

RAPPORT DE STAGE

Présenté par

Lucie MARRON
Promotion Drake 2007-2009

**Mesure de la matière organique dissoute colorée dans le
lagon Sud-Ouest de Nouvelle Calédonie :
Comparaison entre les spectrophotomètres *Ultrapath* et *Perkin Elmer***



Pour l'obtention du :
TITRE DE TECHNICIEN SUPERIEUR DE LA MER (TTSM)
Délivré par :
Le Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM)

Stage placé sous la responsabilité de **Cécile Dupouy**,
effectué du 28 avril au 4 septembre 2009

à

IRD centre de Nouméa

101, promenade Roger Laroque- Anse Vata ; BP A5 98848 Nouméa cedex ;
NOUVELLE CALEDONIE

Tel : (687) 26 10 00 Fax : (687) 26 43 26

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je tiens à exprimer ma grande reconnaissance à Cécile Dupouy qui, en me proposant ce stage, est à l'origine de ma venue en Nouvelle Calédonie. Je la remercie pour sa grande disponibilité et la direction dynamique de cette étude.

Je tiens également à remercier chaleureusement mes coéquipiers Bérénice Diaz et Tanguy Ganascia, pour leur aide précieuse au cours des manipulations et traitement des données. Je les remercie aussi, ainsi que Fanny Noisette, pour les bons moments passés ensemble.

Dans un second temps, je tiens à remercier tout particulièrement le confrère allemand Mr Rüdiger Röttgers, à qui nous devons l'expérience dans la mesure du CDOM et de nombreux échanges mail.

Je remercie aussi l'équipe CAMELIA, en particulier Mr Jean- Michel Fernandez et Aline Tribollet pour leur sympathie et bonne humeur. Ainsi que Philippe Gérard pour la gestion du Laboratoire de Chimie Marine.

Un grand merci aux capitaines du *Coris*, Sam et Napo, à qui nous devons les sorties en mer. Merci aussi à John Butscher de m'avoir fait participer aux prélèvements sur la croissance des Bénéitiers (projet Hobelco).

Enfin, je tiens à remercier l'Administration IRD Marie-Noelle Segura et Catherine Hartmann pour la chambre disponible au sein du centre. Ainsi que les stagiaires, VCATs, anciens élèves d'Intechmer pour leur sympathie.

Je remercie également la Caisse d'Allocation Familiale (CAF) qui m'a beaucoup aidé financièrement pour le billet d'avion aller-retour.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
PROLOGUE	5
1. L'INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT	5
2. LE CENTRE IRD DE NOUMEA	5
3. CAMELIA : CARACTERISATION ET MODELISATION DES ECHANGES DANS LES LAGONS SOUS INFLUENCES TERRIGENES ET ANTHROPIQUES	5
INTRODUCTION	7
I/ PRESENTATION DU SUJET	8
1. LE PROJET PNTS ET LA CAMPAGNE VALHYBIO :	8
2. LES PROPRIETES OPTIQUES INHERENTES DE LA MATIERE	10
1) <i>Absorption</i>	10
2) <i>Diffusion</i>	12
3) <i>Rétrodiffusion</i>	12
4) <i>Calcul de la réflectance satellitale à partir des mesures terrain</i>	12
3. LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUE COLOREE (CDOM)	13
II / MATERIEL ET METHODES	14
1. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE	14
2. ECHANTILLONNAGE	15
1) <i>Campagne VALHYBIO</i>	15
2) <i>Suivi mensuel VALHYBIO</i>	16
3) <i>Préparation des échantillons au laboratoire</i>	18
3. TECHNIQUES DE MESURE SPECTROPHOTOMETRIQUE	19
1) <i>Détermination expérimentale du coefficient d'absorption</i>	19
2) <i>Ultrapath LWCC (Liquid Waveguide Capillary Cell)</i>	19
3) <i>Perkin Elmer lambda 20</i>	20
4. PHASE D'ESSAIS POUR L'ELABORATION D'UN PROTOCOLE POUR L'ULTRAPATH	21
1) <i>Précautions de propreté</i>	21
2) <i>Effet des bulles d'air</i>	21
3) <i>Choix de l'eau de référence pour la mesure de CDOM en milieu marin</i>	21
4) <i>Précision, répétabilité de la mesure, contrôle des spectres (offset) et de la dérive instrumentale</i>	23
5. COMPARAISON AVEC LE PROTOCOLE DU PERKIN ELMER	24
1) <i>Précautions de propreté</i>	24
2) <i>Choix de l'eau de référence</i>	24
3) <i>Répétabilité, contrôle de la mesure</i>	24
6. CONCLUSION DES ESSAIS	25
III/ RESULTATS	25
1. RESULTATS ULTRAPATH	25
2. COMPARAISON ENTRE ULTRAPATH ET PERKIN ELMER	27
DISCUSSION ET CONCLUSION	30
LEXIQUE	31
ANNEXES	34

Liste des figures

Figure 1: Zoom des scènes MODIS-500m dans le lagon sud de la Nouvelle Calédonie montrant la distribution de la chlorophylle de surface estimée à partir d'un algorithme global. Les stations de la campagne VALHYBIO sont superposées aux images.....	9
Figure 2: Spectres d'absorption de la lumière par les détritux, le phytoplancton et le CDOM à la station T2 de VALHYBIO.....	11
Figure 3 : Carte des lagons Sud et Sud -Ouest de Nouvelle Calédonie (Base de données CAMELIA, P. Douillet).....	14
Figure 4 : Carte des stations d'échantillonnage lors de la campagne VALHYBIO (in Dupouy et al., 2008; 2009).....	15
Figure 5 : Carte des stations du suivi mensuel VALHYBIO.....	18
Figure 6 : Schéma d'un Ultrapath Multiple Pathlengths, Liquide Core Waveguide (MPLCW).....	20
(de D'Sa et al., 2001).....	20
Figure 7 : Comparaison des spectres d'absorption d'échantillons par rapport à MQF et par rapport à EAF à l'Ultrapath.....	22
Figure 8 : Spectre du « blanc » établi par l'Ultrapath de l'eau prise en référence (lumière reçue par le spectrophotomètre en « count »).....	22
Figure 9 : Comparaison de 3 spectres Ultrapath d'un même échantillon dans un intervalle de temps de 5 minutes.....	23
Figure 10 : Spectres d'absorption du CDOM mesurés par l'Ultrapath LWCC (UP) et par le Perkin Elmer (PE) pour trois échantillons (stations T12, T28 et T25 à 3 mètres).....	27
Figure 11 : Courbes de régressions entre valeurs de $a_{CDOM} < 0,2 \mu m$ mesurées avec l'Ultrapath (UP) et le Perkin Elmer (PE) à 370 et 442 nm pour les 69 échantillons de la campagne Valhybio.....	28
Figure 12 : En haut : Répartition en surface de la salinité (à gauche) et de la température (à droite) dans le lagon sud-ouest lors de la campagne VALHYBIO (in Dupouy et al., 2009).....	29
En bas : Cartes de l'absorption du CDOM mesuré à 440 nm ($0.2 \mu m$) à l'Ultrapath (à gauche) et au Perkin Elmer (à droite) (résultats bruts).....	29

Liste des tableaux

Tableau 1: Correspondance entre couleur et longueur d'onde.....	10
Table 2 : Coefficient d'absorption du CDOM mesuré à l'Ultrapath pour chaque station.....	26

Liste des photos

Photo 1 : Système Ultrapath : (gauche à droite) LWCC, pompe, spectrophotomètre, lampes (au-dessus).....	6
Photo 2 : Quelques Instruments de mesures utilisés en océanographie.....	17

PROLOGUE

1. L'Institut de Recherche pour le Développement

Créé en 1944, l'Institut de Recherche pour le Développement est un établissement public français à caractère scientifique et technologique (EPST) de plus de 2200 agents, placé sous la double tutelle des ministères chargés de la Recherche et de la Coopération, présidé par Jean-François Girard, Conseiller d'Etat, et dirigé par le Professeur Michel Laurent.

Engagé dans de nombreux programmes scientifiques européens et internationaux, il s'appuie sur sa fonction d'agence pour mobiliser les organismes de recherche et les universités en faveur de la recherche pour le développement, notamment dans l'hémisphère sud (en Afrique, Amérique Latine, Asie et dans l'Outre-mer tropical français).

Il remplit les missions fondamentales de Recherche, Expertise et Valorisation, Soutien et Formation, Information scientifique.

Les travaux effectués par les chercheurs de l'IRD sont coordonnés par trois départements scientifiques, dont Milieux et Environnement (DME) dans lequel les recherches visent à comprendre certains phénomènes comme la variabilité climatique, l'interaction entre océan et atmosphère... et leurs effets sur les ressources biologiques ainsi que sur les risques naturels de l'environnement.

2. Le centre IRD de Nouméa

L'IRD possède en Nouvelle-Calédonie un centre de recherche qui rassemble de nombreuses disciplines scientifiques : océanographie, écologie marine, géologie, géophysique, pharmacologie, agronomie, botanique, entomologie, archéologie, etc. Sa renommée est internationale, non seulement dans la zone du Pacifique Sud-Ouest, mais également dans toute la ceinture intertropicale.

L'évolution du centre est marquée par la mise en place de 13 Unités de Recherche (UR) et de 5 Unités de Service (US) en Nouvelle-Calédonie. Elles sont rattachées aux différents départements. Les unes ont pour finalité d'accroître les connaissances scientifiques de la zone intertropicale, tandis que les autres ont pour mission de valoriser les résultats de la recherche en répondant aux demandes d'expertise des partenaires locaux.

3. CAMELIA : Caractérisation et modélisation des échanges dans les lagons sous influences terrigènes et anthropiques

L'Unité de Recherche UR103 CAMELIA est rattachée au Département Milieu et Environnement. Elle s'intéresse aux mécanismes de transport et de transformation des apports en particules responsables de l'hypersédimentation, des apports organiques et inorganiques responsables de l'eutrophisation et des apports en métaux potentiellement toxiques.

Les états insulaires du Pacifique sont soumis à de profondes mutations économiques qui ont de fortes implications sur l'équilibre de l'environnement côtier. Tout en identifiant des questions scientifiques actualisées, CAMELIA s'inscrit dans le prolongement de la dynamique de recherche mise en œuvre depuis 1996 sur le thème général de l'influence des activités humaines sur les écosystèmes côtiers et tropicaux.

Le Laboratoire de chimie marine de l'UR CAMELIA permet l'ensemble des analyses chimiques et biologiques indispensables à la connaissance du milieu lagunaire. Cette connaissance résulte d'une expérience acquise au cours de différents projets de recherche d'étude du milieu lagunaire (sédiment et colonne d'eau) (Chifflet et al., 2004). Ce laboratoire dispose, entre autres, d'une filtration pour une eau Milli-Q de qualité garantie sans carbone (E pure *Barnstead*), d'un fluorimètre (*Trilogy*), d'un autoanalyseur *Technicon* pour la mesure des sels nutritifs, d'un analyseur de CHN (carbone, hydrogène, azote) *Perkin Elmer*, d'une micro-balance, de deux spectrophotomètres UV-Visible *Perkin Elmer et Beckman Coulter*, du nouveau spectrophotomètre *Ultrath*, ainsi que de tout le matériel de laboratoire usuel.



Photo 1 : Système Ultrath : (gauche à droite) LWCC, pompe, spectrophotomètre, lampes (au-dessus)

INTRODUCTION

Le travail présenté porte sur la mesure de la fraction colorée des composés organiques dissous dans l'eau de mer, ou CDOM (Colored Dissolved Organic Matter) encore appelée « substances jaunes » ou « yellow substances » ou « gelbstoff », définie comme l'absorbance de l'eau de la fraction inférieure à 0.2 μm . Le CDOM est l'un des paramètres qui influence fortement la mesure de chlorophylle* par le satellite. En effet, le CDOM absorbe la lumière solaire aux mêmes longueurs d'onde (200-500 nm) que la chlorophylle (maximum d'absorption à 440 nm). Il est donc capital de pouvoir le mesurer précisément afin de calibrer les données satellitales de couleur de l'eau. En effet, la chlorophylle de surface est estimée à partir de rapports de réflectance de la mer aux canaux 412, 442, 490, 510 et 550 nm.

Le sujet du stage était donc de comparer les mesures d'absorbance du CDOM, dans le lagon oligotrophe* de Nouvelle Calédonie, données par deux spectrophotomètres différents, dont l'un ayant été acquis dans le but d'obtenir une précision maximum sur la mesure de l'absorption du CDOM par allongement de la longueur du trajet optique, l'Ultrapath (WPI).

L'objectif était triple :

- connaître la variabilité des instruments d'une part,
 - d'autre part, réaliser les mesures les plus exactes possibles sur les 190 échantillons récoltés lors de la dernière campagne en mer,
 - réaliser également les mesures au cours d'un suivi mensuel dans le lagon.
- Ces échantillons doivent permettre d'établir une carte de la concentration de CDOM dans le lagon.

La mesure du CDOM constituait un des points forts du projet VALHYBIO, celle-ci n'ayant jamais été mesurée auparavant avec précision et de façon systématique.

Le rapport du travail effectué sera présenté de la manière suivante :
D'abord, nous replacerons le sujet dans son contexte en présentant le projet VALHYBIO, puis nous présenterons les notions d'optique utilisées et la connaissance actuelle du CDOM.
Ensuite, nous expliquerons les méthodes de mesures spectrophotométriques suivies.
Enfin, nous comparerons quelques résultats obtenus avec les deux spectrophotomètres *Ultrapath LWCC* et *Perkin Elmer lambda 20*.

* *Note* : le terme « chlorophylle » englobe ici l'ensemble des pigments absorbants dans le bleu, somme des chlorophylles et caroténoïdes du phytoplancton. La chlorophylle est un indice de la biomasse totale du phytoplancton de la colonne d'eau. Elle est mesurée *in situ* par filtration suivie d'une extraction dans un solvant par fluorimétrie (ou photométrie).

I/ PRESENTATION DU SUJET

1. Le projet PNTS et la campagne VALHYBIO : VALidation HYperspectrale du modèle BIOgéochimique dans le lagon de Nouvelle Calédonie

La concentration en chlorophylle *a* de surface est un excellent indicateur de la quantité de phytoplancton marin. Elle peut être simulée à l'aide d'un modèle biogéochimique couplé à un modèle hydrodynamique et être estimée depuis l'espace.

Dans le lagon tropical oligotrophe (pauvre en éléments nutritifs) de Nouvelle Calédonie, la chlorophylle est dépendante des apports anthropiques d'origine minière, urbaine et du renouvellement par les eaux du large provenant du sud-est, qui transitent à travers les passes découpant la barrière de corail.

Un modèle (Eco3M) reconstitue la distribution de la chlorophylle du lagon en fonction des vents et des pluies. Les conditions initiales, ainsi que les mesures de terrain sont nécessaires pour valider ce modèle et l'améliorer, notamment dans la partie sud.

Vue par les satellites de couleur de l'eau et un algorithme global, la chlorophylle lagonaire intègre les effets combinés des matières en suspension ou dissoutes, et du fond aux bathymétries inférieures à 20 m (figure 1).

