CC000190

DOSAGE FLUORIMÉTRIQUE DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS : ESSAI DE REVUE DES MODALITES TECHNIQUES.

par

Jean PAGES

INTRODUCTION

La biomasse du phytoplancton est souvent déterminée par le biais de ses pigments chlorophylliens. La mesure de la concentration de ces pigments est déjà un procédé fort ancien, mais une rapide revue de la littérature fait cependant apparaître que, malgré divers essais de normalisation (SCOR-UNESCO 1966), les modalités techniques sont loin d'être uniformes.

Nous avons tenté de rassembler ici un certain nombre de détails techniques cités par divers auteurs, afin d'obtenir une vue générale. Ceci ne saurait être une revue exhaustive, et encore moins critique, venant après les travaux publiés dans les "Ergebnisse der Limnologie" (Beiheft 14, 1980). Il s'agit plut& d'un essai de mise au point, à usage interne, axé sur les détails matériels et prenant en compte quelques techniques récentes.

En outre, l'accent a été mis, volontairement, sur le dosage par fluorimétrie, plus adapté aux conditions de la haute mer et plus rapide ; la spectrophotométrie a été assez négligée.

1. FILTRATION

1.1. CHOIX DES FILTRES

Les membranes filtrantes permettent,, du moins en théorie. de séparer des tailles différentes d'organismes (Faust et Correl, 1976; Venrick et al., 1977). En fait, le choix de la marque est assez capital ; les membranes Nuclepore semblent seules fournir des perforations réellement calibrées (Sheldon, 1972). La plupart des membranes, cependant, colmatent assez vite et peuvent, par leur dissolution ultérieure, apporter des substances parasites.

Les filtres en fibre de verre ont des caractéristiques de filtration plus satisfaisantes (Lenz et Fritsche, 1980). Leurs fibres améliorent la

destruction des cellules dans le cas où le filtre est broyé dans le solvant. Leur porosité est assez bien contrôlée (Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980). Il semble cependant que les filtres Gelman type A soient inférieurs aux filtres Whatman GF/C (Herbland, comm. pers.),,

1.2. MODALITE DE LA FILTRATION

La dépression, lors de la filtration, ne doit, pas dépasser 1/10e d'atmosphère (Aaronson, 1978 ; Sharp, 1978).

L'addition d'une suspension de $MgCO_3$ a été recommandée (Strickland et Parsons, 1968). L'utilité, ou même les bienfaits, d'une telle procédure, sont assez discutés pourtant (Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980 b).

1.3. CONSERVATION DES FILTRES

Certains auteurs signalent une 'baisse sensible de la teneur en chlorophylle, tant dans les extraits que sur les filtres (Blasco, 1973), même si ceux-ci sont lyophilisés (Lenz et Fritsche, 1980). Inversement, d'autres essais n'ont pu mettre en évidence de pertes sur des filtres congelés encore humides et conservés à -20% (Holm Hansen et Riemann, 1980). Des filtres ont été conservés de façon satisfaisante (moins de 20 % de pertes) à -15°C, sur gel de silice, pendant 10 mois (Dufour, 1972).

2'. EXTRACTION

Plusieurs solvants ont été employés pour extraire les pigments. L'acétone est le plus fréquemment utilisée, mais d'autres solvants ont été recommandés.

2.1. ACETONE

Le mélange le plus fréquent est l'acétone à 10 % d'eau ("acétone'90 %"). Certains auteurs emploient des mélanges à 85 ou 80 %. Baudouin et Scoppa (1971) utilisent l'acétone 85 % saturée de $MgCO_3$.

Afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction, Stauffer et al. (1979) préconisent un mélange acétone-DMSO (a:a) (1). Le broyage des filtres a été recommandé (Strickland et Parsons, 1968) mais semble d'une efficacité discutable (Holm Hansen et Riemann, 1978) et peut même augmenter la variabilité (Dufour, 1972).

Un des principaux désavantages de l'acétone est sa faible efficacité d'extraction sur de nombreuses formes planctoniques.

---

(1) Le DMSO fluoresce fortement avec $\lambda_{exc} = 405$, $\lambda_{émi} = 525$ nm

2.2. METHANOL

Plusieurs auteurs recommandent, comme plus efficace, le méthanol, soit bouillant pendant 30 s (Heaney, 1978 ; Stauffer et al., 1979 ; Riemann, 1980), soit plus simplement à froid (Berland et al., 1970 ; Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980 a et b). Un broyage du filtre est alors inutile.

Le comportement des pigments dans le méthanol acidifié peut présenter quelques problèmes (Marker et al., 1980 a ; Nusch, 1980). Les vapeurs de méthanol sont assez toxiques (Nusch, 1980).

2.3. ETHANOL

L'éthanol bouillant est employé par quelques auteurs (Moed et Hallgraeff, 1978 ; Marker et al., 1980 a ; Nusch, 7980). Le bon comportement lors de l'acidification est intéressant, Le prix réduit est un argument supplémentaire.

