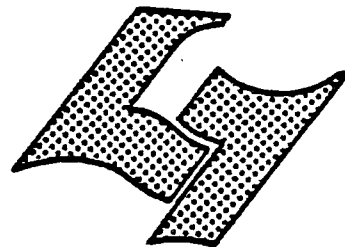


UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON-I
43, Boulevard du 11 Novembre 1918
69621 VILLEURBANNE



Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées

informatique documentaire



* NOTE DE SYNTHÈSE

Comparaison des méthodes
d'extraction et de dosage pour le calcul
des pigments chlorophylliens
phytoplanctoniques.

Revue de la bibliographie récente.

DESS

1981

11

A

AUTEUR : Michèle SAINT-DIZIER

DATE : 11 mai 1981

Je remercie Monsieur le Professeur JUGE et
Monsieur ROSTAND, Maître-Assistant, de m'avoir confié
ce sujet. Je leur sais gré de l'assistance qu'ils
m'ont apportée pour la sélection et l'acquisition
des documents et du soin avec lequel ils ont lu ce
texte.

- S O M M A I R E - ---

	page
Recherche des documents	1
1. Introduction	3
2. Méthodologie générale	5
2.1 Echantillonnage, stockage	
2.2 Choix des filtres	
2.3 Choix du solvant d'extraction	
3. Méthodes spectrophotométriques	9
3.1 Procèdures d'acidification	
3.2 Méthodes de calcul	
4. Méthodes fluorimétriques	16
4.1 Méthodes fluorimétriques après extraction des pigments	
4.2 Méthodes fluorimétriques "in vivo" (I.V.F)	
5. Méthodes chromatographiques	20
5.1 Chromatographie de partage	
5.2 Chromatographie en couche mince	
5.3 Chromatographie liquide haute pression (C.L.H.P.)	
Conclusion	30
Références citées	

RECHERCHE DES DOCUMENTS

Cette recherche s'est effectuée de trois façons :

- 1) Monsieur le Professeur Jugé m'a procuré deux articles de base : "Comparaison des méthodes spectrophotométriques pour le calcul des pigments phytoplanctoniques" de MILLERIOUX et "The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations" de MARKER, NUSH, RAI et RIEMANN, articles référencés sous les numéros 4 et 5.

Bien que ces articles ne fassent mention que des méthodes classiques de spectrophotométrie et de fluorimétrie à l'exclusion de toute technique chromatographique, le second m'a permis, par sa bibliographie fournie, de travailler sur les documents 8, 10, 11 et 17.

- 2) Consultation des numéros de la revue mensuelle "Aquatic sciences and Fisheries Abstracts .1." correspondant aux années 1979, 1980 et 1981.

Chaque numéro comporte environ deux à trois cents résumés d'articles suivis d'un index "Auteurs" et d'un index "Descripteurs".

Après de nombreuses recherches, il s'est avéré que les termes sélectionnant les documents correspondant au sujet sont : chlorophylls, phytoplancton et photosynthetic pigment.

- 3) Interrogation de la Base PASCAL par le serveur TELESYSTEMES dont le logiciel est MISTRAL.

Les interrogations portant sur le champ "Mots-Clés" des enregistrements des documents ont été conduites avec les mots-clés et les opérateurs suivants :

1ère interrogation :

étape 1 : pigment et photosynthèse

étape 2 : étape 1 et phytoplancton

2ème interrogation :

étape 1 : chlorophylle et phytoplancton

étape 2 : étape 1 et mesure

Ces interrogations m'ont permis de sélectionner deux documents portant les numéros de référence 6 et 14.

Ce peu de succès des interrogations de la base PASCAL s'explique par le caractère très particulier du sujet. Le domaine des Sciences Aquatiques est peu important dans cette base du moins sous l'angle du dosage des pigments qui nous préoccupe. Cette base est par contre d'une exploitation tout-à-fait satisfaisante pour tout ce qui concerne le domaine aquatique en relation avec l'aménagement de ports ou la construction d'ouvrage d'art par exemple.

1. INTRODUCTION

Le phytoplancton se définit comme le plancton de nature végétale, c'est-à-dire le plancton capable de synthétiser sa propre substance à partir de l'eau, du gaz carbonique et de l'énergie lumineuse. Il est donc à l'origine de la production en matière organique des mers et des eaux douces de même d'ailleurs que les algues benthiques fixées sur le fond ou tout autre support immergé. (1) (2)

Cette importance fait que, depuis longtemps, des études ont cherché à l'appréhender de façon quantitative en particulier par la mesure des pigments, principalement de la chlorophylle.

La méthode trichromatique a connu un développement considérable. Elle est basée sur le spectre d'absorption d'un extrait acétonique du phytoplancton et sur les mesures de la densité correspondant aux longueurs d'onde d'absorption maximale des chlorophylles a, b et c soit 665, 645 et 630 nm. (3)

La méthode a été perfectionnée en utilisant non plus l'absorption de la lumière par la chlorophylle mais sa fluorescence, c'est-à-dire sa capacité d'émettre de la lumière. Avec le développement de fluorimètres extrêmement sensibles (par exemple le fluorimètre Turner modèle 111), il est devenu possible d'utiliser cette méthode pour doser la chlorophylle "in situ". Celle-ci est alors mesurée directement dans l'eau, sans aucune extraction et l'analyse en continu est possible.

Une cause d'erreur importante cependant, dans l'utilisation de la chlorophylle pour évaluer la biomasse de phytoplancton est l'existence de phéophytine, forme de dégradation de la chlorophylle dont le spectre n'est que très légèrement décalé et qui interfère donc avec la chlorophylle proprement dite dans les mesures, même "in situ".

L'acidification de la chlorophylle provoque sa transformation en phéophytine et c'est sur cette propriété que s'appuient les méthodes corrigées trichromatiques ou de fluorescence où deux mesures d'absorption ou de fluorescence sont effectuées avant et après acidification.

Cependant, dans la plupart des échantillons, d'autres pigments sont présents, caroténoïdes et biliprotéines, qui peuvent entacher d'erreurs les techniques à un stade plus ou moins précoce.

Une précision plus importante est atteinte par séparation préliminaire des pigments initialement présents dans l'échantillon par différentes méthodes : séparation de phases par chromatographie en couche mince **et** par CLHP (chromatographie liquide haute pression).

2. METHODOLOGIE GENERALE

Le protocole de préparation des échantillons est constitué d'étapes similaires quelle que soit la technique employée.