Le projet VALHYBIO financé par le Programme National de Télédétection Spatiale 2007-2010 avait pour objectif (Dupouy et al., 2008):

- d'analyser l'amplitude et la dépendance spectrale des propriétés optiques inhérentes dans le lagon de Nouvelle Calédonie en comparaison avec le large
- d'examiner la performance d'un algorithme classique (OC4) pour estimer la chlorophylle à partir des données de réflectances satellitales R_{rs}
- d'élaborer un algorithme pour calculer la chlorophylle à partir des capteurs satellites MODIS et MERIS incluant l'élimination de l'effet du fond

Deux actions de recherche destinées à calculer ou mesurer les réflectances marines et différencier les influences des divers constituants optiques, quelle que soit la bathymétrie, ont été menées entre 2008 et 2009 :

1) la campagne VALHYBIO sur le navire de l'IRD *Alis* (3 semaines) a fourni les données de bio-optique (propriétés optiques et pigments) de la couleur de l'eau *in situ* nécessaires pour alimenter et vérifier les algorithmes. A toutes les stations, une combinaison de méthodes, suffisamment sensibles pour l'analyse des caractéristiques optique, chimique et biologique des eaux tropicales oligotrophes, a été mise en œuvre. Les données satellitaires MODIS étaient traitées en temps réel.

2) un suivi mensuel à 4 stations de référence dans le lagon et au large (présenté plus loin)

Le but ultime est de fournir un outil de validation de modèles permettant de mieux comprendre l'influence des facteurs environnementaux sur la productivité des eaux lagunaires et de détecter à partir d'observations satellitaires d'éventuels dysfonctionnements liés par exemple au développement de nouvelles exploitations minières continentales.

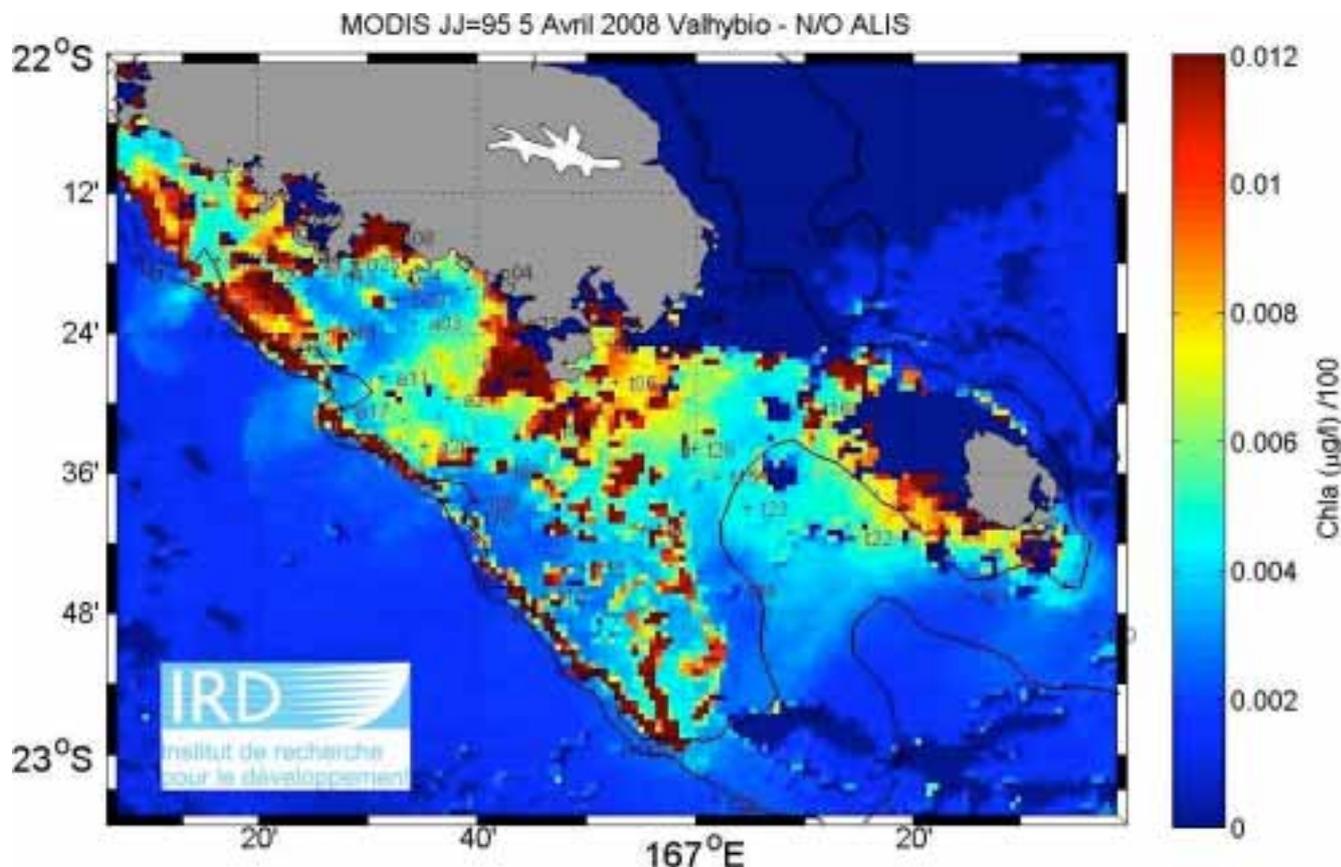


Figure 1: Zoom des scènes MODIS-500m dans le lagon sud de la Nouvelle Calédonie montrant la distribution de la chlorophylle de surface estimée à partir d'un algorithme global. Les stations de la campagne VALHYBIO sont superposées à l'image.

Le projet VALHYBIO dirigé par Cécile Dupouy de l'UR CAMELIA regroupe quatre laboratoires français et un laboratoire allemand:

- L'Unité de Recherche CAMELIA collecte les données d'optique et pigments sur le terrain pour comparaison avec les modèles numériques et les données satellitaires.
- L'Observatoire Océanologique de Banyuls effectue les mesures de pigments et cytométrie en flux.
- Le LOPB de l'Université d'Aix-Marseille II développe une modélisation du fonctionnement biogéochimique du lagon.
- L'Université de Bourgogne réalise une carte estimée de la couleur des fonds du lagon. L'objectif est de réaliser un algorithme permettant de soustraire ce paramètre aux mesures satellites.
- Le GKSS centre d'océanographie côtière de Geesthacht (Hambourg) est expert dans la mesures optiques et développe des instruments de mesure prototypes.

2. Les propriétés optiques inhérentes de la matière

Les longueurs d'onde de la lumière visible s'étendent de 400 nm à 700 nm. La correspondance approximative entre longueur d'onde, notée λ , et couleur est donnée dans le tableau suivant :

λ (nm)	couleur
<350	ultraviolet
400	violet
450	bleu
500	vert
550	jaune
600	orange
700	rouge
>750	infrarouge

Tableau 1: Correspondance entre couleur et longueur d'onde

Deux phénomènes contribuent à l'atténuation de la lumière : l'absorption et la diffusion. Ces trois phénomènes constituent les propriétés optiques inhérentes de la matière.

1) Absorption

L'absorption de la lumière est due à l'absorption de l'énergie des photons, par transition de niveau d'énergie, par les atomes et les molécules constituant l'atmosphère et l'eau de mer. Les différentes concentrations de ses constituants et les différents niveaux d'énergies excitables déterminent la façon dont les différentes longueurs d'onde composant le spectre de la lumière sont absorbées.

La lumière en provenance du soleil est atténuée par l'atmosphère avant d'atteindre la surface de l'eau. L'eau pure est un milieu très absorbant pour la lumière, en particulier pour les infrarouges : ceux-ci sont absorbés dans les premiers mètres et peu de lumière atteint les 100 mètres.

Les matières en suspension, les matières dissoutes participent à l'atténuation. La plupart des substances composant le sel marin ont peu d'effet sur l'absorption de la lumière dans l'eau. Il n'y a pratiquement pas de différence entre le spectre d'absorption d'une eau de mer très claire et celui de l'eau distillée.

Le coefficient d'absorption, noté a , est le rapport du flux radiatif perdu par absorption sur le flux radiatif incident (énergie par unité de temps) par unité de longueur. Son unité est donc le m^{-1} . Le coefficient d'absorption peut être décomposé de manière additive selon les différents constituants :

$$a(\lambda) = a_w(\lambda) + a_y(\lambda) + a_d(\lambda) + a_p(\lambda) + a_{phy}(\lambda) \dots \quad (1)$$

a_y : a_{CDOM} : coefficient d'absorption du CDOM ou substance jaune (y pour yellow) ($< 0.2 \mu m$).

a_p : coefficient d'absorption des particules (m^{-1}) mesuré lors de la campagne en mer ($> 0.4 \mu m$)

a_d : coefficient d'absorption des détritiques (m^{-1}) mesuré lors de la campagne en mer ($> 0.4 \mu m$)

a_w : coefficient d'absorption de l'eau (w pour water), donné par la littérature.

L'absorption *in vivo* des particules dépend de la quantité de phytoplancton et débris biogéniques, ainsi que de la couleur des particules minérales (de taille supérieure à 0.4 µm). L'absorption *in vivo* des substances jaunes correspond à la fraction inférieure à 0.2 µm (molécules de taille variable) absorbant essentiellement dans la partie UV du spectre. Notons que la filtration sur 0.2 µm élimine autant que possible la fraction vivante contenue dans l'eau de mer, bactéries et virus.

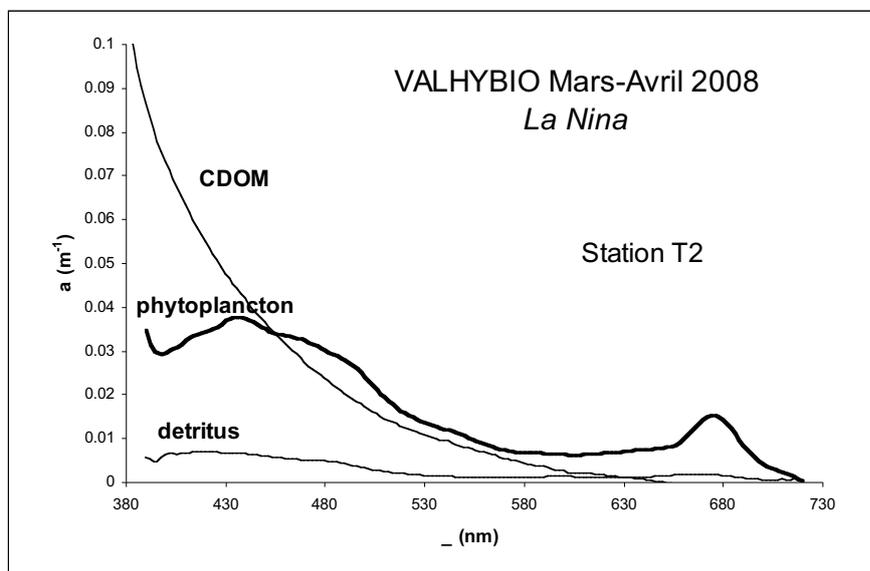


Figure 2: Spectres d'absorption de la lumière par les débris, le phytoplancton et le CDOM à la station T2 de VALHYBIO

Le spectre d'absorption du CDOM a une allure exponentielle décroissante, calculé d'après la formule 2 (Bricaud *et al.*, 1981), tandis que le spectre d'absorption du phytoplancton montre les 2 maxima à 440 et 670 nm liée aux pigments chlorophylliens.

$$a_y(\lambda) = a_y(\lambda_0) \cdot e^{-S(\lambda-\lambda_0)} \quad (2)$$

λ_0 : longueur d'onde de référence prise à 440 nm. La concentration en CDOM, difficilement mesurable, est prise en compte à cette longueur d'onde (Froidefond et Doxaran, 2004).

λ : longueur d'onde considérée pour a_y (coefficient d'absorption du CDOM)

S : pente exponentielle, qui tient compte de la nature des CDOM

D'après la formule (2) on obtient :

$$S = \ln(\text{moyenne}(a_{\text{cdom}}(500\text{nm})) - \ln(\text{moyenne}(a_{\text{cdom}}(350\text{nm}))) / (500-350)$$

D'après Froidefond et Doxaran (2004), le paramètre S tient compte de la nature des CDOM. Les études récentes (voir bibliographie) confirment que S varie peu dans le milieu naturel et sa valeur moyenne ($0,014 \text{ m}^{-1}$) est jugée représentative pour la majeure partie des eaux côtières et océaniques. Kirk (1994) donne des exemples de coefficients $a_y(440 \text{ nm})$, et donc de concentrations en CDOM, mesurés dans différents types d'eau. Les valeurs $a_y(440 \text{ nm})$ s'avèrent faibles et peu variables en milieu océanique ($0,010- 0,113 \text{ m}^{-1}$), mais plus élevées en milieux côtier et estuarien entre $0,07$ et $0,65 \text{ m}^{-1}$, et pouvant atteindre des valeurs proches de 20 m^{-1} .

2) Diffusion

La diffusion de la lumière est un phénomène physique que l'on rencontre lorsque des inhomogénéités optiques (variations de l'indice de réfraction, présence de particules) du milieu provoquent des changements aléatoires de la direction des rayons lumineux. La diffusion par les grosses particules est le résultat de la réflexion, de la réfraction et de la diffraction. Lorsque les dimensions des particules sont inférieures à la longueur d'onde considérée, comme c'est fréquemment le cas pour l'eau de mer, l'optique géométrique* ne suffit plus à expliquer la diffusion et il faut faire appel à la théorie des ondes électromagnétiques*. On appelle rétrodiffusion la partie de la diffusion qui est rétrograde.

Le coefficient de diffusion est noté \mathbf{b} (\mathbf{m}^{-1}). C'est le rapport du flux radiatif perdu par diffusion sur le flux radiatif incident par unité de longueur.

3) Rétrodiffusion

La mesure de la rétrodiffusion, c'est-à-dire de la lumière émise par l'océan à certaines longueurs d'onde, donne des informations quantitatives sur la teneur en éléments organiques et autres matériaux en suspension dans la couche de surface. L'interprétation de ces mesures apporte des résultats importants pour l'étude de la photosynthèse et donc du cycle du carbone, sur l'interaction du vent et des courants avec la biologie de l'océan ainsi que sur l'influence de l'activité humaine sur l'environnement océanique.

La rétrodiffusion des eaux de mer dépend de la distribution de taille des particules, des débris d'origine biogène ou minérale, du phytoplancton, des colloïdes etc...et est mal connue.

Le coefficient de rétrodiffusion, noté \mathbf{b}_b , est tel que :

$$\mathbf{b}(\lambda) = \mathbf{b}_b(\lambda) + \mathbf{b}_f(\lambda) \quad (3)$$

avec un indice b pour *backward* (vers l'arrière) et f pour *forward* (vers l'avant).

$\mathbf{b}_b = \mathbf{b}_b\text{-H6}$: coefficient total de rétrodiffusion, mesuré grâce à un instrument, l'Hydroscat 6 (HOBILabs), lors de la campagne en mer.

On s'intéresse essentiellement à la partie arrière de la diffusion (la partie du signal rétrodiffusé détectée par le satellite).

4) Calcul de la réflectance satellitale à partir des mesures terrain

Les coefficients de rétrodiffusion $\mathbf{b}_b(\lambda)$ et d'absorption $\mathbf{a}(\lambda)$ de la lumière par les particules sont mesurés afin d'explorer la relation avec la réflectance $\mathbf{R}(\lambda)$ en milieu lagunaire, pour une large gamme de chlorophylle, de concentrations en matières en suspension et de matière organique dissoute colorée.

La réflectance est le quotient du flux de particules ou du flux lumineux que réfléchit une surface par le flux incident. Néanmoins, on différencie celle-ci de la réflectance calculée par les satellites. La «Remote Sensing Reflectance», notée \mathbf{R}_{RS} , est la réflectance télédétectée par les capteurs «couleur de la mer» des satellites. Ce n'est pas une réflectance à proprement parlé puisque son unité est le \mathbf{sr}^{-1} (stéradian : unité d'angle solide). Elle est définie par :

$$\mathbf{R}_{RS}(\lambda) = \mathbf{b}_b(\lambda) / [\mathbf{b}_b(\lambda) + \mathbf{a}_w(\lambda) + \mathbf{a}_y(\lambda) + \mathbf{a}_p(\lambda)] \quad (4)$$

Le satellite mesure la réflectance de l'eau de mer pour six longueurs d'onde : 440, 488, 510, 550, 620 et 670 nm (SeaWiFS) et 12 longueurs d'onde pour MODIS (dont 412 nm important pour le CDOM).