3. ACIDIFICATION

Pour transformer les chlorophylles en phéopigments, divers agents peuvent être employés. La chaleur (100°C) a été employée (White et al., 1972). Plus fréquent, car plus simple, est l'emploi de l'acidification, par un acide minéral fort ou un acide organique,

3.1. MODALITES

3.1.1. HCl

La procédure la plus fréquente consiste à additionner un volume faible de HC1 dilué à l'échantillon. Les conditions opératoires sont souvent décrites avec une surprenante imprécision, tant sur le volume ("quelques gouttes") que sur la concentration ("dilué", 'de 0,5 à 1 N"). Holm Ransen et Riemann (1978) recommandent une concentration finale de $3,10^{-3}$M HCl, agissant 3min. Le pH intervient fortement, à la fois sur les spectres des différents pigments et sur la vitesse de transformation des chlorophylles : la chl b se transforme en phéo b 5 à 9 fois plus lentement que la chl a en phéo a (Holm Hansen et Riemann, 1978). Moed et Hallegraeff (1978) indiquent un pH souhaitable de 2,6 à 2,8. Pour un même volume d'HCl, le pouvoir tampon des difffrents solvants décroît dans le sens éthanol-méthanol-acétone 80 %-acétone 90 %.

Pour des dosages ultérieurs en spectrométrie, l'extrait sera neutralisé (Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980 b).

3.1.2. Acide oxalique

Afin de limiter les risques d'acidification excessive, certains auteurs préconisent L'emploi de l'acétone saturée d'acide oxalique, à raison de 2 à 5 % de l'échantillon (Baudouin et Scoppa, 1971). La réaction est beaucoup plus lente (Holm Hansen et al., 1965) ; il est possible que ce soit une raison du peu de succès de la méthode.

3.2. FACTEUR ACIDE ("ACID FACTOR", ACID RATIO"')

Dans le cas de la spectrophotométrie, la majorité des auteurs considèrent que le facteur acide, rapports des absorptions avant et après acidification, a une valeur constante de 1,7 pour la chl a observée à 665 nm.

Le rapport des fluorescences avant et après acidification (F_o/F_a) varie en fonction de nombreux facteurs :

- Modalité de l'acidification (voir plus haut) : le temps joue un, rôle prépondérant dans le cas des acides faibles ;
- Pourcentage d'eau dans l'acétone (Neveux, 1976) ; cet effet est probablement lié au pH (Moed et Hallegraeff, 1978). Le facteur acide diminue quand le pourcentage d'eau augmente :
- Longueur d'onde de l'excitation, à largeur de bande constant (Saijo et Nishizawa, 1969) ;
- Largeur de bande de la lumière d'excitation (Baudouin et Scoppa, 1971) ;
- Rature des filtres secondaires et du photo-multiplicateur (Neveux, 1976).

L'interaction de ces différents facteurs explique les chiffres extrêmement variables apparaissant dans les publications , puisque les conditions expérimentales sont pour le moins variables, et parfois non contrôlables. Le facteur acide diffère, de plus, suivant le pigment considéré. Les valeurs varient ainsi entre 0,9 et plus de 11, suivant les conditions (tabl. I).

4. MESURES PAR FLUORIMETRIE

4.1. CARACTERISTIQUES OPTIQUES DES PIGMENTS

Les longueurs d'onde d'absorption (excitation) et d'émission maximum sont variables selon les pigments considérés. Ainsi, Baudouin et Scoppa (1971) relèvent un spectre de différence entre chl a et phéo a avec un maximum à 433 nm ; le "ratio spectrum" de ces deux pigments a un maximum à environ 438 nm.

Pour les divers pigments principaux, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont assez différentes suivant les auteurs (tabl. II).

Les fluorescences ont des intensités relatives variables. En outre, le signal donné par 1 $\mu M.l^{-1}$ d'un pigment donné est fonction de la longueur d'onde d'excitation (White et al., 1972).

4.2. MATERIEL

Les problèmes purement techniques de matériel sont souvent totalement négligés? ou du moins fort peu mentionnés. La rigueur semble faire souvent défaut quant aux conditions expérimentales (temps, volumes, pH, etc), nous l'avons déjà vu. Peu d'efforts sont faits, également, en vue d'améliorer les techniques et le matériel et des publications relevant des détails importants ont été négligées au profit, de routines bien établies mais personnelles.

Le fluorimètre le plus employé est 'Jc Turner 111, équipé de divers accessoires. L'emploi de spectrofluorimètres est' exceptionnel en routine de terrain.

