

**ÉVALUATION PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE  
DES TENEURS EN CHLOROPHYLLE "a" FONCTIONNELLE  
ET EN PHÉOPIGMENTS  
DES SUBSTRATS MEUBLES MARINS**



**OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER**

**DOCUMENTS SCIENTIFIQUES DE LA MISSION DE L'O.R.S.T.O.M. A NOSY-BÉ**

**Document n°45**



**juillet 1974**

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER  
MISSION ORSTOM DE NOSY-BE (MADAGASCAR).

====

EVALUATION PAR SPECTROPHOTOMETRIE  
DES TENEURS EN CHLOROPHYLLE a FONCTIONNELLE ET EN PHEOPIGMENTS  
DES SUBSTRATS MEUBLES MARINS.

par

M.- PLANTE-CUNY<sup>≠</sup>

Document n° 45 : Juillet 1974.

---

≠ Océanographe biologiste de l'O.R.S.T.O.M., Centre Océanographique de Nosy-Bé, B.P. 68, NOSY-BE, Madagascar et Station Marine d'Endoume, 13007 Marseille (France).

SOMMAIRE.

Introduction.....	4
Abstract.....	5
PREMIERE PARTIE.....	6
I - But de l'étude et problèmes soulevés.....	6
I-1- But des études sur substrats meubles.....	6
I-1-1- Objectifs biologiques.....	6
I-1-2- Objectifs géochimiques.....	7
I-2- Les étapes principales de la progression des techniques.....	8
II - Protocole utilisé à Nosy-Bé sur des sables ou des vases.	12
II-1- Récolte du sédiment.....	12
II-1-1- Deux types de collecte pour quatre objectifs différents.....	12
II-1-2- Quantité de sédiment et traitement avant l'extraction des pigments.....	14
II-2- Extraction des pigments.....	16
II-2-1- Broyage et pesée.....	16
II-2-2- Solvant.....	17
II-2-3- Réfrigération.....	17
II-2-4- Centrifugation.....	17
II-3- Mesures spectrophotométriques.....	17
II-3-1- Matériel utilisé.....	17
II-3-2- Lectures des densités optiques.....	18
II-3-3- Opérations finales.....	19

II-4- Calculs.....	19
II-4-1- Formules originelles.....	19
II-4-2- Formules du programme utilisant les dix variables citées dans le texte.....	21
III - Programme de calcul en FORTRAN IV.....	22
DEUXIEME PARTIE.....	28
Discussion et critiques.	
1 - Récolte du sédiment.....	29
1-1- Collecte.....	29
1-2- Dimensions des échantillons.....	31
2 - Traitement de l'échantillon avant l'extraction.....	33
2-1- Le stockage.....	33
2-2- Le séchage.....	34
2-3- Le broyage.....	39
2-4- Solvant.....	40
3 - Extraction, lectures, expression des résultats.....	41
3-1- Extraction.....	41
3-2- Lectures.....	42
3-3- Expression des résultats.....	44
CONCLUSION.....	44
TABLEAU CHRONOLOGIQUE : Evolution des méthodes d'extraction et de mesures par spectrophotométrie, des pigments végétaux photosynthétiques et de leurs produits de dégradation sur des substrats meubles marins ou lacustres.....	46
BIBLIOGRAPHIE.....	63

## INTRODUCTION.

Une première partie traite des applications actuelles de l'étude des pigments dans les sédiments et analyse les problèmes majeurs soulevés par cette étude en relation avec les objectifs poursuivis. Ensuite, on expose une manière de procéder pour évaluer les teneurs en chlorophylle a non dégradée (considérée comme fonctionnelle) et en phéopigments dérivés de la chlorophylle a. Cette méthode a été utilisée pour traiter 947 échantillons en 1969 et 1970. Les mesures sont faites par spectrophotométrie avant et après acidification. On donne en annexe un programme de calcul (1) qui, à partir de 10 variables, aboutit :

- à l'expression des teneurs pigmentaires en microgrammes par gramme de sédiment sec et en milligrammes par m<sup>2</sup> de sédiment en place.

- à l'expression de certains rapports pigmentaires.

- aux moyennes, variances, écarts-type, erreurs standard de la moyenne et coefficients de variation, au terme d'une série de résultats.

Dans la deuxième partie on donne des alternatives méthodologiques de détail en fonction des connaissances actuelles, des critiques relatives à des points précis de la succession des opérations, les justifications des choix effectués et des explications complémentaires.

Enfin, un tableau chronologique partant de 1955 récapitule les travaux faisant état de l'extraction de la chlorophylle et de ses dérivés dans les sédiments pour des motifs essentiellement biologiques. Les diverses phases opératoires étant résumées, le tableau montre les perfectionnements apportés et peut servir à orienter de futures recherches.

---

(1) Programme réalisé par R. PLANTE, Océanographe biologiste, Mission O.R.S.T.O.M. Nosy-Bé (République Malgache).

ABSTRACT.

The first part of this paper deals about present uses of pigments study in sediments. The author analyses the main problems arising from this study in connection with its required aims. A procedure is described for the evaluation of non degraded chlorophyll a contents (considered as functional) and chlorophyll a derived pheopigments contents.

This method has been used for the treatment of 947 samples in 1969 & 1970. Measurements were made spectrophotometrically before and after acidification. A FORTRAN IV programm using 10 variables gives :

- values of pigment contents expressed as  $\mu\text{g}$  of pigments per g of dry sediment or as  $\text{mg per m}^2$  of original bottom sediment.
- values of some standard pigment ratios.
- means, **variances**, **s.d.**, **standard error**, and variation coefficient after each results sequency.

In the second part, peculiar methodological alternatives are given accounting for the present state of knowledge. Some special points of the method are criticized and arguments are given to justify the adopted solutions.

As a third part, a chronological table beginning in 1955 lists down the published works which deal (from a biological point of view) with chlorophyll and derived compounds extraction from sediments. The different procedure steps are summarized, the table shows the progressive improvements and may be used for future researches.

## PREMIERE PARTIE

### I - BUT DE L'ETUDE ET PROBLEMES SOULEVES.

L'intérêt de l'extraction et de la mesure des pigments photosynthétiques comme indicateurs de "quantités végétales" dans l'étude des chaînes trophiques n'est plus à démontrer. Depuis fort longtemps et à juste titre, on a, sous cet angle, étudié les milieux et les organismes les plus divers.

Pour le domaine benthique, les travaux effectués sur des substrats solides, artificiels ou non, sur des "mattes" algales, sur des récifs d'algues calcaires, sur des macrophytes, sont nombreux et cités par WETZEL (1964), MOSS (1968), MARSH (1970).

Une application intéressante de cette technique a été l'étude de l'importance des symbiotes végétaux dans l'écosystème des récifs de coraux (ODUM et ODUM (1955), MARGALEF (1959), BURKHOLDER et al. (1959), QASIM et al. (1972)).

