

CONSIDÉRATIONS SUR L'ÉTUDE DES PIGMENTS DU PHYTOPLANCTON MARIN EN ZONE TROPICALE OLIGOTROPHE

par B. WAUTHY* et J. LE BOURHIS**

Note préliminaire

Dans cette étude critique de la méthode de Richards-Thompson telle qu'elle est utilisée à bord du *Coriolis*, des résultats des croisières *Alizé* et *Atoll* ne sont donnés qu'à titre d'illustration des possibilités de cette méthode. Les résultats détaillés paraîtront dans des publications ultérieures.

La croisière *Atoll* a été effectuée dans le cadre du programme de recherche de la Direction des Centres d'Expérimentations Nucléaires pour le compte du Centre d'Expérimentation du Pacifique.

1. Introduction. — 2. Ordres de grandeur des teneurs en pigments rencontrés. — 3. Méthode spectrophotométrique de Richards et Thompson (1952). — 3 1. Principe. — 3 2. Mode opératoire. — 3 3. Précision des mesures. — 3 3 1. Étape spectrophotométrique. — 3 3 2. Étape filtration — Extraction. — 3 3 3. Erreur totale pour le travail fait à bord. — 3 4. Enregistrement des spectres d'absorption. 4. Résultats obtenus par la méthode. — 4 1. Croisière *Atoll*. — 4 2. croisière *Alizé II*. — 4 3. Enseignements de ces croisières. — 5. Effets de la révision des formules. — 6. Bilan de la méthode. — 7. Projet d'étude pour l'avenir.

RÉSUMÉ

Une revue des faibles teneurs en pigments phytoplanctoniques rencontrés dans le Pacifique Sud-Ouest montre que l'application, pour leur étude, de la méthode de Richards et Thompson, impose la filtration de volumes d'eau de mer élevés, et l'emploi de cuves spectrophotométriques spéciales.

* Océanographe biologiste, Centre O.R.S.T.O.M. de Nouméa, BP 4, Nouvelle-Calédonie.

** Océanographe biologiste, Centre O.R.S.T.O.M. de Nouméa, BP 4, Nouvelle-Calédonie.

Une étude de la précision obtenue fait ressortir que, dans ces conditions, seules les mesures de chlorophylle « a » sont individuellement utilisables, les autres relevant d'une exploitation globale sur un grand nombre de stations comme le confirment les résultats de deux croisières. Une comparaison des formules révisées (Parsons et Strickland, 1963; Scor-Unesco, 1964) indique qu'elles sont pratiquement équivalentes et qu'elles ont réduit l'importance quantitative de la chlorophylle « c ».

En conséquence, il est proposé d'abandonner la méthode en zone oligotrophique et de la remplacer par la méthode fluorométrique de Yentsch et Menzel pour la chlorophylle « a » et ses produits de décomposition, par celle de Parsons pour la chlorophylle « c » (une mesure des caroténoïdes serait faite sur l'extrait acétonique de cette méthode), toute mesure de la chlorophylle « b » étant laissée de côté.

ABSTRACT

1. A critical study of the application of the Richards-Thompson method (1952) for the determination of phytoplankton pigments in oligotrophic water (namely Tropical South Pacific), as performed aboard « Coriolis » of the Oceanographic Division of Centre ORSTOM Noumea, New Caledonia, shows that, in spite of the filtration of 15 l water samples and of the measurement in 10 cm light path cells, only chlorophyll « a » values can be used individually; chlorophyll « b », chlorophyll « c », and the ratio of the different pigments have to be handled statistically.

2. Attempts to characterize areas by recording absorption spectra of acetone extracts of the phytoplankton samples have not been successful; figures 1 and 2 present two examples (out of more than a hundred) for two different areas; the authors have seen no significant difference between them.

3. Data obtained on two cruises, serve as an illustration of the statistical use of the pigment ratio. Figure 3 presents results from Atoll cruise in the Tuamotu area; the carotenoid to chlorophyll « a » ratio is constant with a hypothetical high-sinking rate of deficient plant cells in the nitrate depleted first hundred meters, followed by a restoration of the physiological state of these cells as they reach the richer water at the bottom of the photosynthetic layer, with subsequent accumulation of plant material due to a lessening of the sinking rate.

Figure 4 presents results from Alize cruise in the western half of the Pacific Equator; the physiological state of the cells seems to be good throughout the photosynthetic layer, with a possible effect of high light intensity at the surface and some degradation of the physiological state at greater depths.

4. Figure 5 presents a comparison of the revised equations by Parsons-Strickland (on the vertical axis) against original equations of Richards-Thompson (RT) and revised equations by SCOR-UNESCO (H) (on the horizontal axis), as applied to our data; direct computation of chlorophyll « a » values with the 665 m μ optical densities uncorrected for chlorophylls « b » and « c » and a specific absorption coefficient of 0,089 for chlorophyll « a », is also shown (Coef.).

Both revised equations give results 45 % lower for chl. « c » and 25 % lower for chl. « a », as compared with original equations. As far as chl. « b » is concerned SCOR-UNESCO revised equations give 30 % higher results as compared with Parsons-Strickland revised equations which give the same values as Richards-Thompson equations.

5. It is suggested that the Richards-Thompson method should be replaced in oligotrophic water by fluorescence determination for chlorophyll « a » and phaeophytin (Yentsch and Menzel, 1963) and the Parsons (1963) method for chlorophyll « c », chlorophyll « b » being left aside.

1. INTRODUCTION

L'étude de la production primaire d'une région océanique n'est possible que si l'on dispose de données quantitatives relatives au phytoplancton, tant sur la masse totale présente que sur sa vitesse de renouvellement.

En ce qui concerne l'estimation de cette biomasse dans un échantillon d'eau de mer, lorsque l'on passe en revue les méthodes possibles (Strickland, 1960), on arrive à la conclusion que la mesure des pigments reste la meilleure chance pour établir une méthode de routine que l'on puisse utiliser à la mer. Les pigments que l'on trouve dans le phytoplancton marin sont principalement des chlorophylles et des caroténoïdes. C'est pourquoi, suivant l'exemple de nombreuses tentatives dans ce sens, Richards et Thompson proposèrent en 1952 une méthode pour évaluer séparément quelques-uns des pigments par spectrophotométrie à plusieurs longueurs d'onde d'un extrait global par l'acétone à 90 %. Cette méthode, relativement simple, eut un succès considérable et ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que les utilisateurs durent admettre qu'elle donnait des résultats aberrants : faibles valeurs pour les caroténoïdes et rapports des chlorophylles « b » et « c » à la chlorophylle « a » bien supérieurs à ceux trouvés par chromatographie sur des cultures (Humphrey 1962).

Les coefficients d'absorption spécifiques des différents pigments furent réévalués et de nouvelles formules proposées, le reste de la méthode étant pratiquement conservé tel quel (Parsons and Strickland 1963, SCOR-UNESCO 1964).

Il nous a paru utile, et même nécessaire, après un an d'expérience de travail à la mer sur le *Coriolis*, nouveau bateau mis à la disposition du Centre Océanographique de Nouméa, de faire le bilan des résultats obtenus par cette méthode, compte tenu des impératifs dus à la faible teneur en pigments des eaux étudiées, et d'en tirer des conclusions pour l'avenir.

