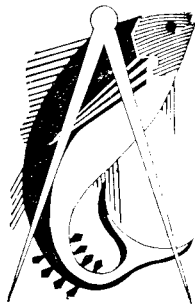


PHILIPPE DUFOUR

CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES
POSSIBILITÉS ET LIMITES DE LA METHODE
DE DOSAGE DE PIGMENTS DE PHYTOPLANCTON



OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE DE POINTE-NOIRE



CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES
POSSIBILITES ET LIMITES DE LA METHODE
DE DOSAGE DES PIGMENTS DU PHYTOPLANCTON

Philippe DUFOUR *

×

R E S U M E

On a procédé à des évaluations de chlorophylle "a", "b", "c", de caroténoïdes et du rapport D 430/D 665 sur des groupes d'échantillons en provenance d'un même prélèvement. La méthode utilisée est celle de CREITZ and RICHARDS. Chaque groupe a subi un régime différent. Il en ressort que les filtres peuvent être conservés au moins dix mois à l'obscurité, au froid et au sec, sans que la perte de chlorophylle "a" dépasse 20 %. Les autres pigments sont beaucoup plus affectés. On constate d'autre part une perte ou une destruction de pigments au fur et à mesure que le volume filtré augmente. La diminution peut atteindre 40 % pour la chlorophylle "a". La précision des mesures est évaluée pour chaque pigment. Les résultats des calculs de chlorophylle "a" par les équations du SCOR UNESCO d'une part, de LORENZEN d'autre part sont comparés.

Document n° 24 N.S.
17 Juillet 1972

* Océanographe biologiste - adresse actuelle : C.R.O. BP V 18, Abidjan (Côte d'Ivoire).

Au cours de l'étude des variations saisonnières de la production primaire à Pointe-Noire (DUFOUR et MERLE, 1972), les pigments végétaux ont été dosés par la méthode RICHARDS and THOMPSON (1952) améliorée par CREITZ and RICHARDS (1955). Cette méthode a été utilisée selon des modalités différentes au cours du temps. Nous avons donc été amenés à tester l'équivalence de ces diverses modalités. Ainsi est examinée la validité de stockage des filtres sur de longues périodes. L'extraction des pigments au broyeur de cellules est comparée à l'extraction par simple macération. Sont également comparés les résultats obtenus par l'usage des formules de calcul recommandées par SCOR UNESCO (ANONYME 1966) et LORENZEN (1967), ainsi que les résultats obtenus par filtration de volumes d'eau de mer différents.

1. METHODES

1.1. Traitement des échantillons

Quatre vingt litres d'eau de mer côtière ont été recueillis. En maintenant cette eau en agitation permanente afin d'éviter une possible sédimentation, on a sous-échantillonné des quantités de un litre. Ces sous-échantillons additionnés de quelques millilitres de carbonate de magnésium en suspension ont été immédiatement passés sur filtres MILLIPORE HA (0,45 μ de diamètre de pores), sous un vide de 55 à 65 cm de mercure.

Les filtres ont été répartis en huit groupes. Toutes les extractions ont eu lieu dans l'acétone à 90 %. Les extraits acétoniques ont été contrifugés 10 minutes à 12000 g avant passage au spectrophotomètre en cuves de 25 ml et de 10 cm de chemin optique. Les différences de traitements entre groupes ont porté sur les durées et les conditions de conservation des filtres avant extraction et sur l'utilisation ou non d'un broyeur de cellules (*).

(*) Broyeur utilisé : Thomas Tissue Grinder (Philadelphie USA), modèle A.

- groupe A : passage au broyeur de cellules et dosage immédiat.
- groupe B : macération 20 heures dans l'acétone à l'obscurité et à 1°C puis dosage sans broyage des cellules.
- groupe C : conservation des filtres 20 heures à -20°C, en dessiccateur et à l'obscurité, puis passage au broyeur de cellules et dosage immédiat.
- groupe D : comme C mais conservation des filtres à 1 semaine.
- groupe E : comme C mais conservation des filtres 1 mois.
- groupe F : comme C mais conservation des filtres 10 mois.
- groupe G : conservation des filtres 10 mois à température du laboratoire, au sec et à l'obscurité, puis passage au broyeur de cellules et dosage.
- groupe H : comme G mais conservation des filtres 10 mois à l'air libre.

Les teneurs des extraits en chlorophylle "a", "b", "c", ont été calculées selon les formules recommandées par le SCOR UNESCO (ANONYME 1966). Les teneurs en caroténoïdes sont évaluées par l'équation de PARSONS and STRICKLAND (1963). :

$$\text{caroténoïdes ; unité MSPU/m}^3 : \frac{10 (D 480 - 3 \times D 750) V}{1 \times v}$$

avec D 480 : densité optique à 480 mμ

D 750 : densité optique à 750 mμ

l : chemin optique en cm

V : volume filtré en l

v : volume de l'extrait en ml.

On a aussi calculé le rapport des densités optiques D 430/D 665 dont l'usage est préconisé par MARGALEFF (1960).

Pour la comparaison des résultats obtenus par filtrations de volumes différents, un autre prélèvement de trente litres a été réalisé. La technique utilisée est la même que celle décrite plus haut. Les filtres ont été broyés. Seule la chlorophylle "a" a été évaluée.

