abele-Ëschger D., W. Schramm** (1989). Carotenoids as biomarkers for macrophyte derived detrital material in a shallow coastal water ecosystem. *Topics in Mar. Biol.* **53**, 315-318.
- Abele-Ëschger D., H. Theede** (1991). Digestion of algal pigments by the common periwinkle *Littorina littorea* L. (Gastropoda). *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **147**, 177-184.
- Abele-Ëschger D., A. Szaniawska, H. Theede** (1992). Do pigments reflect the turnover of plant material in food chain studies? Analysis of plant pigments in the intestine of *Saduria (Mesidotea) entomon*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **81**, 43-49.
- Almeida P.R., F. Moreira, J.L. Costa, C.A. Assis, M.J. Costa** (1993). The feeding strategies of *Iliza ramada* (Risso, 1826) in fresh and brackish water in the River Tagus, Portugal. *J. Fish. Biol.* **42**, 95-107.
- Barlow R.G., Y. Collos, S.Y. Maestrini, S. Roy** (1990). Microphytobenthic pigments in a salt marsh pond determined by HPLC and spectrophotometry. *Mar. microb. Food Webs* **4**, 117-128.
- Barlow R.G., R.F.C. Mantoura, M.A. Gough, T.W. Fileman** (1993). Pigments signatures of the phytoplankton composition in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom. *Deep Sea Res. II*, **40**, 459-477.
- Bianchi T.S., S. Findlay** (1990). Plant pigments as tracers of emergent and submergent macrophytes from the Hudson river. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**, 492-494.
- Bianchi T.S., R. Dawson, P. Sawangwong** (1988). The effects of macrobenthic deposit-feeding on the degradation of chloropigments in sandy sediments. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **122**, 243-255.
- Bianchi T.S., S. Findlay, R. Dawson** (1993). Organic matter sources in the water column and sediments of the Hudson River Estuary : the use of plant pigments as tracers. *Estuar. coast Shelf Sci.* **36**, 359-376.
- Bianchi T.S., S. Findlay, D. Fontvieille** (1991). Experimental degradation of plant materials in Hudson river sediments. I. Heterotrophic transformations of plant pigments. *Biogeochemistry* **12**, 171-187.
- Bidigare R.R.** (1991). Analysis of algal chlorophylls and carotenoids. In: *Marine Particles : Analysis and characterization. Geophysical Monograph* 63. American Geophysical Union: 119-123.
- Bjerkeng B., J.A. Hangan, S. Liaaen-Jensen** (1988). Microalgal carotenoids and chemosystematics: updating the Prymnesiophyceae. *Biol. Oceanogr.* **6**, 271-278.
- Bjørnland T., S. Liaaen-Jensen** (1989). Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. pp. 37-61, in: J. Green, B.S.C. Leadbeater and W.L. Diver eds "The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives", Clarendon, Oxford, 37-60.
- Blanchard G., M.R. Plante-Cuny, A. Dinet, F.L. Samson, C. Gatje, I. Amadi** (1990). Comparison of techniques for the measurement of microphytobenthic chloropigments after cell isolation with Ludox H.S. *Mar. microb. Food Webs* **4**, 207-216.
- Brotas V., F. Catarino** (sous presse). Microphytobenthos Primary Production of Tagus Estuary intertidal flats (Portugal). *Neth. J. Aquat. Ecol.*
- Brotas V., T. Cabrita, A. Portugal, J. Serodio, F. Catarino** (1995). Spatio-temporal distribution of the microphytobenthic biomass in intertidal flats of Tagus estuary (Portugal). *Hydrobiologia* **300/301**, 93-104.
- Brown L.M., B.T. Hargrave, M.D. MacKinnon** (1981). Analysis of chlorophyll *a* in sediments by High Pressure Liquid Chromatography. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**, 205-214.
- Daemen E.A.M.J.** (1986). Comparison of methods for the determination of chlorophyll in estuarine sediments. *Neth. J. Sea Res.* **20**, 21-28.
- Davies B.H.** (1976). Carotenoids. Pp. 38-165, in: Goodwin T.W. (ed) "Chemistry and biochemistry of plant pigments", 2, Academic Press, London.
- Downs J.N.** (1989). Implications of the phaeopigment, carbon and nitrogen content of sinking particles for the origin of export production. Ph. D. Thesis, University of Washington, 196 p.
- Foppen F.H.** (1971). Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.* **14**, 133-298.
- Furlong E.T., R. Carpenter** (1988). Pigment preservation and remineralization in oxic coastal marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **52**, 87-99.
- Garside C., J.P. Riley** (1968). The absorptivity of fucoxanthin. *Deep Sea Res.* **15**, 627.
- Gieskes W.W., G.W. Kraay** (1983a). Unknown chlorophyll *a* derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.* **28**, 757-766.