2. ORDRES DE GRANDEUR DES TENEURS EN PIGMENTS RENCONTRÉES DANS LES EAUX TROPICALES OLIGOTROPES DE LA ZONE D'ACTIVITÉ DU CENTRE DE NOUMÉA

Les possibilités de travail qu'offre le *Coriolis*, basé à Nouméa (22°30S 167°E) permettent d'étendre l'activité du Centre à une zone limitée au nord par l'équateur et au sud par le parallèle 40°. Dans cette zone la richesse relative en phytoplancton en haute mer est surtout fonction de la latitude.

A l'équateur, les résultats de la croisière *Alizé* montrent que de 145°W à 160°E, la distribution des chlorophylles est assez homogène dans la couche 0-100 m ; les teneurs moyennes sont de 0,23 mg/m³ Chl « a » ; 0,04 mg/m³ Chl « b » ; 0,15 mg/m³ Chl « c ». Dans la zone 15°-25°, la croisière *Atoll* effectuée dans les Tuamotu donne une idée des concentrations probables en eau tropicale ; les teneurs moyennes sont, pour la couche 0-100 m : 0,08 mg/m³ Chl « a » ; 0,03 mg/m³ Chl « b » ; 0,06 mg/m³ Chl « c ».

En ce qui concerne la zone 35-40°S, nous emprunterons aux Australiens une valeur moyenne 0-100 m de 0,14 mg/m³ Chl « a » (Humphrey 1962).

On voit donc qu'il faut, en routine, faire des mesures sur des teneurs très faibles ; nous retiendrons les ordres de grandeur suivants :

0,10 mg/m³ pour la chlorophylle « a »
0,03 mg/m³ pour la chlorophylle « b »
0,08 mg/m³ pour la chlorophylle « c »

3. MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE RICHARDS ET THOMPSON (1952)

3 1 — PRINCIPE.

A partir d'un échantillon, on sépare le phytoplancton de l'eau de mer ; on en extrait les pigments par l'acétone à 90 % ; des mesures de densité optique à des longueurs d'ondes correspondant aux maxima d'absorption des pigments considérés permettent de calculer leurs concen-

trations par les formules suivantes (proposées par Parsons et Strickland (1963) après révision des formules originales) :

$$Ca = \frac{v}{Vl} (11,6 D_{665} - 1,31 D_{645} - 0,14 D_{630})$$

$$Cb = \frac{v}{Vl} (20,7 D_{645} - 4,34 D_{665} - 4,42 D_{630})$$

$$Cc = \frac{v}{Vl} (55 D_{630} - 16,3 D_{645} - 4,64 D_{665})$$

$$\text{Carotenoïdes} \\ \text{en MSPU/m}^3 = \frac{v}{Vl} (10 D_{480})$$

Ca, Cb, Cc, sont les concentrations en mg/m³ des chlorophylles « a », « b », « c »,

v est le volume en millilitres de l'acétone d'extraction ;

V est le volume en litres de l'échantillon d'eau de mer utilisé ;

l est le trajet optique, en centimètres, de la cuve de mesure ;

MSPU/m³ est la concentration en *millispecific pigment unit* par mètre cube pour les carotenoïdes.

D₆₆₅, D₆₄₅, D₆₃₀, D₄₈₀, sont les densités optiques corrigées aux longueurs d'onde correspondantes (voir paragraphe 331).

Ces formules montrent que pour des concentrations données il y a trois moyens d'améliorer la précision des déterminations :

- a) traiter un grand volume V d'eau de mer ;
- b) restreindre le volume v d'acétone d'extraction ;
- c) utiliser des cuves à long trajet optique l.

32 — MODE OPÉRATOIRE.

Ayant trouvé des cuves de 10 cm dont la capacité n'était que de 5 ml, nous avons orienté notre mode opératoire à bord du *Coriolis* sur la filtration de grands volumes d'eau de mer.

Le prélèvement à une dizaine de profondeurs choisies dans la couche superficielle (0-250 m) est effectué avec une bouteille de 50 litres en P.V.C. Le maniement de cette lourde bouteille (70 kg à vide) est facilité par le dispositif hydraulique du portique basculant sur la plage arrière du bateau. Cette bouteille, qui est utilisée successivement à chaque profondeur doit être vidée par gravité. Pour éviter d'avoir à transporter à bras de lourds récipients, un tuyau va jusqu'au laboratoire où il permet de remplir des bonbonnes de 30 litres *Kerplas*, disposées sous la rampe de filtration. Par pression, l'eau peut être prélevée ou servir à remplir des bonbonnes plus petites de 10 litres placées au-dessus de la rampe ; c'est à partir de ces sous-échantillons de 10 litres que le phytoplancton est filtré sur Millipore HA de 47 mm, sous un vide de 0,3 kg/cm² environ, contrôlable par un détendeur. De 12 à 20 litres d'eau sont ainsi filtrés à chaque profondeur, sur deux filtres. La filtration est souvent longue (plus de 5 heures), même pour les eaux pauvres, par suite de la présence de particules détritiques. Les filtres sont dissous dans 7 ml d'acétone à 90 % et l'extraction se fait à froid pendant 18 à 20 heures ; ni broyage mécanique, ni dissociation par ultrasons n'ont été utilisés.

Les lectures sont faites au Beckman DU sur des cuves de 10 cm, après centrifugation à 4.000 pendant 20 à 30 minutes de l'extrait acétonique. L'extraction se fait dans des tubes plastiques fermés hermétiquement qui servent à la centrifugation ; nous n'avons pas de diminution du volume d'acétone 90 % introduit au début de l'extraction.

3 3 — PRÉCISION DES MESURES.

Nous avons évalué les erreurs commises aux différentes étapes de la méthode, en ce qui concerne le travail fait à bord ; nous en avons déduit par le calcul l'erreur maximale sur les résultats.

3 31 — *Étape spectrophotométrique.*

3 311 — Au niveau des lectures, une erreur de $\pm 0,001$ unité d'extinction est commise.

3 312 — Au niveau de la correction de turbidité ; la lecture à 750 m μ est retranchée à chaque valeur lue aux autres longueurs d'onde. On introduit donc $\pm 0,001$ d'erreur supplémentaire.

3 313 — Au niveau de la correction due à l'absorption propre aux filtres dissous.

En utilisant des cuves de 10 cm, 36 paires de filtres Millipore HA 47 mm ont été dissoutes dans 7 ml d'acétone, et l'absorption moyenne aux longueurs d'onde utilisées a donné (après correction par D_{750})

665 m μ	0,004 \pm 0,005	au seuil de
645 m μ	0,005 \pm 0,009	probabilité
630 m μ	0,005 \pm 0,009	de 99 %.

La dispersion de ces résultats tient compte, évidemment, d'autres causes d'erreur (propreté des cellules, calage non parfaitement reproductible des cuves, etc.) rencontrées en mesures de routine.

3 314 — Les densités optiques qui entrent dans le calcul des teneurs sont donc entachées d'une erreur maximale totale de :

$$\pm 0,007 \text{ à } 665 \text{ m}\mu \text{ et } \pm 0,011 \text{ à } 645 \text{ et } 630 \text{ m}\mu.$$

3 315 — Cette erreur totale entraîne, par le jeu des coefficients des formules employées, avec un extrait de 7 ml et des cuves de 10 cm, une imprécision de

0,068 μ g sur Chl « a »
0,215 μ g sur Chl « b »
0,572 μ g sur Chl « c »

au niveau du matériel récolté sur les filtres.