1.2. Traitement des données

Sur les tableaux 1 à 5 sont portées les valeurs des pigments et du rapport D 430/D 665 pour chacun des huit groupes A à H. Les teneurs en chlorophylle "b" augmentent avec la durée de conservation des filtres. Ce résultat aberrant est probablement imputable à l'inadaptation des formules utilisées pour la composition pigmentaire du phytoplancton recueilli. WAUTHY et LE BOURHIS (1966) écrivent d'ailleurs que "la complaisance de la méthode à fournir des valeurs de chlorophylle "b" si on les lui demande paraît suspecte. Ce pigment n'est en effet signalé par les auteurs compétents que chez ces Chlorophycées et les Euglenophycées qui ne semblent pas représenter une part importante du plancton tropical". Nous avons donc écarté la chlorophylle "b" de nos investigations. Quatre analyses de variance ont été réalisées sur les autres groupes de données : chlorophylles "a" et "c", caroténoïdes, rapport D 430/D 665, ceci bien que les conditions de normalité et d'homogénéité des variances ne soient pas rigoureusement réalisées. Nous avons admis d'après P. DAGNELIC (1970) p. 124 - que l'analyse de variance, comme le test de t de STUDENT, sont peu sensibles à la non-normalité et à l'inégalité des variances dans le cas d'échantillons d'effectifs sensiblement égaux ; ce qui est notre cas. Les résultats de ces analyses de variance (tableaux 6, 7, 8 et 9) permettent d'affirmer que les régimes d'extraction et de conservation utilisés sont différents : la variation intergroupe (ou factorielle) est supérieure à la variation intragroupe (ou variation de l'erreur ou variation résiduelle). Cette conclusion a été précisée par des comparaisons des moyennes des groupes deux à deux par le test t de STUDENT (tableaux 10, 11, 12 et 13).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Utilité du broyage

Pour l'extraction des pigments, RICHARDS and THOMPSON (1955) préconisaient une simple macération de neuf heures dans l'acétone. STRICKLAND et PARSONS (1960) recommandent qu'elle se fasse à l'obscurité et au réfrigérateur. Depuis YENTSCH et MENZEL (1963) on sait que le broyage améliore l'extraction de la chlorophylle "a" dans les proportions variant de 5 à 60 %. D'après HUMPHREY et WOOTOM (1966) cette amélioration apparaît aussi pour les chlorophylles "b" et "c" extraites de cultures pures.

En ce qui concerne nos résultats, la comparaison des groupes B (macération vingt heures dans l'acétone) et C (conservation des filtres vingt heures puis broyage), montre que le broyage améliore significativement, mais peu (moins de 10 %) l'extraction de la chlorophylle "a" (tabl. 1 et 10). L'amélioration n'est pas significative en ce qui concerne les autres pigments (tabl. 3, 4, 11 et 12). Il est assez probable que ces résultats eussent été différents sur d'autres échantillons ; la facilité d'extraction des chlorophylles par l'acétone avec ou sans intervention mécanique devant varier avec les espèces végétales.

Mais tandis que le broyage n'apparaît pas nettement améliorer l'extraction, il permet d'en réduire la durée. Son usage permet d'éviter la phase d'attente dans l'acétone qui elle, apparaît génératrice d'une destruction de tous les pigments. En effet, les groupes A (broyage immédiat après filtration) donnent des résultats 6 à 45 % plus élevés que les groupes C (macération des filtres d'abord 20 heures, puis broyage) : tabl. 1, 2, 4 et 10, 11, 12.

2.2. Conservation des filtres (tableaux 1, 3, 4, 5 et 10, 11, 12, 13).

CREITZ et RICHARDS (1955) constatent que les filtres peuvent être conservés trois semaines au sec, à l'obscurité et au réfrigérateur. STRICKLAND et PARSONS (1960) allongent cette durée jusqu'à 6 mois toujours au sec et à l'obscurité mais à -20°C. Dans le rapport du SCOR UNESCO WORKING GROUP 17 (ANONYME 1966), il est recommandé d'analyser les

filtres moins de deux mois après la récolte, mais on reconnaît manquer de données sur des conservations de filtres sur de longues périodes.

Nous avons testé la conservation des filtres au sec, à l'obscurité et à -20°C de 20 heures à 10 mois (groupes C, D, E et F). Pour la chlorophylle "a", passée la perte d'environ 10 % dès les premières heures, on ne constate plus de dégradation supplémentaire jusqu'à 2 mois. Entre 2 et 10 mois il y a eu à nouveau une dégradation significative quoique faible (moins de 10 %). Les filtres peuvent donc être conservés sur de très longues périodes, sans que les évaluations de chlorophylle "a" en soient beaucoup affectées. Il n'en est pas de même pour les caroténoïdes et la chlorophylle "c". Pour les caroténoïdes, la perte de 14 % après 20 heures, atteint 36 % après 10 mois. Mais c'est encore la chlorophylle "c" de nos échantillons qui s'est le plus mal conservée : 45 % de perte après 20 heures, plus de 75 % après 10 mois. Le rôle des conditions de conservation des filtres est démontré pour la chlorophylle "a" et les caroténoïdes. On extrait significativement moins de ces pigments des groupes G et H (conservation 10 mois, au sec et à l'obscurité mais à la température du laboratoire pour le groupe G, conservation 10 mois à l'air libre pour la série H) que du groupe F (conservation 10 mois, au sec à l'obscurité et à -20°C). Le même résultat n'est pas mis en évidence pour la chlorophylle "c" déjà très dégradée après 10 mois quelles que soient les conditions de conservation.

Le rapport D 430/D 665 diminue au cours de la conservation, attestant que les caroténoïdes sont plus affectés que les chlorophylles, ce qui a déjà été noté. La diminution est faible : moins de 15 %, mais elle est significative du fait de la très faible dispersion des valeurs du rapport de chaque groupe. La comparaison de ces rapports portant souvent sur des différences assez faibles, il faudra tenir compte de cette diminution au cours de la conservation.