- Gieskes W.W., G.W. Kraay** (1983b). Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis of pigments. *Mar. Biol.* **75**, 179-185.
- Gieskes W.W., G.W. Kraay** (1984). Phytoplankton, its pigments, and primary production at a central North Sea station in May, July and September 1981. *Neth. J. Sea Res.* **18**, 51-70.
- Gieskes W.W., G.W. Kraay** (1986). Analysis of phytoplankton pigments by HPLC before, during and after mass occurrence of the microflagellate *Corymbellus aureus* during the spring bloom in the open northern North Sea in 1983. *Mar. Biol.* **92**, 45-52.
- Gieskes W.W., G.W. Kraay, A. Nontji, D. Setiapermana, Sutomo** (1988). Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the Banda Sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints. *Neth. J. Sea Res.* **22**, 123-127.
- Goodwin T.W.** (1955). Carotenoids. pp. 272-311, in: Paech K. and Tracey M.V. (eds) "Modern Methods of Plant Analysis" 3, Berlin, Springer-Verlag.
- Harmelin-Vivien M.L., M. Peyrot-Clausade, J.-C. Romano** (1992). Transformation of algal turf by echinoid and scarid fishes on French Polynesian coral reefs. *Coral Reefs* **11**, 45-50.
- Hurley J.P., D.E. Armstrong** (1990). Fluxes and transformations of aquatic pigments in Lake Mendota, Wisconsin. *Limnol. Oceanogr.* **35**, 384-398.
- Jeffrey S.W.** (1961). Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochem. J.* **80**, 336-342.
- Jeffrey S.W.** (1968). Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Bioch. Biophys. Acta* **162**, 271-285.
- Jeffrey S.W.** (1972). Preparation and some properties of crystalline chlorophyll *c*₁ and *c*₂ from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta* **279**, 15-33.
- Jeffrey S.W.** (1974). Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin layer chromatography. *Mar. Biol.* **26**, 101-110.
- Jeffrey S.W., F.T. Haxo** (1968). Photosynthetic pigments of dinoflagellates (zooxanthellae) from corals and clams. *Biol. Bull.* **135**, 149-165.
- Jeffrey S.W., G.F. Humphrey** (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **167**, 191-194.

- Jeffrey S.W., K. Shibata (1969). Some spectral characteristics of chlorophyll *c* from *Tridacna crocea* zooxanthellae. *Biol. Bull.* **136**, 54-62.
- Jensen A. (1966a). Algal carotenoids. V. Iso-fucoanthin- a rearrangement product of fucoxanthin. *Acta chem. Scand.* **20**, 1728-1730.
- Jensen A. (1966b). Carotenoids of Norwegian brown seaweeds and of seaweeds meals. *Norw. Inst. Seaweed Res., Rep.* **31**, 138 p. Tapir, Trondheim.
- Johansen J.E., W.A. Svec, S. Liaaen-Jensen, F.T. Haxo (1974). Carotenoids of Dinophyceae. *Phytochemistry* **13**, 2261-72.
- Keely B.J., R.G. Brereton (1986). Early chlorin diagenesis in a recent aquatic sediment. *Org. Geochem.* **10**, 975-980.
- King L.L., D.J. Repeta (1991). Novel phytopheophorbide steryl esters in Black Sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **55**, 2067-2074.
- Klein B., C. Riaux-Gobin (1991). Algal pigment diversity in coastal sediments from Kerguelen (sub-Antarctic Islands) reflecting local dominance of green algae, euglenoids and diatoms. *Polar Biol.* **11**, 439-448.
- Klein B., A. Sournia (1987). A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. II. Phytoplankton pigment composition studied by HPLC analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **37**, 265-275.
- Kraay G.W., M. Zapata, M.J.W. Veldhuis (1992). Separation of chlorophyll *c*₁, *c*₂, and *c*₃ of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance liquid chromatography. *J. Phycol.* **28**, 708-712.
- La Giraudière (de) I., P. Laborde, J.C. Romano (1989). HPLC determination of chlorophylls and breakdown products in surface microlayers. *Mar. Chem.* **26**, 189-204.
- Leavitt P.R., S.R. Carpenter (1990). Aphotic pigment degradation in the hypolimnion: implications for sedimentation studies and paleolimnology. *Limnol. Oceanogr.* **35**, 520-534.
- Levinton J.S., M. McCartney (1991). Use of photosynthetic pigments in sediments as a tracer for sources and fates of macrophyte organic matter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **78**, 87-96.
- Lorenzen C.J., J.N. Downs (1986). The specific absorption coefficients of chlorophyllide *a* and pheophorbide *a* in 90 % acetone, and comments on the fluorometric determination of chlorophyll and phaeopigments. *Limnol. Oceanogr.* **31**, 449-452.