Tous les coefficients d'absorption et rétrodiffusion ont été mesurés pendant la campagne et le suivi mensuel. Le coefficient d'absorption du CDOM était le seul paramètre dont la précision était jusqu'à présent insuffisante pour comparer les données issues de la campagne en mer avec les données satellitales.

3. La Matière Organique Dissoute Colorée (CDOM)

Le CDOM (ou MODC) est défini comme une partie des substances organiques (matière organique dissoute DOM) qui absorbent la lumière dans l'ultraviolet et le bleu et passe à travers un filtre de diamètre de pore égal à $0.2\mu\text{m}$ (Bricaud et al., 1981 ; Kirk, 1994). Par conséquent, sa concentration et ses propriétés optiques peuvent avoir une influence sur la couleur des océans. La composition exacte du CDOM varie mais reste peu connue. On sait seulement que les substances humiques* (acide humique et acide fulvique) sont les principaux éléments. Leur couleur varie du jaune au marron, c'est pourquoi ils sont appelés « yellow substance » ou « Gilvin ».

La matière organique dissoute colorée est omniprésente dans le milieu marin et joue un rôle important dans les processus biochimiques et en particulier dans le cycle du carbone (Blough and Del Vecchio 2002).

La production *in situ* de CDOM provient de la dégradation de la matière organique particulaire (Hayase et al, 1988) dans les eaux côtières, mais aussi de l'activité photosynthétique des macroalgues (Fogg, 1966) et de la diffusion passive des cellules algales (Zhao, 2009). D'autres études ont montré également que les bactéries et le phytoplancton peuvent être une source de CDOM en milieu océanique (Carder et al, 1991; Nelson et al, 1998 ; 2004 ; 2007).

En surface, le CDOM subit la photo-altération: le rayonnement solaire casse les grosses molécules organiques en plus petites qui sont ensuite supprimées par la communauté microbienne (Miller and Moran, 1997).

De récentes études ont utilisé la fluorescence du CDOM comme traceur de masses d'eaux et la corrélation entre le CDOM et les processus écologiques (Coble et al., 1998; Nelson et al., 2007). Dans un contexte plus général, ces études s'inscrivent dans la recherche sur le réchauffement climatique.

Les études passées de la dynamique de la MODC en milieu aquatique étaient entravées par le manque de système optique assez sensible pour la détecter en eau oligotrophe. La méthode standard pour mesurer le coefficient d'absorption de la lumière, était effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre conventionnel équipé de cuve en quartz de 10 cm. L'échantillon d'eau de mer est filtré sur $0.2\mu\text{m}$ et sa densité optique mesurée par rapport à l'eau distillée (Green and Blough 1994; Vodacek et al. 1997). Cette méthode atteint sa limite dans le cas des eaux oligotrophes (très pauvres en particules), c'est pourquoi le spectrophotomètre *Ultrapath* LWCC, plus sensible puisque permettant un trajet optique de 200 cm, a été utilisé pour des applications océanographiques.

II / MATERIEL ET METHODES

1. Présentation du site d'étude

Le lagon de Nouvelle Calédonie (figure 3) est une zone sensible car située en zone tropicale, oligotrophe, et soumise à des apports anthropiques d'origine minière (métalliques, sédimentaires) et urbaine (sels nutritifs), ainsi qu'aux aléas climatiques (cyclones, cycle El Nino/La Nina avec alternance de périodes de sécheresse et de fortes pluies). Il est cerné par une barrière corallienne interrompue par d'étroites passes permettant des échanges avec l'océan du large et forme une zone de transition vers l'océan ouvert.

Dans sa partie sud, il comprend pour un tiers de sa surface des récifs coralliens de profondeur variable (entre 20 et 40 mètres) où la chlorophylle vue par satellite est forte, de nombreuses passes où peuvent se produire des échanges, enfin une zone ouverte sur le large où les images satellites (figure 1) montrent des phénomènes d'enrichissement importants près des récifs côté océanique (upwelling) sous l'effet des vents alizés.

Dans sa partie sud-ouest, il comprend des milieux optiquement bien distincts : les baies peu profondes (10m) à fort temps de résidence où les concentrations en chlorophylle sont statistiquement les plus élevées, le milieu de lagon à faible temps de résidence, soumis aux apports du large et à bathymétrie variable (20 m en moyenne à 50 m dans les canyons profonds), et enfin les fonds blancs situés derrière la barrière corallienne.

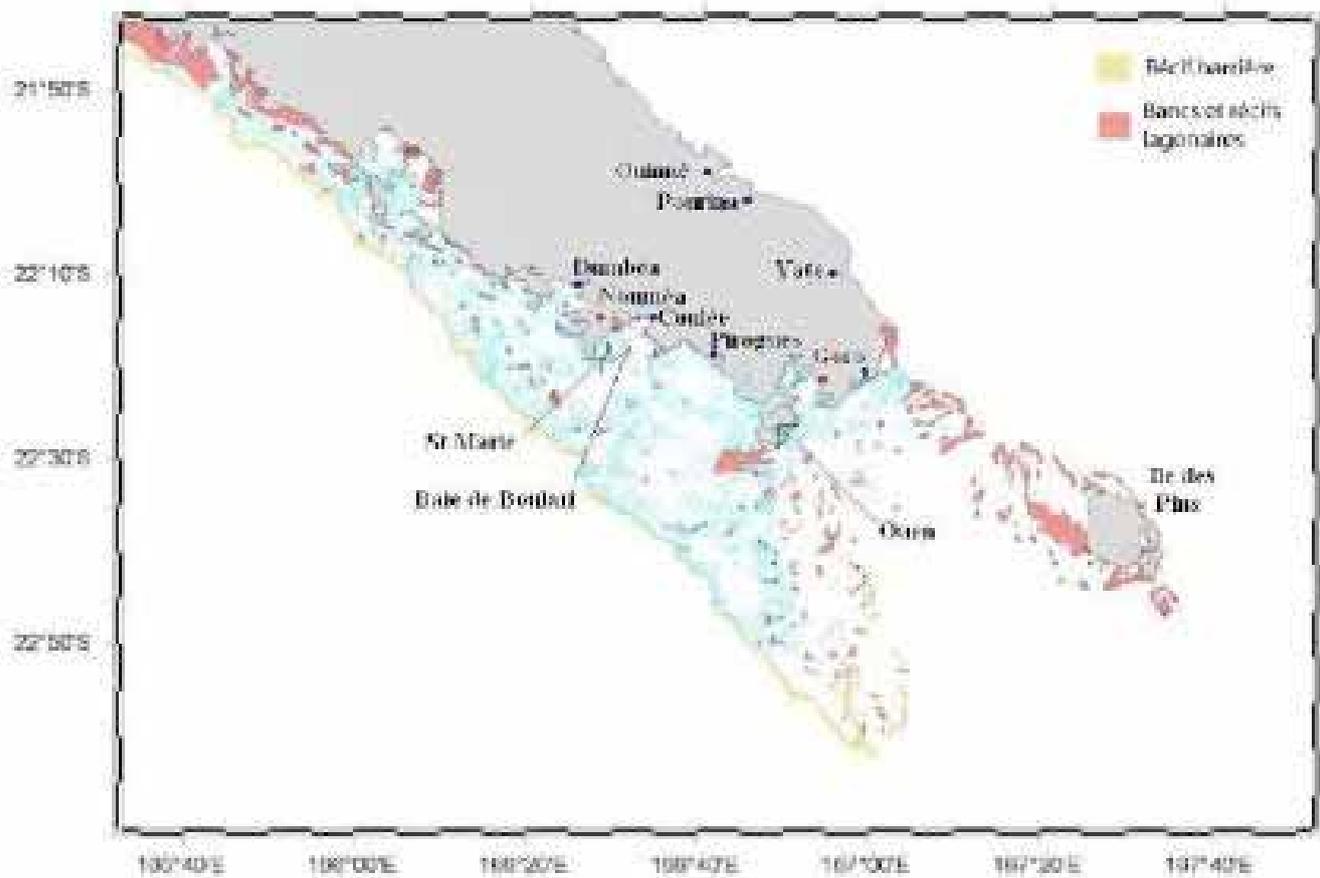


Figure 3 : Carte des lagons Sud et Sud -Ouest de Nouvelle Calédonie (Base de données CAMELIA, P. Douillet)

2. Echantillonnage

1) Campagne VALHYBIO

Un réseau de 53 stations représentatives des différents types de fonds et incluant des stations de référence à l'extérieur de la barrière corallienne, a été réalisé deux fois de suite dans des conditions de vents différentes au cours de la campagne sur le navire *Alis* de l'IRD du 22 mars au 7 avril 2008 (Dupouy et al., 2008 ; 2009).

De plus, trois points fixes de 24h représentatifs des différentes zones lagonaires (entre les cornes du lagon sud, canyon profond, et bande côtière) ont eu pour but d'améliorer notre connaissance de la variabilité à court terme des propriétés optiques des eaux en fonction des facteurs environnementaux (marée, pluies, vent).

L'ensemble des paramètres physiques a été mesuré à l'aide d'un profileurs CTD* (Conductimetry, Temperature, Density) équipé d'un transmissiomètre. L'ensemble des paramètres biologiques a été collecté à l'aide d'une rosette de 12 bouteilles (surface et au-dessus du fond) pour l'analyse ultérieure des propriétés optiques inhérentes et apparentes (pigments chlorophylliens et phycoérythrine, comptages en cytométrie en flux, poids sec, sels nutritifs (PO₄, NO₃+NO₂, NH₄ à bord, Silicates) ainsi que pour la quantité totale de carbone et d'azote....L'ensemble de ces paramètres est en cours de transmission au site SISMER à Brest.

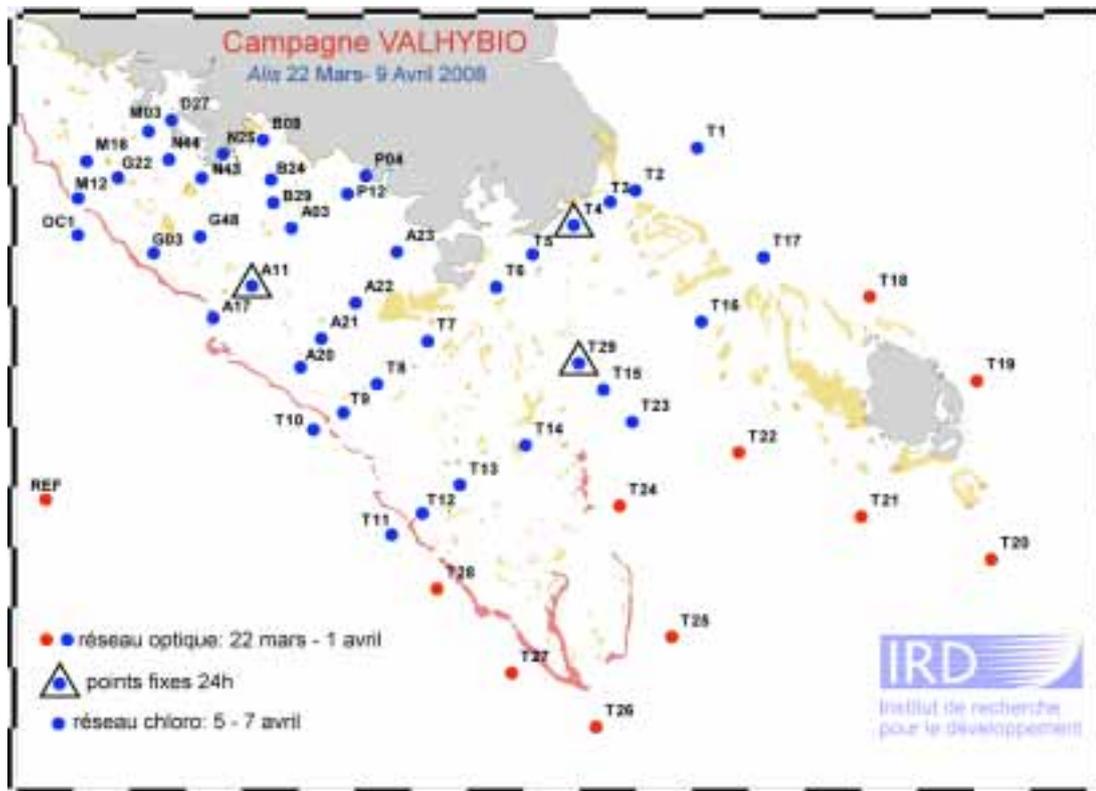


Figure 4 : Carte des stations d'échantillonnage lors de la campagne VALHYBIO (in Dupouy et al., 2008; 2009)

Les limites de précision de la méthode spectrophotométrique avec des cuves de 10 cm nécessitent l'utilisation d'un *Ultrapath LWCC*, ou d'un instrument type *PSICAM* (Rottgers et al., 2006a). Ces instruments permettent de mieux décrire les gradients fins d'absorption du CDOM de part et d'autre des barrières coralliennes.

Ainsi, les échantillons d'eau de mer filtrée sur 0.2 μm (Nuclepore) ont été conservés à 4°C dans des bouteilles ambrées (nettoyées à l'acide et passées à l'étuve 100°C pendant une nuit) pour mesurer le spectre d'absorption UV de la matière organique colorée dissoute à l'aide du capillaire de 200 cm *Ultrapath* (WPI), tandis que les autres paramètres optiques ont été mesurés directement sur le bateau (PSICAM et AC9 par Rüdiger Röttgers, GKSS).

2) *Suivi mensuel VALHYBIO*

La campagne VALHYBIO comporte aussi un suivi mensuel au niveau de quatre stations située en différents fonds du lagon (figure 5):

OC1 en océan ouvert derrière la passe de Dumbéa, qui entaille le récif barrière et est associée à la rivière de la Dumbéa. point où l'algorithme du satellite s'applique directement. Cette station sert de référence puisque l'eau est bleue marine*.

G03 à Crouy, dans le lagon proche de la barrière récifale où le sable est blanc.

M33 au milieu du lagon, à proximité de l'îlot Maître, au dessus de sable gris.

GD10 en baie de Dumbéa soumise aux rejets miniers et peu profonde (10 m), fonds vaseux, où l'eau est verdâtre

En juillet 2009 les stations B03, B08 et B50 ont été rajoutées. Situées en baie de Boulari, elles sont soumises aux rejets agricoles et terrigènes apportés par la rivière des Pirogues.

A bord du navire *Coris* de l'IRD, différents types de mesures sont effectués sur la colonne d'eau. Les mesures de salinité, température, profondeur, fluorescence de la chlorophylle sont effectuées à l'aide de deux profileurs CTD* (Conductimetry, Temperature, Density). Tandis que le coefficient de rétrodiffusion est mesuré à l'aide du profileur *Hydroscat-6* * aux longueurs d'ondes mesurées par le satellite (440, 488, 510, 550, 620 et 660 nm).

De plus, la profondeur de disparition de la lumière est déterminée grâce au disque de Secchi. Le disque est descendu avec une corde graduée tous les mètres et la profondeur, à laquelle il n'est plus perçu, est notée. Cette profondeur sera ensuite utilisée pour calculer le coefficient d'atténuation de la lumière.