3 316 — En ce qui concerne l'erreur systématique sur les teneurs en chlorophylles d'un échantillon d'eau de mer ceci se traduit par le tableau suivant (en mg/m³).

Volumes litres.....	5	10	15	20
Chlorophylle « a »....	0,014	0,007	0,004	0,003
Chlorophylle « b »....	0,043	0,021	0,014	0,011
Chlorophylle « c »....	0,114	0,057	0,038	0,029

3 317 — Pour avoir une idée de la précision relative des déterminations à différents niveaux de concentration en chlorophylles, en fonction du volume de l'échantillon filtré, due uniquement à la spectrophotométrie, on peut consulter le tableau du paragraphe 3 33 ; les valeurs 10 %, 25 %, 50 %, 100 % devront être lues 5 %, 20 %, 45 %, 95 %.

3 32 — *Étape filtration — extraction.*

3 321 — Le volume d'eau filtré est obtenu par différence entre deux lectures faites à $\pm 0,25$ l ; on détermine un volume par filtre. Ce qui donne, pour des échantillons traités sur deux filtres, les erreurs relatives suivantes :

10 litres	15 litres	20 litres
5 %	3,5 %	2,5 %

3 322 — L'acétone d'extraction est donné par une burette au 1/10 ml, soit pour 7 ml, avec une précision relative de $\pm 1,5$ %.

3 323 — La somme de ces erreurs sur les volumes donne donc :

10 litres	15 litres	20 litres
6,5 %	5 %	4 %

Nous retiendrons une valeur moyenne de 5 % pour cette étape ; on pourrait remédier à cette imprécision par la pratique de filtrer un volume connu fixe ; mais le procédé manque de souplesse et on peut craindre le colmatage des filtres dans certains cas, si l'on tient aux volumes élevés.

3 33 — *Erreur totale pour le travail fait à bord.*

Le tableau suivant donne les niveaux de concentration requis (en mg/m^3) pour les échantillons en fonction du volume traité et de la précision relative désirée.

Précision	10 litres	15 litres	20 litres	Pigment
± 10 %	0,136	0,090	0,068	Chl « a »
	0,430	0,286	0,214	Chl « b »
	1,144	0,762	0,572	Chl « c »
± 25 %	0,034	0,022	0,017	chl « a »
	0,107	0,071	0,053	Chl « b »
	0,286	0,191	0,143	Chl « c »
± 50 %	0,015	0,010	0,007	Chl « a »
	0,048	0,032	0,024	Chl « b »
	0,127	0,084	0,063	Chl « c »
± 100 %	0,007	0,005	0,004	Chl « a »
	0,022	0,015	0,011	Chl « b »
	0,060	0,040	0,030	Chl « c »

Il y a de nombreuses causes d'erreur dont nous n'avons pas tenu compte (échantillonnage, profondeur d'échantillonnage, extraction plus ou moins complète, etc.). Mais à partir de ce calcul d'erreurs instrumentales et de manipulation, nous pouvons avancer que le tableau qui précède ne peut qu'être optimiste.

Pour les valeurs moyennes rencontrées en routine en zone tropicale évaluées au paragraphe 2 nous voyons qu'en filtrant 15 litres on peut espérer obtenir $\pm 10\%$ sur la Chl « a » au niveau $0,1 \text{ mg/m}^3$, $\pm 50\%$ sur la Chl « b » au niveau $0,03 \text{ mg/m}^3$ et sur la Chl « c » au niveau $0,08 \text{ mg/m}^3$. Il va sans dire que, pour des teneurs plus faibles, même avec 20 litres filtrés, seule la Chl « a » peut être valablement mesurée.

Notons que la précision obtenue sur les rapports des chlorophylles entre elles n'est en zone tropicale oligotrophique que très rarement meilleure que 50% .

En conclusion de cette évaluation de l'erreur totale, nous pouvons noter que nous avons réussi à adapter la méthode aux conditions extrêmes des zones oligotrophiques et obtenu la même précision relative que les auteurs de la méthode originale avançaient pour des concentrations dix fois supérieures.

34 — ENREGISTREMENT DES SPECTRES D'ABSORPTION.

Suivant une suggestion faite à plusieurs reprises par certains auteurs nous avons essayé l'enregistrement continu des spectres d'absorption de nos extraits acétoniques à bord. Après avoir tenté d'adapter un enregistreur sur le Beckman DU qui, malheureusement, n'avait pas de réglage automatique du 100% , nous nous sommes tournés vers le Beckman DB avec un enregistreur de 5 inches. Une centaine d'enregistrements pour l'Atlantique tropical au large de Dakar et une cinquantaine pour la croisière équatoriale *Alizé II* nous permettent de faire le point.

L'avantage évident de cette technique était que, pour un échantillon donné, nous remplacions quelques mesures limitées, par un document que nous pouvions conserver et classer.

De ces documents nous espérons tirer trois choses :

- a) une exploitation de routine par mesures aux longueurs d'onde de la méthode ;
- b) la possibilité de faire, par la suite, des mesures à d'autres longueurs d'onde qui pourraient se révéler intéressantes ;
- c) des indications qualitatives sur d'autres pigments, à partir de la forme générale des spectres ou d'accidents de détail dans leur tracé.

Les spectres présentés dans la figure 1 pour l'Atlantique tropical E et dans la figure 2 pour le Pacifique équatorial W, montrent pourquoi ces trois espoirs sont déçus et la technique abandonnée.