4.2.1. Lampes

- F4T4 BL (Strickland et Parsons, 1968), lampe UV à vapeur de Hg, donc spectre de lignes ;
- F4T5B, qui a une émission continue (d'après le constructeur) et non un pie (Neveux, 1976);
- Hanovia xenon, 150 W (Baudouin et Scoppa, 1971). On peut remarquer que la puissance totale du Turner 111 est de 120 W (Operating manual).
- Kulandaivelu et Daniell (1980) indiquent un optimum de 10 $W.m^{-2}$ pour l'excitation.

4.2.2. Photomultiplicateur

- RCA 931 A sur les anciens Turner 111 ;
- R 136 Hamamatsu, 15 fois plus senible que le précédent dans le rouge (Neveux, 1976) ;
- R 446 Hamamatsu, plus sensible encore (Baudouin et Scoppa, 1971). Installé en usine sur les modèles actuels Turner Ill-003 et 111-004 ;
- R 456 Hamamatsu (Baudouin et Scoppa, 1971) ;
- R 375 Hamamatsu (Kulandaivelu et Daniell, 1980).

4.2.3. Filtres optiques

Il semble que les publications montrant l'importance du choix des longueurs d'onde, et de leur précision, n'aient guère eu d'écho. Les filtres interférentiels semblent rarement employés, bien que nettement préférables quant à la définition et à l'étroitesse de leur bande passante. Ils sont plus chers que les filtres d'absorption (600 FF ou 120 US$ contre 200 FF).

4.2.3.1. Filtres primaires

- CS 5-60 Corning (Turner 110-992), le plus employé ; maximum à 420 nm (Blasco, 1973) ou 425 nm (Heaney, 1978) ;
- CS 5-62 (Corning ?), maximum à 402 nm (White et al., 1972) ;
- cs 5-74 " , maximum à 44.2 nm (White at al., 1972) ;
- cs 5-75 " , maximum à 465 nm (mite et al., 1972) ;
- Corning 5113, maximum à 400-460 nm (Kulandaivelu et Daniell) ;
- Corning 5543 ? (Slovacek et Hannan, 1977) ;
- Wratten 47 B, équivalent au CS 5-60 (Strickland et Parsons).

4.2.3.2. Filtres secondaires

- CS 2-64 (Turner 110-921), filtre d'arrêt :
. arrêt à 640, maximum à 675 nm (Blasco, 1973),
. [illegible] 645, maximum à 687 nm (Heaney, 1978),
. arrêt à 650 environ (Holm Hansen et al., 1965),
- cs 2-60:
. arrêt à 630 (Holm Hansen et al., 1965) ou 599 nm (White et al., 1972) ·
- Wratten 25 :
. arrêt à 600 nm environ (Holm Hansen et al., 1965), moins étroit que CS 2-64 (Tunzi et al., 1974).
- (cs 2-60 + B&L (1) 680) maximum à 680 nm (White et al., 1972) ;
- (cs 2-60 + B&L (650) maximum à 653 nm (White et al., 1972) ;

---

(1) B&L : Bausch & Lomb.

- (Cs 2-64 + Wratten 70)
  arrêt à 660 nm (Loftus et Carpenter, 1971)
- (CS 2-59 + Corion 6509 (1))
  maximum à 650 nm (Loftus et Carpenter, 1971)
- (CS 2-62 + Corion 6217 (1))
  maximum à 620 nm (Loftus et Carpenter, 1971)
- Corning 2418
  ? (Slovacek et Hannan, 1977)
- Schott ? ?
  maximum à 690 nm (Kulandaivelu et Daniell, 1980)

..4.2.4.. Cuvettes

La forme des cuvettes employées n'est généralement pas mentionnée. Turner fournit des cuvettes cylindriques. Une cuvette rectangulaire est employée par Kulandaivelu et Daniell (1980).

4.2.5. Emploi du fluorimètre

Bien que de nombreux fluorimètres soient remarquablement stables dans le temps (Dufour, comm. pers.), plusieurs auteurs recommandent des recalibrations périodiques par le sulfate de quinine en solution dans H_2SO_4 0,1 N à des concentrations variables (Loftus et Carpenter, 1971 ; Slovacek et Hannan, 1977). Stewart et Wetzel (1980) indiquent une lecture de 40, en échelle 10 X, pour 15 $\mu g.l^{-1}$ de quinine.

Une recalibration est aussi possible par de la chlorophylle a pure (réf. C5753 chez Sigma Chemical Company, POB 14508, St-Louis, 63172, USA).

4.3. MESURES EN FLUORIMETRIE

4.3.1. Mesures sur les extraits

Dans la plupart des cas, une seule longueur d'onde est utilisée à l'excitation, une autre à la lecture. Des interférences peuvent apparaître, surtout par la chl b (Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Rai, 1980). Il est possible de travailler à plusieurs longueurs d'onde pour éviter ces interférences.