2.3. Précision des mesures (tabl. 14)

L'erreur aléatoire, c'est-à-dire la reproductibilité des évaluations d'une même quantité (précision des anglo-saxons) est ici évaluée par le

coefficient de variation en % :

$$\frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

Cette "précision" des mesures est faible et inacceptable pour la chlorophylle "b". Pour les autres pigments, elle diminue avec la durée de conservation des filtres (tabl. 1, 3, 4 et 5). Après une conservation de 20 heures la précision est toujours meilleure lorsque l'extraction a lieu par simple macération, que lorsqu'elle a lieu par broyage (tabl. 1, 3, 4 et 5). On peut penser que la précision des mesures soit améliorée dans ce dernier cas par une normalisation plus stricte des conditions du broyage : vitesse et durée de rotation du piston, température etc...

2.4. Equivalence d'échantillons d'eau de volumes différents

Une différence significative avec une probabilité supérieure à 99,9 % apparaît entre les moyennes des teneurs en chlorophylle "a" mesurées par unité de volume entre des échantillons de 1 et 2 litres (tabl. 15). Les valeurs de concentration sont un tiers plus faibles dans le cas d'échantillons de 2 litres. Ce résultat a été confirmé par des filtrations de volumes différents d'un même prélèvement sur filtres WHATMAN GFC et MILLIPORE HA.

A cinq reprises, on a constaté une destruction ou une perte en chlorophylle "a", tandis que le volume filtré croît (fig. 1) cette perte est sensible. Elle est de plus de 20 % lorsqu'on passe de 2 litres à 4 litres et atteint 40 % entre 2 et 12 litres. PARSONS (1966) signale un résultat semblable : la concentration en chlorophylle "a" décroît si le volume filtré excède cinq litres. En fait, il nous semble qu'il y a des pertes quel que soit le volume filtré. Le volume limite acceptable est difficile à définir, car les pertes doivent dépendre des techniques utilisées, de la nature du phytoplancton, de son abondance etc... Il est raisonnable de penser que leur cause principale est un colmatage des filtres. Celui-ci augmentant avec le volume filtré, il entraîne une suction accrue, un endommagement des cellules et leur passage à travers le filtre.

Cette importante source d'erreur devrait pouvoir être minimisée moyennant quelques précautions. Il faudrait réduire le colmatage en arrêtant la filtration dès que celle-ci devient trop lente. On pourrait également augmenter l'épaisseur du "gatcau" de carbonate de magnésium à la surface des filtres. Il y aurait aussi intérêt à réduire la dépression de filtration surtout avec les filtres en fibre de verre pour lesquels la rétention des cellules s'effectue en grande partie par absorption. RYTHER, cité par HUMPHREY et WOOTON (1966) n'utilise qu'une succion de 12,5 cm de mercure avec de tels filtres.

2.5. Usage de filtres différents

Les dosages rapportés sur les courbes 1 et 2 de la fig. 1, proviennent du même prélèvement. La filtration sur filtre MILLIPORE HA en cellulose (courbe 1), donne des résultats 30 % supérieur à la filtration sur filtre en fibre de verre WHATMAN GFC. Une telle remarque a déjà été faite par HUMPHREY et WOOTON (1966), qui constatent que les filtres en fibre de verre retiennent jusqu'à deux fois moins de pigments que les filtres en ester de cellulose. Selon SPENCER (1964) ce résultat ne serait exact que lorsque le phytoplancton est en majorité constitué de petites espèces ; dans d'autre cas les résultats les plus faibles sont au contraire observés avec les filtres MILLIPORE, ce qui, toujours selon cet auteur, serait dû à la présence du filtre dissous dans l'extrait acétonique. LONG et COOKE (1971), travaillant sur du phytoplancton d'eau douce, constatent que les filtres en fibre de verre donnent des résultats de 6 à 18 % supérieurs à ceux de cellulose.

Que penser de ces résultats contradictoires ? D'abord, que l'efficacité des filtres doit différer avec la taille, la forme et la nature des cellules de phytoplancton récoltées. En outre, que le rendement des filtres en fibre de verre doit être très sensible à la dépression de filtration. LONG et COOKE (loc. cité) opèrent avec des dépressions de 0,25 à 0,33 atmosphères, alors que celles que nous avons utilisées sont supérieures à 0,70 atmosphère. On peut donc conclure, qu'à condition de limiter la

dépression de filtration, les filtres en fibre de verre WHATMAN, doivent donner satisfaction ; ceci d'autant plus qu'ils permettent une réduction notable des durées de filtration et des coûts.

2.6. Comparaison des équations du SCOR UNESCO et de LORENZEN

De nombreux auteurs n'utilisent plus que la chlorophylle "a" pour évaluer la biomasse du phytoplancton. La perte d'information qui en résulte ne paraît pas considérable car les résultats des dosages des chlorophylle "b" et "c" et des caroténoïdes de l'eau de mer sont sujets à caution (PARSONS, 1966). D'autre part, les travaux de EMERSON, HILL, BENDALL entre autres ont mis en évidence que la chlorophylle "a" est un passage obligatoire dans les transferts d'énergie qui conduisent à l'élaboration de la matière organique. Elle est le plus constant, et le plus représentatif des pigments du phytoplancton. Donc compte tenu des contraintes de temps, elle est le pigment le plus intéressant à doser. Le coefficient d'extinction de 89,31 l/g. cm à 665 m μ pour la chlorophylle "a" en solution d'acétone à 90 %, permet d'établir une relation simple déjà utilisée par STEELE et BAIRD (1968)

$$\text{chlorophylle "a"} = (D\ 665, - D\ 750) \frac{v}{V \times l} \frac{1}{0,08931} \quad (1)$$

mg/m³

v = volume de l'extrait acétonique en ml

V = volume du prélèvement en litre

l = longueur de la cuve du spectrophotomètre en cm

D 665 = densité optique de l'extrait à 665 m μ

D 750 = densité optique de l'extrait à 750 m μ .