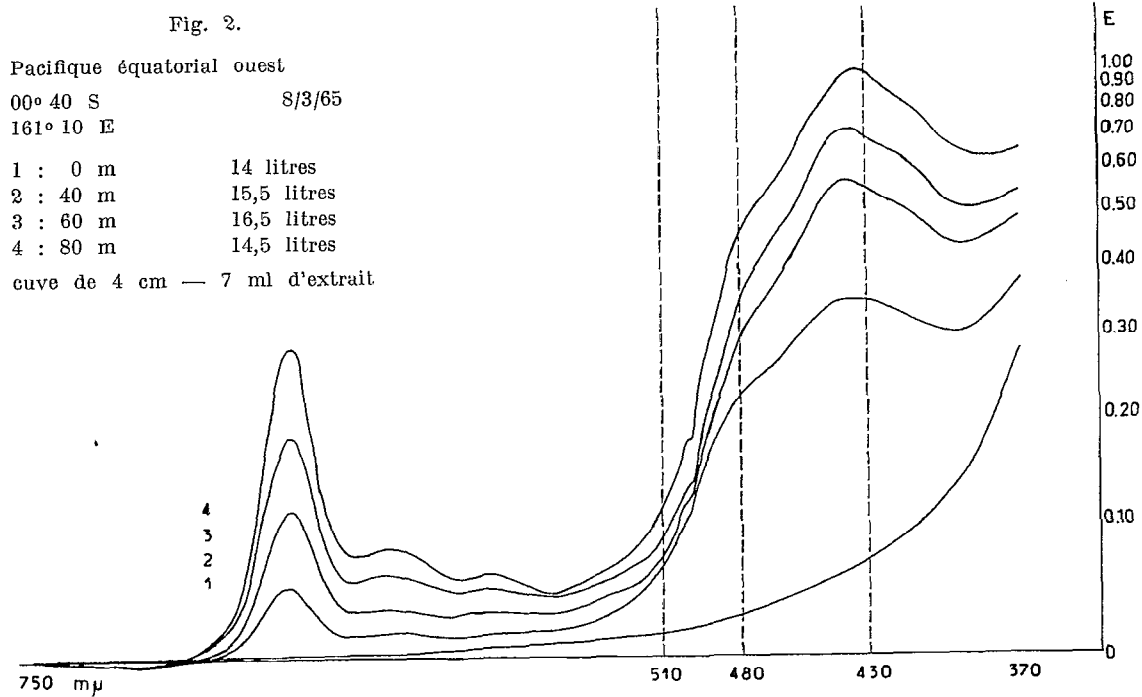
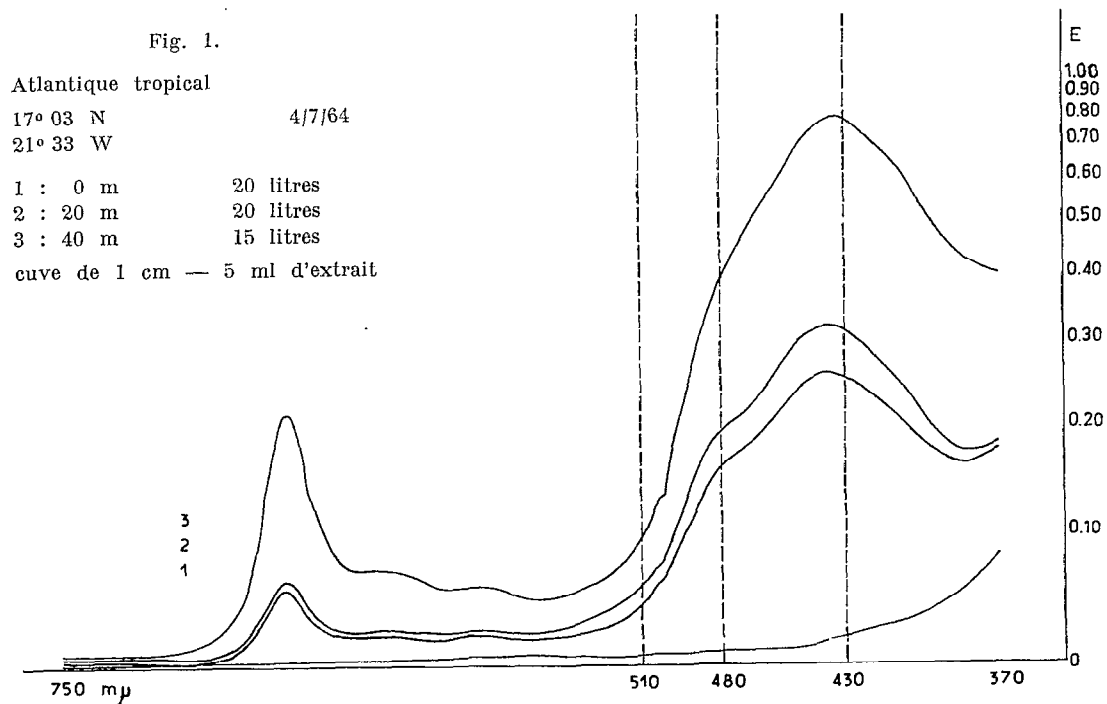
En ce qui concerne les points a) et b), la limitation à des cuves de 4 cm et l'imprécision dans les lectures sur l'enregistrement, associées à la mauvaise définition des longueurs d'ondes, font que toute mesure quantitative est entachée d'une erreur relative élevée ; pour nos analyses de routine nous devons retourner aux lectures en cuves de 10 cm au Beckman DU. Pour le point c), les spectres d'une région tropicale ne diffèrent pas, à nos yeux, de ceux d'une région équatoriale et aucun accident dans le tracé ne peut être défini en longueur d'onde de façon assez précise pour nous permettre d'obtenir une indication qualitative quelconque, qui serait de toute manière, hautement hypothétique.

Remarquons le spectre d'absorption propre à deux filtres Millipore HA 47 mm qui fausse le maximum après $400 \text{ m}\mu$.

4. RÉSULTATS OBTENUS PAR LA MÉTHODE

41 — CROISIÈRE « ATOLL ».

Effectuée du 21 décembre 1964 au 26 janvier 1965 dans le quadrilatère $15^{\circ}\text{S} - 25^{\circ}\text{S}, 130^{\circ}\text{W} - 145^{\circ}\text{W}$, cette croisière nous a permis d'occuper 20 stations.



Les teneurs en chlorophylles « b » et « c », rencontrées dans les cent premiers mètres sont à la limite de la sensibilité de la méthode ; la dispersion des rapports entre les pigments à différents niveaux est en accord avec le tableau des précisions relatives que nous avons établi. Mais dans ces conditions, seule une étude statistique sur les résultats de toute la croisière permet d'obtenir quelques renseignements sur le phytoplancton présent.

La figure 3 donne une vue synoptique des résultats obtenus.

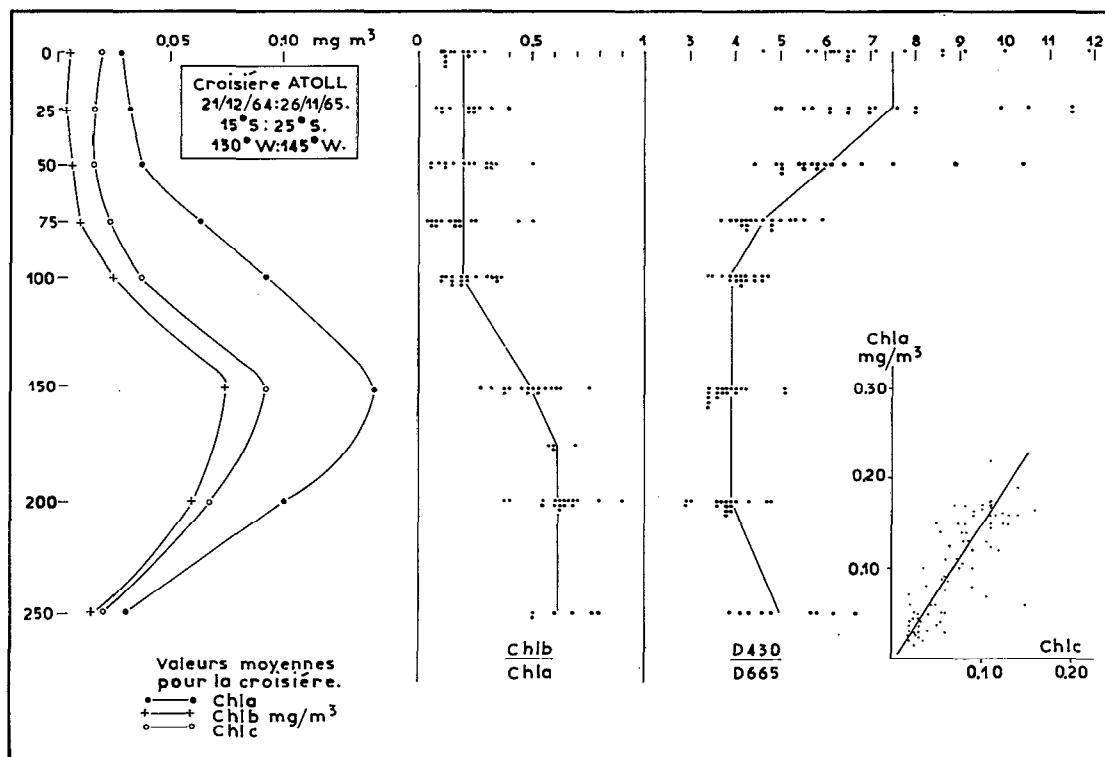


Figure 3.