- Lorenzen C.J., S.W. Jeffrey (1980). Determination of chlorophyll in seawater. Report of intercalibration tests. *UNESCO technical papers in marine science* **35**, 1-20.
- Mantoura R.F.C., C.A. Llewellyn (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica chim. Acta* **151**, 297-314.
- Marker A.F.H. (1977). Some problems arising from the estimation of chlorophyll *a* and pheophytin *a* in methanol. *Limnol. Oceanogr.* **22**, 578-579.
- Nelson J.R. (1986). Phytoplankton carotenoids as organic tracers in marine particulate organic matter. Ph. D. Thesis, University of California, San Diego, 309 p.
- Paerl H.W., D.F. Millie (1991). Evaluation of spectrophotometric, fluorometric and high performance liquid chromatographic methods for algal pigment determinations in aquatic ecosystems. A workshop report to the United States Environmental Protection Agency, 44 p.
- Pennington F., R.R.L. Guillard, S. Liaaen-Jensen (1988). Carotenoid distribution pattern in Bacillariophyceae (Diatoms). *Biochem. Syst. Ecol.* **16**, 7-8, 589-592.
- Plante-Cuny M.R., C. Barranguet, D. Bonin, C. Grenz (1993). Does chlorophyllide *a* reduce reliability of chlorophyll *a* measurements in marine coastal sediments? *Aquat. Sci.* **55**, 19-30.
- Plante R., M.R. Plante-Cuny, J.P. Reys (1986). Photosynthetic pigments of sandy sediments on the north Mediterranean coast: their spatial distribution and its effects on sampling strategies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **34**, 133-141.
- Plante R., J.P. Reys, M.R. Plante-Cuny (1985). Analyse spectrale, pigments chlorophylliens et rythmes sédimentaires. Un essai d'application. *J. Rech. océanogr.* **10**, 100-101.
- Renstrom B., G. Borch, O.M. Skulberg, S. Liaaen-Jensen (1981). Optical purity of (3S, 3'S)-astaxanthin from *Haematococcus fluvialis*. *Phytochemistry* **20**, 2561-4.
- Repeta D.J., R.B. Gagosian (1983). Carotenoid transformation products in the upwelled waters off the peruvian coast: suspended particulate matter, sediment trap material, and zooplankton fecal pellet analyses. *Advances in Organic Geochemistry* 1981, John Wiley and Sons, 380-388.
- Reys J.P., M.R. Plante-Cuny, R. Plante (1987). Sampling problems in the quantitative estimation of the microphytobenthos. C.E.C. - COST 647. *Coastal Benthic Ecology Report* 1985-1987, 174-180.
- Riaux-Gobin C., B. Klein (1993). Microphytobenthic biomass measurement using HPLC and conventional pigment analysis. pp. 369-376, in Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B. and Cole J.J. eds "Handbook of methods in aquatic microbial ecology", Lewis, Boca Raton, London.
- Riaux-Gobin C., C.A. Llewellyn, B. Klein (1987). Microphytobenthos from two subtidal sediments from North Brittany. II. Variations of pigment compositions and concentrations determined by HPLC and conventional techniques. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **40**, 275-283.
- Riemann B. (1978). Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural populations of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **23**, 1059-1066.
- Rowan K.S. (1989). *Photosynthetic pigments of algae.*, Cambridge University press, 334 p.
- Sartory D.P. 1985. The determination of algal chlorophyllous pigments by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Water Res.* **19**, 5, 605-610.
- Vernet M., C.J. Lorenzen (1987). The relative abundance of pheophorbide *a* and pheophytin *a* in temperate marine waters. *Limnol. Oceanogr.* **32**, 352-358.
- Vernon L.P. (1960). Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Anal. Chem.* **32**, 1144-1150.
- Wilhem C. (1987). Purification and identification of chlorophyll *c*₁ from the green alga *Mantoniella squamata*. *Biochem. Biophys. Acta* **892**, 23-29.
- Williams R., H. Claustre (1991). Photosynthetic pigments as biomarkers of phytoplankton populations and processes involved in the transformation of particulate organic matter at the Biotrans site (47° N, 20° W). *Deep-Sea Res.* **38**, 347-355.
- Wright S.W., S.W. Jeffrey (1987). Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **38**, 259-266.
- Wright S.W., S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, T. Bjørnland, D. Repeta, N. Welschmeyer (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**, 183-196.
- Yost R.W., L.S. Ettore, R.D. Conlon (1981). *Pratique de la chromatographie liquide*, Technique et Documentation, Paris, 259 p.
- Zapata M., J.L. Garrido (1991). Influence of injection conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Chromatographia* **31**, 11/12, 589-594.
- Zapata M., A.M. Ayala, J.M. Franco, J.L. Garrido (1987). Separation of chlorophylls and their degradation products in marine phytoplankton by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **23**, 1, 26-30.