#### I-1. But des études sur substrats meubles :

L'étude des substrats meubles sous l'angle des teneurs en pigments chlorophylliens ou apparentés peut avoir des objectifs très variés que j'examine brièvement, la méthodologie ayant progressé grâce à la diversité de ces objectifs.

##### I-1.1. - Objectifs biologiques :

La teneur en pigments est considérée comme :

##### I.1.1.1. - Indice d'une production primaire :

a) - Production primaire passée (planctonique ou benthique) due à des pigments maintenant fossiles (fossiles biochimiques : VALLENTYNE (1954, 1955), VALLENTYNE et CRASTON (1957), VALLENTYNE (1960), BROWN et COLMAN (1963)); ce point rejoint les objectifs géochimiques (§ 1-2).

b) - Production primaire actuelle benthique, due à des pigments actifs, ou biomasse végétale décelée par ces pigments :  
.../...

- dont la quantité est considérée comme indice du "standing crop" : ODUM et ODUM (1955), MOUL et MASON (1957), TAYLOR et GEBELEIN (1966), EATON et MOSS (1966), MOSS et ROUND (1967), MOSS (1968, 1969), PAMATMAT (1968), STEELE et BAIRD (1968), TIETJEN (1968, 1970), HARGRAVE (1969), HICKMAN et ROUND (1970), RIZNIK et PHINNEY (1972), OLAH (1972),

- dont la présence indique une capacité potentielle de fixer le CO<sub>2</sub> si la lumière intervient (capacité de production primaire : ODUM et al. (1958), POMEROY (1959), WETZEL (1963, 1964), GOLDMAN et al. (1963), BURKHOLDER et al. (1965), LEACH (1970), FENCHEL et STAARUP (1971), BOUCHER (1972), BUNT et al. (1972), COLOCOLOFF (1972), PLANTE-CUNY (1973))

- dont la quantité est même considérée comme un indice de la production d'une biocoenose en général (FIGUERAS (1955, 1956), SANDERS et al. (1962)).

c) - Production primaire actuelle planctonique :

Il existe des relations directes entre les teneurs en chlorophylles détritiques des sédiments et la fertilité actuelle de l'eau de certains lacs (GORHAM (1960)).

I-1.1.2. - Indice de divers phénomènes biologiques :

- indice de surpeuplement ou de limite d'âge dans des parcs à huîtres perlières ; indice obtenu par mesures des dérivés de la chlorophylle dans **les fèces des huîtres et dans les sédiments** (phéopigments comme indicateurs d'accumulation de substances organiques : SAWADA et UYENO (1966)).

- indice de la quantité de sédiment filtrée par certains poissons herbivores : rapport entre les teneurs en pigments chlorophylliens des contenus stomacaux et celles des sédiments en place (ODUM 1970).

I-1.2. - Objectifs géochimiques :

I-1.2.1. : étude des conditions passées de la sédimentation : granulométrie, conditions aérobies ou anaérobies (GORSCHKOVA 1938, JASTREBOVA 1938, KLENOVA et JASTREBOVA 1938, ALDERSHOFF 1951, LAEVASTU 1958).

.../...



I-1.2.2. : étude des processus biochimiques passés ou présents de dégradation des chlorophylles (LUBIMENKO et RAUSER-CERNOUSSOVA (1930); "sedimentary chlorophyll degradation products" : TRASK et WU (1930) cité par FOX et ANDERSON (1941), FOX (1944), FOX et al. (1944), VALLENTYNE (1954, 1955, 1956), VALLENTYNE et CRASTON (1957)), aspects de la formation des pétroles (ORR et GRADY (1957), ORR et al. (1958), VALLENTYNE (1960), BROWN (1969)).

I-1.2.3. : datation (FOGG et BELCHER (1961), BELCHER et FOGG (1964), SANGER et GORHAM (1972)).

## I-2. - Les étapes principales de la progression des techniques :

Les premiers travaux effectués à partir de 1921 par LUBIMENKO (LUBIMENKO et RAUSER-CERNOUSSOVA 1930) et poursuivis jusqu'à VALLENTYNE (1954, 1955) ont vu avant tout dans la chlorophylle extraite des sédiments marins ou lacustres, un fossile biochimique.

A partir des travaux de FIGUERAS (1955) et de ceux de ODUM et ODUM (1955), les pigments chlorophylliens de la surface des sédiments sont considérés comme des indices biologiques actuels, mais, jusqu'en 1963, on déplore l'impossibilité d'évaluer vraiment par ce moyen une quantité de matière vivante : on ne parvient pas encore à faire des mesures distinctives entre la chlorophylle dite "active" ou "fonctionnelle" ("functional chlorophyll" WETZEL 1963) et ses produits de dégradation particulièrement abondants dans les sédiments (ODUM et al. 1958).

La chlorophylle a, souvent seule considérée à cause de son importance prépondérante dans la photosynthèse et, il faut bien le dire, à cause des difficultés rencontrées pour évaluer les autres chlorophylles, se dégrade principalement en chlorophyllide a (perte du groupement phytol) ou en phéophytine a (perte de magnésium) puis en phéophorbide a à partir des deux corps précédents (ORR et al. (1958), VALLENTYNE (1960), YENTSCH (1965a, 1966), SEELY (1966)).

Les spectres d'absorption de ces pigments dans divers solvants ont un pic caractéristique aux environs de 665 nm (fig. 1 et 2). Le pic de la chlorophylle a à 665 nm subit un léger glissement vers les plus grandes

longueurs d'onde quand cette chlorophylle est transformée en phéophytine a, glissement trop faible cependant pour servir pratiquement à des mesures différentielles (ODUM et al. 1958, WETZEL 1964). Cette bande commune de forte absorption est située entre 660 et 670 nm, mais la capacité d'absorption de la phéophytine a est dans l'acétone inférieure d'environ 40 % à celle de la chlorophylle a. En conséquence, il existe dans cette zone une différence notable entre les coefficients d'absorption spécifiques ( $\alpha$  ou  $k$  en  $l.g^{-1}cm^{-1}$ ,  $\epsilon$  en  $l.mole^{-1}cm^{-1}$ ) de ces deux catégories de pigments dans les différents solvants (1,6 à 1,7 dans l'acétone). Cette observation semble remonter au moins à 1936 (STERN et WENDELEIN (1936) cités par ORR et GRADY (1957)), (1).

Pour des informations plus détaillées sur cette importante question des pigments photosynthétiques, des produits de dégradation et de leurs qualités spectrophotométriques, on pourra consulter les travaux de ARONOFF (1950, 1953), SMITH et BENITEZ (1954, 1955), BOGORAD (1962), TALLING et DRIVER (1963), BARRETT et JEFFREY (1964), HOLT (1965), HOLDEN (1965), CHICHESTER et NAKAYAMA (1965), YENTSCH (1965a et b, 1966), VERNON et SEELY (1966).