A) Les profils moyens des chlorophylles montrent la pauvreté de la couche 0-100 m et une accumulation de matériel phytal entre 100 et 250 m, avec un maximum à 150 m.

B) Le rapport $\frac{\text{Chl « b »}}{\text{Chl « a »}}$ est à peu près constant et voisin de 0,2 de la surface à 100 m ; aux niveaux 150, 200 et 250 m, il est significativement plus fort et s'établit à 0,60 en moyenne.

Le rapport $\frac{\text{Chl « c »}}{\text{Chl « a »}}$ n'est pas donné en détail ; la dispersion est trop élevée dans la couche 0-75 m ; cependant, à 100 m, les teneurs étant un peu plus élevées, on a une valeur moyenne de 0,4, alors qu'à 150, 200 et 250 m elle est à peu près de 0,7.

On peut donc simplifier le schéma en disant que nous avons deux couches : la couche 0-100 m où la proportion relative de Chl « a » est forte ($\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}} = 0,2$ et $\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}} = 0,4$) et la couche 100-250 m où elle diminue ($\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}} = 0,6$ et $\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}} = 0,7$).

C) Le rapport $\frac{D_{430}}{D_{665}}$ varie de façon tout à fait différente ; la dispersion aux faibles teneurs

est élevée, mais l'analyse statistique des distributions des valeurs à chaque niveau montre que l'on peut distinguer, au niveau de probabilité 95 %, trois couches :

a) Une couche superficielle où le rapport décroît de la surface à 100 m (valeurs moyennes : 7,5 pour 0-25 m ; 6,1 pour 50 m ; 4,6 pour 75 m ; 4,1 pour 100 m).

b) Une couche 100-200 m où la valeur moyenne s'établit autour de 4,0 (4,1 pour 100 m ; 3,8 pour 150 m ; 3,9 pour 200 m).

c) Une couche profonde en dessous de 200 m, où le rapport croît à nouveau (5,0 pour 250 m).

Cette accumulation de matériel végétal en dessous de la couche euphotique est une situation que l'on retrouve assez souvent en zone tropicale, mais elle est ici particulièrement marquée. Il nous a paru intéressant, à la lumière des données disponibles d'essayer une explication de cette distribution verticale.

Les mesures physico-chimiques de cette croisière fournissent quelques renseignements :

— il n'y a pas de gradient élevé de densité pouvant expliquer l'accumulation profonde des phytoplanctes ;

— jusqu'à 100 m, les nitrates sont pratiquement inexistants, mais leur teneur croît ensuite rapidement ; (teneurs moyennes : 0-100 m 0,02 μ Ag/l ; 0,18 à 150 m ; 1,10 à 200 m ; 2,58 à 250 m) ; la concentration en phosphates est plus régulière, de l'ordre de 0,45 μ Ag/l pour la couche 0-300 m ; il y a un maximum de nitrites entre 150 et 200 m.

Nous nous appuyons sur un certain nombre de faits :

— GROSS et ZEUTHEN (1948) ont suggéré que la flottabilité des cellules du phytoplancton et leur état physiologique général étaient étroitement liés.

— STEELE et YENTSCH (1960) ont montré que dans des cultures déficientes en nitrates, les cellules coulaient rapidement ; que si ces cultures étaient brusquement enrichies en nitrates, la vitesse de sédimentation diminuait aussitôt, d'autant plus nettement que la lumière ambiante était faible.

— VACCARO et RYTHER (1960) ont également expérimenté sur des cultures déficientes en nitrates et enrichies brusquement en ces sels nutritifs ; il se produisait une assimilation rapide de ces nitrates accompagnée d'une accumulation de nitrites dans le milieu, accumulation d'autant plus forte que la lumière était faible.

— MARGALEF (1961) fait remarquer que le rapport $\frac{D_{430}}{D_{665}}$ (qui donne une idée de l'abon-

dance relative des caroténoïdes végétaux et de la chlorophylle « a ») est un indice de l'état physiologique des cellules, pour une population donnée. Un rapport faible dénote un bon état physiologique, un rapport élevé un état déficient ou sénile.

En l'absence de pycnocline marquée pouvant expliquer une diminution importante de la vitesse de sédimentation des cellules, nous pouvons considérer la déficience en nitrates dans les cent premiers mètres comme responsable d'un mauvais état physiologique du phytoplancton dans cette couche. La flottabilité des cellules est faible et elles coulent rapidement ; elles pénètrent alors dans une couche enrichie en nitrates, à la base de la couche euphotique, où l'assimilation de ces nitrates, qui peut se faire à très faible luminosité (Ketchum 1939) restaure leur état physiologique ; leur flottabilité augmente et leur vitesse d'enfoncement diminue, d'où accumulation avec maximum vers 150 m ; plus bas, la lumière est insuffisante pour que la réduction des nitrates

soit complète et des nitrites s'accablent dans le milieu, avec maximum entre 150 et 200 m ; plus bas encore l'absence de lumière porte atteinte à l'état physiologique des cellules qui reprennent leur descente rapide.

Le tableau suivant résume le mécanisme hypothétique que nous avons avancé :

Zm	NO3 μAg/l	NO2 μAg/l	Chl a mg/ m ³	D430 D665	État physiologique	Vitesse de Sédimentation	Chl « b »	Chl « c »	Phénomènes biochimiques	
							Chl « a »	Chl « a »		
0	0,02	0,12	0,028	7,6	Déficient	Élevée	0,2	0,4	Photosynthèse	Assimilation de nitrates
25	0,03	0,06	0,032	7,4						
50	0,02	0,03	0,037	6,1	En amélioration	Décroissante				
75	0,01	0,03	0,063	4,6						
100	0,02	0,02	0,082	4,1	Bon	Faible	0,6	0,7	↑ NO2 NO3	
150	0,18	0,08	0,140	3,8						
200	1,10	0,13	0,100	3,9						
250	2,58	0,03	0,027	5,0	Détérioré	Croissante				

Les mesures d'activité photosynthétique, effectuées in situ dans les cent premiers mètres n'ont pu être exploitées par suite d'une contamination bactérienne accidentelle responsable du fait que les résultats sont du même ordre de grandeur pour les échantillons exposés à la lumière et pour les témoins maintenus à l'obscurité ; mais le fait qu'une activité bactérienne puisse masquer la production primaire des autotrophes permet de penser que le niveau réel de cette dernière était très bas.

Nous sommes donc en présence d'une situation extrême où dans une zone euphotique déficiente en nitrates, un phytoplancton en mauvais état physiologique, ne subsiste que difficilement, et a tendance à s'accumuler en profondeur où, pour un temps, il trouve des conditions qui restaurent son état physiologique.

42 — CROISIÈRE « ALIZÉ II ».

Elle s'est déroulée du 19 février au 8 mars 1965, le long de l'équateur entre 145°W et 160°E ; 17 stations ont été occupées. Les profils obtenus à chaque station ne sont pas très différents, bien que l'on puisse mettre en évidence sur la Chl « a » une tendance à l'accumulation du matériel phytal à la partie inférieure de la couche euphotique dans les stations les plus ouest ; mais les valeurs des rapports entre les pigments ont une dispersion telle que seul le regroupement de toutes les stations fait apparaître quelques traits intéressants. La figure 4 présente de façon synoptique l'essentiel des résultats.