2.1 Echantillonnage, stockage

Le volume de l'échantillon dépend de la concentration du phytoplancton dans le milieu. Il sera en général au moins égal à 1 litre et d'autant plus grand que la concentration en pigment est plus faible (4), (5). En particulier, le dosage spectrophotométrique d'échantillons marins (contenant une faible concentration de chlorophylle par rapport à celle des organismes en suspension) nécessite le filtrage de plusieurs litres d'eau pour obtenir une quantité de pigments mesurable et différencier les pigments de leurs produits de dégradation (6). Si la concentration des pigments est très faible, cette technique est à proscrire.

D'une façon générale, le volume de l'échantillon dépendra, outre de la concentration en pigment du milieu, de la sensibilité de la méthode - (sensibilité déterminée par traitement de pigments purs) -.

Les auteurs s'accordent à recommander le traitement des échantillons transportés au froid et à l'obscurité, dans les délais les plus courts. Il est cependant possible de garder les échantillons quelques heures au réfrigérateur.

Par contre, la conservation des échantillons après filtrage ne fait pas l'unanimité des auteurs. Ainsi, certains prétendent qu'il est possible de conserver les filtres humides congelés (5) tandis que d'autres conservent les filtres plusieurs jours à 4°C et à l'obscurité (6).

ABAYACHI et RILEY (7) conservent sans dommage les organismes filtrés pendant une semaine à -20°C dans des tubes fermés sous atmosphère d'azote, mais précisent qu'il n'est plus possible de différer l'opération dès que l'extraction des pigments est commencée. De même HOLM-HANSEN (8) a montré qu'il n'y a aucune perte de pigment (chlorophylle a ou phéophytine a) ni variation du rapport $\frac{\text{chlorophylle a}}{\text{phéophytine a}}$ dans des échantillons marins ou d'eau douce lorsqu'ils sont conservés 2 à 3 semaines à -20°C avant leur extraction. D'autres auteurs les conservent même plusieurs mois dans de telles conditions (9).

2.2 Choix des filtres

Les limnologues et les océanographes s'accordent maintenant à préférer les filtres en fibres de verre type GF/C Whatman (4), (5), (8) ou Gelman type A (9) par exemple, aux fibres à membrane.

Leur réserve antérieure semble avoir été due à la non-indication de la taille des pores sur ces filtres. Cette dimension a été déterminée électroniquement, grâce à un compteur de particules, et est de $0,7\ \mu\text{m}$ donc supérieure à celle des pores des filtres à membrane ($0,2$ à $0,5\ \mu\text{m}$). Mais des mesures comparatives n'ont pas permis de montrer une perte de chlorophylle à partir d'échantillons filtrés à travers des filtres à fibres de verre.

Par contre, ces filtres présentent de nombreux avantages sur les filtres à membrane :

- a) ils filtrent plus vite et se colmatent moins rapidement,
- b) les extraits à l'acétone ou au méthanol ne présentent aucune turbidité après centrifugation,
- c) ils aident par leur nature même à la rupture des cellules par broyage des filtres,
- d) ce choix facilite la standardisation des méthodes de dosage des variables chimiques.

L'emploi de carbonate de magnésium (MgCO_3) pendant la filtration est controversé. MILLERIOUX (4) ajoute une quantité constante de MgCO_3 en vue d'éviter la dégradation des pigments chlorophylliens en phéopigments pendant la préparation des échantillons (erreur pouvant atteindre 20 % (10)). D'autres auteurs n'ont pas constaté de différence significative dans le dosage de la chlorophylle a ou de la phéophytine a avec ou sans MgCO_3 dans des échantillons marins (seulement 8% de pigments en plus). De plus, ils pensent que l'addition de MgCO_3 provoquerait la formation d'agrégats algues- MgCO_3 , que ce soit en milieu marin ou d'eau douce, qui retiendraient la chlorophylle lors de l'extraction et seraient responsables d'une sous-estimation de la quantité de chlorophylle. La formation de ces agrégats serait spécifique de certaines espèces d'algues et cette sous-estimation de la chlorophylle a n'apparaîtrait que dans des échantillons concernant ces algues particulières (8).

2.3 Choix du solvant d'extraction

L'acétone à 90% a longtemps été le solvant le plus employé car la chloro. a * est plus stable dans l'acétone que dans le méthanol (4), (6).

Cependant, les auteurs se sont beaucoup attachés à perfectionner cette phase d'extraction car il est bien évident qu'elle est l'étape préalable obligatoire à tout dosage précis. Et il semble que l'unanimité se fasse sur la plus grande efficacité des alcools (5), (8), (10).

L'éthanol doit encore être testé mais semble être destiné à être largement adopté (5).

* Etant donné la fréquence d'apparition dans le texte, nous utiliserons chloro. pour chlorophylle.

Le méthanol est très utilisé :

a) le temps d'extraction est plus court,

b) l'extraction est plus efficace,

- ceci vérifié dans différents milieux : eaux douces lacustres en milieu euphotique dominé par des diatomées et des algues bleu-vert (11), phytoplancton marin côtier riche en diatomées mais dépourvu d'algues vertes et bleu-vert (8), phytoplancton riche en algues bleu-vert (8) -

c) de plus, le méthanol permet une séparation ultérieure plus efficace des chloro a et phéophytine a que l'acétone ce qui est essentiel sur des échantillons très riches en phéopigments (comme le périphyton des rivières, dont plus de la moitié des pigments sont des produits de dégradation).

Dans certaines techniques, l'extraction par le méthanol est amélioré en amenant le mélange extrait-méthanol à la température d'ébullition du méthanol pendant un temps très court 30 secondes (10), 2 minutes (11).

D'autres solvants sont employés dans les techniques citées en référence mais ils interviennent à un stade plus tardif pour la séparation physique des pigments avant tout dosage.

Tels sont :

l'hexane (12), (13)

l'éther sulfurique (14),

le diméthyl sulfoxide (14),

l'acétonitrile (13).

3. METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES

MARKER et coll. (5) insistent sur l'absolue nécessité d'ajuster fréquemment le spectrophotomètre au moyen de la ligne de l'hydrogène à 656,3 nm, en particulier dans le cas de mesures prolongées.

Les coefficients d'absorption spécifique des pigments dans un solvant donné demeurent controversés, et ceux retenus dans l'article de synthèse le plus récent sont, pour la chloro. a à 665 nm :

- . 89 dans l'acétone à 99%
- . 87 dans l'éthanol à 90%
- . 77 dans le méthanol absolu.

Les équations trichromatiques de Parsons et Strickland permettent la détermination de la chloro. a corrigée de l'interférence des chloro. b et c ainsi que le calcul des chloro. b et c respectivement (4).