Les quantités ainsi déterminées seront désignées par l'abréviation "chl S-B". Elles sont assez proches de celles obtenues par les équations du SCOR UNESCO (ANONYME, 1966) que nous désignerons par l'abréviation "chl S-V". Selon PARSONS (1966), la différence serait d'environ 1 %. Pour PITON et MAGNIER (1971), elle est de 5 %.

Après avoir utilisé les équations du SCOR UNESCO nous utilisons aujourd'hui les équations de LORENZEN (1967), qui permettent de distinguer la chlorophylle "a" active de ses produits de dégradation les pheopigments "a". Aux lectures à 750 m μ et 665 m μ est adjointe une lecture à 665 m μ après acidification de l'extrait acétonique (D 665 a). Ces équations sont les suivantes :

$$\left[\begin{array}{l} \text{chlorophylle "a" active} \\ \text{en mg/m}^3 \end{array} \right] = 26,7 (D 665 - D 665 a) \frac{v}{V.l.} \quad (2)$$

$$\left[\begin{array}{l} \text{pheopigments "a"} \\ \text{en mg/m}^3 \end{array} \right] = 26,7 \left[1,7 \times (D 665 a - D 750) - (D 665 - D 750) \right] \frac{v}{V.l.} \quad (3)$$

D 665 et D 665 a et D 750 : valeurs des densités optiques de l'extrait à 750 m μ et à 665 m μ avant et après acidification.

v, V, l : même signification et unités que pour la relation (1).

Selon la proportion de pheopigments présents - il apparait que la quantité de chlorophylle "a" active, puisse être assez différente de celle de la chlorophylle "a S.U." précédemment obtenue. La connaissance des teneurs en chlorophylle "a active" permet d'obtenir les teneurs correspondantes en chl "a S.B." (qui on l'a vu ne sont pas très différentes de celle de chl "a S.U."). Si on appelle R le rapport $\frac{D 665}{D 665 a}$ la combinaison des équations (1), (2), et (3) conduit à la relation :

$$\left[\text{chl "a S.U."} \right] \approx \left[\text{chl "a S.B."} \right] = 0,419 \frac{R}{R-1} \left[\text{chlorophylle "a active"} \right]$$

R varie entre 1 et 1,7, lorsqu'on passe de 100 % de pheopigments à 100 % de chlorophylle "a active". Plus R diminue, plus l'écart entre la chlorophylle "a active" et la chlorophylle "a S.B." augmente (fig. 2).

L'utilisation des mêmes équations (1), (2) et (3) permet aussi d'obtenir une relation entre la chlorophylle "a S.B." et la somme : chlorophylle "a active" + pheopigments "a" :

$$\left[\text{chl "a S.U."} \right] \approx \left[\text{chl "a S.B."} \right] = 0,598 R \left[\text{chl a active + pheopigment a} \right] \quad (4)$$

Lorsque R varie entre 1 et 1,7, on constate alors que le coefficient de passage de la chl "a S.B." à la somme chlorophylle "a" + pheopigments "a", donc aussi à la chl "a S.U." varie entre 1,7 et 1,0 (fig. 2).

3. RESUME ET CONCLUSIONS

On a évalué les chlorophylles "a", "b" et "c", les caroténoïdes et le rapport $\frac{D\ 430}{D\ 665}$ sur des groupes d'échantillons en provenance d'un même prélèvement. Chaque groupe a subi un régime d'extraction et de conservation différent. Les résultats permettent de conclure que :

1) L'usage du broyeur de cellule permet d'éviter la phase de macération des filtres dans l'acétone, ce qui améliore les extractions de chlorophylle "a" et "c" et de caroténoïdes 6 à 45 %.

2) Les filtres (MILLIPORE) ont été conservés à l'obscurité, au sec et à 20°C pendant dix mois. La perte de pigments extraits est de moins de 20 % pour la chlorophylle "a", d'un tiers pour les caroténoïdes et des trois quart pour la chlorophylle "c". Le rapport $D\ 430/4\ 665$ diminue de moins de 15 %. La dessiccation, la congélation et l'obscurité permettent de réduire les pertes.

3) Les formules de calcul du SCOR UNESCO (ANONYME 1966) ont été trouvées inadéquates à l'évaluation de la chlorophylle "b". La précision de nos mesures est évaluée pour les autres pigments et pour le rapport $D\ 430/D\ 665$.

4) Il y a perte ou destruction de pigments au fur et à mesure que le volume filtré augmente. Cette perte atteint 40 % de chlorophylle "a" entre 2 et 12 litres.

5) Le rendement des filtres en ester de cellulose (MILLIPORE) est supérieur à celui des filtres en fibre de verre (WHATMAN GFC). La dépression de filtration trop forte utilisée est supposée être responsable de ce résultat.

6) Les résultats obtenus par les équations de LORENZEN (1967) et celles du SCOR UNESCO (ANONYME 1966) sont comparés.

BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME - 1966 - Détermination of photosynthetic pigments. (Report of SCOR UNESCO working group 17, 4 to 6 june, 1964, UNESCO, Paris Monographs on Oceanographic Methodology, UNESCO, 1, pp. 9-18.
- CREITZ (G.I.) and RICHARDS (F.A.) - 1955 - The estimation and characterization of plankton populations by pigments analysis. III. A note on the use of "Millipore" membrane filters in the estimation of plankton pigments. J. Mar Res., 14, pp. 211-216.
- DAGNELIE (P.) - 1969 - Théorie et méthodes statistiques. Applications agronomiques 2 vol., éditions J. Ducilot SA - Gembloux Belgique.
- HUMPHREY (G.F.) and WOOTTON (M.) - 1966 - Comparision of the techniques used in the determination for phytoplankton pigments in : Détermination of photosynthetic pigments. Monographs on Oceanographic Methodology, UNESCO, 1, pp. 37-63.
- LORENZEN (C.J.) - 1967 - Determination of chlorophyll and pheopigments. Spectro-photometric équations - Limn. and oceanogr., 12, (2), pp. 343-346.
- LONG (E.B.) and COOKE (G.D.) - 1971 - A quantitative comparison of pigments extraction by membrane and glass-fiber filters. Limn. and Ocean., 16, (6), pp. 990-992.
- MARGALEF (R.) - 1960 - Valeur indicatrice de la composition des pigments du phytoplankton sur la productivité, la composition taxonomique et les propriétés dynamiques des populations. Rapp. et prov. verbaux des réunions de la CIECMM, 15, (2), pp. 277-281.
- PARSONS (T.R.) - 1966 - The determination of photosynthetic pigments in sea-water. A survey of methods - in : Determination of photosynthetic pigments - Monographs on Oceanographic Methodology, UNESCO, 1, pp. 19-36.
- PITON (B.) et MAGNIER (Y.) - 1971 - Sur la détermination de la chlorophylle "a" dans l'eau de mer tropicale. ORSTOM Centre de Nosy-Bé, Madagascar - Document Scientifique, n° 20, 24 p.

- RICHARDS (F.A.) and THOMPSON (T.G.) - 1952 - The estimation and characterization of plankton populations by pigments analyses. II : A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. J. Mar. Res., 11, pp. 156-172.
- STEELE (J.H.) and BAIRD (I.F.) - 1968 - Production ecology of a sandy beach. Limnol. Ocean., 13, (1), pp. 14-25.
- STRICKLAND (J.D.H.) and PARSONS (T.R.) - 1960 - A manual of sea-water analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can., 125.
- SPENCER (C.P.) - 1964 - The estimation of phytoplankton pigments. Journal du C.P.I.E.M., vol. XXVIII, (3), pp. 327-334.
- YENTSCH (C.S.), MENZEL (D.W.) - 1963 - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep Sea Research, 10, pp. 221-231.
- WAUTHY (B.), LE BOURHIS (J.) - 1966 - Considérations sur l'étude des pigments du phytoplancton marin en zone tropicale oligotrophe. Cah. ORSTOM, série Oceanogr., vol. IV, (4), pp. 3-19.

Série	A	B	C	D	E	F	G	H
Concentration en chl <u>a</u> mg/m ³	2,37	2,38	2,56	2,46	2,55	2,00	1,95	0,67
	2,78	2,46	2,68	2,72	2,56	2,12	2,11	0,88
	2,84	2,50	2,71	2,74	2,66	2,41	2,20	0,99
	2,88	2,53	2,71	2,77	2,68	2,64	2,25	1,31
	2,94	2,55	2,72	2,85	2,82	2,65	2,27	1,35
	2,96	2,56	2,76	2,90	2,87	2,77	2,30	1,43
	2,99	2,57	2,83	2,97	2,90	2,80	2,31	1,45
	3,15	2,61	2,87	2,97	2,92	2,84	2,35	1,46
	3,18	2,63	3,11	3,24	2,96	2,90	2,36	1,47
	3,27	2,77			3,23	2,97	2,39	
Moyenne	2,94	2,56	2,77	2,85	2,82	2,61	2,25	1,22
Variance	0,063	0,010	0,024	0,045	0,043	0,108	0,017	0,088
Coefficient de variation (1)	6,51	3,91	5,58	7,45	7,35	12,57	5,78	24,20

Tableau 1. Concentrations en chlorophylle "a".

(1) Coefficient de variation : pourcentage de l'écart type à la moyenne, soit

$$100 \times \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}}$$

Série	A	B	C	D	E	F	G	H
Concentrations en mg/m ³	0,07	0,02	0,07	0,07	0,00	0,12	0,34	0,19
	0,09	0,07	0,09	0,17	0,04	0,27	0,43	0,20
	0,10	0,11	0,13	0,22	0,25	0,35	0,43	0,21
	0,10	0,13	0,13	0,25	0,25	0,36	0,44	0,23
	0,11	0,14	0,16	0,26	0,29	0,41	0,44	0,24
	0,14	0,16	0,16	0,36	0,31	0,59	0,57	0,28
	0,19	0,17	0,17	0,36	0,34	0,65	0,60	0,33
	0,19	0,18	0,18	0,48	0,45	0,70	0,53	0,41
	0,22	0,24	0,19	0,46	0,56	0,85	0,90	0,47
	0,27	0,28			0,66	0,87	0,97	
Moyenne	8,15	0,15	0,14	0,28	0,32	0,52	0,57	0,29
Variance	0,0043	0,0060	0,0137	0,0154	0,0420	0,0640	0,0436	0,0098
Coefficient de variation	44,1	52,2	29,4	43,6	65,2	49,2	36,7	34,1

Tableau 2. Concentrations en chlorophylle "b"