Les spectres d'absorption des chlorophylles a, b, c, d, et phéophytines a, b, c, d, dans l'éther et les valeurs aux absorptions maxima des coefficients d'absorption spécifiques sont donnés dans SMITH et BENITEZ (1954, 1955), souvent repris notamment par BOGORAD (1962), HOLT (1965), et confirmés par GOEDHEER (1966).

.../...

- (1) A partir de données assez dispersées, j'ai évalué le rapport entre les coefficients d'absorption spécifiques de la chlorophylle a et de la phéophytine a dans les différents solvants suivants :

	chl. <u>a</u> pic à	phéo. <u>a</u> pic à	rapport coef. abs.
SEELY et JENSEN, ORR et GRADY chloroforme (1965) (1957)	665,3	668	1,52
" " " " éthyl éther	660,6	667	1,54
SMITH et BENITEZ (1955) éther	662	667	1,58
VERNON (1960) acétone 80 %	665	666-67	1,64
SEELY et JENSEN, ORR et GRADY dioxane (1965) (1957)	662,0	667,5	1,90
MACKINNEY, LIVINGSTON méthanol (1941) et al. (1953)	665	667	2,12
SEELY et JENSEN, LIVINGSTON méthanol (1965) et al. (1953)	665,7	667	2,22

Pour deux pigments importants du microphytobenthos, la chlorophylle a et la chlorophylle c, je donne quelques exemples significatifs :

Pics importants : longueurs d'onde en nm

( ) Coefficients d'absorption spécifiques :  
 $l.g^{-1}.cm^{-1}$

Chlorophylle <u>a</u> (éther)				
SMITH et BENITEZ (1955)	410		430	662
	(85,2)		(131,5)	(100,9)
Phéophytine <u>a</u> (éther)				
SMITH et BENITEZ (1955)	408,5			667
	(132)			(63,7)
GOEDHEER (1966)	408			667
	( - )			( - )
Chlorophylle <u>c</u> (éther)				
SMITH et BENITEZ (1955)			443,6	
			(à 447,	
			<del>227</del> )	
GOEDHEER (1966)			441	
Phéophytine <u>c</u> (éther)				
SMITH et BENITEZ (1955)		421,5		
GOEDHEER (1966)		421		

Chl. a : Phéo. a ; glissement du pic de 662 nm vers 667 nm avec diminution de l'absorption. - disparition du pic à 430 nm, augmentation de l'absorption aux environs de 410 nm.

Chl. c : Phéo. c ; glissement du pic principal vers les plus faibles longueurs d'onde, même absorption.

L'important travail de VERNON (1960) sur des végétaux alimentaires semble avoir ouvert à certains océanographes des voies nouvelles. Cet auteur détermine, par spectrophotométrie, des quantités de chlorophylle a et b, phéophytine a et b extraites par l'acétone de végétaux les plus divers (pois, haricots, brocolis, épinards), congelés, cuits ou en conserves. Les équations de calcul sont obtenues après détermination de coefficients

d'absorption spécifique de solutions acétoniques à des longueurs d'ondes caractéristiques. On trouvera chez cet auteur les spectres d'absorption des pigments en solution dans l'acétone à 80 % (reproduits fig. 2) et de nombreuses valeurs de  $\alpha$  ( $l.g^{-1}.cm^{-1}$ ).

Par exemple : Chl. a acétone 100 % pic à 663 nm  $\alpha = 92,6$   
                  acétone 90 % pic à 664 nm  $\alpha = 91,1$   
                  acétone 80 % pic à 665 nm  $\alpha = 90,8$   
Phéophytine a acétone 80 % -"à 666-667 nm  $\alpha = 55,2$

L'idée de transformer totalement en phéopigments les extraits chlorophylliens par acidification a été utilisée en 1954 par HOGETSU et ICHIMURA pour des algues de substrats durs et par ORR et GRADY (1957) pour des sédiments marins.

WETZEL (1962, 1963, 1964) tente pour la première fois (à ma connaissance) d'estimer, sur des sédiments lacustres, la quantité de "chlorophylle fonctionnelle" par conversion différentielle en phéophytine (extraits acidifiés et non acidifiés étudiés en parallèle).

C'est vers la même époque que YENTSCH et MENZEL (1963) donnent, pour le phytoplancton, une méthode d'estimation de la chlorophylle et de la phéophytine par fluorescence et par lectures avant et après acidification des extraits.

En 1967, simultanément MOSS, utilisant les pics à 410 et 430 nm, et LORENZEN, utilisant le pic à 665 nm, publient des formules de calcul de la chlorophylle a (y compris la chlorophyllide a que l'on ne peut distinguer) et des phéopigments (phéophytine a et phéophorbide a) à partir de mesures spectrophotométriques. Les formules de LORENZEN utilisant le pic caractéristique de la chlorophylle a semblent plus usitées (STRICKLAND et PARSONS (1968, 1972), VOLLENWEIDER (1969)). Une mesure à la seule longueur d'onde de 665 nm d'un extrait acétonique avant et après acidification permet ainsi une évaluation très rapide de la teneur en pigments (Chl. a et dérivés). Il est clair que ces estimations ne sont pas suffisantes pour donner une image complète et nuancée des véritables teneurs en pigments photosynthétiques et pigments dégradés. Mais la rapidité et la simplicité permettent de multiplier le nombre des échantillons dans l'espace et dans le temps.

Les corrélations obtenues entre ces estimations et les mesures d'assimilation photosynthétique du CO<sub>2</sub> (méthode du 14C) dans nos expériences sur la surface des sédiments (PLANTE-CUNY 1973) montrent que l'on peut s'approcher d'une image du potentiel de production primaire dans quelques zones caractéristiques, côtes sableuses, vasières. D'autre part, les mesures stratifiées, sur des tranches de carottes, donnent des résultats cohérents par rapport aux observations de populations végétales. Il est évident qu'un grand champ d'étude reste ouvert pour améliorer les extraits et apprécier l'importance et le rôle d'autres pigments végétaux dans ces écosystèmes où abondent les organismes photosynthétiques microscopiques les plus variés.

## II - PROTOCOLE UTILISE A NOSY-BE SUR DES SABLES OU DES VASES.

Le parti pris de traiter un nombre important d'échantillons a rendu nécessaire une mise au point technique. Parmi les travaux publiés jusqu'en 1969, au moment du début de cette étude, les données méthodologiques relatives aux sédiments sont assez disparates et la standardisation inexistante (cf. tableau chronologique).

Les échantillons ont été prélevés sur des fonds de vases et de sables calcaires marins situés entre 0 et 65 m. Quelques échantillons proviennent d'un fond sableux de rivière et d'estuaire et quelques autres d'un fond sableux situé à 83 m de profondeur.

### II-1. - Récolte du sédiment :

En plongée libre ou en scaphandre autonome, ou à pied pour les niveaux superficiels.

#### II-1.1.- Deux types de collecte pour quatre objectifs différents :

a)- "écrémage" de la surface du sédiment sur 1/2 à 1 cm d'épaisseur, à l'aide d'une petite pelle de 5 cm de bord d'attaque ; remplissage effectué délicatement d'une boîte de 200 à 300 cm<sup>3</sup> environ, de 7 cm de  $\phi$ , à couvercle hermétique.