Or, dans la plupart des cas, la teneur en chloro. b est de l'ordre de 10 à 20 % de celle de la chloro. a et entraîne une surestimation de 4 à 9% de la chloro. a après extraction dans le méthanol (5), ce qui est un maximum car, si on emploie comme solvant d'extraction l'acétone ou l'éthanol, les pics correspondant à l'absorption maximum de la chloro. b sont plus éloignés de ceux de la chloro. a - donc leur influence est moindre -.

Pour le moment, il ressort des différents travaux que la présence de la chloro. b dans une proportion de 10 à 20 % peut être considérée comme négligeable pour le calcul de la concentration en chloro. a (sauf pour les populations largement dominées par les algues vertes riches en chloro. b et où il sera indispensable de séparer les pigments avant toute mesure).

De la même façon sera négligée la teneur en chloro. c (sauf pour des populations riches en diatomées). En effet, pour une teneur en chloro. c égale à celle en chloro. a, ce qui semble être une condition maximale, la concentration en chloro. a mesurée est surestimée de 10 % (5).

3.1 Procédure d'acidification

Les équations traditionnelles de Parsons et Strickland (4) ou de SCOR-UNESCO (4) ne permettent pas de distinguer les chlorophylles physiologiquement actives de certains de leurs produits de dégradation. Aussi conduisent-elles à une surestimation de la chlorophylle d'autant plus importante que ces produits sont en plus grande quantité. Il est essentiel, dans l'optique d'une évaluation de la biomasse à partir des concentrations en chlorophylle, de corriger l'influence de la présence de ces produits. Ces formes dégradées ne présentent pas de réduction d'absorption contrairement à la chlorophylle active et cette simple propriété permet de doser la chlorophylle active dans des échantillons contenant des produits de dégradation. Aussi procède-t-on de façon classique à l'acidification des extraits.

Ainsi, selon RIEMANN (12), par comparaison des spectres d'absorption des extraits dans du méthanol à 100% de pigments de populations naturelles de diatomées avant et après acidification par $\text{HCl } 3.10^{-3}\text{M}$, le pic de la chloro. a à 665 nm décroît et se déplace à 662 nm (655 nm d'après HOLM-HANSEN (8)).

Ceci est le résultat de la dégradation immédiate de la chloro. a en phéophytine a. De même, le pic initialement à 440 nm migre à 410 nm.

Il est à remarquer que les changements de spectres varient pour une même concentration d'acide en fonction du solvant utilisé : acétone, méthanol ou éthanol. Ainsi, le même échantillon traité par l'acétone à 90% montre bien une réduction d'absorption à 665 nm mais pas de déplacement du pic d'absorption maximale.

D'autre part, toujours dans le but d'évaluer la biomasse phytoplanctonique à partir de la concentration en chloro. a, il faut s'assurer par chromatographie de la présence ou de l'absence de caroténoïdes. En effet, s'ils n'interfèrent pas dans les analyses spectrophotométriques au dessus de 600 nm, RIEMANN (15) a montré que les produits de dégradation des caroténoïdes époxydiques par l'acide absorbent la lumière à 665 et 675 nm donc influent sur le dosage des chlorophylles.

Pour que l'efficacité de l'acidification dans les dosages spectro- ou fluorimétriques soit parfaite, il faudrait (compte-tenu du fait qu'aucun changement n'intervient par acidification des solvants purs (13)) que quatre hypothèses soient vérifiées :

- 1° Le traitement de l'extrait chlorophyllien dans l'acétone ou le méthanol par des acides dilués doit entraîner une rapide dégradation des chlorophylles en phéophytines. Ceci est vérifié.
- 2° Aucun changement ultérieur ne doit intervenir dans l'extrait y compris aucune dégradation ultérieure des phéophytines, ce qui n'est vrai que lorsque la molarité de l'acide dans l'extrait acidifié n'est pas supérieure à $3 \cdot 10^{-3} M$. A des concentrations supérieures, on observe une aug-

mentation de l'absorption à 750 nm qui provient de la rapide dégradation par l'acide de la fucoxanthine, de la diadinoxanthine ou autres caroténoïdes époxydiques en groupements absorbant dans le rouge (600-700 nm). Or, ces caroténoïdes sont quantitativement importants dans les milieux riches en diatomées. Pour évaluer l'ampleur des erreurs de dosage qui seraient dues à la négligence de telles causes, RIEMANN (15) a réalisé des mélanges artificiels avec de la fucoxanthine pure présente selon des taux de 85% à 40% par rapport à la chloro. a pure (ce qui se rencontre couramment dans la nature). Quand ils sont traités par HCl à des concentrations supérieures à $10^{-3}M$, l'erreur dans le dosage de la concentration en chloro. a varie de 10 à 369% selon la force de l'acide (erreurs plus modérées dans l'acétone que dans le méthanol).

D'autre part, à des concentrations en HCl supérieures à $3.10^{-3}M$ se produit une dégradation des phéophytines en phéophorbides.

3° Les phéophytines doivent être les seuls produits de dégradation présents dans l'échantillon. Ceci n'est certainement jamais vérifié.

En effet, beaucoup de chercheurs notent la présence de chlorophyllides dans les échantillons marins, de phéophorbides dans les échantillons marins ou d'eau douce. Or, on sait en particulier que le coefficient d'absorption des phéophorbides a est voisin de celui des phéophytines a dans l'acétone à 90 %.

4° Aucune autre chlorophylle, phéopigment ou caroténoïde ne doit interférer lors du dosage de la chloro. a et de la phéophytine a. C'est à ce propos qu'interviennent les plus sévères objections, en particulier la dégradation de la chloro. b en phéophytine b. Pour minimiser la dégradation d'autres pigments que la chloro. a,

et outre la concentration de l'acide qui doit toujours être inférieure ou égale à $3.10^{-3}M$, il faut limiter l'action de l'acide dans le temps.

En effet, la dégradation de la chloro. b en phéophytine b est 5,5 à 9 fois plus lente pour d'autres auteurs (19). On peut ainsi observer les changements de spectre après acidification, 1 minute après addition d'acide sans neutraliser le milieu (15).

On peut, par contre, stopper l'acidification en neutralisant le milieu soit par la diméthylaniline (5) soit 3 minutes après l'acidification par du carbonate de magnésium.