Monochromatique

Si T est le facteur acide, déterminé préalablement dans les mêmes conditions expérimentales, on a :

$$\text{chl } a = \alpha.(T/(T-1)).(F_o - F_a)$$

$$\text{phéo } a = \alpha.(T/(T-1)).(T.F_a - F_o)$$

avec un facteur constant α regroupant toutes les caractéristiques de l'appareillage. Le facteur α devra aussi être déterminé expérimentalement (Holm Hansen et al., 1965 ; Strickland et Parsons, 1968 ; Loftus et Carpenter, 1971).

Les équations ci-dessus présupposent l'absence de chl b, dont la pré-

(1) Il est à remarquer que ces deux références n'existent pas dans le catalogue Corion 1979.

sence entraînera une sur-estimation de la phéo a (Marker et al., 1980 b). Les différences de vitesse: de transformation des chl a et b (Holm Hansen et Riemann, 1980) n'ont pas été utilisées, à notre connaissance, pour distinguer *entre les* deux chlorophylles.

Polychromatique :

Les longueurs d'onde différentes d'excitation et d'émission maximum des divers pigments peuvent permettre de les distinguer. Quelques hypothèses doivent être faites, entre autres que les divers composants du mélange fluorescent indépendamment et que la combinaison de leur réaction est linéaire.

- A l'excitation (White et al., 1972) :

. en l'absence de phéopigments :

$$\text{chl a} = 0{,}733.F_{405} - 0{,}029.F_{460}$$

$$\text{chl b} = 0{,}292.F_{450} - 0{,}131.F_{405}$$

. en présence de phéopigments, avec Δ la variation de F après acidification, et Fa la fluorescence après acidifidation :

$$\text{chl a} = 1{,}46.\Delta_{440} + 0{,}013.\Delta_{460}$$

$$\text{chl b} = 0{,}43.\Delta_{460} - 0{,}33.\Delta_{440}$$

$$\text{phéo a} = 0{,}70.F_{a405} - 0{,}23.F_{a440}$$

$$\text{phéo b} = ,81.F_{a440} - 0{,}04.F_{a405}$$

- A l'émission (Loftus et Carpenter, 1971) :

$$\text{chl a} = 0{,}110.\Delta_{660} - 0{,}109.\Delta_{650} + 0{,}110.\Delta_{620}$$

$$\text{chl b} = 0{,}052.\Delta_{660} - 0{,}286.\Delta_{650} + 0{,}310.\Delta_{620}$$

$$\text{chl c} = -0{,}012.\Delta_{660} + 0{,}036.\Delta_{650} + 0{,}265.\Delta_{620}$$

4.3.2. Mesures in vivo

La concentration de chlorophylle (mesurée par spectrophotométrie, ou par fluorimétrie sur les extraits) ne présente pas une relation linéaire avec la fluorescence in vivo ("IVF").

Un prunier facteur est instrumental. Neveux (1976) relève une saturation de L'appareillage, Une telle saturation, due à l'instrumentation autant qu'à l'auto-absorption par le pigment même, apparaît aussi sur des extraits au-delà de 100 $\mu g.l^{-1}$ (Dufour, comm. pers.). Strickland (1968) observe une loi exponentielle entre IVF et chl, et recommande de ne pas utiliser l'échelle 1X. Thomas (1970) obtient une réponse linéaire mais ne précise pas la marque. Kulandaivelu et Daniell (1980) indiquent un maximum mesurable de 500 $\mu g.l^{-1}$.

Dans la plupart des cas in situ, la relation est cependant linéaire dans *une* même masse d'eau entre IVF et chlorophylle (Blasco, 1973 ; Neveux, 1976 : Herbland et Voituriez; 1977) et on peut écrire :

$$\text{chl} = K.(\text{IVF})$$

Ce coefficient de proportionalité, K, varie de 1,1 (Heaney, 1978) à 7,6 (Tunzi et al., 1974) en fonction de nombreux facteurs, K diminue quand la profondeur de la thermocline augmente (Herbland et Voituriez, 1977) ; l'espèce dominante joue un rôle (Striskland, 1968 ; Slovaeck et Hannan, 1977). L'état physiologique semble *jouer* un rôle primordial, par exemple déficience en N ou P (Kiefer, 1973 a et b ; Slovaeek et Hannan, 1977) ou taux de crois-

sance in situ (Heaney, 1978) ou in vitro (Dufour, comm. pers,,). Le "fluorescence number" (Kiefer, 1973.a) varie très fortement avec la lumière (Heaney, 1978). La photoinhibition se manifeste nettement (Kiefer, 1973 b ; Heaney, 1978) à des intensités lumineuses faibles. Son mécanisme est double (Kiefer, 1973 a ; Barris et Piccinin, 1977).