Série	A	B	C	D	E	F	G	H
Concentrations en mg/m ³	2,37	1,35	1,32	0,88	0,19	0,38	0,47	0,42
	2,78	1,37	1,38	1,02	0,07	0,42	0,64	0,54
	2,84	1,51	1,48	1,14	1,06	0,57	0,64	0,59
	2,88	1,57	1,49	1,18	1,25	0,68	0,67	0,65
	2,94	1,58	1,51	1,32	1,28	0,71	0,68	0,65
	2,96	1,62	1,59	1,52	1,64	0,71	0,74	0,63
	2,99	1,65	1,72	1,55	1,65	0,76	0,75	0,84
	3,15	1,66	1,79	1,58	1,73	0,82	0,94	0,87
	3,18	1,68	2,34	1,59	1,78	0,85	1,02	0,93
	3,27	1,95			2,08	0,99	1,19	
Moyenne	2,94	1,59	1,62	1,31	1,22	0,69	0,77	0,68
Variance	0,064	0,029	0,094	0,071	0,596	0,035	0,045	0,028
Coefficient de variation	8,5	10,5	18,8	20,2	63,2	27,2	27,4	24,6

Tableau 3. Concentrations en chlorophylle "c".

Série	A	B	C	D	E	F	G	H
Concentrations en MPSU/m ³	2,65	2,59	2,46	2,29	1,48	1,53	1,46	0,41
	3,23	2,64	2,55	2,58	1,84	1,74	1,59	0,45
	3,24	2,69	2,58	2,59	1,94	1,93	1,59	0,56
	3,24	2,70	2,73	2,66	2,39	2,03	1,69	0,63
	3,26	2,75	2,74	2,71	2,42	2,18	1,69	0,76
	3,33	2,78	2,81	2,72	2,58	2,24	1,74	0,79
	3,41	2,86	2,95	2,91	2,69	2,28	1,76	0,80
	3,48	2,94	3,06	2,96	2,66	2,35	1,85	0,83
	3,49	3,03	3,07	2,98		2,38	1,85	1,10
	3,70	3,16				2,53	1,88	
Moyenne	3,30	2,81	2,77	2,71	2,23	2,12	1,71	0,70
Variance	0,074	0,032	0,048	0,047	0,225	0,095	0,017	0,045
Coefficient de variation	8,2	6,3	7,9	8,0	21,3	14,5	7,6	30,2

Tableau 4. Concentrations en caroténoïdes

Série	A	B	C	D	E	F	G	H
Valeur du rapport	2,79	2,85	2,71	2,69	2,51	2,57	2,55	2,41
	2,83	2,96	2,79	2,76	2,57	2,58	2,56	2,45
	2,84	2,96	2,93	2,77	2,60	2,63	2,60	2,47
	2,86	2,97	2,93	2,79	2,60	2,64	2,61	2,51
	2,95	2,99	2,94	2,82	2,61	2,65	2,61	2,51
	2,95	3,06	2,95	2,85	2,67	2,66	2,68	2,54
	2,99	3,06	2,97	2,85	2,73	2,67	2,70	2,63
	3,00	3,06	2,98	2,87	2,76	2,68	2,74	2,86
	3,02	3,07	3,01	3,26	2,78	2,71	2,77	3,04
	3,05	3,09			2,96	2,81	2,88	
Moyenne	2,93	3,01	2,91	2,85	2,68	2,66	2,67	2,60
Variance	0,0082	0,0055	0,0095	0,0270	0,0170	0,0046	0,0110	0,0450
Coefficient de variance	3,09	2,46	3,34	5,72	4,91	2,55	3,91	8,11

Tableau 5. Rapports D 430/D 665.

Sources de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F (1)
Différences entre groupes (facteur contrôlé)	7	19,70	2,81	Fobs = 56,18
Différences entre mesures dans les groupes (erreur rés.)	69	3,55	0,05	F (0,99) = 2,91
Totaux	76	23,25		

Tableau 6. Comparaison de traitements des filtres pour la chlorophylle "a". Analyse de la variance.

Sources de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F (1)
Différences entre groupes (facteur contrôlé)	7	37,36	5,34	Fobs = 43,39
Différences entre mesurés dans les groupes (erreur rés.)	69	8,47	0,12	F (0,99) = 2,91
Totaux	76	45,83		

Tableau 7. Comparaison des traitements des filtres pour la chlorophylle "a". Analyse de la variance.

(1) Fobs = valeur du F de Snedecor observé.

F (0,99) : valeur du F de Snedecor minimum pour que la différence entre groupes soit supérieure à la différence entre mesures dans les groupes au niveau du 99 %.

Sources de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F (1)
Différences entre groupes (facteur contrôlé)	7	58,36	8,34	Fobs = 128,48
Différences entre mesures dans les groupes (erreur rés.)	69	4,48	0,065	F (0,99) = 2,91
Totaux	76	62,84		

Tableau 8. Comparaison des traitements des filtres pour les caroténoïdes. Analyse de la variance.

Sources de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyen	F (1)
Différences entre groupes (facteur contrôlé)	7	1,52	0,217	Fobs = 14,07
Différences entre mesures dans les groupes (erreur rés.)	69	1,07	0,015	F (0,99) = 2,91
Totaux	76	2,59		

Tableau 9. Comparaison des traitements des filtres pour le rapport D 430/4 665. Analyse de la variance.

(1) Même signification que note (1) p. 17.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A		4,578 ***	1,725	0,859	1,216	2,583 **	8,276 ***	14,213 ***
B			3,656 ***	3,926 ***	3,690 ***	0,516	7,003 ***	14,071 ***
C				0,849	0,519	1,389	8,852 ***	14,420 ***
D					3,330	1,892 *	8,083 ***	13,849 ***
E						1,734 *	8,061 **	14,334 ***
F							3,450 *	10,042 ***
G								10,831 ***
H								

Tableau 10. Comparaison des moyennes des différents traitements par le test de t pour la chlorophylle "a".