- mode de collecte a 1 : petits coups au hasard

sur 1 à 2 m<sup>2</sup> de la surface du sédiment (dans le programme MOCO = EC)

- objectifs : - étude des variations saisonnières des teneurs pigmentaires : collecte tous les 15 jours à 3 semaines dans la plupart des cas, tous les mois pour les stations les plus difficiles d'accès.

- comparaisons entre différents biotopes : collecte à des profondeurs différentes, dans des sédiments de granulométries différentes.

- mode de collecte a 2 : préparation sur le fond d'un quadrillage (programme MOCO = QU) par exemple grille métallique de 1 m de côté avec 16 cases. Le contenu d'un coup de pelle par case est placé immédiatement dans une boîte numérotée.

- objectifs : étude de la répartition des pigments en surface : microdistribution qui, en particulier, donne une idée de la validité des mesures obtenues en a 1 et permet de déterminer la surface à "écrémer".

b)- carottage : (MOCO = CA)

Tube en plexiglas à bord d'attaque taillé en biseau.  $\phi$  intérieur 2,7 cm (S = 5,7 cm<sup>2</sup>, longueur 30 cm au moins). Deux bouchons sont attachés au tube par des liens : on enfonce très délicatement le tube dans le sédiment, on bouche la partie supérieure, on retire le tube, on bouche la partie inférieure tout en relevant le bouchon supérieure et en le remplaçant ensuite. Les tubes sont toujours ensuite maintenus verticalement, rassemblés dans un sac en plastique pour la remontée.

Note : Ces précautions, qui peuvent paraître excessives, sont nécessaires pour obtenir en fin de manipulation une authentique "tranche" de ce qui existe in situ. Il est incontestable que la couche superficielle est la plus fragile du point de vue de la collecte, c'est pourquoi la manipulation en plongée est recommandée autant que faire se peut.

Les carottes sont congelées immédiatement à bord du bateau ou le plus tôt possible. L'étude des pigments se fera sur des tranches de carottes de 1/2 ou 1 cm d'épaisseur.

- objectifs : étude de la répartition des pigments dans l'épaisseur du sédiment.

II-1.2. - Quantité de sédiment et traitement avant l'extraction des pigments :

II-1.2.1 - Cas de l'"écrémage" :

Compte-tenu des réalités biologiques (possibilités d'utilisation de la lumière par les organismes chlorophylliens), j'ai choisi de prélever à la pelle sur une épaisseur faible (0,5 à 1 cm = variable EPSED du programme). J'ai choisi (cf. 2ème partie) de rapporter les teneurs pigmentaires à un poids sec sédiment ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) puis à une surface ( $\text{mg.m}^{-2}$ ) de sédiment en place. L'extraction étant effectuée sur du sable humide préalablement pesé (ordre de grandeur 3 g), ici intervient un essorage.

II-1.2.1.1 - Essorage : à terre ou sur le bateau.

Le récipient de collecte est renversé dans un entonnoir garni de plusieurs épaisseurs de papier filtre très absorbant. En dernier lieu, en contact avec le sédiment on place un filtre Whatman n° 6,  $\varnothing$  15 cm, choisi pour son pouvoir de rétention élevé (90), un peu inférieur à celui des filtres de verre GF/C ( $\gg 100$ ) mais allié à une vitesse de filtration rapide et une résistance forte sans nécessiter d'appareil de filtration. Il s'agit d'absorber vite l'excès d'eau collecté inévitablement, qui ne fait pas partie du "milieu" que représente le "sédiment en place". Si le récipient de collecte est bien rempli de sable au cours de la plongée, il y a peu d'eau susceptible de s'écouler lors de l'essorage.

Note 1°) : Une partie du sable essoré servira pour les mesures d'assimilation du 14C (PLANTE-CUNY 1971).

Note 2°) : A ce stade peut intervenir une congélation ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) si la suite du traitement n'est pas immédiatement possible.

II-1.2.1-2 - Opérations spéciales pour chaque station nouvelle non suivie régulièrement :

a) - on évalue sommairement (par ex. par pesées du sable dans de petites éprouvettes graduées) sur du sédiment essoré, le poids spécifique approximatif du sédiment humide (variable PS, en  $\text{g.cm}^{-3}$ , du programme), afin de pouvoir rapporter les résultats de l'extraction

.../...

et des calculs à une surface.

b) - on réserve une coupelle de sable essoré (30 à 50 g environ) pour évaluer après séchage à l'étuve (80° à 100°C pendant 24 h.) la teneur en eau du sable humide essoré afin de choisir la concentration acétonique pour l'extraction (cf. 2ème partie discussion). Cette manipulation simple est nécessaire chaque fois que les conditions de l'essorage ne sont pas identiques entre elles (par exemple : durée de l'essorage, variations de 9 à 22 % d'eau pour un sable grossier). Des essais pour uniformiser les conditions de l'essorage ont été effectués avec uneessoreuse de ménage : les résultats ne furent pas plus reproductibles que par gravité **sur papier filtre** ; de plus, les organismes risquaient d'être abîmés, l'appareil était peu résistant à l'eau de mer et la nécessité d'utiliser l'électricité pouvait être un handicap dans certains cas.

Note : Cette évaluation grossière de la teneur en eau ne peut servir à la détermination exacte du volume d'eau de chaque échantillon - donc du volume de l'extrait acétonique - car le broyage ultérieur de l'échantillon (cf. 2.1.1.) affecte très sensiblement cette teneur en eau (évaporation).

#### II-1.2.2. : Cas du carottage :

L'expérience m'a montré que dans de nombreux cas, les tranches de 1 cm d'épaisseur étaient trop importantes pour une extraction dans un volume de 6 à 9 cm<sup>3</sup> d'acétone, les teneurs en pigments étant trop fortes dans les premiers centimètres. J'ai adopté par la suite des tranches de 1/2 cm d'épaisseur, pesant entre 2 et 5 g environ. Il ne me semble guère possible de découper plus finement et plus précisément à la main une carotte même congelée. Un essorage sur papier peut être nécessaire pour le premier centimètre découpé : en principe l'eau surnageante est éliminée (glace) mais à l'interface eau-sédiment il faut prendre garde de ne pas altérer une zone particulièrement riche en organismes et de ne pas perdre le matériel superficiel ; donc en garde un peu de glace qu'il faut néanmoins éliminer lorsqu'elle est fondue pour éviter une dilution trop grande de l'acétone.



II-2. - Extraction des pigments :

II-2.1. : Broyage et pesée :

Opérations à réaliser sur le sédiment humide, le plus rapidement possible, à la semi-obscurité (salle de balances non éclairée), et, en pays tropical, dans une pièce climatisée.

II-2.1.1. : Broyage : dans les deux cas (écrémage et carottage) :

- écrémage : un sous-échantillon de 10 à 12 g environ de sédiment essoré est broyé dans un mortier de porcelaine pendant quelques minutes (sable calcaire ; pour un sable siliceux, prévoir un mortier d'agate).