La mesure de la IVF ne résoud donc pas le problème de la détermination de la biomasse planctonique. En outre, de nombreux travaux effectues sur la IVF ne tiennent pas compte de la fluorescence dissoute, dont l'importance n'est pas négligeable parfois (Herbland et Voituriez, 1977 ; Heaney, 1978 ; Cullen et Renger, 1979). Suivant le type de filtre employé, des débris cellulaires ou des cellules de petite taille peuvent passer dans le filtrat (Herbland, comm. pers.) et entraîner une sur-évaluation sérieuse de la fluorescence dissoute.

4.3.3. Emploi de la DCMU

Les variations vues ci-dessus du "fluorescence number" K correspondent à un rendement de luorescence ("fluorescence yield") variable.

Ce rendement est fonction inverse du taux de transport d'électrons pour la photosynthèse (Kiefer., 1973 a) : le rendement de fluorescence est en compétition avec le rendement chimique (Butler, 1966). Une mesure fiable de la chlorophylle par IVF implique un découplage, par blocage chimique in vivo (Duysens et Sweers, 1963), qui équivaut au découplage réalisé, autrement, par l'extraction acétonique. La DCMU (1) réalise ce blocage au niveau de la réaction de Hill (Fleischhacker et Senger, 1978).

Les concentrations finales réalisées sont variables : 10^{-5}M (Fleischhacker et Senger, 1978 ; Samuelson et al., 1978 ; Kulandaivelu et Daniell, 1980), 3.10^{-6}M (Cullen et Renger, 1979), 3 à 10. 10^{-6}M (Slovacek et Hannan, 1977). Les délais de réaction, et d'observation, varient de 30 s (Cullen et Renger, 1979 ; Kulandaivelu et Daniell, 1980) à 10 min (Samuelson et al., 1978). La production d'O_2 est totalement stoppée après 2,5 min même sur des formes cuirassées (Slovacek et Hannan, 1977). Des délais de 4 à 14 s sont probablement insuffisants., et expliqueraient certains résultats décevants in situ (Roy et Legendre, 1980).

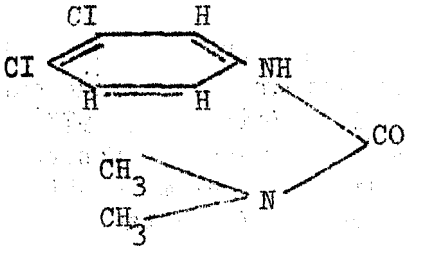
La fluorescence est mesurée sans DCMU (F_N) et avec DCMU (F_D). On calcule,,, soit le rapport F_D/F_N (Roy et Legendre, 1980), soit un "fluorescence response index", FRI :

$$FRI = (F_D - F_N)/F_D$$

Une valeur nulle de FRI, correspondant à une absence d'effet de la DCMU, indique une capacité photosynthétique nulle.

---

(1) DCMU : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthyl-urée



fabriquée par K & K
vendue par O.S.I. (154 FF/100g)
ou Touzart et Matignon

Résultats :

FD augmente de façon asymptotique avec le temps de réaction (Samuelson atl., 1978'). La fluorescence double (FRI = 0,5) après 30 à 60 s tant sur des cultures que sur des populations naturelles. In, situ, le maximum de FRI (0,6) est observé à la profondeur du maximum de chlorophylle (Cullen et Renger, 1979). FRI augmente avec la profondeur (Roy et Legendre, 1980).

Plusieurs états physiologiques extrêmes ont été réalisés sur des cultures : forte carence en N, P, CO_2, empoisonnement par $HgCl_2$ etc... Quelles que soient les espèces et les conditions, il existe une relation entre F_D et la concentration de chl a mesurée sur les extraits (Slovacek et Hannan, 1977).

On observe d'autre part une relation étroite entre FRI et la photosynthèse, *mesurée* par exemple par ^{14}C (Samuelson et al., 1978). D'autres exemples d'utilisation de la DCMU aboutissent à des conclusions analogues quant à l'intérêt de cette méthode (Halmann et Elgavish, 1979 ; Kulandaivelu et Daniell, 1980).

5. MESURES PAR SFECTROPHOTOMETRIE

La spectrophotométrie est généralement considérée comme la méthode de référence pour des mesures par fluorimétrie. Nous avons vu que l'emploi de la DCMU permet des déterminations absolues ; d'autre part, la calibration du fluorimètre peut se faire sur de la chlorophylle pure, Pour ces raisons? la spectrophotométrie perd une partie de son importance, et ne sera traitée ici que rapidement, pour mémoire.

Les corrections de turbidité des extraits sont basées généralement sur une lecture à 750 nm (Moss, 1967 ; Samuelson et al., 1978), encore que d'autres longueurs d'onde aient été employées : 730 nm (Jensen, 1978) ou 720 nm.