Les prélèvements d'eau sont effectués à la profondeur de 3m grâce à l'utilisation d'une bouteille NISKIN de 5l. Celle-ci est constituée d'un cylindre en PVC muni d'un bouchon à chaque extrémité. Elle est placée sur un bout alourdi par un poids et descendue en position ouverte. La fermeture à distance est assurée par le déclenchement d'un mécanisme sous le choc d'un messenger (masse métallique) qui coulisse le long du bout.

L'eau ainsi prélevée est stockée à l'abri de la lumière dans quatre bouteilles de 5L en polyéthylène (NALGENE) par station, en attendant les filtrations en laboratoire.

Au laboratoire de chimie marine de l'UR CAMELIA, les différents prélèvements d'eaux sont filtrés (sur 0.7 μm , filtres GF/F Whatmann) afin de récupérer la chlorophylle, les phycoérythrine, le carbone organique particulaire total, et la matière particulaire en suspension (filtres GF/F Millipore de porosité 0.4 μm). Enfin, l'eau est filtrée sur des filtres en polycarbonate Millipore de porosité 0.2 μm pour le CDOM. Toutes les analyses sont faites au laboratoire de chimie de IRD Noumea. Seuls les filtres pour l'analyse du pigment phycoérythrine (des cyanobactéries picoplanctoniques ou filamenteuses) sont envoyés à l'Observatoire Océanologique de Banyuls (Jacques Neveux) où les concentrations en pigments par spectrofluorimétrie seront dosées.

L'absorbance du CDOM est mesurée tout de suite à l'*Ultrapath* et au spectrophotomètre *Perkin Elmer lambda 20*.



Sonde CTD



Profileur Hydrocat-6



Bouteille NISKIN



Disque de Secchi

Photo 2 : Quelques Instruments de mesures utilisés en océanographie

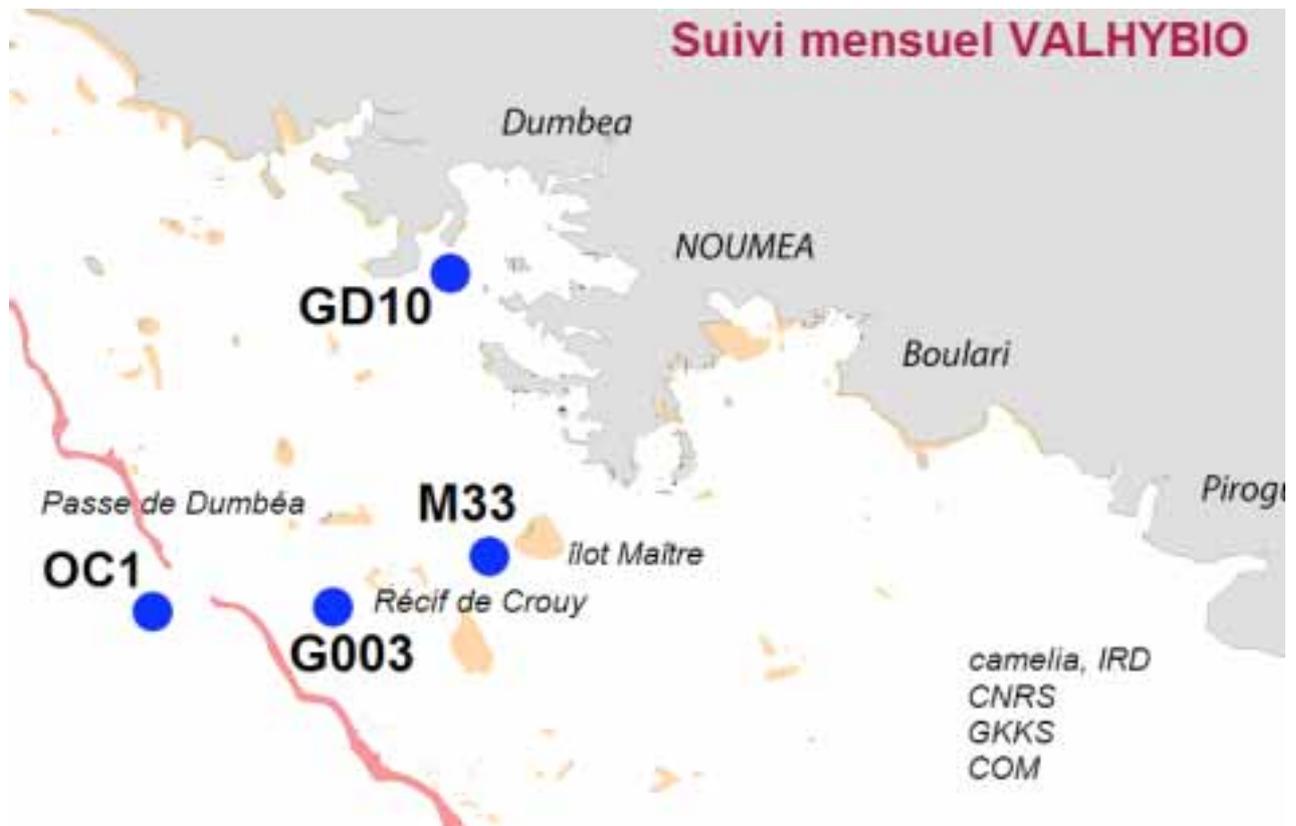


Figure 5 : Carte des stations du suivi mensuel VALHYBIO

3) Préparation des échantillons au laboratoire

a) Conservation des échantillons

La lumière et la température peuvent influencer sur la mesure des concentrations en CDOM. C'est pourquoi les échantillons analysés doivent être conservés à l'abri de la lumière et au froid. Une fois sortis du réfrigérateur et portés à température ambiante, les échantillons doivent être analysés le jour même. Il faut donc bien organiser la journée de manipulations pour ne pas sortir trop d'échantillons. En revanche, l'idéal reste de les analyser juste après les prélèvements en mer.

b) Nécessité de la refiltration

Par définition le CDOM est constitué de molécules de taille inférieure à $0,2 \mu\text{m}$ (ceci est l'absorption d'un filtrat sur $0.2 \mu\text{m}$). Toutefois, il est nécessaire de refiltrer les échantillons à mesurer car nos observations montrent que des particules se forment au bout d'un certain temps (de l'ordre de 12 à 24h) dans la bouteille même si l'échantillon a déjà été filtré. Juste avant la mesure, l'échantillon est donc filtré sur un filtre $0,2 \mu\text{m}$ (Nucléopore) à la pression maximum de 200 mm/Hg.

3. Techniques de mesure spectrophotométrique

1) Détermination expérimentale du coefficient d'absorption

Le spectrophotomètre mesure l'absorbance de l'échantillon en fonction de la longueur d'onde. L'absorbance A est le rapport entre le flux absorbé et le flux incident. Il est relié au coefficient d'absorption par la relation suivante :

$$a(\lambda) = 2,303 A(\lambda) / L \quad (5)$$

où L est la longueur du trajet optique dans l'échantillon

$A = -\log_{10} T$ (T est la transmission)

Le facteur 2,303 convertit \log_{10} en \ln

La concentration en CDOM, difficilement mesurable, est déterminée grâce au coefficient d'absorption à 370 et 440 nm.

2) *Ultrapath LWCC (Liquid Waveguide Capillary Cell)*

L'*Ultrapath* a été développé par WPI en collaboration avec la NASA (Centre Spatial Stennis) pour la détermination spectroscopique de la matière organique dissoute colorée dans l'eau de mer et l'eau douce, et a été conçu pour être utilisé dans le laboratoire et sur le terrain (ex. en mer) (Dsa et al., 1999, 2001; Miller et al., 2002).

Nous avons utilisé un appareil de trajet optique (longueur de la fibre) d'environ 2m et 2 mm de diamètre extérieur : Le constructeur annonce 202 cm ± 0.5 cm, mais d'après la comparaison pour un standard effectuée par Rüdiger Röttgers au GKSS, elle mesure exactement 1.9 m.

La fibre capillaire est enroulée sur elle-même afin d'optimiser la place et peut contenir un volume de liquide de 480 μ L. Les parois de ce tube sont constituées d'un matériau aux caractéristiques optiques spécifiques. Ainsi, la lumière se propage le long du tube comme dans une fibre optique. Le trajet de la lumière étant allongé d'un facteur 20 par rapport à un spectrophotomètre classique, la mesure est en principe 20 fois plus précise.

L'ensemble *Ultrapath* inclue :

- un spectrophotomètre à barrette de photodiodes (TIDAS I) pour mesurer l'absorbance au trajet optique. L'instrument opère dans la gamme de trajets optiques 250 à 720 nm (UV-visible) avec une résolution de 5nm et un bruit sous les 0.2 mAU.
- deux sources lumineuses : une lampe au Deutérium émettrice dans l'UV et une lampe Halogène émettrice dans le visible, envoie la lumière à travers une fibre optique vers la cellule de mesure.
- une pompe péristaltique ou une seringue peut être utilisée pour pousser l'échantillon dans l'injecteur et à travers la fibre capillaire.
- un PC, comportant le logiciel TIDASDAC, est connecté au système de détection via une interface RS232 pour l'acquisition, l'enregistrement et le maniement des données.

Finalement, en accord avec notre collègue Rüdiger Röttgers, nous avons jugé préférable de pousser l'échantillon dans la fibre capillaire à l'aide d'une seringue équipée d'un filtre 0.2 μ m, car la pompe génère trop de bulles d'air perturbant la mesure. Trois mesures sont faites ensuite systématiquement pour chaque échantillon : le « dark », la « référence » et l'échantillon. Ainsi on contrôle une dérive éventuelle au cours de l'analyse.

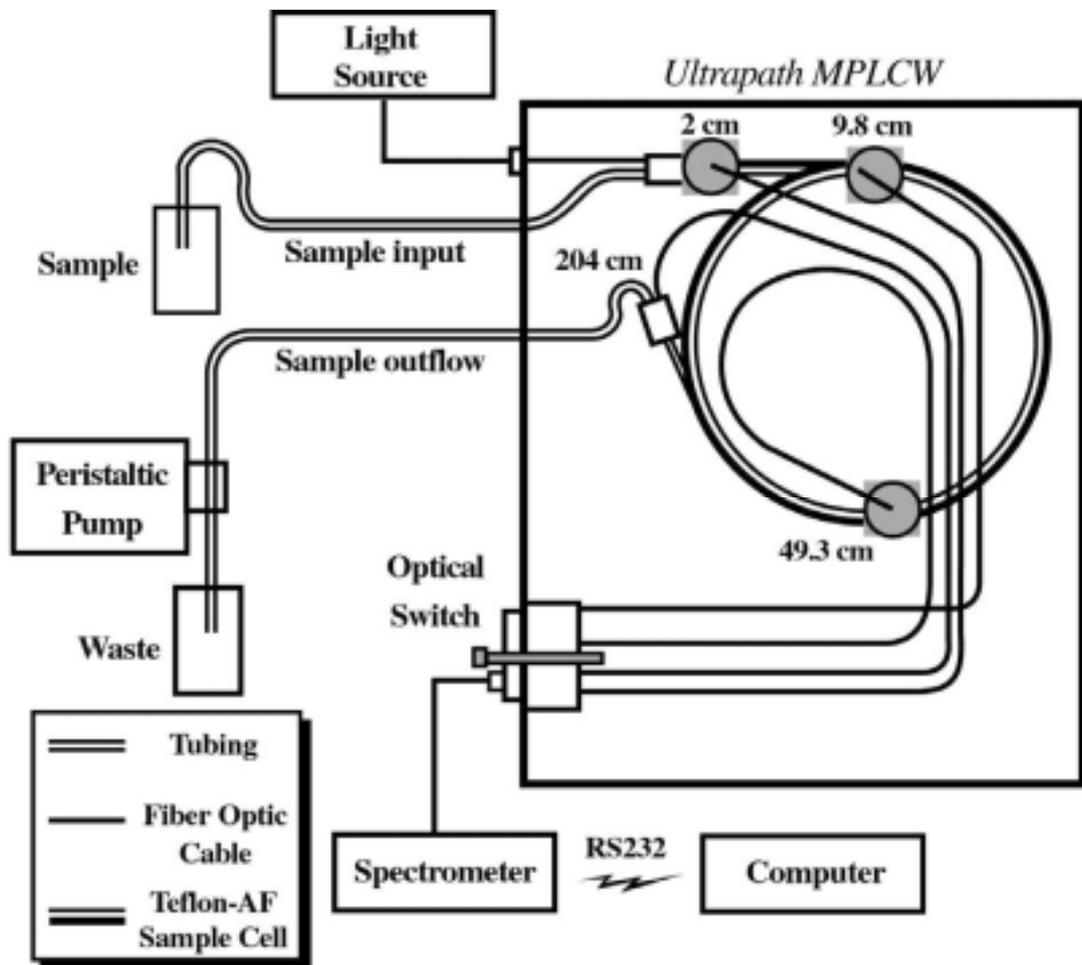


Figure 6 : Schéma d'un Ultrathin Multiple Pathlengths, Liquid Core Waveguide (MPLCW)
(de D'Sa et al., 2001)

Le principe du LWCC est identique au MPLCW sauf que celui-ci comporte uniquement la fibre capillaire de 202 cm.

3) Perkin Elmer lambda 20

Le Perkin Elmer lambda 20 est un spectrophotomètre UV/Visible classique. Une lampe au Deutérium est utilisée pour émettre le rayonnement UltraViolet, ainsi que la lampe au Tungstène émettrice de lumière visible.

La précision d'absorbance de cet instrument est de $\pm 0,003$ à 440 ; 546 et 635 nm (dans le visible) et de $\pm 0,015$ à 257 et 350 nm (dans l'UV).

Les cuves utilisées sont des cuves en quartz de 10 cm de longueur (trajet optique). Une cuve est prévue pour l'eau de référence et reste toujours en place, l'autre est prévue pour l'échantillon. L'appareil est relié à un ordinateur comportant le logiciel d'acquisition UVWINLAB.

Cependant, le principe est le même chez les deux spectrophotomètres : une eau de référence, choisie judicieusement, est tout d'abord mesurée. Elle permet d'établir une ligne de base - un zéro - par rapport auquel l'échantillon sera mesuré. C'est ce que l'on appelle « faire le blanc ». Puis, on mesure l'échantillon et l'on obtient en fait la différence d'absorbance entre les deux.

4. Phase d'essais pour l'élaboration d'un protocole pour l'Ultrapath

L'objectif de mon stage était d'obtenir des courbes exploitables avec chaque instrument et réduire les erreurs de mesure. Un protocole de mesure pour le laboratoire a été élaboré à la suite de nos essais (Annexe 1).

1) Précautions de propreté

La seringue doit être rincée à l'eau distillée filtrée avant chaque mesure. Une seringue neuve a été utilisée tous les 50 échantillons environ. Par ailleurs, chaque récipient est rincé avec de l'eau milli-Q, puis entre une et trois fois avec l'échantillon à mesurer avant utilisation afin d'éviter toute contamination.

2) Effet des bulles d'air

En comparant les spectres obtenus à l'Ultrapath par injection à la pompe péristaltique à ceux obtenus par injection à la seringue. Nous avons remarqué que la pompe génère plus de macro-bulles d'air que la seringue, ainsi que l'injection à la seringue continue pendant la mesure. En fait, l'arrêt de l'injection à la seringue juste avant de lancer la mesure est la solution pour éviter la formation de macro-bulles. L'injection doit se faire lentement sans trop forcer afin d'éviter les bulles.