- carottage : broyage de chaque tranche de carotte. Pour les vases, l'expérience a prouvé que le broyage était inutile (extraction de quantités équivalentes de pigments avec ou sans broyage).

II-2.1.2. : Pesées :

a) - dans une phase préparatoire, on aura lavé, séché, numéroté,

- des tubes à centrifuger de verre :

- des tubes en plastique de différentes marques se sont tous imprégnés de chlorophylle au bout d'un certain temps.

- pour leur résistance, leurs dimensions en rapport avec la centrifugeuse dont je disposais, et les quantités de sédiment à traiter, j'avais choisi les tubes "Jena Glass, Schott Mainz G 20" de 12 à 13 ml environ.

- des bouchons en téflon pour ces tubes

- les tubes, contenant chacun une pincée de  $\text{CO}_3 \text{Mg}$  (pour prévenir la dégradation possible in vitro de la chlorophylle en alcalinisant le milieu), et les bouchons séjournent plusieurs jours dans les dessiccateurs à "silicagel".

- les tubes secs avec  $\text{CO}_3 \text{Mg}$  sont pesés à l'avance au mg près (variable T, en g du programme de calcul)

- on prévoit généralement 3 échantillons de sable par station "écrémée".

b) - pesée de l'échantillon de sable humide (essoré, broyé, introduit à la spatule dans le tube adéquat).

En général, pour les stations entre 5 et 30 m, riches en pigments, l'expérience m'a conduite à adopter le poids approximatif de 3 g de sable humide, l'extrait acétonique devant conduire à des densités optiques à 665 nm inférieures à 0,6 dans une cuve de 1 cm de trajet optique (cf. 2ème partie 1-2). Les 10 à 12 g de départ donnent 3 sous-échantillons. Cette pesée donne la variable TH, en g, du programme de calcul : tube sec + sable humide.

#### II-2.2. : Solvant :

- introduction immédiate de l'acétone par une burette automatique Metrohm qui délivre 9 ml d'acétone à 90 % (variable ACE du programme). Cette quantité est diminuée si le sable semble peu riche.

Dans la 2ème partie (2-2 fin du paragraphe) on explique comment il a été tenu compte de la teneur en eau du sédiment pour choisir une concentration de départ de l'acétone entre 100 % et 90 %.

- on bouche immédiatement et on agite vigoureusement.

- le tube est placé dans une boîte étanche à la lumière (précautions à prendre quand on introduit les tubes successivement).

#### II-2.3. : Réfrigération :

- boîte obscure au réfrigérateur (5°C environ) durant 20 à 24 h. Agiter plusieurs fois. On s'arrange pour bien caler les tubes et on agite toute la boîte sans l'ouvrir.

#### II-2.4. : Centrifugation :

- 4 à 5000 rév/min, 10 à 15 min, jusqu'à obtention d'un liquide limpide.

#### II-3. - Mesures spectrophotométriques :

##### II-3.1. : Matériel utilisé :

- spectrophotomètre Beckman DU.

- cuves de quartz de 2,5 ml, trajet optique 1 cm (variable L en cm du programme de calcul).
- bouchons pour cuves.
- cuve témoin avec acétone à 90 %.

II-3.2. : Lectures des densités optiques :

- à 750, 665, puis 430 nm : recommandations générales STRICKLAND et PARSONS (1968, 1972).

DO 750 : pour corrections de turbidité ; dans le programme, les variables DO\_665\_0\_ = DO 665 nm - DO 750 nm (avant acidification).

$$\underline{DO\_430} = DO\ 430\ \text{nm} - 3\ DO\ 750\ \text{nm}$$

- on acidifie les extraits : dans les cuves, y compris la cuve témoin, on ajoute 1 à 2 gouttes de HCl 1 N.

- on bouche la cuve, on agite vigoureusement.

- au bout de 3 à 5 mn on relit à 750 nm et 665 nm.

DO\_665\_A\_ = DO 665 nm - DO 750 nm (après acidification).

Note 1. : L'exactitude est améliorée si la densité optique de la première lecture à 665 nm est supérieure à 0,200 (WETZEL et WESTLAKE (1969) voir 2ème partie 1-2).

Note 2. : J'ai quelquefois effectué des lectures à 665 nm, 645 nm, 630 nm pour appliquer les équations trichromatiques de STRICKLAND et PARSONS (1968) mais les résultats sont incertains car les pigments surnuméraires sont probablement plus importants dans le sédiment que dans le phytoplancton. Ce type de calcul n'a donc pas été inclus dans le programme.

Note 3. : La lecture à 430 nm sert à évaluer le rapport DO 430/DO 665 considéré comme indice de diversité pigmentaire (MARGALEF 1961). Des précisions sont apportées dans la 2ème partie (3-2).

Note 4. : Quelques lectures à 410 nm ont permis de vérifier le point de vue de MOSS (1967) sur l'utilisation différentielle des pics à 410 et

430 nm en présence ou absence de phéopigments (cf. fig. 1 et 2). La méthode LORENZEN, plus simple et plus sûre (à mon avis), a seule été retenue.

### II-3.3. : Opérations finales :

Les tubes et leurs résidus sont placés à l'étuve à 80°C pour séchage jusqu'à poids constant.

Une pesée donne alors la variable TS = tube + sédiment sec.

TH - T = poids humide ; c'est la quantité réelle de sédiment sur laquelle a été faite l'extraction.

TS - T = poids sec ; la quantité de pigments lui est rapportée. Par différence (TH - TS) on détermine la teneur réelle en eau de l'échantillon ce qui permet d'évaluer exactement le volume de l'extrait acétonique soit ACE + (TH - TS) (acétone versé + eau de l'échantillon).

### II-4. - Calculs :

#### II-4.1. : Formules originelles :

Les équations de LORENZEN (1967) concernent des volumes d'eau filtrée (phytoplancton) :

$$\text{Chl } \underline{a} \text{ mg.m}^{-3} = \frac{A \cdot K \cdot (6650 - 665a) \cdot v}{V_f \cdot l}$$

$$\text{Phé. } \underline{a} \text{ mg.m}^{-3} = \frac{A \cdot K \cdot (R [665a] - 6650) \cdot v}{V_f \cdot l}$$

A = coefficient d'absorption de la chlorophylle a = 11.0 (11.0 correspond en réalité à  $10^3$ , étant le coefficient d'absorption spécifique de la Chl a en l.  $\frac{\text{cm}^{-1}}{\text{g}}$ , déterminé par VERNON 1960, soit 90,8 dans l'acétone 80 % ou 91,1 dans l'acétone 90 % ; cf. A -2).

K = facteur destiné à rétablir la concentration initiale en chlorophylle a à partir de la réduction d'absorption observée : (1,7/1,7-1) soit 2,43.