5.1. MESURES MONOCHROMATIQUES

Pour la chlorophylle a, 'les coefficients d'absorption spécifique sont assez bien connus (Marker et al., 1980 b). A 665 nm, on a selon le solvant employé :

- acétone 90 % 89
- éthanol 90 % 87
- méthanol 77
- diéthyl éther 100

Pour l'acétone 90 %, on aura ainsi l'équation (Jensen, 1978):

$$\text{chl a} = 11{,}23.(D_{665} - D_{730})$$

D'autres auteurs utilisent des valeurs quelque peu différentes : 11,9 chez Talling et Driver (1963) par exemple.

La détermination des phéopigments se fait par lecture à 665 nm avant (D_o) et après (D_a) acidification. Diverses équations sont données, analogues mais non identiques, par divers auteurs. En négligeant les facteurs de volumes d'extrait et d'échantillon, on trouve ainsi :

$$\left.\begin{array}{l}\text{chl a} = 26{,}7(D_o - D_a) \\ \text{phéo} = 26{,}7(1{,}7.D_a - D_o)\end{array}\right\} \text{Strickland et Parsons, 1968}$$

5.2. MESURES A DEUX LONGUEURS D'ONDE

Différents pigments peuvent être déterminés en utilisant les différents maximums d'absorption :

$$\text{chl } \underline{a} = 11{,}6.D_{665} - 1{,}3.D_{645}$$
$$\text{chl } \underline{b} = 19{,}1.D_{645} - 4{,}7.D_{665}$$ - Talling, 19

et

$$\text{chl}(c_1 + c_2) = 24{,}36.D_{630} - 3{,}73.D_{664}$$ (Jensen, 1978)

5.3. MESURES A TROIS LONGUEURS D'ONDE

Des lectures à trois longueurs d'onde permettent de déterminer les concentrations respectives de chl a, b et c. Les équations ne prennent cependant pas en compte les phéopigments correspondants et, de ce fait, surévaluent les chlorophylles (Marker et al., 1980 b).

Les coefficients, et les longueurs d'onde varient suivant les auteurs. Jensen (1978) donne les équations :

$$\text{chl a} = 11{,}85.D_{664} - 1{,}54.D_{647} - 0{,}08.D_{630}$$
$$\text{chl b} = 5{,}43.D_{664} + 21{,}03.D_{647} - 2{,}66.D_{630}$$
$$\text{chl c} = 1{,}67.D_{664} - 7{,}60.D_{647} + 24{,}52.D_{630}$$

Strickland et Parsons (1968) donnent, trois séries d'équations, de sources différentes, sans déterminer la valeur relative de ces équations, dont les, coefficients sont assez fortement différents.

BIBLIOGRAPHIE

BANNISTER (T.T.) et RICE (G.), 1968.- Parallel time courses of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. Biochim. biophys. Acta, 162 :555-580.

BAUDOUIN (M.F.) et SCOPPA (P.), 1971.- Fluorometric determination of chlorophyll a in the presence of pheopigments effect of the half-value width of the excitation beam. Mar. Biol., 10/1 : 66-69.

BLASCO (D.), 1973.- Estudio de las variaciones de la relacion fluorescencia in vivo/clorofila a, y su aplicacion en oceanografia. Influencia de la limitacion de diferentes nutsientes, efecto del dia y noche dependencia de la especia estudiada. Inv. Pesq., 37/3 533-556.

CULLEN (J.J.) et RENGER RENGER (E.H.), 1979.- Continuous measurement of the DCMU-induced fluorescence response of natural phytoplankton populations. Mar. Biol., 53/1 : 13-N.

DUFOUR (P,), 1972.- Contribution à la connaissance des possibilités et limites de la méthode de dosage des pigments du phytoplancton. ORSTOM, Doc. scient. Centre Pointe Noire, 24 : 1-25

EPPLEY (R.W.) et SHARP (J.H.), 1975.-Photosynthetic measurements in the Central North Pacific : the dark loss of carbon in 214-h incubations. Limnol. Oceanogr., 20/6 : 981-987.

FLEISCHHACKER (P.) et SENGER (H.), 1978.- Adaptation of the photosynthetic apparatus of Scenedesmus obliquus to strong and weak light conditions II : Differences in photochemical reactions, the photosyntetic electron transport and photosynthetic units. Physiol. Plant., 43 : 43-51.

HALMANN (M.) et ELGAVISH (A,), 1979 .- An 'indication to the role of intracellular phosphorus for the development of the dinoflagellate peridinium bloom in Lake Kinneret. Water Res., 13/7 : 585-588.

HARRIS (G.P.) et PICCININ (B.B.) , 1977.- Photosynthesis by natural phytoplankton populations. Arch. Hydrobiol., 80/4 : 405-457.

HEANEY (S.I.), 1978.- Some observations on the use of the in-vivo fluorescence technique to determine chlorophyll-a in natural populations and cultures of freshwater phytoplankton. Freshw. Biol., 8/2 : 115-126.