Les profils moyens des trois chlorophylles montrent qu'à partir de valeurs légèrement plus fortes en surface, on obtient une répartition assez constante dans la zone euphotique, avec un léger maximum vers 75 m et une décroissance marquée à partir de ce niveau jusqu'à 150 m. En rapport avec ces profils, l'analyse de la composition relative en pigments fait apparaître trois points :

a) En surface, l'importance relative de la Chl « a » est plus faible qu'aux niveaux superficiels.

	0 m	10 m
$\frac{\text{Chl « b »}}{\text{Chl « a »}}$	0,21	0,16
$\frac{\text{Chl « c »}}{\text{Chl « a »}}$	0,61	0,49
$\frac{D_{430}}{D_{665}}$	5,1	4,2

Les moyennes des deux niveaux sont significativement différentes aux seuils de probabilité 99 % pour $\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}}$ et $\frac{430}{665}$ et 95 % pour $\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}}$.

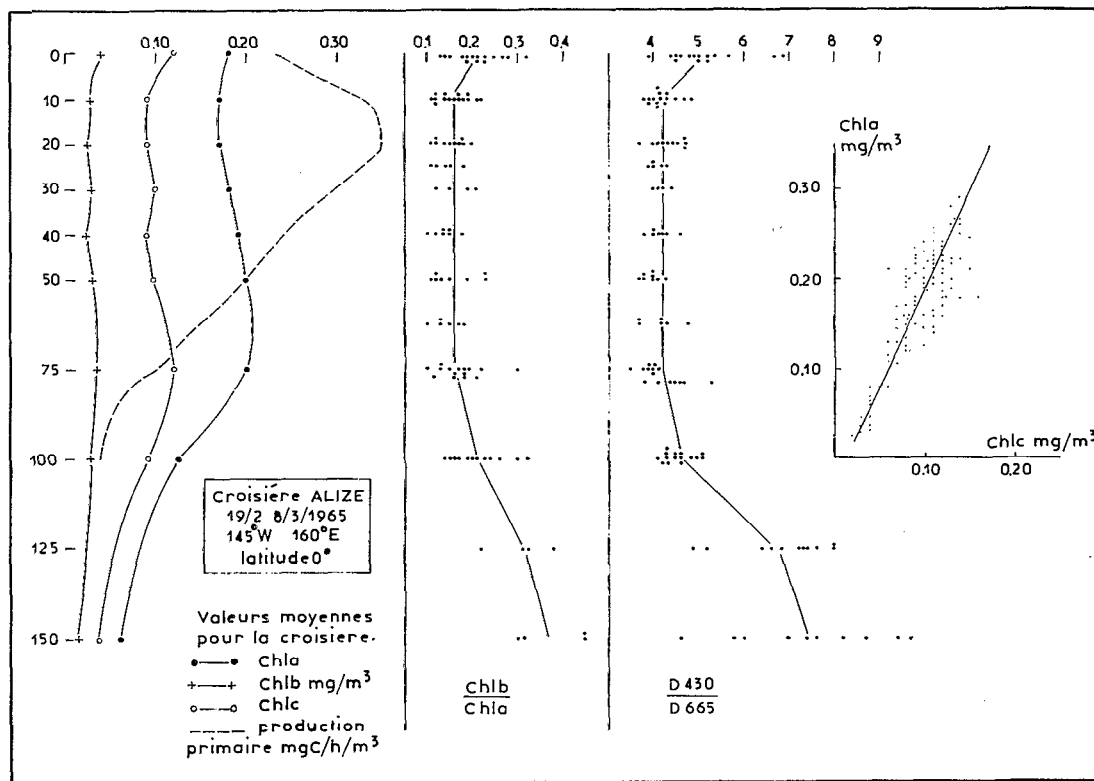


Figure 4.

b) La composition relative en pigments est constante de 10 à 75 m ; $\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}} = 0,16 \frac{D_{430}}{D_{665}} = 4,2$

c) A partir de 100 m, l'importance relative de la Chl « a » décroît nettement.

$$\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}} = 0,4 \text{ et } \frac{D_{430}}{D_{665}} = 7,5 \text{ à } 150 \text{ m.}$$

Le profil moyen de la production photosynthétique in situ permet de faire quelques rapprochements :

— entre l'inhibition de la photosynthèse en surface due à la forte intensité lumineuse et la diminution relative de la Chl « a » mise en relief au point a) précédent ;

— entre l'essentiel de l'activité de photosynthèse et la composition relative assez constante, à forte proportion de Chl « a », de la couche définie en b) ;

— entre la pauvreté relative en Chl « a » de la couche profonde définie en c) liée à un vieillissement des cellules ou à la présence de matériel détritique et la disparition de la photosynthèse à partir de ce niveau.

Mises à part les dernières stations ouest l'analyse chimique de la couche euphotique a montré que les concentrations en sels nutritifs n'étaient pas limitatives. Nous avons donc une situation que l'on pourrait appeler normale, avec une zone euphotique où un phytoplancton en bon état physiologique, trouve des conditions favorables à une production soutenue ; plus bas, la lumière devenant insuffisante, les cellules dépérissent et s'enfoncent rapidement.

43 — ENSEIGNEMENTS DE CES CROISIÈRES.

Une synthèse des résultats acquis au cours de ces deux croisières permet d'apprécier l'opportunité de faire des mesures sur d'autres pigments en plus de la chlorophylle « a ».

La composition relative en chlorophylles semble liée au facteur lumière sans qu'une déficience sévère en nitrates ait grande importance : dans toute la zone euphotique, pour ces deux croisières, les rapports $\frac{\text{Chl « b »}}{\text{Chl « a »}}$ et $\frac{\text{Chl « c »}}{\text{Chl « a »}}$ sont sensiblement constants, mis à part un effet possible de la forte intensité lumineuse sur les phytoplanctes en bonne santé rencontrés en surface au cours d'*Alizé*, et en dessous de cette zone l'abondance relative de la Chl « a » diminue. Les chlorophylles « b » et « c » seraient donc constitutives de l'appareil responsable de la photosynthèse, à un moindre titre que la chlorophylle « a », mais leurs proportions relatives ne dépendraient que de la composition spécifique de la population et de la lumière.

Par contre, l'abondance relative des caroténoïdes et de la chlorophylle « a » semble directement liée à l'état physiologique des cellules ; un rapport $\frac{D_{430}}{D_{665}}$ élevé peut aussi bien être trouvé en surface où il y a déficience en nitrates comme au cours de la croisière *Atoll* qu'en profondeur où il n'y a plus de lumière comme au cours de la croisière *Alizé* ; un rapport $\frac{D_{430}}{D_{665}}$ bas caractérise

aussi bien la couche euphotique où toutes les conditions sont favorables, rencontrée au cours d'*Alizé*, que le niveau d'accumulation en profondeur où la déficience en nitrates cesse mais où il n'y a plus de lumière que l'on trouve au cours d'*Atoll*. Ce dernier point semblerait indiquer que le bon état physiologique d'une cellule est relatif à une situation antérieure, en rapport avec les caractéristiques physicochimiques du milieu mais pas obligatoirement lié à l'activité de photosynthèse.