Le signal d'absorbance du CDOM, obtenu avec l'Ultrapath dans les zones oligotrophes, doit être parfaitement stable sur tout le spectre (allure d'une exponentielle décroissante) et inférieur à 0.01 AU dans le rouge (600-700 nm). En revanche, lorsque une macro-bulle d'air est présente dans la fibre, le signal d'absorbance est plus élevé, très instable et l'intensité lumineuse (en %) reçue par le spectrophotomètre est très faible, voir nulle.

Il semble également que des micro-bulles se forment et perturbent le signal (R. Röttgers). Il faut donc, dans la mesure du possible, éviter d'agiter l'échantillon. Cependant, ceci est quasiment impossible, notamment lors de la filtration.

3) Choix de l'eau de référence pour la mesure de CDOM

en milieu marin

Le premier mois nous avons effectué des mesures tests à l'Ultrapath afin de trouver la bonne eau de référence parmi celles à disposition. Celles-ci étaient :

- l'eau de source du Mont Dore vendue dans le commerce
- une eau milli-Q (17,6 MOhm/cm) fraîchement distillée et re-filtrée sur 0,2 μm (MQF). Cette eau est fabriquée au laboratoire de chimie marine à partir de l'eau déminéralisée et obtenue après distillation dans les colonnes échangeuses d'ions.
- l'eau de mer prélevée au large et vieillie à l'obscurité
- une eau salée artificielle filtrée (EAF) tel que recommandé par Röttgers et Doerffer (2007) Celle-ci a été fabriquée à partir de NaCl pur chauffé 4h à 450°C, comme recommandé, à la concentration de 35g/l et avec l'eau distillée milli-Q et re-filtrée sur 0,2 μm après dissolution du sel.

Les tests avec les différentes eaux prises en référence nous ont permis de choisir l'EAF. La comparaison des spectres de CDOM obtenus par référence avec l'EAF ou l'eau MQF (ci-dessous) nous montre pourquoi.

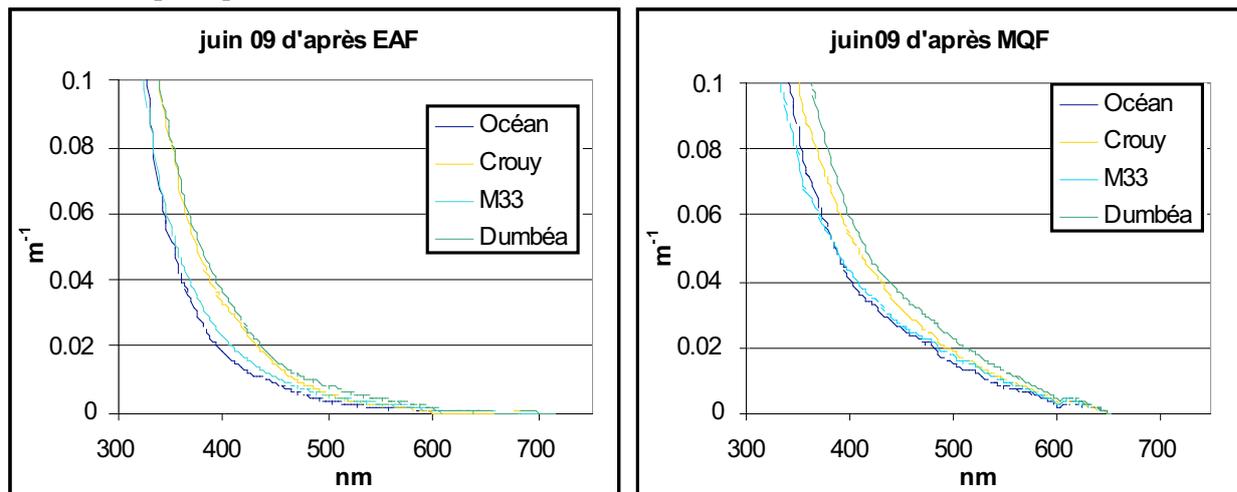


Figure 7 : Comparaison des spectres d'absorption d'échantillons par rapport à MQF et par rapport à EAF à l'Ultrapath.

Dans cette figure, l'offset à 650 nm a été soustrait.

Les spectres obtenus par rapport à MQF ou EAF ont l'allure attendue d'une exponentielle. Comme l'EAF est déjà très absorbante à cause du sel, la différence d'absorbance mesurée entre l'échantillon et la référence est plus faible. En revanche, la pente des spectres obtenus par rapport à l'eau milli-Q filtrée est plus raide à cause de l'absorbance du sel qui se surajoute. Ceci se traduit par des spectres plus creux (Figure 7 à gauche) par rapport aux spectres plus « pentus » (Figure 7 à droite). Il a été déterminé par plusieurs auteurs qu'il était plus juste de mesurer le CDOM des échantillons d'eau de mer par rapport à l'EAF afin d'éliminer autant que possible les artefacts de mesure dus à la différence d'indice de réfraction entre l'échantillon et la référence (Röttgers and Doerffer, 2007).

Lorsque l'instrument effectue son « blanc » à l'aide de l'eau prise en référence on obtient le spectre suivant (Figure 8).

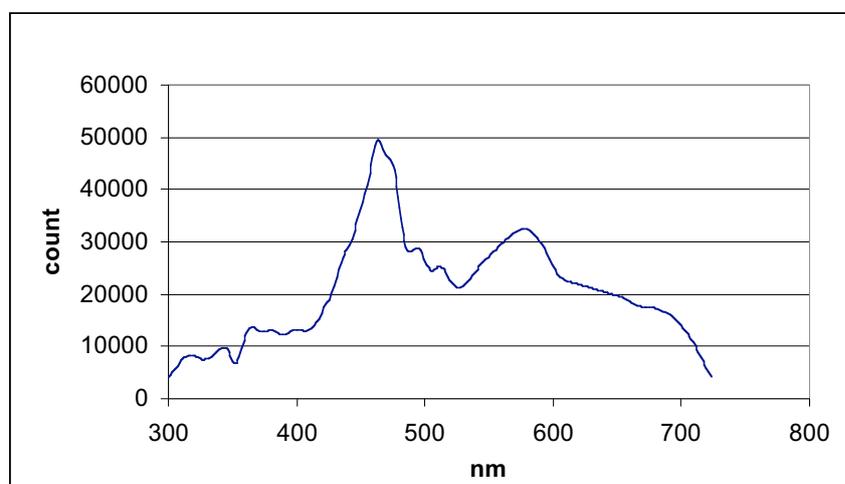


Figure 8 : Spectre du « blanc » établi par l'Ultrapath de l'eau prise en référence (lumière reçue par le spectrophotomètre en « count »)

4) Précision, répétabilité de la mesure, contrôle des spectres (offset) et de la dérive instrumentale

- La précision théorique de l'Ultrapath étant de 0.2 mAU, la précision sur le coefficient d'absorption est donc de 0.0024 m⁻¹ (2.303/ 1.9 * 0.002).
- Nous avons vérifié la répétabilité de la mesure Ultrapath en mesurant systématiquement le spectre de l'échantillon 3 fois. Le spectre d'absorption final est la moyenne des 3 mesures (Figure 9).

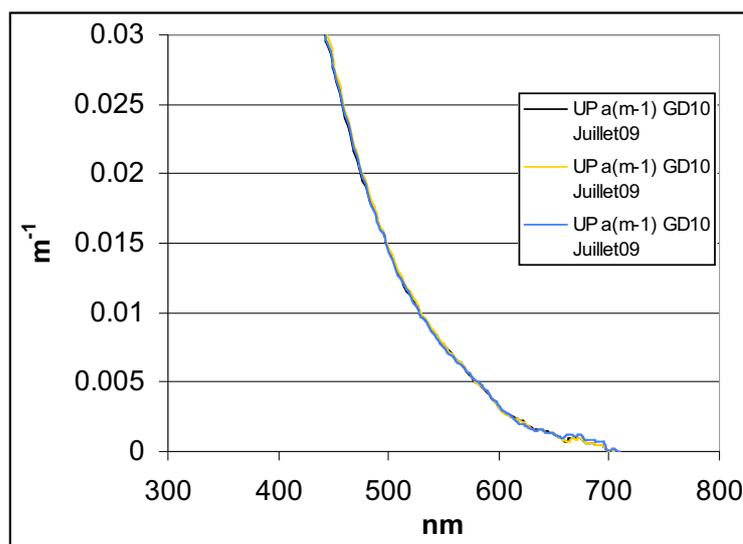


Figure 9 : Comparaison de 3 spectres Ultrapath d'un même échantillon dans un intervalle de temps de 5 minutes

- Les échantillons ayant été réfrigérés à 4°C pour leur conservation, il était nécessaire d'obtenir leur équilibration par rapport à la température de l'air ambiant et de l'eau de référence. Ainsi, la variation de température de l'échantillon et celle de la référence étaient contrôlées et la différence ne devait pas excéder 1°C. Le contrôle de la qualité de chaque spectre est obtenu en vérifiant l'offset à 700 nm comme Röttgers et Doerffer (2007). Les solutions de CDOM, de température équilibrée par rapport à l'eau de référence de salinité nulle, devraient avoir une absorbance nulle à 700 nm. Dans le cas de salinité plus forte (eau de mer), une absorbance minimale de +0.002 est observée. En conséquence, la valeur de l'absorbance à 700 nm était considérée comme un offset * qui a été éliminé de chaque courbe.
- La dérive instrumentale était évitée en refaisant la ligne de base (« référence ») de l'instrument entre chaque échantillon.
- Le contrôle de l'absorption de l'EAF est fait par une mesure de son spectre par rapport à la MQF systématiquement chaque jour de mesure au laboratoire.

5. Comparaison avec le protocole du *Perkin Elmer*

1) Précautions de propreté

Au *Perkin Elmer*, les problèmes sont nombreux (Annexe 2). Comme à l'*Ultrapath*, il ne faut pas de bulles d'air dans l'échantillon. Néanmoins, les bulles sont plus faciles à repérer et à éviter dans une cuve de 10 cm de long. Ce n'est donc pas réellement un problème, à l'inverse des poussières. Celles ci modifient le signal en l'amplifiant. Or, les poussières présentes dans l'air finissent toujours par tomber dans la cuve. À défaut de disposer d'une salle blanche, nous avons éliminé au maximum la poussière autour du plan de travail. Les contenants doivent rester ouvert à l'air le moins de temps possible.

Il faut également que les vitres des cuves, à travers desquelles passe le rayon lumineux, soient très propres. Il ne faut jamais les toucher avec les doigts. Lorsqu'elles sont sales, le spectre prend un offset négatif. Or les données négatives ne sont pas stockées avec suffisamment de précision pour être exploitées. Les vitres sont donc nettoyées régulièrement à l'éthanol (qualité HPLC). Puis, il est important d'essuyer soigneusement les vitres au papier *Joseph* afin d'enlever tout reste d'alcool. Dans le cas contraire, le spectre prend l'allure d'une droite affine.

2) Choix de l'eau de référence

La différence d'absorbance entre l'eau milli-Q filtrée et l'eau de mer (échantillon) n'est pas assez forte pour être détectée par le spectrophotomètre comportant des cuves de 10 cm. Par la suite, par commodité et pour comparer avec les nombreux autres travaux, nous avons donc utilisé MQF en référence au *Perkin Elmer*.

3) Répétabilité, contrôle de la mesure

La mesure au *Perkin Elmer* est plus lente. Les premières mesures tests étaient réalisées avec une vitesse de 120 nm/min pour une gamme de 250 à 800 nm. Le temps de mesure de l'ordre de 5 mn entraînait une dérive importante. Le meilleur compromis trouvé a été d'augmenter la vitesse à 240 nm/min et de diminuer la gamme de 300 à 750 nm. Le temps de mesure diminue alors à moins de 2 min. Ainsi, on supprime quasiment la dérive entre deux mesures. La répétabilité est alors presque aussi bien que celle de l'*Ultrapath*. Pour ce paramétrage, trois mesures successives d'un échantillon sont toutefois nécessaires. Entre deux échantillons différents, le zéro est refait pour éviter la dérive instrumentale.

Enfin, les spectres négatifs sont le dernier problème. On l'a vu, un spectre négatif est inutilisable car le stockage de la donnée est faite avec une précision inférieure (facteur 10) par le programme de transformation du signal analogique en digital. Aussi nous avons veillé à refaire le spectre de façon à ce qu'il soit positif sur l'ensemble de la courbe. Si après plusieurs essais, il s'avère que ni les poussières, ni la propreté des parois ne sont en cause, la solution trouvée est de refaire le zéro, puis de refaire la mesure.

6. Conclusion des essais

A la suite de ce stage, de nos essais précédents et en comparant avec la littérature (Röttgers and Doerffer, 2007), nous avons pu mettre en place notre propre protocole d'utilisation de l'*Ultrapath* et améliorer celui du *Perkin Elmer*, pour la mesure du CDOM en milieu oligotrophique.

Ces tests nous ont permis de :

- Trouver l'eau de référence la plus adéquate pour chaque spectrophotomètre : L'eau salée filtrée artificielle (EAF) pour l'*Ultrapath* et l'eau milli-Q filtrée (MQF) pour le *Perkin Elmer*.
- Limiter les particules en filtrant de nouveau systématiquement les échantillons et les eaux de référence sur 0.2 μm (filtre Nuclepore rincé 3 fois avec MQF).
- Limiter les artefacts de mesures en utilisant une seringue et en poussant doucement l'échantillon pour éviter les bulles.
- Contrôler la dérive du signal en fonction du temps en mesurant la référence entre chaque échantillon.

Ces précautions de mesure ont été utilisées par la suite pour les mesures de CDOM dans le lagon (suivi mensuel 2008-2009) et pour la détermination du CDOM de la campagne VALHYBIO de mars-avril 2008.

III/ RESULTATS

1. Résultats *Ultrapath*

Le tableau 2 montre le coefficient d'absorption du CDOM à 370 et 442 nm, ainsi que la pente exponentielle S , pour tous les échantillons mesurés lors de la campagne VALHYBIO avec l'*Ultrapath LWCC*. Ce coefficient a été calculé à partir de la formule (5). Comme expliqué précédemment (figure 2), 370 nm (UV) est la longueur d'onde principale d'absorption du CDOM et 442 nm (bleu) la seconde à laquelle le CDOM absorbe encore un peu (canal bleu du satellite permettant de calculer la concentration en chlorophylle).

A 370 nm la gamme d'absorption du CDOM est comprise entre 0,003 m^{-1} (T17 une station à la lisière du lagon) et 0,735 m^{-1} (G48 située dans le lagon). Tandis que pour la longueur d'onde 442 nm, les valeurs d'absorption varient de 0,004 m^{-1} (station T10 située côté océan) à 0,153 m^{-1} (P4 dans la baie des Pirogues). A 442 nm les valeurs correspondent à celles obtenues en baie de Villefranche (Méditerranée) et à la baie de Jervis (Sud-Est Australie) (Kirk, 1994).

La pente de chaque station a été calculée entre 350 et 500 nm d'après la formule (1). Elle donne la taille des molécules dont on en déduit leur nature. Les pentes des spectres d'absorption, des échantillons filtrés sur 0,2 μm , calculées à chaque station sont comprises entre 0,009 nm^{-1} (T21) et 0,026 nm^{-1} (T10). Elles sont assez proches de la littérature (Twardowski et al., 2004 ; Helms et al., 2007 ; Loiselle et al., 2009) et en particulier de Bricaud et al. pour les eaux de Méditerranée (également oligotrophes) (1995) ou pour les eaux de l'Atlantique tropical (Röttgers et Doerffer, 2007).