HERBLAND (A.) et VOITURIEZ (B.), 1977.- Relation chlorophylle a- fluorescence in vivo dans l'Atlantique tropical. Influence de la-structure hydrologique. Cah, ORSTOM, sér. Océanogr., 15/1 67-77.

HOLM HANSEN (0.) et RIEMANN (B.), 1978.- Chlorophyll a determination : improvements in methodology Oikos, 30 : 438-447.

HOLM HANSEN (O.), LORENZEN (C.), HOLMES (R.W.), STRICKLAND (J.D.H.), 1965.- Fluorometric determination of chlorophyll. J. Cons. int. Explor. Mer. 30/1 : 3-15.

JEFFREY (. .)et HUMPHREY (.), 1975 .- New cpectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c in higher plants, algae and natural phytoplankton, Biochem. Physiol . Pflanz., 167:191-194.

JENSEN (A.), 1978.-Chlorophylls and carotenoids, In: Handbook of phycological mcthods. Physiological and biochemical methods. Fd. by J.A. HELLEBUST and J.S. GRAIGIE. Cambrige University Press. 59-70.

KIEFER (D.A.), 1973 a.- Chlorophyll a fluorescence in marine centric diatoms : Response of chloroplasta to light and nutrient stress. Mar., Biol., 23/1 : 39-46.

KIEFER (D.A.), 1973 b.- Fluorescence properties of natural phytoplankton populations. Mar. Biol., 22/3 : 263-269.

KULANDAIVELU (G.) et DANIELL (II.), 1980.- Dichlorophenyl-dimethylurea (DCMU)-induced increase in chlorophyll a fluorescence intensity, An index of photosynthetic oxygen evolution in leaves, chloroplats and algae. Physiologia Pl., 48 : 385-388.

LARSON (R.A.) et ROCKWELL (A.L.), 1980.- Fluorescence spectra of water-soluble humic materiels and some potential precursors. Arch. Hydrobiol., 89/4 : 416-425.

LENZ (J.) et FRITSCHE (P.), 1980.- The estimation of chlorophyll a in water samples : a comparative study on ratention in a glass-fibre and membrane filter and on the reliability of two storage methods. Arch. Hydrobiol. Beih, Ergebn. Limnol., 14 : 46-51.

LOFTUS (M.E.) et CARPENTER (J.H.), 1971.- .A fluorimetric method for determining ehlorophylls a, b and c. J. mar. Res., 29 : 319-338.

LOFTUS (M.E.) et SELIGER (H.H.), 1975.- Some limitations of the in vivo fluorescence technique. Chesapeake Sci., 16 : 79-92.

LORENZEN (C.J.), 1966.- A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration, Deep Sea Res., 13 : 223-227.

MADIGAN (M.T.) et BROCK (T.D.), 1977.- Adaptation by hot spring phototrophs to reduced light intensities, Arch. Mirrobiol., 113(1/2) :111-120.

MAERKER (M.) et SZEKIELDA (K.H.), 1976.- Chlorophyll determination- in phytoplankton : Acomparison of in vivo fluorescence with spectrophotometric absorption, J. Cons, int. Explor. Mer., 36/3 : 217-219.

MARKER (A.F.H.), CROWTHER (C.A.), GUNN (R.J.M.), 1980.- Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry. Arch. Hydrobiol. Beih, Ergebn. Limnol., 14 : 52-69.

MARKER (A.F.H.), NUSCH (E.A.), RAI (H.), RIEMANN (B.), 1980.- The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods : Conclusions and recommendations. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 14 : 91-106.

MOED (J.R.) et HALLEGRAEFF (G.M.), 1978.- Some problems in the estimation of spectrophotometric measurements. Int. Revue ges Hydrobiol., 63/6 : 787-800.

MOSS (B.), 1967.- A spectrophotometric method for the estimation of percentage degradation of chlorophylls to phco--pigments in extracts of a algae. Limnol. Oceanogr., 12/2 : 335-340.

MOSS (B.), 1967.- .A note on the estimation of chlorophyll a in freshwater algal communities. Limnol. Oceanogr., 12/2 . 340-342.

NEVEUX (J.), 1976.- Dosage de la chlorophylle a e-t de la phéophytine a par fluorimétrie. Ann. Inst. océanogr., 52/2 : 165-174.

NUSCH (E.A.), 1980.- Comparison of different methods for chlorophyll and phaepigment determination. Arch. Hydrobiol., Beih. Ergebn. Limnol., 14 : 14-36.

PREZELIN (B.B.) et SWEENEY (B.M.), 1977.- Characterization of photosynthetic rythms in marine dinoflagellates. II - Photosynthesis - irradiance curves and in vivo chlorophyll a fluorescence. Pl. Physiol. (Lancaster), 60 : 388-392.

RAI (H.), 1980.- Some problems in determination of photosynthetic planktonic pigments and their decomposition products. Arch. Hydrobiol., Beih. Ergebn. Limnol., 14 : 3-13.