3.2 Méthodes de calcul

L'équation de Lorenzen (1967) pour le calcul de la chloro. a par spectrophotométrie est la suivante :

$$C = (D.O.665_B - D.O. 665_A) \cdot (R/R_1) \cdot k \cdot \frac{V}{V.l}$$

où

C = concentration de la chloro. a en $mg.m^{-3}$

D.O.665_B = absorption de l'extrait à 665 nm avant acidification diminuée de la densité optique (D.O.) à 750 nm *

D.O.665_A = absorption de l'extrait à 665 nm après acidification diminuée de la D.O. à 750 nm *

R = $\frac{D.O.665_B}{D.O.665_A}$ mesuré quand les extraits ne contiennent pas de phéopigments (= 1,7)

* La densité optique mesurée à 750 nm est celle de la turbidité de l'extrait

- k = $1.10^3 \times \frac{1}{89}$
- V = volume d'eau filtrée en litres
- v = volume du solvant employé pour extraire l'échantillon en ml
- l = trajet optique en cm

Pour le calcul de la phéophytine a, l'équation est la suivante :

$$P = (D.O.665_A - D.O. 665_B) \cdot R/R-1 \cdot k \cdot \frac{v}{V \cdot l}$$

TETT, KELLY et HORNBERGER proposent d'autres équations (8) :

$$C = G (O - A) \quad (1)$$

$$P = 5 (HA - O) \quad (2)$$

où

C = concentration en chloro. a en mg.ml⁻¹

P = concentration en phéophytine a en mg.ml⁻¹

O = D.O. à 666 nm avant acidification corrigée de la D.O. à 750 nm

A = D.O. à 666 nm après acidification corrigée de la D.O. à 750 nm

G = $1/(E_c - E_p)$

H = E_c/E_p

E_c = coefficient d'extinction spécifique de la chloro. a à 666 nm

E_p = coefficient d'extinction spécifique de la phéophytine a à 666 nm

Si une molécule de chloro. a est dégradée en une molécule de phéophytine a, H (dit taux d'acidification) aura sa valeur maximale et les solutions contenant ces 2 pigments auront H compris entre 1 et H.

Cette équation a été corrigée ultérieurement par ses auteurs (17) car ils ont remarqué que le coefficient d'extinction spécifique de la phéophytine a dans le méthanol à 666 nm soit E_p variait en fonction du pH.

Les nouvelles équations proposées sont les suivantes :

$$C = G ((0 - A) - PJ) \quad (3)$$

$$P = G (HA - O) / (1 - GJ) \quad (4)$$

où

$$G = 20 \mu\text{g cm}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$H = 3,8$$

J étant la différence entre les valeurs du coefficient d'extinction de la phéophytine à 666 nm dans le méthanol neutre et acidifié. (Cette valeur est très variable selon la longueur d'onde, la teneur de l'extrait en eau et le pH final).

Dans le cas d'une forte concentration relative des phéophytines dans le milieu, les auteurs recommandent de ne faire les mesures après acidification qu'après avoir neutralisé le milieu et emploient alors les équations

(1) et (2) avec

$$G = 33 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ et}$$

$$H = 1,8.$$

Pour tenir compte de la présence d'autres produits de dégradation, ils les assimilent à un seul pigment présent dans l'extrait à une concentration B et dont le coefficient d'extinction serait E_b (indépendant du pH).

Ils utilisent alors les équations suivantes, les mesures des densités optiques post-acidification étant réalisées après neutralisation :

$$C = G (O - A) \quad \text{donc indépendante de } P$$

$$P = \frac{G ((AH - O) + BE_b (1 - H))}{1 - (GJ)}$$

4. METHODES FLUORIMETRIQUES

4.1 Méthodes fluorimétriques après extraction des pigments

Ces techniques ne pourront être employées que sur des extraits dépourvus de chloro. b car, après acidification, la bande d'émission de fluorescence de la phéophytine b recouvre celle de la phéophytine a. Dans les eaux lacustres où il y a de grandes quantités d'algues vertes riches en chloro. b, on ne pourra donc pas employer ces techniques. Pour les échantillons marins, il est bon de s'assurer préalablement à toute mesure de l'absence de cette chloro. b car, bien que ceci ait été longtemps admis comme certain, des auteurs ont trouvé dans les eaux du Pacifique Nord de grandes concentrations d'algues vertes.

Dans de telles conditions, on emploiera soit les techniques spectrophotométriques soit la fluorimétrie mais après séparation des pigments par chromatographie.

De même, le rapport chloro. c/chloro. a influe sur le dosage de la chloro. a par ces méthodes.

Enfin, on ne doit pas les utiliser pour des quantités de chloro. a supérieures à $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ au dessus de laquelle il n'y a pas de relation linéaire entre la fluorescence des extraits et la concentration en chloro. a (5).

4.2 Méthodes fluorimétriques "in vivo" (I.V.F.)

Quels sont les avantages de ces méthodes ?

Elles permettent un contrôle continu des milieux et elles sont plus rapides que les techniques d'extraction. Les principaux groupes d'algues ont des spectres d'émission de fluorescence pour la chloro. a nettement différents : les bandes correspondant aux longueurs d'onde d'excitation ou d'émission sont très séparées pour chaque groupe ce qui minimise les effets dus au recouvrement (fréquent en spectrophotométrie) (18). Enfin, la présence de produits de dégradation de la chlorophylle : phéophorbide et/ou chlorophyllide (19) ne pose pas de problème puisqu'ils ne sont que très faiblement fluorescents in vivo. Ceci est très important car, après extraction, les pigments dégradés sont hautement fluorescents et sources d'erreurs.

Mais cette méthode ne va pas sans présenter elle-même des problèmes.

Ainsi, si R est le rapport entre l'intensité de la fluorescence et la teneur en chloro. a, il faudrait que ce rapport soit constant pour que les mesures soient significatives. Or des variations de l'ordre de 1 à 10 sont observées dans les populations naturelles de phytoplancton (10).

Ces variations sont attribuées à l'influence de l'intensité du rayonnement, des différences de comportement des groupes d'algues pour une même intensité lumineuse et, à l'intérieur d'une même espèce, du stade physiologique en général, nutritif en particulier.

Il ressort de tout ceci que l'on ne doit employer ces techniques de fluorescence "in vivo" qu'avec précaution (notamment il est recommandé de faire des étalonnages fréquents sur chaque milieu par comparaison avec des mesures traditionnelles).

Néanmoins, cette méthode donne de bons résultats (avec cependant une dérogation pour les populations très riches en algues bleu-vert, ce qui est plus fréquent dans les eaux douces que dans les milieux marins).

On a, en particulier, étudié la différence de spectres d'excitation de la fluorescence de la chloro. a pour 3 groupes d'algues :

- 1) chez les algues vertes, les longueurs d'onde de 530 nm son inefficaces contrairement à celles de 450 nm. L'émission de la fluorescence se fait à $\lambda = 680$ nm. (Ces algues vertes sont dépourvues de tout complexe protéine-caroténoïde).
- 2) Les diatomées et les dinoflagellés ont des pics d'excitation à 450 et 530 nm et d'émission à 680 nm (présence dans ces algues de caroténoïdes (fluoxanthine)).
- 3) Les algues bleu-vert et les Cryptomonades ont des longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence de 450 nm et 490 nm (et de 560-570 nm pour l'émission (ces algues possèdent des biliprotéines)).