R = maximum du rapport 6650/665a en absence de phéopigments = 1,7

Rappelons que cette valeur du rapport : 1,7, comparable au résultat Fo/Fa 1,6 à 1,8 évalué par YENTSCH et MENZEL (1963) (fluorométrie),

.../...

a été trouvé expérimentalement par LORNZEN en étudiant des mélanges de chlorophylle a et de phéopigments (gradients croissants) : s'il n'y a pas de Chl. a le rapport = 1, s'il n'y a que de la Chl. a il est de 1,7.

La valeur expérimentale est confirmée par la valeur du rapport entre les coefficients d'absorption spécifiques à 665 nm de la chlorophylle a et de la phéophytine a dans l'acétone (1,64 dans l'acétone à 80 % d'après les données de VERNON (1960) ; 1,60 si l'on corrige le coefficient d'absorption spécifique de la phéophytine a pour perte de l'atome de Mg).

665o "absorbance" avant acidification (densités optiques)

665a "absorbance" après acidification

v = volume d'acétone utilisé pour l'extraction

Vf = litres d'eau filtrée

l = largeur de la cuvette (cm).

Ces équations sont reprises en 1968 et 1972 dans les manuels de STRICKLAND et PARSONS ( $A \times K = 26,7$ ).

WETZEL et WESTLAKE in VOLLENWEIDER (1969) donnent une équation générale pour la chlorophylle a en  $\mu\text{g}$  par "échantillon" (eau filtrée ou tout autre échantillon). Le coefficient 1,7 est adopté "neglecting the small change in molecular weight when chlorophyll is changed to phéophytin". La valeur du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle a à 665 nm par contre est choisie comme égale à 84 : "a value of 84 may be preferred" par rapport à la valeur de VERNON reprise par LORENZEN. Cette valeur de 84 est issue de TALLING et DRIVER (1963) et a été calculée empiriquement. La justification des divers auteurs n'étant, à mon avis, pas très convaincante et la valeur de VERNON (90,8) étant actuellement la plus usitée, c'est cette dernière qui a été retenue.

GOLTERMAN et CLYMO (1969) soulignent à nouveau qu'il existe des différences pouvant atteindre 25 % dans les coefficients d'extinction donnés par les divers auteurs (cf. 2ème partie 2-2 note infrapaginale) et recommandent d'utiliser 89 et 56 ( $\text{l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) respectivement pour la chlorophylle a et la phéophytine a (ce qui donne un rapport de 1,58) alors que le rapport correspondant à R est adopté comme égal à 1,7.

Comme on le voit, il reste encore à affiner des points de détail. Il n'est pas inutile de rappeler comme le font STRICKLAND et PARSONS (1968 et 1972) que "par cette méthode, il est possible d'obtenir une mesure

.../...

de la quantité totale de chlorophylle a et des phaeophytine a et phaeophorbide a, mais non de la chlorophyllide a ou des phaeophytines et phaeophorbides des autres chlorophylles. Pour une analyse complète de toutes les chlorophylles et de leurs produits de dégradations il n'est probablement pas d'autre alternative que les méthodes chromatographiques qui sont généralement trop fastidieuses (tedious) pour une analyse de routine d'un grand nombre d'échantillons. Pour une observation de routine, toutefois, il est souvent suffisant d'obtenir une mesure de la quantité de chlorophylle a non-active en termes de quantités de phaeo-pigments".

II-4-2. : Formules du programme utilisant les dix variables citées dans le texte :

Chl. a /ug.g<sup>-1</sup> sédiment sec :

$$\text{CHLAP} = \frac{26,7 (\text{DO } 665 \text{ O} - \text{DO } 665 \text{ A}) ((\text{TH}-\text{TS}) + \text{ACE})}{(\text{TS} - \text{T}) \text{ L}}$$

Chl. a mg.m<sup>-2</sup> sédiment en place :

$$\text{CHLAS} = \frac{\text{CHLAP} (\text{TS} - \text{T}) \times \text{PS} \times 10 \times \text{EPSSED}}{(\text{TH} - \text{T})}$$

*Poids de l'échantillon*  
↑  
*Poids de l'humidité*

Phéo /ug.g<sup>-1</sup> sédiment sec :

$$\text{PHEOP} = \frac{26,7 (1,7 (\text{DO } 665 \text{ A} - \text{DO } 665 \text{ O})) ((\text{TH}-\text{TS}) + \text{ACE})}{(\text{TS} - \text{T}) \text{ L}}$$

Phéo mg.m<sup>-2</sup> sédiment en place :

$$\text{PHEOS} = \frac{\text{PHEOP} (\text{TS} - \text{T}) \times \text{PS} \times 10 \times \text{EPSSED}}{(\text{TH} - \text{T})}$$

Les autres résultats exprimés sont :

P. HUM = poids de sédiment humide sur lequel a lieu  
l'extraction

P. SEC = poids de sédiment sec recueilli en fin  
d'expérience

.../...

PROP. EAU } proportions respectives d'eau et de sédiment  
PROP. SED }  
dans l'échantillon.

665 O/A = DO 665 O/DO 665 A donne une indication immédiate de la proportion de produits dégradés (1,7 en absence de phéo-pigments).

DELTA = DO 430/DO 665 O (cf. 3-2 et 2ème partie)

CHLA/PHE = rapport entre la Chl. a fonctionnelle et les phéopigments.

CHL/P.T. = rapport entre la quantité de Chl. a fonctionnelle et le total des quantités Chl. a + Phéo.

Pour un groupe d'échantillons d'une même station (en pratique lorsque dans la suite des données le n° de la station change) on obtient pour les 8 colonnes de résultats concernant les pigments : moyenne, variance, écart-type, erreur standard de la moyenne, coefficient de variation.

Exemples : - dans le cas d'"écrémage" pour l'étude des variations saisonnières en une station, nous avons extrait les pigments sur 3 sous-échantillons.

- dans le cas d'une carotte nous avons plusieurs demi-centimètres successifs.