- * différence significative au niveau 95 %
- ** différence significative au niveau 99 %
- *** différence significative au niveau 99,9 %

	A	B	C	D	E	F	G	H
A		13,994 ***	10,250 ***	13,753 ***	6,688 ***	23,291 ***	2,242 ***	22,706 ***
B			0,270	2,850 **	1,503	11,974 ***	9,972 ***	12,024 ***
C				2,349 *	1,472	8,332 ***	7,261 ***	8,168 ***
D					0,332	6,154 ***	5,029 ***	6,093 ***
E						2,125 *	1,770 *	2,053 *
F							1,024	0,116
G								1,105
H								

Tableau 11. Comparaison des moyennes des différents traitements par le test de t pour la chlorophylle "c".

*** différence significative au niveau 99,9 %
 ** différence significative au niveau 99 %
 * différence significative au niveau 95 %

	A	B	C	D	E	F	G	H
A		5,494 ***	5,310 ***	5,920 ***	6,311 ***	10,033 ***	17,992 ***	23,677 ***
B			0,600	1,179	3,367 **	6,414 ***	17,749 ***	24,170 ***
C				0,617	3,102 **	5,472 ***	14,386 ***	20,912 ***
D					2,753 **	4,961 ***	13,560 ***	20,295 ***
E						0,598	3,434 **	8,740 ***
F							4,134 ***	11,866 ***
G								13,641 ***
H								

Tableau 12. Comparaison des moyennes des différents traitements pour les caroténoïdes par le test de t.

*** différence significative au niveau 99,9 %
 ** différence significative au niveau 99 %
 * différence significative au niveau 95 %

	A	B	C	D	E	F	G	H
A		2,387 *	0,400	1,341	5,198 ***	8,097 ***	6,262 ***	4,566 ***
B			2,639 **	2,852 **	7,338 ***	12,305 ***	9,011 ***	5,853 ***
C				0,990	4,578 ***	7,000 ***	5,414 ***	5,762 ***
D					2,626 **	3,492 ***	3,017 ***	2,839 **
E						0,425	0,177	0,986
F							0,267	0,838
G								0,926
H								

Tableau 13. Comparaison des moyennes des différents traitements pour rapport D 430/D 665 par le test de t.

* différence significative au niveau 95 %
 ** différence significative au niveau 99 %
 *** différence significative au niveau 99,9 %

Pigment	Mode d'extraction	Niveau de la mesure	Coefficient de variation (1)
Chlorophylle "a"	macération	2,6 mg	3,9 %
	broyage	2,6 à 2,9 mg	8,3 %
Chlorophylle "b"	macération	0,15	52,2 %
	broyage	0,15 à 0,5 mg	46,3 %
Chlorophylle "c"	macération	1,6 mg	10,5 %
	broyage	0,7 à 2,9 mg	27,6 %
Caroténoïdes	macération	2,8 PSU	6,3 %
	broyage	2,1 à 3,3 PSU	12,0 %
rapport $\frac{D\ 430}{D\ 665}$	macération	3,0	2,5 %
	broyage	2,6 à 2,9	4,5 %

Tableau 14. Précision des mesures.

(1) Le coefficient de variation des mesures après broyage = moyenne des coefficients de variation des séries A, C, D, E et F.

	. 1 litre filtré	2 litres filtrés
Chlorophylle "a"	5,43	3,43
	5,57	4,17
	5,60	4,00
Concentrations	5,68	3,73
en	5,35	3,29
µg/l	5,32	3,21
	5,43	3,45
	5,02	3,29
<hr/>	<hr/>	<hr/>
Moyenne	5,43	3,57
Variance	0,042	0,127
Coefficient de variation	3,79 %	9,98 %

Tableau 15. Résultats des filtrations de volumes différents d'un même prélèvement.