A partir de ces données (concernant les pigments accessoires présents dans les différents groupes d'algues), on peut aboutir à une estimation des populations relatives dans les différents milieux.

Pour des mesures quantitatives, et ainsi qu'il a été noté plus haut, le problème majeur pour relier la fluorescence de la chlorophylle "in vivo" à la biomasse chlorophyllienne est que la quantité de lumière émise par fluorescence par unité de chlorophylle varie beaucoup en fonction de l'intensité de la lumière et des contraintes nutritives.

Ainsi, certains auteurs préfèrent-ils utiliser les données fluorimétriques du rapport 530/450 nm pour comparer les surfaces de productivité des eaux (ou la pollution) (18).

D'autres auteurs pensent que, employées avec précaution et en connaissant les organismes présents et les comportements caractéristiques de leurs spectres de fluorescence, les mesures "in situ" permettent aussi un meilleur échantillonnage des populations phytoplanctoniques.

Toutes les réserves faites sur les méthodes spectro- et fluorimétriques justifient la séparation des pigments préalablement à toute mesure.

Seront abordées successivement les techniques de séparation liquide/liquide, de chromatographie en couche mince et de chromatographie liquide haute pression (C.L.H.P.)

5. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

5.1 Chromatographie de partage

WHITNEY et DARLEY (12) ajoutent de l'hexane à l'extrait pigmentaire acétonique. Ils obtiennent ainsi deux phases : l'épiphase avec les carotènes, les chlorophylles a et b et les phéophytines a et b dans l'hexane et l'hypophase acétonique avec la chlorophylle c, certains caroténoïdes et les chlorophyllides a et b ainsi que les phéophosbides a et b.

Ensuite, à partir de la couche hyperphasique, la chloro. a est dosée en présence de la phéophytine a par la méthode classique d'acidification très légèrement modifiée.

L'absorption de chacune des 2 phases est mesurée à 750 nm puis à 664 nm pour l'extrait acétonique et 663 nm pour l'extrait dans l'hexane.

Les équations utilisées sont celles de Lorenzen et, pour l'extrait dans l'hexane, elles sont les suivantes : (12)

$$\begin{array}{l} C \\ \text{chloro. a en mg.l}^{-1} \end{array} = \frac{K. A (663_0 - 663_a).V}{L}$$

$$\begin{array}{l} P \\ \text{phéo.a en mg.l}^{-1} \end{array} = \frac{K. A (R663_a - 663_0).V}{L}$$

$$K = 1,82$$

A = coefficient d'absorption de la chloro. a dans la couche d'hexane = 11,05

$$R = \frac{\text{D.O. à 663 nm avant acidification}}{\text{D.O. à 663 nm après acidification}}$$

663_0 = D.O. corrigée avant acidification (-D0 750 nm)

663_a = D.O. corrigée après acidification (-D0 750 nm)

L = trajet optique

V = facteur de correction pour la différence de volume
entre la couche de l'hexane et la couche acétonique = 1,6

Le transfert de la chlorophylle a dans la couche de l'hexane est indépendant de sa concentration (du moins, pour les concentrations étudiées dans le travail cité qui sont supérieures à $3,7 \text{ mg.l}^{-1}$ d'acétone) et il peut être considéré comme complet ($100,3 \pm 0,8\%$ déterminé par l'étude de l'hypophase).

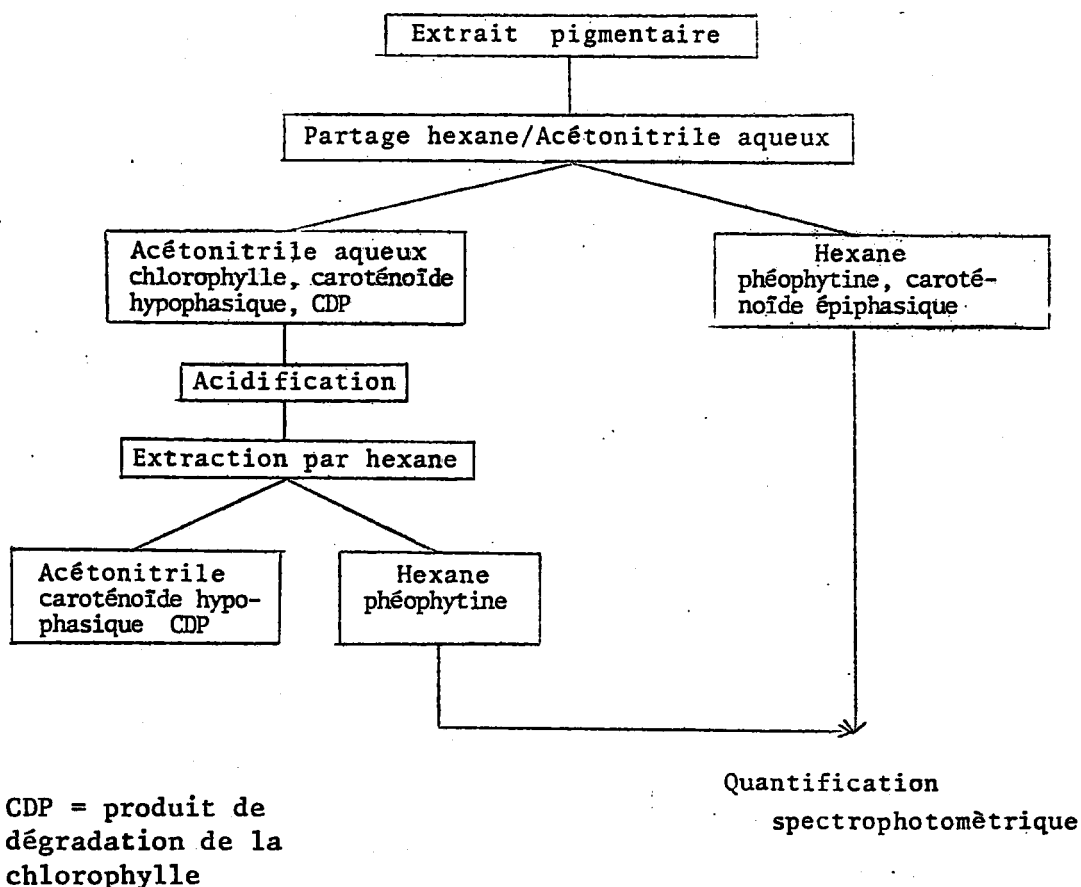
Le rapport R de l'absorption avant/après acidification varie significativement pour de faibles variations de longueur d'onde dans les deux solvants, mais plus spécialement dans l'hexane. Aussi, les auteurs recommandent-ils de calibrer le spectrophotomètre avant toute mesure ou mieux de déterminer le rapport R pour chaque instrument en employant des solvants d'expérimentation et de la chloro. a purifiée par chromatographie sur colonne ou en couche mince.