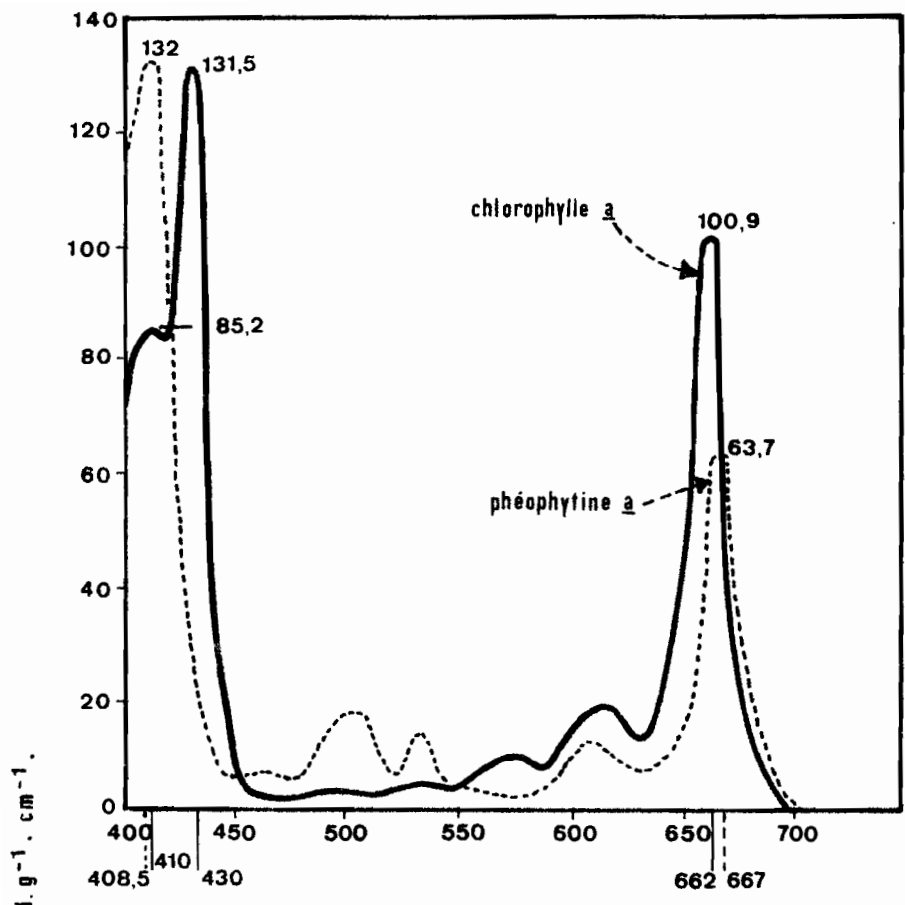
- pour l'étude de la microdistribution nous avons traité 16 échantillons par station.

Quelques exemples numériques sont donnés en annexe avec le programme en FORTRAN IV qui constitue le point III de la première partie (3 sous-échantillons dans 4 stations différentes, une carotte de six 1/2 cm).

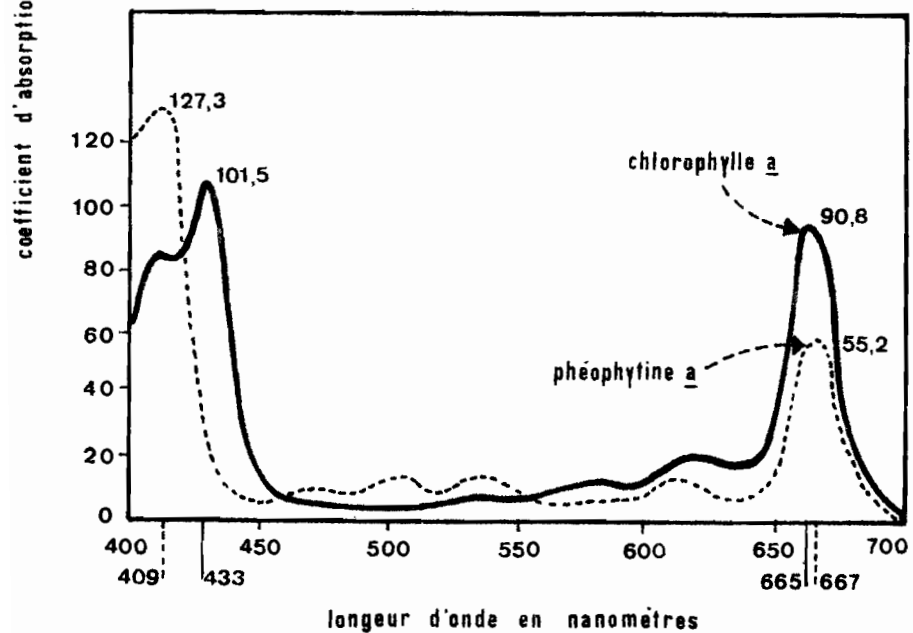
### III - PROGRAMME DE CALCUL, EN FORTRAN IV

réalisé par R. PLANTE

avec la collaboration de M.-R. PLANTE-CUNY



**Fig.1.** Spectre d'absorption de la chlorophylle a et de la phéophytine a dans l'éther.  
(d'après SMITH et BENITEZ 1954)