Table 2 : Coefficient d'absorption du CDOM mesuré à l'Ultrapath pour chaque station pour les Niskin de surface et de fond

0.2 μm	Ultrapath		
	a370nm	a442nm	S
Station	(m-1)	(m-1)	(nm-1)
A03	0.529	0.135	0.016
A11	0.221	0.088	0.012
A17	0.580	0.114	0.019
A20	0.129	0.037	0.017
A21	0.125	0.035	0.015
A22	0.260	0.093	0.012
A23	0.302	0.069	0.016
B08	0.339	0.103	0.014
B24	0.139	0.041	0.018
B29	0.603	0.134	0.017
D27	0.397	0.106	0.016
G03	0.209	0.085	0.011
G22	0.307	0.094	0.014
G48	0.735	0.109	0.018
M12	0.235	0.099	0.011
M16	0.204	0.086	0.011
N25	0.286	0.077	0.017
N43	0.216	0.049	0.019
N44	0.302	0.079	0.017
OC1	0.384	0.122	0.014
P04	0.534	0.153	0.015
P12	0.607	0.152	0.017
T1	0.148	0.061	0.011
T2	0.491	0.094	0.012
T3	0.137	0.042	0.014
T4	0.370	0.098	0.016
T5	0.215	0.068	0.015
T6	0.105	0.038	0.014
T7	0.637	0.143	0.017
T8	0.161	0.031	0.021
T9	0.599	0.136	0.017
T10	0.050	0.004	0.026
T11	0.336	0.073	0.018
T12	0.107	0.035	0.014
T13	0.172	0.045	0.016
T14	0.077	0.017	0.018

0.2 μm	Ultrapath		
	a370nm	a442nm	S
Station	(m-1)	(m-1)	(nm-1)
(suite)			
T15	0.230	0.056	0.016
T16	0.307	0.098	0.014
T17	0.003		0.019
T18	0.148	0.049	0.017
T19	0.263	0.071	0.010
T20	0.221	0.080	0.013
T21	0.115	0.054	0.009
T22	0.153	0.054	0.012
T23	0.220	0.085	0.011
T24	0.067	0.026	0.012
T25	0.446	0.085	0.019
T26	0.322	0.083	0.016
T27	0.299	0.082	0.016
T28	0.150	0.043	0.015
G03 fond	0.129	0.057	0.011
T1 150m	0.113	0.025	0.022
T10 150m	0.160	0.055	0.013
T10 90m	0.119	0.045	0.013
T11 40m	0.176	0.049	0.015
T11 70m	0.226	0.054	0.017
T16 30m	0.181	0.067	0.012
T17 150m	0.380	0.081	0.020
T18 60m	0.254	0.116	0.013
T19 60m	0.057	0.024	0.016
T20 40m	0.212	0.081	0.012
T22 80m	0.295	0.054	0.022
T23 80m	0.380	0.124	0.013
T24 80m	0.072	0.028	0.012
T25 60m	0.390	0.101	0.016
T26 54m	0.063	0.021	0.013
T27 60m	0.426	0.106	0.015
T28 54m	0.120	0.037	0.014
T10 150m	0.160	0.055	0.013
TRICHOS	0.514	0.121	0.016

Note : TRICHOS est un prélèvement d'eau contenant une forte concentration de *Trichodesmium* (phytoplancton) qui a des propriétés d'absorption différentes (Dupouy et al., 2008)

2. Comparaison entre *Ultrapath* et *Perkin Elmer*

Au *Perkin Elmer*, les coefficients d'absorption du CDOM à la longueur d'onde 370 nm pour les échantillons filtrés sur 0,2 μm (Annexe 3) sont compris entre 0,074 m^{-1} (T26 54m) et 0,609 m^{-1} (T07). A la longueur d'onde 442 nm, la gamme est de 0,020 m^{-1} à 0,152 m^{-1} (pour T26 54m et P12). Rappelons que les coefficients d'absorptions ont été calculés d'après la formule (5) avec 0,1 m comme trajet optique (L) pour le *Perkin Elmer* et 1,9 m pour l'*Ultrapath LWCC*. De même, les eaux de références utilisées sont différentes pour les deux appareils. Dans le cas de l'*Ultrapath*, l'absorbance du sel contenu dans l'eau de référence s'ajoute à celle du CDOM, ainsi le spectre « monte » plus rapidement à partir de 700 nm.

La figure 10 montre la variabilité des spectres observée entre le spectrophotomètre classique et le LWCC pour les mêmes échantillons. Les spectres d'absorption du CDOM obtenus au LWCC montrent des fluctuations minimales avec la longueur d'onde en comparaison au spectrophotomètre classique. Les oscillations de spectre de ce dernier sont dues au bruit de fond plus fort en raison du faible trajet optique.

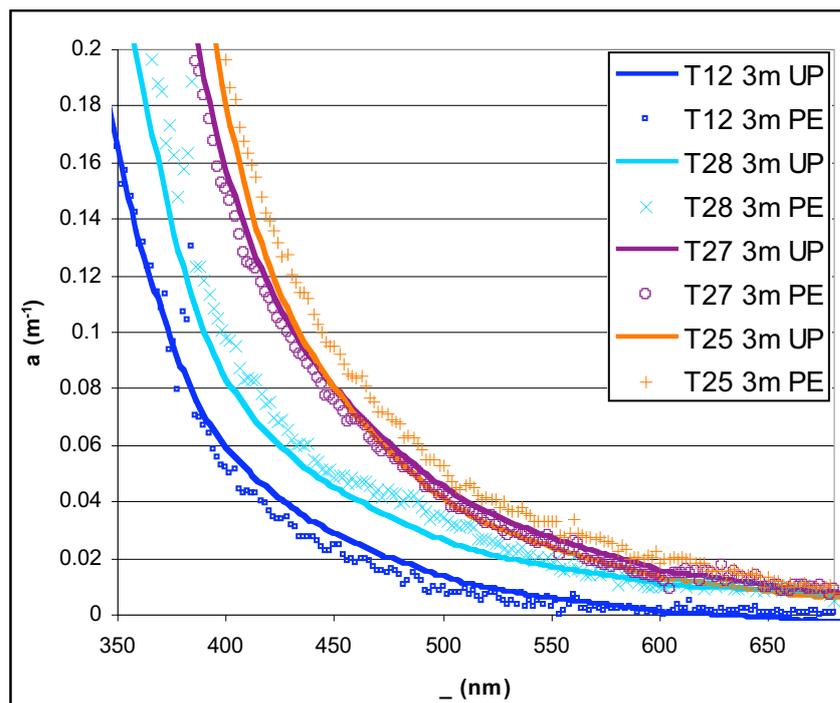


Figure 10 : Spectres d'absorption du CDOM mesurés par l'*Ultrapath LWCC* (UP) et par le *Perkin Elmer* (PE) pour trois échantillons (stations T12, T28 et T25 à 3 mètres)

Les moyennes obtenues aux deux instruments ne sont pas statistiquement différentes ni à 370 nm (0.267 et 0.027 m^{-1}) ni à 442 nm (0.069 et 0.07 m^{-1}) (test t, seuil de signification de 0.05, Annexe 4).

Les courbes de régressions (figure 11) montrent la bonne corrélation de mesure de l'absorption du CDOM inférieur à $0,2 \mu\text{m}$ existantes entre le LWCC et le Perkin Elmer. La corrélation est excellente à 442 nm ($r^2 = 0.92$, $n=68$, $p < 0.05$) et à 370 nm ($r^2 = 0.85$, $n=68$, $p < 0.05$). Les corrélations sont excellentes (résultats bruts) et pourraient être encore améliorées en raison de corrections qui devront être apportées ultérieurement (diffusion résiduelle dans le visible, Röttgers and Doerffer, 2007). Remarquons que les valeurs de a_{CDOM} sont faibles par rapport à une gamme de CDOM mondiale, ce qui souligne la très bonne comparaison entre les 2 spectrophotomètres.

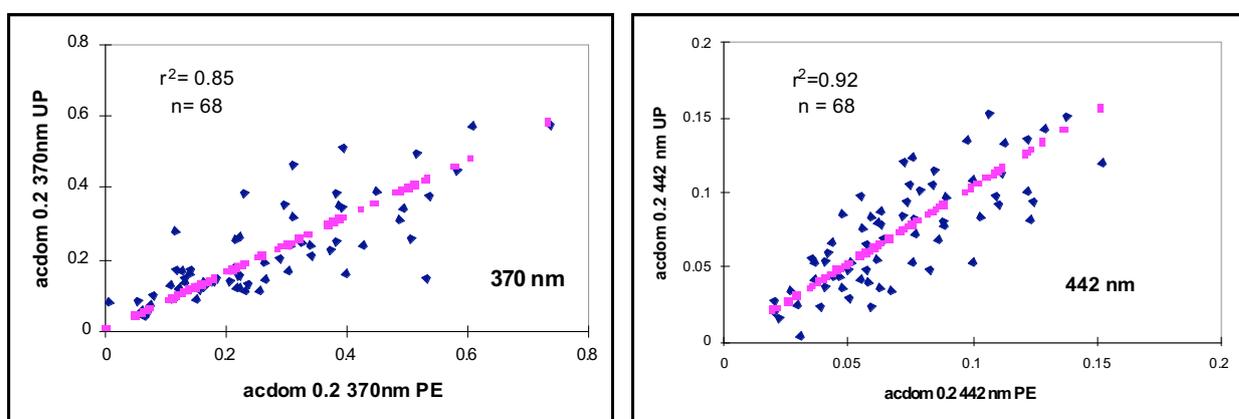


Figure 11 : Courbes de régressions entre valeurs de $a_{\text{CDOM}} < 0,2 \mu\text{m}$ mesurées avec l'Ultrapath (UP) et le Perkin Elmer (PE) à 370 et 442 nm pour les 69 échantillons de la campagne Valhybio

Les cartes (Figure 12) montrent la répartition du CDOM dans le lagon. On remarque que les valeurs d'absorption du CDOM à 442 nm sont plus élevées dans le lagon qu'en bordure ou en dehors. Elles sont les plus fortes dans les baies du lagon sud ouest. La répartition du CDOM est corrélée aux faibles valeurs de la température et aux faibles valeurs de salinité qui correspondent elles-mêmes à l'apport d'eau douce. En effet, la matière organique en milieu côtier est détritique, cela signifie qu'elle provient majoritairement du lessivage des sols par les rivières. En période de pluies abondantes l'apport d'eau douce est plus important. En conséquence, le panache de matière colorée détritique s'étend largement dans le lagon. Ce phénomène est corrélé à la période pluvieuse *La Nina*.

On observe une répartition de a_{CDOM} mesurée au *Perkin Elmer* similaire à celle mesurée à l'*Ultrapath*.

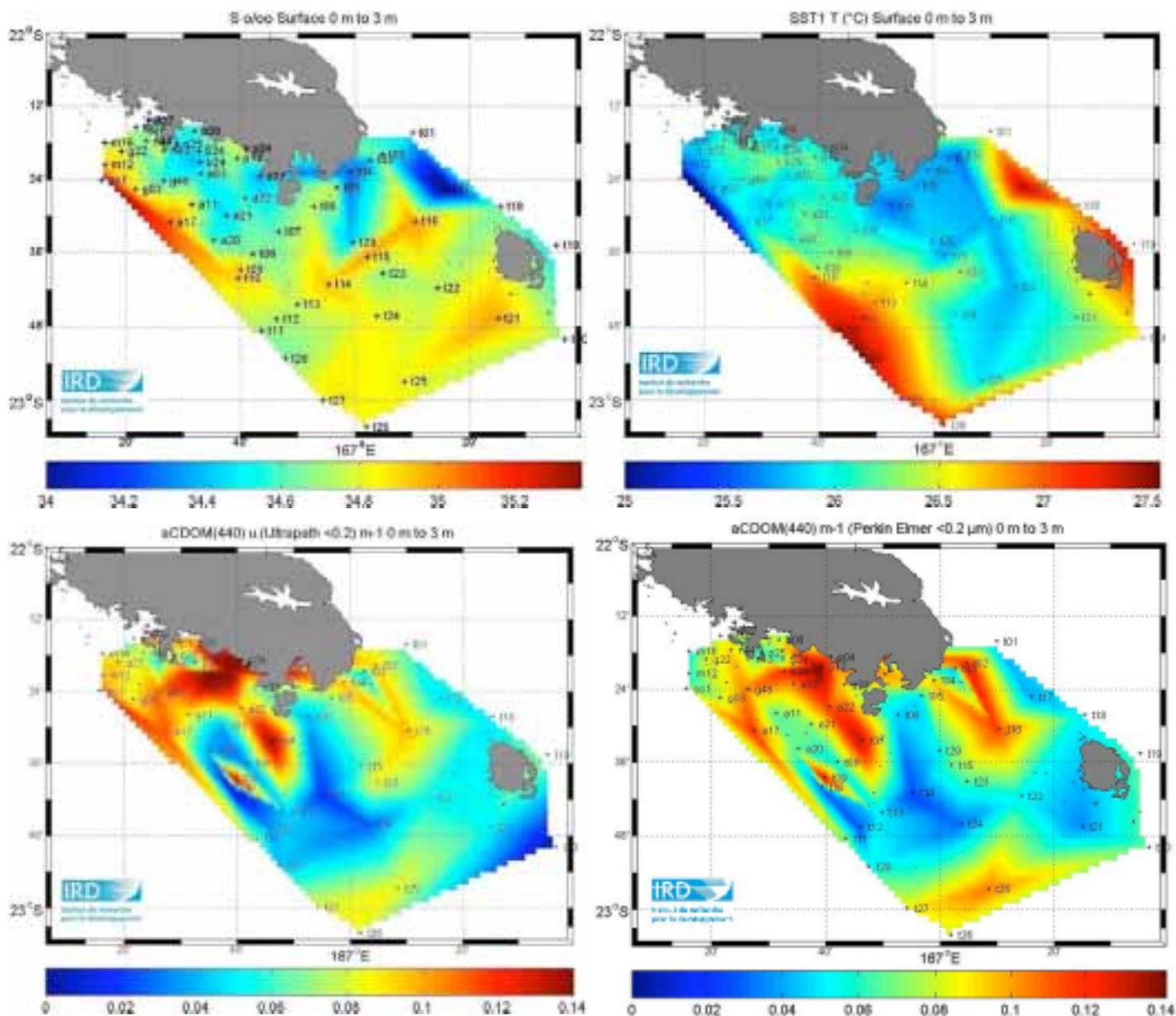


Figure 12 : En haut : Répartition en surface de la salinité (à gauche) et de la température (à droite) dans le lagon sud-ouest lors de la campagne VALHYBIO (in Dupouy et al., 2009)

En bas : Cartes de l'absorption du CDOM mesuré à 440 nm (0,2 μm) à l'Ultrapath (à gauche) et au Perkin Elmer (à droite) (résultats bruts)

DISCUSSION ET CONCLUSION

Récapitulons les avantages et les défauts de chaque appareil :

L'*Ultrapath LWCC* génère moins de fluctuation au niveau du spectre (excellent rapport signal/bruit) et possède une meilleure répétabilité de la mesure. En revanche, la génération de bulles invisibles lors de l'injection augmente artificiellement l'absorption dans la partie visible du spectre comme suggéré précédemment (Röttgers et Doerffer, 2007). De plus, les variations d'absorption de l'eau salée de référence, dont le spectre peut varier au cours de la journée, peuvent modifier l'allure du spectre de l'échantillon. De plus, un grand nombre de paramètres environnementaux entrent en jeu lors de la mesure (différence de salinité entre celle de l'échantillon et l'eau de référence artificielle, variations de température etc). Ces problèmes de dérive sont en principe corrigés lors de l'acquisition de la ligne de base entre chaque échantillon.