Les auteurs pensent que cette méthode est appelée à être très employée spécialement pour mesurer la chloro. a présente dans les eaux où les produits de dégradation de la chlorophylle sont très abondants. Sa précision a été évaluée (à partir de chloro. a purifiée) à 98,5 %. Sa relative lenteur par rapport aux méthodes trichromatiques (supplément de 5 mn par échantillon) est largement compensée par sa plus grande précision.

D'autre part, puisque les méthodes traditionnelles mesurent la chloro. A avec la chlorophyllide a et la phéophytine a avec la phéophorbide a, il devrait être possible, mais cela reste à confirmer avec des pigments purs et des coefficients d'absorption connus), de connaître les concentrations en chlorophyllide a et phéophorbide a par simple soustraction des valeurs obtenues par cette méthode de celles obtenues par méthodes classiques.

Une autre équipe de chercheurs (13) emploie cette technique de séparation liquide/liquide mais le partage est réalisé par extraction des pigments par deux solvants différents : l'acétone et l'hexane.

Pour tester l'efficacité de leur méthode, les auteurs utilisent de la chloro. a (99 % pure) et b, des carotènes a et b, des xanthophylles, des phéophytines (préparés par acidification de chloro. pure) et des mélanges de pigments en particulier des échantillons dont les pigments sont extraits par de l'acétone à 90 %.



En outre, la comparaison des concentrations de différents pigments contenus dans des échantillons de phytoplancton obtenus par cette méthode et par la technique d'acidification confirme tout-à-fait les critiques faites à cette dernière :

- 1° Quand les produits de dégradation de la chloro. sont présents en proportion importante, ils conduisent à surestimer la teneur en phéophytine a de l'échantillon.
- 2° Certains d'entre eux comme les chlorophyllides présentent une réduction d'absorption après acidification et un spectre semblable à celui de leurs chlorophylles respectives.
- 3° En outre, un certain nombre de caroténoïdes comme l'antraxanthine, la diadinoxanthine, la violanxanthine et la fucoxanthine présentent après acidification des changements de leurs spectres et de leurs coefficients d'absorption dans le rouge.

Ainsi il est évident qu'il y a de gros avantages à séparer les chlorophylles actives des phéophytines et des autres produits de dégradation des chlorophylles, ainsi que des caroténoïdes, avant toute analyse spectrophotométrique.

La finalité de cette méthode pour séparer les chlorophylles des phéophytines et pour les débarrasser des pigments qui interfèrent dans leur dosage justifie le temps supplémentaire nécessaire.

Enfin, l'efficacité de cette méthode de partage est de 95 à 98% pour la chlorophylle a et de 93 à 96 % pour la phéophytine a. Il faut cependant préciser que la séparation chloro. b - phéophytine b est moins rigoureuse. (13).

5.2 Chromatographie en couche mince (C.C.M.)

Dans leur technique, SHOAF et LIUM (14) associent une chromatographie en couche mince à une séparation préalable des pigments par des solvants spécifiques.

Après filtrage, broyage du filtre dans du diméthyl sulfoxide, centrifugation, les auteurs ajoutent de l'éther sulfurique, puis, après agitation, de l'eau distillée, tout ceci dans des proportions bien déterminées. Après centrifugation, ils ont dans le tube deux phases nettement séparées dont la phase supérieure contient toutes les chlorophylles. Ils la pipettent et la débarrassent de toute trace de diméthylsulfoxide par lavage à l'eau distillée. Cette couche d'éther sulfurique est pratiquement desséchée puis amenée à un volume déterminé par addition d'acétone et homogénéisée.

Ensuite, ils disposent une mince raie de solution ou des spots sur des feuilles pré-enduites de cellulose à 15 mm d'un bord et 6 mm de l'autre. Ils placent ces plaques dans une cuve à chromatographie contenant 98% d'éther de pétrole et 20% de méthanol à l'obscurité. Après développement, les spots ou les raies de chlorophylle sont récupérées en grattant la cellulose au-dessus d'un tube à centrifugation contenant de l'acétone à 90%. Après mixage et centrifugation (pour récupérer la cellulose), les concentrations des chlorophylles sont déterminées avec un spectrophotomètre ou un fluorimètre.

Testée à partir de chlorophylles pures, cette méthode permet de mesurer 98% de la chloro. a et 96% de la chloro. b initialement présentes. (On ne peut quantifier la chloro. c des solutions parce que les chlorophyllides a et b ne migrent pas mais restent avec les chloro. c et

phéophytine c d'une part et d'autre part parce qu'elle n'est que faiblement soluble dans l'éther sulfurique ou l'acétone).

Il faut remarquer que cette méthode est peu coûteuse (ce qui est universellement apprécié dans les laboratoires) et précise : elle permet des dosages fins, de l'ordre du microgramme.

5.3 Chromatographie liquide haute pression (C.L.H.P.)

Ces techniques présentent de nombreux avantages : ce sont les plus rapides et les plus précises (dosage de concentrations de pigments de l'ordre du microgramme (7) voire du picogramme (6)).

JACOBSEN (6) sépare ainsi les phéophytines a et b des chlorophylles a et b sur des colonnes en acier inoxydable qui sont remplies de silica-gel type H sous forte pression. Les échantillons sont filtrés sur filtres en fibres de verre, les filtres sont broyés dans 3 ml d'acétone à 100% à 0°C pendant 1 minute.

L'échantillon homogénéisé est transféré sous un volume de 9 ml dans un tube à centrifuger (3 ml de solution initiale + 2 fois 3 ml de produit de rinçage à l'acétone), fermé sous atmosphère d'azote de façon à éviter l'allo-mérisation de la chloro. sous oxygène.

L'extraction de la chloro. dure 12 heures à 0°C et est suivie d'une centrifugation à 2000g pendant 5 minutes, puis l'extrait acétonique est ajouté sous lumière faible dans des fioles contenant 100 ml de chlorure de sodium (NaCl) et 10 ml de ligroïne à basse température. L'ensemble est agité et la ligroïne est alors évaporée par balayage d'azote. Les fioles contenant les échantillons secs

sont fermées sous atmosphère d'azote et elles peuvent ainsi être gardées à -50°C pendant plusieurs mois sans formation de produits de dégradation des pigments présents.