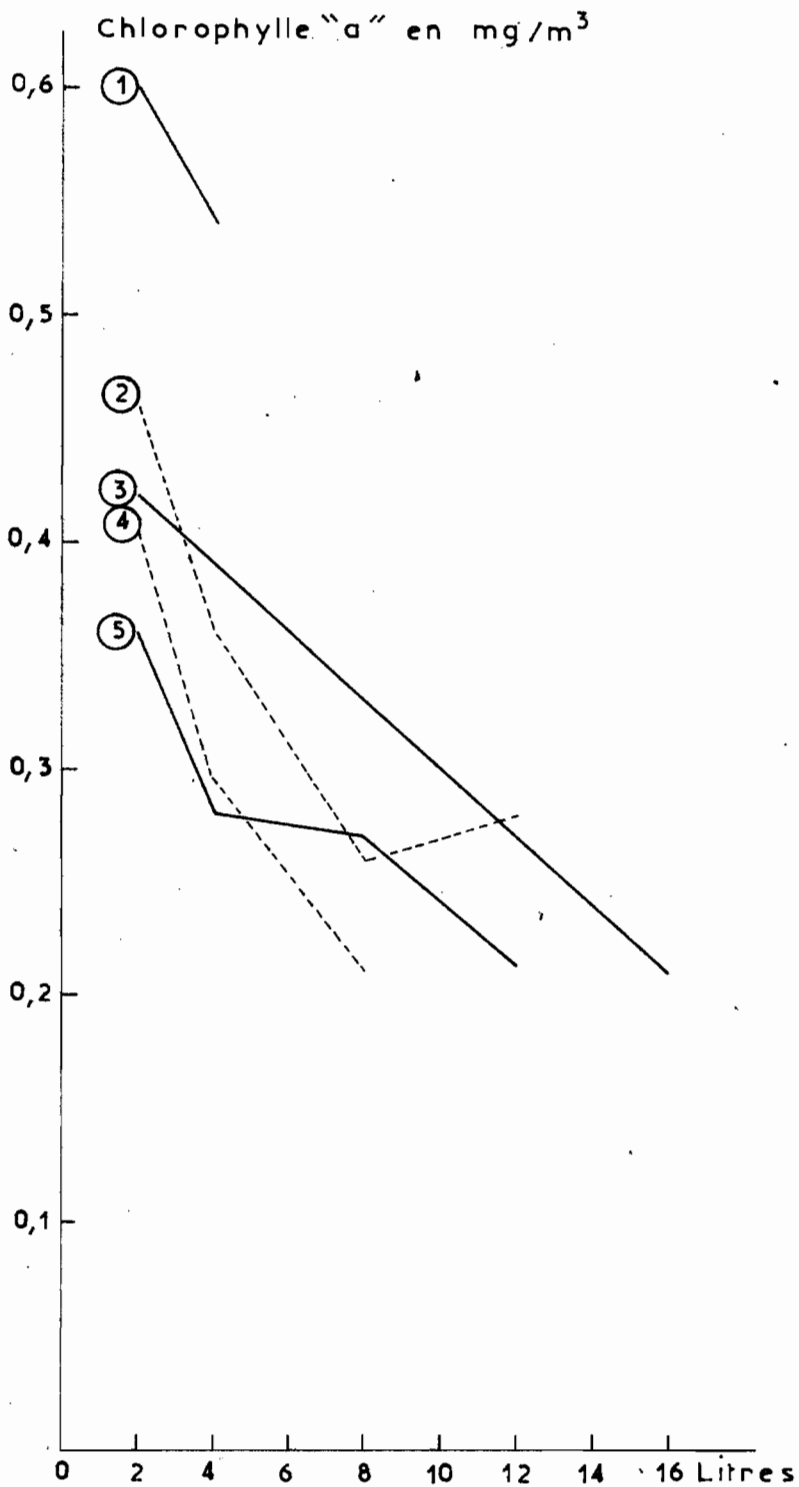


Fig. 1- Filtrations de volumes différents d'un même prelevement. Il y a perte de pigments au fur et à mesure que le volume augmente.

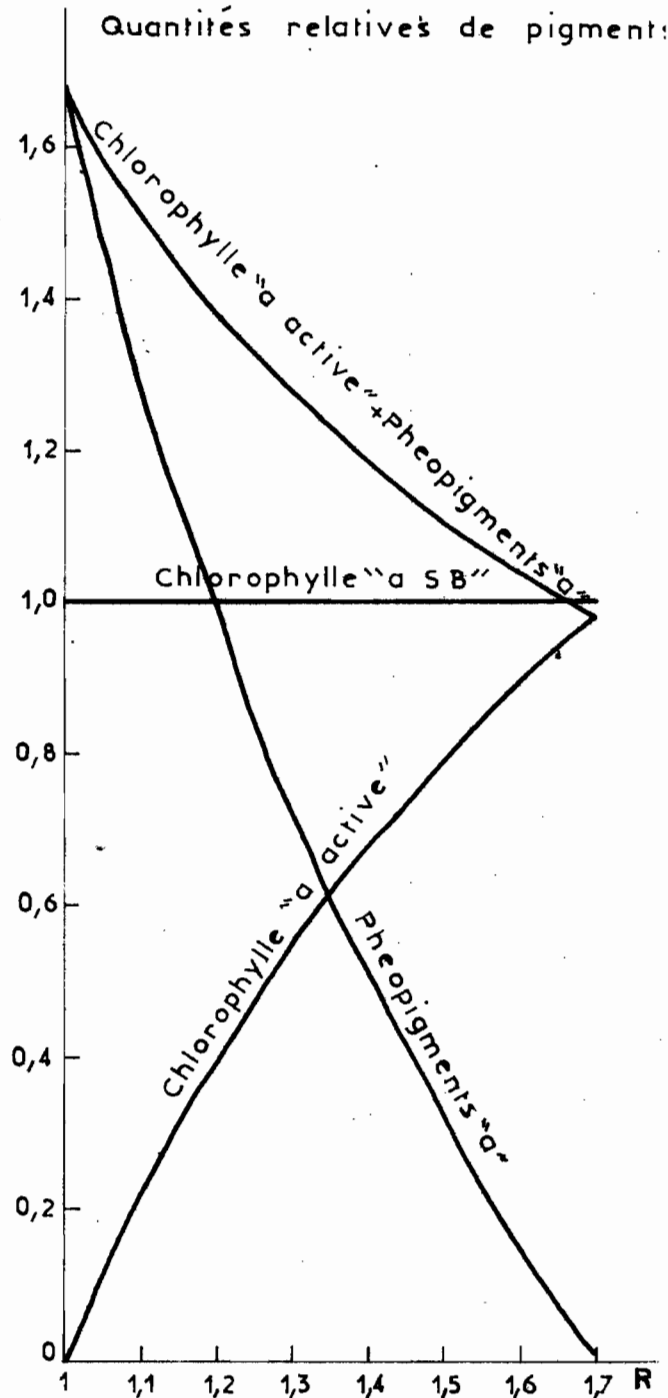


Fig. 2- Relation entre la chlorophylle "a" active et les pheopigments "a" calculé selon LORENZEN et la chlorophylle "a" calculée selon STEELE et BAIRD