Le Perkin Ekmer possède tout de même une bonne répétabilité de la mesure. Néanmoins, il reste plus sensible aux conditions de mesure (propreté des cuves, variation de l'eau de référence etc..) et possède un mauvais rapport signal/bruit.

Malgré les différences existant entre les deux appareils, nous avons pu conclure que les valeurs d'absorption de l'*Ultrapath LWCC* étaient statistiquement identiques à celles du spectrophotomètre *Perkin Elmer lambda 20* (régressions de $R^2 = 0.85$ à 370 nm et de $R^2 = 0.92$ à 440 nm, t-test d'égalité des moyennes). Cependant, le plus long trajet optique du LWCC est mieux adapté au milieu oligotrophe où le CDOM est présent en très faible concentration car il augmente la sensibilité de l'instrument et les mesures sont plus rapides.

Précisons que la qualité des mesures de CDOM repose essentiellement sur celle de l'eau milli-Q servant à préparer le blanc pour le Perkin Elmer et l'eau artificielle salée pour l'*Ultrapath*.

La re-filtration des échantillons Valhybio stockés 1 an avant la mesure a permis de s'affranchir des problèmes de stockage en éliminant les particules ou amas susceptibles de se former pendant le stockage. En effet, les valeurs d'absorption du suivi mensuel mesurées sur les échantillons de 2008 ne sont pas plus élevées que celles de 2009 dans les mêmes conditions de conservation.

Il est probable que les fortes valeurs de CDOM observées lors de la campagne VALHYBIO soient dues à la forte influence des eaux douces dans le lagon, qui s'est traduit par une augmentation d'un facteur 3 de la chlorophylle de surface (Dupouy et al., 2009).

CONCLUSION PERSONNELLE

Lors de ce stage, à l'UR CAMELIA, j'ai participé à l'élaboration et l'optimisation du protocole pour la mesure de l'absorption de la lumière par la matière organique dissoute colorée, à l'aide du spectrophotomètre à flux laminaire *Ultrapath*.

De plus, j'ai pu améliorer ma rigueur au niveau de la propreté et la précision des manipulations (rinçages...). J'ai pu aussi appliquer mes capacités à travailler en équipe.

Je me suis confrontée à de nombreuses conditions de prélèvements en mer liées aux conditions météorologiques.

LEXIQUE

Note : Les mots signalés d'une astérisque bleue () sont dans le lexique*

CTD : système permettant de mesurer différents paramètres physico-chimiques (la teneur en sel, la température, la concentration d'oxygène dissout, la quantité de chlorophylle, la turbidité, etc.) dans la colonne d'eau. Le système CTD est immergé dans la colonne d'eau au bout d'un câble et permet l'enregistrement en continu d'un profil des différents paramètres jusqu'à la profondeur souhaitée.

Eaux bleues : eaux océaniques oligotrophes, très peu chargées en substances nutritives et en plancton ; par extension et par abus : eau optiquement pure.

Hydroscat-6 : sonde mesurant un profil du coefficient de rétrodiffusion $b_b(\lambda)$ en fonction de la profondeur. Les longueurs d'onde de l'Hydroscat-6 acquis par l'Unité de Recherche CAMELIA ont été choisies spécifiquement : ce sont celles des satellites. Il permet de plus de mesurer la fluorescence de la chlorophylle et de la phycoérythrine aussi en fonction de la profondeur.

Oligotrophe : se dit d'une étendue d'eau pauvre en éléments nutritifs et où, par conséquent, le plancton est peu dense.

Optique géométrique : étudie la manière dont la lumière se propage en ne considérant que la marche des rayons. Repose sur trois lois fondamentales : propagation rectiligne de la lumière, principe du retour inverse de la lumière et lois de Descartes.

Offset : signifie « décalage » en anglais. Ce terme désigne ici le décalage du spectre par rapport au zéro. Nous avons enlevé ce décalage en soustrayant les valeurs d'absorbance à 700 nm aux autres valeurs. Ainsi le spectre commence à zéro à partir de 700 nm.

Substances Humiques: proviennent de l'accumulation et de la réaction chimique naturelle des sous-produits résultant de la décomposition des matières organiques.

Ces substances sont fréquentes dans les sols, les eaux de surface, les eaux usées, le compost, les sédiments marins et ceux des lacs, les tourbières, les schistes carbonneux et les lignites. Elles peuvent être divisées en trois fractions principales basées sur leur solubilité dans les acides et/ou les bases. La fraction soluble dans les acides et les bases s'appelle *acide fulvique*. Elle possède le plus faible poids moléculaire. Celle qui est soluble dans les bases mais précipite dans les acides est l'*acide humique*, enfin celle qui est insoluble dans les acides et les bases est l'*humine*.

Théorie des ondes électromagnétiques : étude des ondes comportant une partie magnétique et une partie électrique, telle que la lumière.

References

- Belanger, S., Babin, M., et P. Larouche, 2008. An empirical ocean color algorithm for estimating the contribution of chromophoric dissolved organic matter to total light absorption in optically complex waters. *Journal of Geophysical Research*, 113, C04027, doi:10.1029/2007JC004436.
- Blondeau-Patissier, D., Brando, V. E., Oubelkheir, K., Dekker, A. G., Clementson, L., and P. Daniel, 2009. Bio-optical variability of the absorption and scattering properties of the Queensland inshore and reef waters, Australia. *Journal of Geophysical Research*, 114, C05003, doi:10.1029/2008JC005039.
- Blough, N. V. & R. Del Vecchio, 2002. Chromophoric DOM in the coastal environment. In Hansell, D. A. & C. A. Carlson (eds), *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press, San Diego: 509–540.
- Bricaud, A., A. Morel & L. Prieur, 1981. Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domain. *Limnology and Oceanography* 26: 43–53.
- Carder, K. L., S. K. Hawes, R. C. Smith, R. G. Steward & B. G. Mitchell, 1991. Reflectance model for quantifying chlorophyll *a* in the presence of productivity degradation products. *Journal of Geophysical Research* 9: 20599–20611.
- Conmy R. N., Coble P. G., R. F. Chen, G. B. Gardner, 2004. Optical properties of colored dissolved organic matter in the Northern Gulf of Mexico. *Marine Chemistry* 89, 127–144.
- D'sa, E. J., Steward, R. G., Vodacek, A., Blough, N. V., and D. Phinney, 1999. Determining optical absorption of colored dissolved organic matter in seawater with a liquid capillary waveguide. *Limnol. Oceanography*, 44 (4), 1142-1148.
- D'sa, E. J., and R. G. Steward, Liquid capillary waveguide application in absorbance spectroscopy (Reply to the comment of Byrne and Kaltenbacher). *Limnol. Oceanography*, 46 (3), 742-745.
- Dupouy, C., Neveux J., Dirberg G., Röttgers R., Tenório, M. M. B. and S. Ouillon, 2008. Bio-optical properties of the marine cyanobacteria *Trichodesmium* spp., *Journal of Applied Remote Sensing*, 2, 1-17. doi:10.1117/1.2839036.
- Dupouy C., Minghelli-Roman A., Despinoy M., Röttgers R., Neveux J., Ouillon S., Pinazo C., and M. Petit, 2008. MODIS/Aqua chlorophyll monitoring of the New Caledonia lagoon: the VALHYBIO project. in *Remote Sensing of Inland, Coastal, and Oceanic Waters*, edited by Robert J. Frouin, Serge Andrefouet, Hiroshi Kawamura, Mervyn J. Lynch, Delu Pan, Trevor Platt, Proceedings of SPIE Vol. 7150 (SPIE, Bellingham, WA, 2008) [7150 41] 715014, 8 pp.
- Dupouy C., R., Frouin, Röttgers, R., Neveux, J., R., Gallois, F., Gérard, P., Fontana, C., Pinazo, C., Ouillon, S., and A. Minghelli-Roman, 2009. Ocean color response to an episode of heavy rainfall in the lagoon of New Caledonia, in *Ocean Remote Sensing : Method and Applications*, edited by Robert J. Frouin, Proceedings of SPIE Vol. 7459-15 (SPIE, Bellingham, WA, 2009), 10 pp.
- Dupouy C., Neveux J., Ouillon S., Frouin, R., Murakami H. , Hochard S., Dirberg, G., 2009. Satellite retrieval of chlorophyll concentration in the lagoon and open ocean waters of New Caledonia, en revision à *Marine Pollution Bulletin*.
- Froidefond J.M. et D. Doxaran, 2004, Télédétection optique appliquée à l'étude des eaux côtières., *Télédétection*, Éditions scientifiques GB, vol. 4, n° 2, p. 157–174,
- Helms, J. R., Stubbins, A., Ritchie, J. D., Minor, EL C., Kieber, D. J., Mopper, K., 2007. Absorption spectral slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric organic matter. *Limnol. Oceanography*, 53 (3), 955-969.
- Hulatt, C. J., Thomas, D. N., Bowers, D. G., Norman, L., Chi Zhang, 2009. Exudation and Decomposition of Chromophoric Dissolved Organic Matter (CDOM) from some Macroalgae. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, doi:10.1016/j.eess.2009.06.014.
- Loiselle, S. A. Bracchini, L. Dattilo, A. M., Ricci, M. Tognazzi, A., Cozar, A., and Rossi, C., 2009. Optical characterization of chromophoric dissolved organic matter using wavelength distribution of absorption spectral slopes, *Limnol. Oceanography*, 54 (3). Sous presse.
- Miller, W.L. and M.A. Moran. 1997. Interaction of photochemical and microbial processes in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 42:1317-1324.

- Miller R. L., Belz, M., Del Castillo, C. and E. Trzaska, 2002. Determining CDOM Absorption Spectra in Diverse Coastal Environments Using a Multiple Pathlength, Liquid Core Waveguide System, *Continental Shelf Research*, 22, 1301-1310.
- Nelson, N. B., D. A. Siegel & A. F. Michaels, 1998. Seasonal dynamics of colored dissolved organic material in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research I* 45: 931-957.
- Nelson, N. B., C.A. Carlson and D.K. Steinberg. 2004 Production of chromophoric dissolved organic matter by Sargasso Sea microbes. *Marine Chemistry* 89: 273-287.
- Nelson, N. B., Siegel, D. A., Carlson, C. A., & Swan, C., et al. (2007). Hydrography of chromophoric dissolved organic matter in the North Atlantic. *Deep-Sea Research, Part I*, 54, 710-731.
- Röttgers, R., and R. Doerffer, 2007. Measurements of optical absorption by chromophoric dissolved organic matter using a point source integrating cavity absorption meter. *Limnol. Oceanography: Methods*, 126-135.
- Twardowski, M. S., Boss, E., Sullivan, J. M., Donaghay, P. L., 2004. Modeling the spectral shape of absorption by chromophoric dissolved organic matter. *Marine Chemistry*, 89, 69-88.
- Wang X-C, Litz L., Chen R.F., Huang W., Feng P., Altabet, M. A. 2007. Release of dissolved organic matter during oxic and anoxic decomposition of salt marsh cordgrass, *Marine Chemistry* 105, 309-321.

Ouvrage:

- Kirk, J. T. O., 1994. *Light & photosynthesis in aquatic ecosystems*, seconde édition, Cambridge University Press, p 12-15

Rapport

- Diaz, B, 2009. Comparaison de deux spectrophotomètres pour la mesure de la matière organique dissoute dans des eaux oligotrophes. Rapport de stage, 38p

Documents techniques

- Notice Perkin Elmer, Lambda 20/Lambda 40 UV/VIS spectrometers, Installation, Maintenance, System Description, Manual version A, Nov 96, 40 p.
- Notice World Precision Instrument, Ultrathin System Guide, 2002, 33 p.

Sources internet

- <http://oceancolor.nasa.gov>
<http://www.gov.ns.ca/nse/water/docs/droponwaterFAQ-SubstancesHumiques-Fr.pdf>
http://www.florazone.ca/CONS_fertilisation_humique_fulvique.html
<http://www.ifremer.fr/sismer/FR/catal/campagne/campagne.htql?Crno=8100020>
<http://www.wpi-europe.com/fr/products/spectroscopy/ultrapath.shtml>

ANNEXES

ANNEXE 1 :	35
PROCOLE DE L'ULTRAPATH LIQUIDE WAVE GUIDE CAPILLARY CELL.....	35
ANNEXE 2 :	37
PROCOLE OPERATOIRE POUR SPECTROPHOTOMETRE PERKIN ELMER LAMBDA 20	37
ANNEXE 3 : TABLEAU DES VALEURS DE ACDOM A 370 ET 440 NM MESUREES AU PERKIN ELMER	39
ANNEXE 4 : TEST T D'EGALITE DES MOYENNES UP/ PE.....	40
ANNEXE 5 : CALENDRIER DES MESURES EFFECTUEES LORS DU STAGE	41

Annexe 1 :

Protocole de l'UltraPath Liquide Wave guide Capillary Cell Mesure du CDOM

1. Composition du système

Lampes deutérium, halogène
Fibre capillaire de 2m
Spectrophotomètre
Ordinateur + logiciel TIDAS DAQ
Seringue (ou Pompe)

2. Nettoyage

Les étapes suivantes peuvent être effectuées lorsque l'*UltraPath* n'a pas été utilisé depuis plusieurs mois et si la fibre est encrassée.

Elles peuvent être effectuées à l'aide de la pompe, pendant 2 min chacune. Remplir la fibre avec l'air entre chaque solution.

- 1- Détergeant
- 2- Méthanol
- 3- HCl
- 4- Eau milliQ

Les solutions 1 et 4 rincent la fibre capillaire et les 2 et 3 empêchent sa contamination.

Ou uniquement rinçage à l'eau milli-Q pendant 10-15 min, puis vidage complet de la fibre par injection d'air à l'aide d'une seringue.

Remarques :

- les étapes 1 à 3 ne sont pas importantes on pense même que les solutions salissent la fibre.
- nous n'utilisons pas la pompe car elle fuit et génère trop de bulles d'air.

→ Injection de l'eau milli-Q à la seringue montée d'un filtre

Allumer dans l'ordre : les lampes 15-20 min avant les mesures, le spectrophotomètre, puis l'ordinateur.

3. Filtration

Matériel :

filtre Nucléopore 0.2 µm de diamètre
Unité de filtration
pompe

- Rincer l'unité de filtration avec quelques millilitres de la solution : la partie supérieure avec solution non filtrée, partie inférieure avec solution filtrée. Jeter cette solution de rinçage.

- Filtrer l'échantillon avec le filtre Nucléopore 0.2µm.

Faire attention au vide qui ne doit pas dépasser les 200 mm/hg (le mieux étant entre 100 et 200 mm/hg). L'eau doit s'écouler au goutte à goutte.

- Rincer le flacon avec quelques mL de solution filtrée avant de le remplir entièrement.

4. Mesures

- Créer une *directory* et définir un *filename*, et un *comment*

- *Temps d'intégration* :

Dans le logiciel Tidasdaq, suivre le chemin suivant pour régler le temps d'intégration :

icône *Scan* → *setting* → *integration time*

50 -60 ms pour avoir l'intensité lumineuse 70-75 % pour l'eau de référence salée et 60-65 % pour l'eau douce (d'après Röttgers)

Remarque : Pour l'eau milli-Q et l'eau salée, l'intensité lumineuse varie entre 50-90% avec un temps d'intégration égale à 50 ms.

Ajuster ce temps en fonction de l'intensité lumineuse : si celle-ci est trop faible, augmenter le temps, et vice versa. Il faut juste que la barre d'intensité reste verte.

- Après le nettoyage, vider la fibre en injectant de l'air à l'aide d'une seringue prévue à cet effet.

- Injecter l'eau milli-Q filtrée à l'aide de la seringue montée du filtre.