Pour réaliser cette technique C.L.H.P. sur ces échantillons, on injecte dans la fiole 0,5 ml de mélange d'acétone-ligroïne dans un rapport volumétrique de 20%, puis 20 μl de la solution est injectée dans la colonne à l'aide d'une seringue d'Hamilton. L'éluant est un mélange acétone-ligroïne v/v 20%. Le débit est de 1 à 3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Les éluants sont étudiés par mesures fluorimétriques.

L'étalonnage est réalisé à partir de solutions standard de pigments purs transférés dans de l'éther, évaporés puis stockés sous azote à -50°C .

Les valeurs obtenues, pour un même milieu, par les méthodes spectrophotométriques et fluorimétriques comparées à celles obtenues ici sont toujours supérieures pour les premières et elles le sont souvent pour les secondes (cette surestimation pouvant aller jusqu'à 10 fois la concentration réelle).

Les limites de détection dans les conditions expérimentales décrites (milieux de prélèvement, caractéristiques des appareils de mesure) sont données par l'auteur comme telles :

pigment	limite de détection	déviati-on standard
chloro. a	$1,4 \cdot 10^{-10} \text{ g}$	$3,6 \cdot 10^{-12}$
chloro. b	$3,7 \cdot 10^{-9} \text{ g}$	$2,9 \cdot 10^{-9}$
phéo. a	$1,0 \cdot 10^{-10} \text{ g}$	$1,4 \cdot 10^{-11}$
phéo. b	$2,7 \cdot 10^{-10} \text{ g}$	$8,7 \cdot 10^{-12}$

Cette méthode est rapide, précise et peut être employée pour des analyses de routine sur des bateaux ou des plate-formes marines.

De même, BESSIERE et MONTIEL (16) présentent une méthode de séparation des chloro. a et b par C.L.H.P. Ils qualifient leur technique de sélective, sensible et rapide (20 min) car le dosage est rendu automatique par l'emploi d'un passeur d'échantillons et l'enregistrement par un intégrateur.

Cette méthode présente, de plus, l'avantage d'admettre l'utilisation du méthanol absolu qui est un solvant d'extraction plus efficace que l'acétone (voir p.8).

Pour cette technique, les auteurs préconisent l'emploi de colonne, spherisorb ODS C18 avec, comme éluant, un mélange méthanol-eau (97/3) et un débit de 1ml.mm^{-1} . Les chlorophylles sont dosées à leur sortie par mesure de la fluorescence $> 470\text{ nm}$ (à $\lambda_{\text{exc}} = 427\text{ nm}$).

Une autre application de la technique C.L.H.P. est proposée pour les eaux marines (et les cultures) (7). Elle se distingue essentiellement de la première par une étape d'élution par 2 mélanges de solvants passés successivement. La colonne construite avec un calibre de $0,45\text{ mm}$ est en acier inoxydable et remplie de Partisil 10 sous une pression de 350 kg.cm^{-2} . La hauteur de la couche de Partisil est de 30 cm . L'échantillon sera introduit comme dans la première application de la technique (3) par une injection de $20\text{ }\mu\text{l}$ à l'aide d'une seringue Rheodyne. Les éluants seront passés avec un débit de 2 ml.min^{-1} . Le premier est un mélange d'éther de pétrole (point d'ébullition 60.80°C), acétone, diméthyl-sulfoxyde et diméthylamine dans des proportions volumétriques de 75/25, 25/1, 5/0,25. Le second éluant est constitué d'éther de pétrole, acétone, méthanol et

diméthyl-sulfoxyde dans des proportions volumétriques de 30/40/27/3. (Le passage du premier au second éluant correspondra sur le chromatogramme à un tracé non exploitable). Le second solvant est nécessaire car le premier n'est pas assez polaire pour éluer les phéophorbide et chlorophylle c.

De façon à identifier les différents pics des chromatogrammes, des extraits d'une série d'algues sont traités selon la technique étudiée. Les éluats générateurs de pics correspondant à des temps de rétention connus sont collectés et mélangés jusqu'à atteindre une quantité de pigment compatible avec la sensibilité de la méthode. Les éluats sont rapidement séchés et, après dissolution dans un solvant approprié, identifiés par leur spectre d'absorption. Les chlorophylles et leurs produits de dégradation sont caractérisés par leur spectre dans l'éther et dans un mélange eau-acétone (1 volume d'eau pour 9 volumes d'acétone). Les caroténoïdes sont identifiés en comparant leur longueur d'onde d'absorption maximale dans l'hexane, l'éthanol, le disulfure de carbone à celles prises pour référence dans l'article. Les identifications ont de plus été confirmées par chromatographie en couche mince sur silica-gel.

Les temps de rétention des différents pigments sont strictement reproductibles. D'où la standardisation de la technique et la construction de courbes d'étalonnage pour chaque pigment (relation absorption-quantité de pigment). Pour cela, un extrait contenant le pigment désiré est injecté dans la colonne et le pigment est collecté. Après évaporation (à une température proche de la température ambiante pour éviter toute dégradation), le pigment est immédiatement dissous dans un volume connu du solvant approprié et sa concentration est déterminée par spectrophotométrie. Si on répète cette procédure pour différentes dilutions de l'extrait, on peut construire une courbe d'étalonnage pour chaque pigment, courbes qui sont pratiquement linéaires.

La sensibilité de la méthode varie d'un pigment à l'autre. Un pic de 5 mm de haut sera considéré comme significatif dans la mesure où l'échelle des ordonnées sera telle que 25 cm correspondront à 0,2 unité d'absorption. Dans de telles conditions, la limite de détection de la méthode varie de 5ng pour le β -carotène à 80 ng pour la chlorophylle a. En fait, la sensibilité pourrait être 2 à 3 fois supérieure. Ceci est dû à la longueur d'onde de 440 nm à laquelle sont faites les mesures d'absorption - ce qui ne correspond pas aux longueurs d'onde d'absorption maximale des pigments mais semble un compromis valable pour les chlorophylles et les caroténoïdes ensemble.

En comparant les résultats obtenus par cette méthode à ceux des méthodes CCM ou polychromatiques, on constate :

- 1) que les quantités de chloro. a détectées sont très voisines,
- 2) que la chloro. b est sous-estimée dans les méthodes polychromatiques.
- 3) que la chloro. c y est surestimée (en particulier détectée même quand elle est absente comme dans le cas des algues bleu-vert).

CONCLUSION

Les méthodes spectrophotométriques et fluorimétriques de dosage des chlorophylles présentent des inconvénients majeurs que l'on peut résumer ainsi :

- l'important chevauchement des bandes d'absorption des chlorophylles entraîne une faible précision du dosage des chlorophylles b et c,
- les résultats obtenus à partir des différentes équations proposées peuvent être très dissemblables,
- les produits de dégradation des chlorophylles ont des spectres d'absorption semblables à ceux des chlorophylles, aussi interfèrent-ils sérieusement dans leurs dosages,
- la sensibilité très faible des méthodes exige l'emploi d'échantillons de grands volumes.