Nous voyons donc qu'il est utile de mesurer en plus de la chlorophylle « a », une autre chlorophylle et les caroténoïdes. Le problème du matériel détritique doit être abordé, par exemple par le biais de la mesure des produits de décomposition des chlorophylles. Il serait aussi hautement souhaitable d'avoir une évaluation de la biomasse végétale en mesurant directement le carbone organique.

5. EFFETS DE LA RÉVISION DES FORMULES

Pour exploiter les mesures spectrophotométriques de la méthode Richards-Thompson nous disposons actuellement de trois ensembles de formules :

a) les formules originales qui ont servi à calculer presque tous les résultats de pigments en mer obtenus dans le monde entier depuis plus de dix ans ;

b) les formules révisées par Parsons-Strickland, que nous avons employées pour les croisières du *Coriolis* ;

c) les formules révisées par Humphrey, utilisées récemment par certains de nos collègues (SCOR-UNESCO 1964).

Une révision des formules originales était apparue nécessaire car, des résultats acquis, il ressortait que les chlorophylles « b » et « c » étaient probablement surestimées, leurs rapports à la chlorophylle « a » étant bien plus élevés que ceux trouvés par analyse chromatographique des pigments de phytoplancton en cultures ou en milieu naturel ; la chlorophylle « c » paraissait être le pigment principal dans une bonne partie des océans.

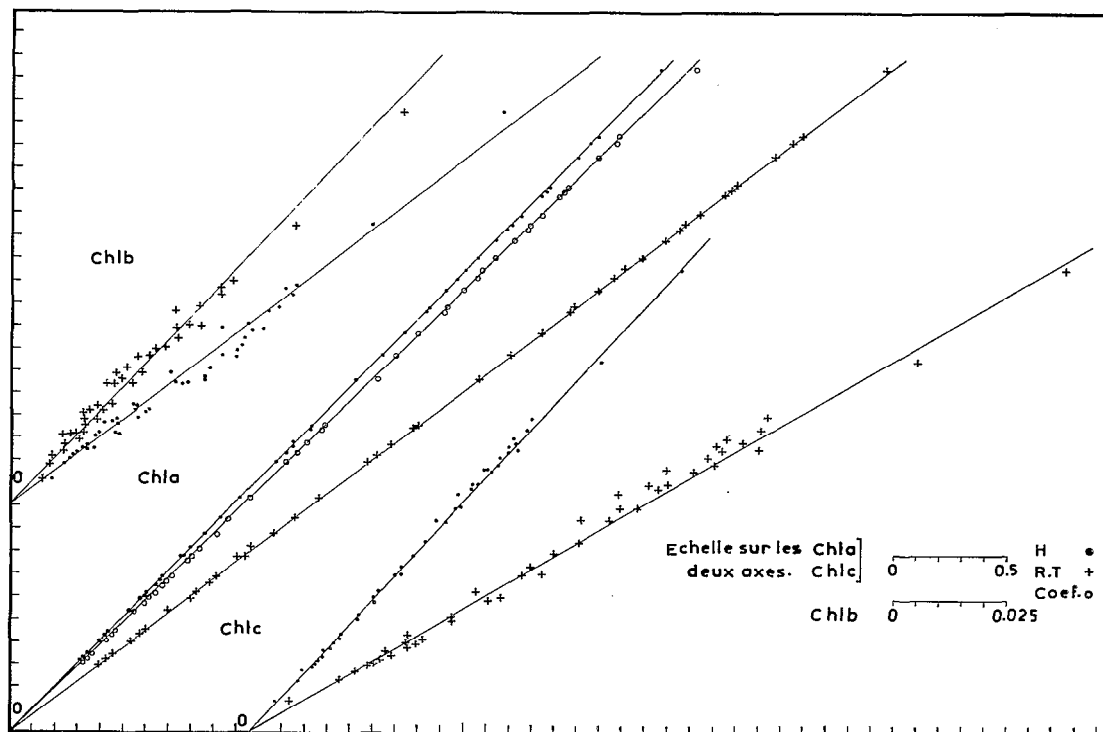


Figure 5.

Dans le double but d'apprécier l'effet des nouvelles formules sur la composition relative en chlorophylles du phytoplancton de notre aire océanique et d'avoir des coefficients correctifs pour comparer nos résultats avec ceux acquis ou à venir, nous avons appliqué les trois ensembles de formules à quelques mesures obtenues au cours des croisières du *Coriolis*; les résultats sont présentés figure 5, les valeurs des formules Parsons-Strickland étant portées en ordonnée, les autres en abscisse.

Dans les formules de Humphrey ce sont les lectures à 663 m μ qui doivent être utilisées ; nous avons cependant fait les calculs avec nos lectures à 665 m μ , pensant qu'avec les spectrophotomètres employés en mer, un décalage de 2 m μ ne devait pas être significatif.

La corrélation obtenue entre les diverses formules est excellente pour la chlorophylle « a » et reste acceptable pour les chlorophylles « b » et « c ». Nous avons tracé à vue les droites qui matérialisent ces corrélations et d'après les pentes obtenues nous avons dressé le tableau suivant :

Formules	Chl « a »	Chl « b »	Chl « c »	$\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}}$	$\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}}$
R.T.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
P.S.	0,76	1,05	0,57	1,38	0,77
SCOR-UNESCO	0,74	1,36	0,53	1,84	0,72

Ce tableau montre que, si l'on accepte les formules révisées comme donnant une meilleure analyse de la composition relative pigmentaire, les anciennes formules surévaluaient la Chl « a » d'un tiers et la chlorophylle « c » de 80 %, mais sous-évaluaient la chlorophylle « b » ; en conséquence les rapports $\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}}$ sont maintenant diminués d'un quart et les rapports $\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}}$ augmentés de 5 % ou de 36 %, la chlorophylle « a » restant le pigment principal.

La comparaison des formules révisées entre elles apparaît sur le tableau suivant :

Formules	Chl « a »	Chl « b »	Chl « c »	$\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}}$	$\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}}$
P.S.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SCOR-UNESCO	0,97	1,30	0,93	1,34	0,96

Nous en concluons que, dans la pratique, les deux méthodes sont équivalentes pour les Chl « a » et « c », mais que la Chl « b » est 30 % plus forte d'après SCOR-UNESCO.

Nous avons également calculé les teneurs en chlorophylle « a » directement à partir des lectures à 665 μ corrigées de la seule turbidité, sans tenir compte des absorptions propres des chlorophylles « b » et « c » à cette longueur d'onde, en prenant 0,089 comme valeur du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle « a ». Remarquons que, d'après la figure 5 cette pratique conduit à des résultats qui excèdent de moins de 2 % ceux obtenus avec corrections.

6. BILAN DE LA MÉTHODE

6 1 — Les valeurs moyennes des rapports $\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}}$ et $\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}}$ obtenues lors des croisières *Alizé II* et *Atoll* sont résumées dans le tableau ci-dessous ; les valeurs soulignées sont celles qu'on aurait obtenues en utilisant les formules originales de Richards-Thompson :

		$\frac{\text{« b »}}{\text{« a »}}$	$\frac{\text{« c »}}{\text{« a »}}$
<i>Alizé II</i>	0-75 m	0,19	0,45
		<u>0,14</u>	<u>0,60</u>
<i>Atoll</i>	0-100 m	0,20	0,73
		<u>0,14</u>	
	100-250 m	0,58	<u>0,97</u>
		<u>0,41</u>	

Si nous nous référons à Humphrey (1962, tableau 4) nous voyons que, quelles que soient les formules employées, nous avons des valeurs acceptables pour ces rapports, assez proches de celles obtenues par chromatographie sur des cultures, alors que les mesures effectuées sur de faibles

volumes d'eau de mer avec des cellules à court trajet optique conduisent à des valeurs trop élevées pour ces mêmes rapports.