- *Dark* :

Faire le « noir » signifie mesurer la lumière « bruit de fond ».

Si le « dark » commandé par le logiciel donne un mauvais signal, il faut le faire manuellement en fermant la lampe (petite manette « power » sur « close »).

Cliquer sur l'icône *Dark* (courbe rouge).

- *Référence* (« blanc ») :

La ligne de base (eau de mer artificielle ou eau milli-Q filtrée à 0,2 µm) est déterminée par rapport au Dark.

Cliquer sur l'icône *Blank* (courbe bleue)

- Injecter de l'air pour vider la fibre

- Contrôler la température des solutions, elle doit être ambiante.

- *Echantillon* :

Rincer la seringue 2 fois et son filtre une fois avec l'échantillon

Injecter l'échantillon à l'aide de la seringue montée du filtre.

Cliquer sur « *start scan* » (icône courbe verte).

Injecter 3-4 gouttes du même échantillon et refaire un scan.

Répéter 2 fois cette opération pour avoir 3 scans en tout.

Important : A la fin de la manipulation, remplir la fibre capillaire avec de l'eau milli-Q pour éviter sa contamination par des particules ambiantes (poussières..)

Annexe 2 :

Protocole opératoire pour spectrophotomètre PERKIN ELMER lambda 20

Pour analyse du CDOM

Au préalable

- Allumer le spectrophotomètre 30 mn avant utilisation (chauffage de la lampe).
- Les échantillons à analyser doivent être à température ambiante.
- Nettoyage des cuves :

Rincer abondamment les cuves (10 cm de trajet optique) à l'eau afin d'enlever toute poussière. Les rincer à l'éthanol en passant bien la pipette sur toutes les parois intérieures. Laisser sécher cuves retournées. Rincer ensuite 3 fois l'intérieur des cuves à l'eau MQ filtrée sur 0,2 µm. Bien faire passer l'eau sur toutes les parois intérieures en inclinant les cuves et en les agitant doucement.

Avec une pissette d'éthanol, laver les 2 parois extérieures à l'éthanol. Laisser sécher, essuyer si besoin avec du papier Joseph (et pas autre chose car sinon traces de papier sur les vitres).

Essuyer de nouveau soigneusement les vitres avec du papier Joseph bien propre et sec.

ATTENTION : si l'éthanol n'a pas bien séché ou n'a pas été essuyé au papier Joseph, le spectre est faussé, il prend une allure linéaire et part à 700 nm.

- Remplir la cuve de référence avec de l'eau MQ filtrée. Regarder à travers les 2 parois pour vérifier la présence de poussières dans l'eau ou de traces sur les vitres. Placer la cuve dans le spectrophotomètre et bien fermer le couvercle.

Faire un blanc

- Remplir la 2e cuve de la même façon avec l'eau MQ filtrée.
- Lancer le logiciel UVWINLAB (sur le bureau). Une fenêtre « Methods » apparaît.
- Dans l'onglet « scan » choisir une méthode. La méthode CECILEU2 est normalement déjà paramétrée correctement. Vérifier les paramètres et modifier si besoin :
 - Dans l'onglet « scan » de la méthode sélectionnée : « start » = 750 nm, « stop » = 300 nm, « data interval » = 2 nm. Toujours mettre « Autoprint » sur off car sinon le logiciel bugge (car pas d'imprimante).
 - Dans l'onglet « inst » : vitesse 240nm/min, « smooth » = 0.
 - Dans l'onglet « sample » : « calculation factor » = factor, rentrer 100 dans « number of samples » pour être tranquille. Dans « sample identity » sur la première ligne rentrer le nom de fichier (du type nom_01 ou date_01), pas plus de 8 caractères. Ensuite cliquer sur « sample identity », toute 1 colonne est sélectionnée. Cliquer sur « Fill down » pour incrémenter les noms de fichier. Si les derniers caractères sont des chiffres, attention de laisser 2 caractères min pour les chiffres car sinon au-delà de 9 le logiciel va reprendre à 1 et écraser les premières mesures (au lieu de mettre 10).
- Cliquer sur le bouton start. Le logiciel demande « insert blank ».
- Pour visualiser la ligne de base (zéro), il faut faire une mesure de l'eau utilisée en référence. Une fois la mesure effectuée le logiciel demande d'insérer l'échantillon suivant.

Faire une mesure

- Sortir la cuve « sample » contenant l'eau de référence. La vider et rincer une fois avec l'eau de l'échantillon. Essuyer les vitres au papier Joseph, si besoin (goutte d'eau à l'extérieur sur la vitre, traces, poussières etc) re-nettoyer à l'alcool et bien essuyer au papier Joseph. Remplir avec l'échantillon et vérifier la présence de poussières dans l'eau ou de traces sur les vitres en regardant à travers. Placer la cuve dans le spectro et appuyer sur OK dans la fenêtre qui apparaît après chaque mesure.

Méthode à suivre

- Il faut faire une mesure du blanc puis 3 mesures consécutives de l'échantillon. Une fois les 3 mesures effectuées, cliquer sur le bouton rouge « stop ». Le logiciel annonce que la méthode est stoppée.
- Avant de refaire le blanc rincer 3 fois la cuve (ayant contenu l'échantillon) à l'eau MQ filtrée
- Refaire le blanc à chaque nouvel échantillon.

Sauvegarde des fichiers de mesures et de la méthode

Après les 3 premières mesures, vérifier que le logiciel a bien sauvé les données mesurées. Pour cela aller dans C:\UVWINLAB\DATA\ . Vérifier que tous les fichiers sont sauvés :

- fichiers RLS (mesures de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde en ASCII)
- fichiers RSC (en-têtes des fichiers, un nouveau fichier RSC est créé à chaque fois qu'on relance une méthode, c'est à dire un blanc et une série de mesures à la suite)
- fichiers SP (données des mesures en binaire)
- Pour voir où sont sauvegardées les mesures, aller dans Utilities/Configuration. Si besoin modifier le chemin d'accès du dossier où seront enregistrées les mesures dans « Data ». Dans « default spectral » choisir binary pour sauvegarder des fichiers SP.

On peut choisir n'importe quelle méthode dans l'onglet « scan » de la fenêtre « Methods », modifier les paramètres et l'enregistrer. Pour cela Aller dans File/Save ou Save as.

Problèmes rencontrés

- Le spectre est négatif. Cas à proscrire absolument car le stockage des valeurs négatives se fait avec une précision réduite (manque un digit en précision, d'où spectres en créneaux). Vérifier la propreté des vitres, les nettoyer à l'alcool + papier Joseph. Refaire le blanc et recommencer la mesure permet souvent de résoudre le problème. Toujours utiliser de l'eau MQ fraîchement filtrée sur 0.2 μm (Röttgers et al., 2007).
- Le spectre est quasi linéaire et part à 700 nm. Les vitres n'ont pas bien été essuyées au papier Joseph après nettoyage à l'alcool.
- Essuyer régulièrement les vitres au papier Joseph car des vitres sales ont tendance à diminuer l'offset du spectre.

**Annexe 3 : Tableau des valeurs de aCDOM à 370 et 440 nm mesurées
au Perkin Elmer à chaque station en surface et au fond**

0.2 μm	Perkin Elmer	
	a370nm	a442nm
Station	(m-1)	(m-1)
A03	0.509	0.097
A11	0.234	0.063
A17	0.543	0.111
A20	0.257	0.062
A21	0.222	0.067
A22	0.330	0.110
A23	0.327	0.086
B08	0.338	0.078
B24	0.211	0.058
B29	0.533	0.113
D27	0.389	0.074
G03	0.216	0.071
G22	0.304	0.073
G48 3m	0.466	0.100
M12	0.193	0.054
M16	0.169	0.047
N25	0.193	0.055
N43	0.336	0.082
N44	0.347	0.088
OC1	0.343	0.072
P04	0.482	0.106
P12	0.571	0.137
T1	0.149	0.041
T2	0.097	0.035
T3	0.131	0.036
T4	0.353	0.089
T5	0.171	0.043
T6	0.123	0.040
T7	0.609	0.129
T8	0.196	0.050
T10	0.109	0.030
T11	0.347	0.077
T12	0.108	0.026
T13	0.186	0.046
T14	0.084	0.021
T9	0.519	0.122

0.2 μm	Perkin Elmer	
	a370nm	a442nm
Station	(m-1)	(m-1)
(suite)		
T15	0.233	0.061
T16	0.350	0.109
T17	0.331	0.087
T18	0.212	0.084
T19	0.105	0.038
T20	0.240	0.063
T21	0.120	0.036
T22	0.173	0.051
T23	0.165	0.058
T24	0.084	0.029
T25	0.462	0.103
T26	0.287	0.076
T27	0.296	0.084
T28	0.186	0.054
G03 fond	0.120	0.035
T1 150m	0.170	0.058
T10 150m	0.159	0.040
T10 90m	0.132	0.044
T11 40m	0.206	0.057
T11 70m	0.291	0.075
T16 30m	0.172	0.057
T17 150m	0.181	0.049
T18 60m	0.225	0.064
T19 60m	0.410	0.124
T20 40m	0.182	0.061
T22 80m	0.361	0.100
T23 80m	0.310	0.075
T24 80m	0.080	0.020
T25 60m	0.412	0.122
T26 54m	0.074	0.020
T27 60m	0.465	0.123
T28 54m	0.140	0.047
T10 150m	0.159	0.040
TRICHOS	0.628	0.152

Annexe 4 : Test t d'égalité des moyennes UP/ PE

Test d'égalité des espérances: observations appariées

	UP 370 0,2	PE 370 0,2
Moyenne	0,267539605	0,27035
Variance	0,027692841	0,020627195
Observations	69	69
Coefficient de corrélation de Pearson	0,926572938	
Différence hypothétique des moyennes	0	
Degré de liberté	68	
Statistique t	-0,367773224	
P(T<=t) unilatéral	0,357092306	
Valeur critique de t (unilatéral)	1,667572281	
P(T<=t) bilatéral	0,714184611	
Valeur critique de t (bilatéral)	1,995468907	

L'observation est appariée car les échantillons sont les mêmes mesurés avec chaque instrument.
 l'hypothèse de départ est que les moyennes d'absorption sont identiques (différence hypothétique 0).
 Statistique t est très inférieure à valeur critique de t (bilatéral) donc notre hypothèse de départ est juste:
 Les moyennes sont identiques à 370 nm.

Les moyennes sont aussi identiques à 442 nm.

Test d'égalité des espérances: observations pairées

	UP 440 0.2	PE 440 0.2
Moyenne	0.069807949	0.072621156
Variance	0.000980405	0.001259385
Observations	65	65
Coefficient de corrélation de Pearson	0.77803235	
Différence hypothétique des moyennes	0	
Degré de liberté	64	
Statistique t	1.003603427	
P(T<=t) unilatéral	0.159674649	
Valeur critique de t (unilatéral)	1.669013026	
P(T<=t) bilatéral	0.319349299	
Valeur critique de t (bilatéral)	1.997729633	

Annexe 5 : Calendrier des mesures effectuées lors du stage

Date	Experiences et mesures au laboratoire
06/05/2009	Tests Ultrath
12/05/2009	Tests Ultrath
18/05/2009	Sortie Lagon Sud Ouest VALHYBIO / Coris MAI 09
19/05/2009	Sortie lagon Sud-ouest avec John Butscher (HOBELCO)
28/05/2009	Tests Ultrath avec eau MQF 4 stations au 29 /05/2009
1-15/06/2009	Analyse des spectres de CDOM de la campagne Bissecote
10/06/2009	Prelèvements Aquarium de Noumea (HOBELCO)
15/06/2009	Prelèvements Aquarium de Noumea (HOBELCO)
16/06/2009	Sortie Lagon Sud Ouest VALHYBIO / Coris JUIN 09
16/06/2009	Tests Ultrath avec eau MQF et EAF 4 stations 16/06/2009
17/06/2009	Sortie lagon Sud-ouest avec John Butscher (HOBELCO)
18 19 22 et 23/06/2009	Mesures Ultrath avec MQF Suivi mensuel 2008-2009
22/06/2009	Prelèvements Aquarium de Noumea (HOBELCO)
29/06/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)
30/06 1 2 et 3/07/2009	Mesures Ultrath avec EAF Suivi mensuel 2008-2009
01/07/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)
06/07/2009	Sortie Lagon Sud Ouest VALHYBIO / Coris JUILLET 09 Mesures Ultrath avec EAF Juillet 2009 (7 stations au lieu 4) 0.4 μm
06/07/2009	μm
15/07/2009	Mesures Ultrath avec EAF1 Valhybio Cycle A11 (0.4 μm)
15/07/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)
16 17 20 21 et	
22/07/2009	Mesures Ultrath Réseau avec EAF1 (0.4 μm)
22/07/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)
23 24 27 28 et	
29/07/2009	Mesures Ultrath Réseau avec EAF2 (0.2 μm)
29/07/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)
30/07/2009	Mesures Cycle T4 EAF2 (0.2 μm)
03/08/2009	Mesures OC5 EAF2 (0.2 μm)
04/08/2009	Sortie lagon Sud-ouest avec John Butscher (HOBELCO)
07/08/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)
13/08/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)
19/08/2009	Prelèvement Aquarium de Noumea (HOBELCO)

Résumé

L'absorption de la lumière par la matière organique dissoute colorée (CDOM) est un élément capital pour la calibration des mesures satellitales de concentration en chlorophylle de surface. En effet, le CDOM est un composé qui fausse l'estimation de la chlorophylle de surface.

Le lagon de Nouvelle Calédonie est une zone fragile car soumise à des pressions d'origine minière et urbaine, ainsi qu'aux aléas climatiques. Un projet de surveillance du lagon par étude des concentrations en chlorophylle de surface via les images satellites est en cours (projet PNTS Valhybio). Or le lagon de Nouvelle Calédonie présente les caractéristiques des milieux oligotrophes. Les concentrations en CDOM sont donc difficiles à mesurer.

Les mesures de CDOM s'effectuent par la méthode de la spectrophotométrie UV-visible. Pour avoir des mesures fiables, il fallait comparer les mesures de deux spectrophotomètres ayant une longueur de trajet optique différente. Cette étude portait sur la comparaison entre le *Perkin Elmer lambda 20* et l'*Ultrapath LWCC*. Un protocole opératoire a été mis en place de façon à limiter les erreurs de mesures. De plus, le choix de l'eau de référence conditionne la qualité du signal mesuré (eau MilliQ ou eau salée).

Mots-clés : Absorption, CDOM, Ultrapath LWCC, Perkin Elmer lambda 20, Spectrophotométrie, lagon oligotrophe, Nouvelle Calédonie

Summary

Measurement of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) is capital for calibration of chlorophyll remote sensing measurements. Indeed, CDOM falsifies computation of chlorophyll.

New Caledonia's lagoon is a fragile ecosystem which has to face mining and urban pressures, as well as climate changes. A lagoon supervision project by ocean color remote sensing monitoring of chlorophyll is studied (Valhybio PNTS project). Yet, New Caledonia's lagoon has low CDOM region characteristics. As a consequence, CDOM concentrations are difficult to detect.

CDOM measurements are made thanks to UV-visible spectroscopy. To have reliable measures, it was necessary to compare the measures of two spectrophotometers having a different optical pathlength. This study concerned the comparison between the *Perkin Elmer lambda 20* and the *Ultrapath LWCC* instruments. To do this, an experimental protocol has been written to limit errors due to manipulation. In addition, the signal quality depends on the choice of the reference water (MilliQ or salt water).

Keywords: Absorption, CDOM, Ultrapath LWCC, Perkin Elmer lambda 20, Spectrophotometry, oligotrophic lagoon, New Caledonia