On peut maîtriser ces inconvénients en séparant les pigments avant dosage

- soit par chromatographie liquide ou de partage qui isole la chlorophylle a des autres pigments, surtout des phéophytines, avec une efficacité de 95 à 98%,
- soit par chromatographie en couche mince qui permet des dosages de pigments de l'ordre du microgramme mais qui, selon certains auteurs, a une approximation de $\pm 5\%$ avec une séparation imparfaite de certaines xanthophylles des autres pigments,

- soit par chromatographie liquide haute pression. Les limites de détection pour les chlorophylles a et b et leurs phéophytines sont de l'ordre du picogramme voire du nanogramme. La précision de la quantification des pics du chromatogramme est largement améliorée (jusqu'à être multipliée par 10) si leurs aires sont calculées par un intégrateur. La précision du calcul sera alors de 0,5 % et mieux, par opposition aux mesures des aires par triangulation (3-4%), par planimétrie (4%) ou pesée (2%).

Cette méthode C.L.H.P. allie à une grande précision la rapidité nécessaire à des mesures systématiques. Cependant, peu de laboratoires d'algologie sont équipés du matériel coûteux nécessaire à l'emploi de cette technique et les méthodes classiques, malgré leur imperfection et le peu de fiabilité de leurs équations de calcul, restent très employées.

Références citées

1. Ecologie du plancton marin. I. Le phytoplancton
BOUGIS (P.).- Paris : Masson, 1974.
2. Physiologie végétale. Nutrition et Métabolisme.
MAZLIAK (P.).- Paris : Herman, 1974.
3. Abrégé de Physiologie Végétale. Tome I. Nutrition
HELLER (R.).- Paris : Masson, 1977.
4. Comparaison des méthodes spectrophotométriques pour
le calcul des pigments phytoplanctoniques
MILLERIOUX (M.).
Annales de la Station Biologique de Besse-en-Chandesse,
(1974-1975), 9, 59-75.
5. The measurement of photosynthetic pigments in
freshwaters and standardization of methods:
conclusions and recommendations. MARKER (A.F.H.),
NUSH (E.A.), RAI (H.), RIEMANN (B.). (Univ.
Copenhagen, Freshwater Biological Laboratory,
51 Helsingorsgade, DK - 3400 Hillerød).
Arch. Hydrobiol. Beilh. (Ergebn. Limnol.), (1980),
14, 91-106, bibl. (63 ref.).
6. A quantitative method for the separation of chlorophylls
a and b from phytoplankton pigments by high pressure
liquid chromatography. JACOBSEN (T.R.). (Univ. Georgia,
Depart. Zoology, Athens, Georgia 30602).
Mar. Sci. Communic., (1978), 4, n° 1, 33-47,
bibl. (26 ref.).
7. The determination of phytoplankton pigments by high
performance liquid chromatography. ABAYACHI (J.K.),
RILEY (J.P.). (Univ. Liverpool, Depart. Oceanography,
Liverpool L693BX, Gt Britain).
Analytica Chimica Acta, (1979), 107, 1-11,
bibl. (25 ref.).
8. Chlorophyll a determination: improvements in
methodology. HOLM-HANSEN (O.), RIEMANN (B.). (Univ.
California, Scripps Institution of Oceanography,
Univ. Aarhus, Botanical Institute).
oikos, (1978), 30, 438-447, bibl. (41 ref.).

9. High-speed video-densitometric determination of chlorophylls and carotenes separated by thin-layer chromatography. (CSORBA (I.), BUZAS (Z.), POLYAK (B.), BOROSS (L.)). (Univ. Attila József, Depart. Biochemistry, H-6701 Szeged 533 (Hungary)).
J. Chromatography, (1979), 172, 287-293, bibl. (19 ref.).
10. Some observations on the use of the in vivo fluorescence technique to determine chlorophyll a in natural phytoplankton. HEANEY (S.I.). (Freshwater Biological Association, Windermere Laboratory, Cumbria, England).
Freshwat. Biol., 8, 115-121, bibl. (23 ref.).
11. A method for the spectrophotometric measurement of chlorophyll a and pheophytin a in benthic microalgae. TETT (P.), KELLY (M.G.), HORNBERGER (G.M.). (Univ. Virginia, Depart. Environmental Sciences, Charlottesville 22903).
Limnol. Oceanogr., 20, 887-896, bibl. (20 ref.).
12. A method for the determination of chlorophyll a in samples containing degradation products. WHITNEY (D.E.), DARLEY (W.M.). (Univ. Georgia, Marine Institute, Sapelo Island 31327).
Limnol. Oceanogr., 24, n° 1, 183-186, bibl. (8 ref.).
13. A solvent partitioning procedure for the separation of chlorophylls from their degradation products and carotenoid pigments. WUN (Ch.K.), RHO (J.), WALKER (R.W.), LITSKY (W.). (Univ. Massachussets, Depart. Environmental Sciences, Amherst, Massachussets 01003).
Hydrobiol., 71, 289-293, bibl. (17 ref.).
14. The quantitative determination of chlorophylls A and B from freshwater algae without interference from degradation products. SHOAF (T.), LIUM (B.W.).
J. Res. US. Geol. Surv., (1977), 5, n° 2, 263-264, bibl. (8 ref.).
15. Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural populations of phytoplankton. RIEMANN (B.). (Univ. Aarhus, Botanical Institute, 68, Nordlandsveg, DK- 8240 Risskov, Denmark).
Limnol. Oceanogr., (1978), 23, 1059-1066, bibl. (27 ref.).

16. Méthode rapide de dosage sélectif des chlorophylles a et b. Utilisation de la séparation par chromatographie liquide haute pression. BESSIERE (J.), MONTIEL (A.). (Service de Contrôle des Eaux de la Ville de Paris).
Water Research, (Articles en cours de parution).
17. Estimation of chlorophyll a and pheophytin a in methanol. TETT (P.), KELLY (M.G.), HORNBERGER (G.M.). (Univ. Charlottesville 22903).
Limnol. Oceanogr., (1977), 20, 579-580, bibl. (3 ref.).
18. Fluorescence spectral signatures: the characterization of phytoplankton populations by the use of excitations and emission spectra. YENTSCH (C.S.), YENTSCH (C.M.). (Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbor, Maine 04575, U.S.A.).
J. Mars. Res., (1979), 37, n° 3, 471-483, bibl. (22 ref.).