RIEMANN (B.), 1980.- A note on the use of methanol as an extraction solvent for chlorophyll a determination. Arch. Hydrobiol., Beih. Ergebn. Limnol 14 : 70-78.

ROY (S.) et LEGENDRE (L.), 1979.- DCMU-enhanced fluorescence as an index of in situ phytoplankton photosynthetic: activity. Can. J. Fish. aquatic. Sci,, 37/6 : 1028-1031.

SAIJO (Y;) et NISHIZAWA (S.), 1969.- Excitation spectra in the fluorometric determination of chlorophyll a and phaephytin a, Mer. Biol., 2/ : 135-136.

SAMUELSON (G.), OQUIST (G.), HALLDAL (P.), 1978.- The variable chlorophyll a fluorescence as a mesure of photosynthetic capacity in algae. Mitt. Internat. Verein. Limnol., 21 : 207-215.

SLOVACEK (R.E.) et HANNAN (P.J.), 1977.- In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll a. Limnol. Oceanogr., 22/5 : 919-925.

STAUFFER (R.E.), LEE (G.F.), ARMSTRONG (D.E.), 1979.- Estimating chlorophyll extraction biasss. J. Fish, Res. Board Can., 36/2 : 152-157.

STEWART (A.J.) et WETZEL (R.G.), 1980.- Fluorescence- absorbance ratios- a molecular-weight tracer of dissolved organic matter. Limnol., Oceanogr., 25/3 : 559-564.

STRICKLAND (J.D.H.), 1968.- Continuous measurement of in vivo chlorophyll : a precautionnary note. Deep-Sea Res., 15 : 225-227.

STRICKLAND (J.D.H.) et PARSON (T.R.), 1968.- A pratical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Board Can., 167 : 311 pp.

TALLING (J.F.) et DRIVER (D.), 1963.- Some problems in the estimation of chlorophyll in phytoplankton. Proc. Conf. prim. Prod. Meas., mar. Freshw. Hawaii, Aug. 21-Sep. 6, 1961. US Atomic Energy Comm., Div. Techn. Inf., ~ID-7633 (1963). 142-146.

TUNZI (M.G.), CHU (M.Y.), BAIN (R.C.Jr.), 1975.- In vivo fluorescence, extracted fluorescence and chlorophyll concentrations in algal mass measurements. Water Res., 8/9 : 623- 635,

WATSON (R.A.) et OSBORNE (P.L.), 1979.- An algal pigment ratio as an indicator of the nitrogen supply to phytoplankton in three Norfolk broads. Freshw. Biol., 9/6 : 585-594,

WHITE (R.C.), JONES (I.D.), GIBBS (E.), BUTLER (L.S.), 1972.- Fluorometric estimation of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in mixtures, Agric. Food Chem., 20/4 : 773-778.

WUN (C.K.), RHO (J.), WALKER (R.W.), LITSKY (W.), 1980.- A solvent partitionning procedure for the separation of chlorophylls from their degradation products and carotenoid pigments. Hydrobiologia, 71/3 : 289-293.

YENTSCH (C.S.) et MENZEL (D.W.), 1963.- A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaephytin by fluorescence. Deep-Sea Res., 10 : 227-231,

TABLEAU I .- Valeur du facteur acide

	chl a	Réf.*
2,2	valeur moyenne	(1)
1,7	acide oxalique, 3 min	(2)
6,0 12,8	excitation à 445 nm excitation à 438 nm extrapolé à largeur de bande nulle	(3)
0,9-3,0	suivant acide employé et temps	(4)
1,42	avec photomultiplicateur R 1 36	(5)
3,07		(6)
2,0-11,5	excitation entre 430 et 450 nm, largeur de bande 10 nm	(7)
	chl b	
0,42		(5)
0,5		(6)
	chl c	
1,73	fi.1 tre	(5)
2,4 5,8	fi3 tre. CC 2-64 filtre CC 2-60	(4)
14,1		(6)

TABLEAU II.- Caractéristiques optiques

	excitation	réf.*	émission	réf.*
chl a	432 430 445	(8) (7) (3)	674 676 670	(8) (6) (9)
chl b	466	(8)	659 660	(8) (6)
chl c			642	(6)
pheo a	398 445	(8) (3)	676 676	(8) (6)
pheo b	437 410	(8) (7)	662 662	(8) (6)
pheo c			665	(6)

*REFERENCES POUR LES TABLEAUX

(1) : Strickland et Parsons, 1968
(2) : Yentsch et Menzel, 1963
(3) : Baudouin et Scoppa, 1971
(4) : Holm Hansen et al., 1965
(5) : Neveux, 1976
(6) : Loftus et Carpenter, 1971
(7) : Saijo et Nishizawa, 1969
(8) : White et al., 1971
(9) : Tunzi et, 1974