Il est donc certain que nos efforts pour améliorer ces deux points de la méthode trouvent là une justification partielle.

6 2 — L'exploitation des résultats obtenus au cours des croisières *Atoll* et *Alizé II* a montré que, mise à part la chlorophylle « a », les valeurs pour les autres pigments prises isolément sont inutilisables à cause de leur grande imprécision ; leur dispersion, pour une même profondeur est de l'ordre de celle que l'on peut prévoir d'après notre tableau des précisions. Cependant, l'analyse statistique des valeurs pour toute une région, permet d'obtenir quelques indications intéressantes sur la physiologie du phytoplancton en rapport avec le milieu.

6 3 — La complaisance de la méthode à fournir des valeurs de chlorophylle « b » si on les lui demande, nous paraît suspecte. Ce pigment n'est en effet signalé par les auteurs compétents que chez les Chlorophycées et chez les Euglenophycées qui ne semblent pas représenter une fraction importante du phytoplancton tropical.

6 4 — Le problème de la détermination des teneurs en caroténoïdes végétaux par spectrophotométrie à partir d'un extrait acétonique de tous les pigments, a été traité par Parsons et Strickland (1963). On ne peut obtenir qu'une mesure approximative en MSPU/m³ par lecture à 480 m μ corrigée de la turbidité lue à 750 m μ . Cette unité arbitraire sera voisine de 1 gramme dans la plupart des cas dans notre région (prédominance de fucoxanthine ou de péridinine, ou d'un mélange des deux).

En conclusion de ce bilan, nous dirons qu'il ne nous semble pas possible, en routine, à bord d'un petit bateau de filtrer beaucoup plus que nos 15 à 20 litres à chacune des 8 à 10 profondeurs étudiées à chaque station, ni de faire mieux que d'employer des cuves de 10 centimètres de trajet optique et de moins de 10 millilitres de capacité dans un spectrophotomètre courant ; nous pensons donc avoir été aussi loin qu'il est pratiquement possible pour améliorer la précision de la méthode ; nous constatons que nous avons réussi à obtenir en zone tropicale pauvre la précision que donne le mode opératoire original en zone tempérée plus riche ; en conséquence nos résultats restent quantitativement acceptables pour la chlorophylle « a » et insuffisants en ce qui concerne les autres pigments. Nous nous proposons donc d'abandonner la méthode des lectures à plusieurs longueurs d'onde sur un extrait global et de nous tourner vers des techniques mieux adaptées aux faibles teneurs à étudier.

7. PROJET D'ÉTUDE POUR L'AVENIR

Pour ceux qui ne considèrent pas l'étude des pigments du phytoplancton comme une fin en soi, mais plus simplement comme un moyen d'arriver à mieux comprendre le processus de la production primaire en mer, en fonction des conditions de milieu, les questions auxquelles ils doivent impérativement répondre sont :

- quels sont les organismes présents ?
- quelle quantité de matière vivante représentent-ils ?
- quel est leur état physiologique ?
- quelle est la vitesse de leur renouvellement ?

L'observation directe permet seule de répondre à la première question ; la méthode du C14 est assez sensible pour éclaircir, en zone tropicale le dernier point ; pour les deux restants, l'étude des pigments reste le seul moyen d'approche.

Nous pensons avoir montré que la méthode de Richards et Thompson, si elle peut rendre des services appréciables dans les croisières descriptives, n'est pas en mesure de nous donner des mesures utilisables dans une étude fine de la couche euphotique en vue de préciser les mécanismes d'utilisation des sels nutritifs et de minéralisation de la matière organique.

En l'absence de technique chromatographique utilisable en mer, nous proposons, en routine d'utiliser pour la chlorophylle « a » la technique par fluorescence de Yentsch et Menzel (1963) : elle permet d'opérer sur un litre, même dans notre région, ce qui offre, en plus d'une rapidité évidente, la possibilité de faire cette mesure sur un échantillon de 3 à 4 litres qui serait utilisé pour toutes les mesures physiques, chimiques et biologiques d'une étude fine de la couche superficielle, et donne une mesure des produits de décomposition des chlorophylles qui indique la proportion relative des cellules mortes et des cellules vivantes ; à quelques profondeurs choisies à chaque station, un volume supplémentaire raisonnable de 4 ou 5 litres serait filtré sur Millipore et l'extraction acétonique après broyage mécanique des cellules, permettrait par lectures spectrophotométriques à 665 et à 430 ou 480, d'obtenir des mesures d'abondance relative des caroténoïdes ; cet extrait, traité suivant la méthode de Parsons (1963) donnerait une mesure précise et spécifique de la chlorophylle « c » ; toute mesure de chlorophylle « b » serait abandonnée.

Nouméa, décembre 1965

BIBLIOGRAPHIE

- GROSS (F.) and ZEUTHEN (E.). — 1948 — The buoyancy of plankton diatoms: a problem of cell physiology. *Proc. Roy. Soc. London*, Vol. 135 : 382-9.
- HUMPHREY (G. F.) (1962). — Phytoplankton pigments in the Pacific Ocean. *Proc. Conf. on Primary Productivity Measurement, Marine and Fresh-water, Univ. of Hawaii, Aug. 21-Sept. 6, 1961.* (Ed. M. S. Doty) (U.S. Atomic Energy Commission Monograph.)
- KETCHUM (B. H.), (1939). — The development and restoration of deficiencies in the phosphorus and nitrogen composition of unicellular plants. *J. Cellular and Comp. Physiol.*, 13 : 373.
- MARGALEF (R.), (1961). — *Hidrografia y fitoplancton di un area marina de la costa meridional de Puerto Rico.* *Inv. Pesq. Tomo XVIII.*
- PARSONS (T. R.), (1963). — A new method for the Microdetermination of chlorophyll « c » in sea water. *J. Mar. Res.*, 21 : (3) : 164-171.
- PARSONS (T. R.) and STRICKLAND (J. D. H.), (1963). — Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.*, 21 : (3) : 155-163.
- RICHARDS (F. A.), with THOMPSON (T. G.), (1952). — The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.*, 11 : 156-172.
- SCOR-UNESCO, (1964). — Report of SCOR-UNESCO Working Group 17 on « Determination of Photosynthetic Pigments » (mimeo), Sydney.
- STEELE (J. H.) and YENTSCH (C. S.), (1960). — The vertical distribution of chlorophyll. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 39 : 217-226.
- STRICKLAND (J. D. H.), (1960). — Measuring the Production of Marine Phytoplankton. *Fish. Res. Bd. Canada, Bul. 122.*
- VACCARO (R. F.) and RYTHER (J. H.), (1960). — Marine Phytoplankton and the distribution of nitrite in the sea. *J. du Cons. Vol. XXV, n° 3* : 260-271.
- YENTSCH (C. S.) and MENZEL (D. W.) (1963). — A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, 10 : 221-231.