**Fig.2.** Spectre d'absorption de la chlorophylle a et de la phéophytine a dans l'acétone à 80%.  
(d'après VERNON 1960)



```

1) C *****
2) C CALCUL DES TENEURS EN CHLOROPHYLLE A FONCTIONNELLE, EN PHEOPIGMENTS
3) C ET DE DIVERS RAPPORTS PIGMENTAIRES, APRES EXTRACTION A L'ACETONE
4) C SUR DES SEDIMENTS HUMIDES ET MESURES AU SPECTROPHOTOMETRE,
5) C (FORMULES DE LORENZEN 1967 ADAPTEES AUX SEDIMENTS)
6) C *****
7) C
8) C SIGNIFICATION DES PARAMETRES PIGBE005
9) C NPASS = NOMBRE D'OBSERVATIONS QUE L'ON VEUT TRAITER PIGBE006
10) C NOST = NUMERO DE LA STATION PIGBE007
11) C DATE = DATE DU PRELEVEMENT PIGBE008
12) C MOCO = MODE DE COLLECTE; CAROTTAGE(CA), ECREMAGE(EC), PIGBE009
13) C QUADRILLAGE(QU) PIGBE010
14) C NUEC = NUMERO DE L'ECHANTILLON PIGBE011
15) C T = POIDS DU TUBE SECHE(G) PIGBE012
16) C TH = POIDS DU TUBE CONTENANT L'ECHANTILLON HUMIDE(G) PIGBE013
17) C TS = POIDS DU TUBE CONTENANT LE SEDIMENT APRES SECHAGE(G) PIGBE014
18) C ACE = VOLUME D'ACETONE VERSE (ML) PIGBE015
19) C L = LONGUEUR DU TRAJET OPTIQUE EN CM (POUR CETTE SERIE, L=1) PIGBE016
20) C PS = POIDS SPECIFIQUE APPROXIMATIF DU SEDIMENT HUMIDE(G PAR CM3) PIGBE017
21) C EPSSED = EPAISSEUR DU SEDIMENT (CM) PIGBE018
22) C DO 665 O = VALEUR CORRIGEE POUR LA TURBIDITE DE LA DENSITE OPTIQUE PIGBE019
23) C DE L'EXTRAIT ACETONIQUE A 665 NM AVANT ACIDIFICATION PIGBE020
24) C DO 665 A = VALEUR CORRIGEE POUR LA TURBIDITE DE LA DENSITE OPTIQUE PIGBE021
25) C DE L'EXTRAIT ACETONIQUE A 665 NM APRES ACIDIFICATION PIGBE022
26) C DO 430 = VALEUR CORRIGEE POUR LA TURBIDITE DE LA DENSITE OPTIQUE PIGBE023
27) C DE L'EXTRAIT ACETONIQUE A 430 NM. PIGBE024
28) C DIMENSION D=NV*N MAX/N MAX=100 PIGBE025
29) C DIMENSION NOST(2), DATE(2), MOCO(2), D(200), X(200) PIGBE026
30) C DIMENSION AM(6), V(8), ET(8), ERM(8), CV(8) PIGBE027
31) C READ1, NPASS; NV=NPASS PIGBE028
32) C WRITE (108,2) PIGBE029
33) C WRITE (108,22) PIGBE030
34) C WRITE (108,2) PIGBE031
35) C PIGBE032
36) C INITIALISATION DES INDICES PIGBE033
37) C N=0; IZ=K+1 PIGBE034
38) C NPASS=NPASS+1 PIGBE035
39) C PIGBE036
40) C LECTURE DES VARIABLES PIGBE037
41) C DO 999 I=1, NPASS PIGBE038
42) C READ(105,3,END=1000) NOST(1), DATE(1), MOCO(1), NUEC, T, TH, TS, ACE, PS, PIGBE039
43) C SEPSSED, DO665O, DO665A, DO430 PIGBE040
44) C PIGBE041
45) C CALCUL DES MOYENNES PIGBE042
46) C IF (I.EQ.1) NOST(I+1)=NOST(I); DATE(I+1)=DATE(I); MOCO(I+1)=MOCO(I); PIGBE043
47) C GO TO 10 PIGBE044
48) C IF (NOST(1).NE.NOST(2)) GO TO 1515 PIGBE045
49) C IF (DATE(1).NE.DATE(2)) GO TO 1514 PIGBE046
50) C IF (MOCO(1).NE.MOCO(2)) GO TO 1513 PIGBE047
51) C GO TO 10 PIGBE048
52) C 1000 IZ=IZ+1 PIGBE049
53) C 1515 NOST(2)=NOST(1) PIGBE050
54) C 1514 DATE(2)=DATE(1) PIGBE051
55) C 1513 MOCO(2)=MOCO(1) PIGBE052
56) C CALL LIGCOL(D;X,N;8) PIGBE053
57) C CALL VAR (D,AM,V,ET,ERM,CV,8,N) PIGBE054
58) C PRINT 1516,AM PIGBE055
59) C PRINT 1518,V PIGBE056
60) C PRINT 1519,ET PIGBE057
61) C PRINT 1520,ERM PIGBE058
62) C PRINT 1521,CV PIGBE059
63) C WRITE(108,1517); N=0 ;K=1 PIGBE060
64) C GO TO(10,1010), IZ PIGBE061
65) C 10 L=1 PIGBE062
66) C CHLAP=(26.7*(DO665O-DO665A)*(TH-TS+ACE))/(TS-T)+L PIGBE063
67) C CHLAS=(CHLAP*(TS-T)+PS*10+EPSSED)/(TH-T) PIGBE064
68) C PHEOP=26.7*(1.7*DO665A-DO665O)*(TH-TS+ACE)/(TS-T)+L PIGBE065
69) C PHEOS=(PHEOP*(TS-T)+PS*10+EPSSED)/(TH-T) PIGBE066
70) C RAPAC=DO665O/DO665A PIGBE067
71) C DELTA=DO430/DO665O PIGBE068
72) C CHLAPH=CHLAP/PHEOP PIGBE069
73) C RAPCLO=CHLAP/(CHLAP+PHEOP) PIGBE070
74) C POIHU=TH-T PIGBE071
75) C POISEC=TS-T PIGBE072
76) C PROEAU=(TH-TS)/(TH-T) PIGBE073
77) C PROSED=(TS-T)/(TH-T) PIGBE074
78) C N=N+1 PIGBE075
79) C D(K)=CHLAP;D(K+1)=CHLAS;D(K+2)=PHEOP;D(K+3)=PHEOS;D(K+4)=RAPAC; PIGBE076
80) C D(K+5)=DELTA;D(K+6)=CHLAPH;D(K+7)=RAPCLO;K=K+8 PIGBE078

```

```

81: C PIGBE079
82: C IMPRESSION DES RESULTATS PIGBE080
83: WRITE(108,100) NOST(1), DATE(1), MOCO(1), NNEG, POIHU, POISEC, PIGBE081
84: SPROEAU, PROSED, CHLAP, CHLAS, PHEOP, PHEOS, RAPAC, DELTA, CHLAPH, RAPCLO PIGBE082
85: 999 CONTINUE PIGBE083
86: 1010 WRITE(108,2) PIGBE084
87: WRITE(108,222)
88: 1516 FORMAT(7X,'*',14X,'MOYENNES PIGMENTS',19X,'*',8(F7.2,X,'*')) PIGBE085
89: 1518 FORMAT(7X,'*',22X,'VARIANCES',19X,'*',8(F7.2,X,'*')) PIGBE086
90: 1519 FORMAT(7X,'*',20X,'ECARTS-TYPE',19X,'*',8(F7.2,X,'*')) PIGBE087
91: 1520 FORMAT(7X,'*',16X,'ERREUR STANDARD',19X,'*',8(F7.2,X,'*')) PIGBE088
92: 1521 FORMAT(7X,'*',6X,'COEFFICIENTS DE VARIATION',19X,'*',8(F6.1,X,'*')) PIGBE089
93: 3X,'*') PIGBE090
94: 1517 FORMAT(7X,'*',122X,'*') PIGBE091
95: 100 FORMAT(7X,'*',A4,I6,AZ,I2,'*',2(F7.2,X,'*'),2(F7.4,X,'*'), PIGBE092
96: 88(F7.2,X,'*')) PIGBE093
97: 1 FORMAT(I3) PIGBE094
98: 2 FORMAT(7X,124'**) PIGBE095
99: 22 FORMAT(7X,'*',3X,'STATION',4X,'*',X,'P.HUM.',X,'*',X,'P.SEC',2X,'*' PIGBE096
100: 8,'PROP.EAU',**,'PROP.SED',**X,'CHLA/G',X,'*',X,'CHLA/M2',** PIGBE097
101: 8X,'PHEO/G',X,'*',X,'PHEO/M2',**X,'665 O/A',**XX,'DELTA',X,'*' PIGBE098
102: 8'CHLA/PHE',**,'CHL/P.T.',**') PIGBE099
103: 222 FORMAT(7X,'P.HUM.=POIDS DU SEDIMENT HUMIDE EN G./' PIGBE100
104: 87X,'P.SEC.=POIDS DU SEDIMENT SECHE EN G./' PIGBE101
105: 87X,'PROP.EAU = PROPORTION D EAU/' PIGBE102
106: 87X,'PROP.SED = PROPORTION DE SEDIMENT SEC/' PIGBE103
107: 87X,'CHLA/G= CHLOROPHYLLE A EN MICROGRAMMES PAR G.DE SEDIMENT SEC/' PIGBE104
108: 87X,'CHLA/M2=CHLOROPHYLLE A EN MILLIGRAMMES PAR M2 DE SEDIMENT/' PIGBE105
109: 87X,'PHEO/G= PHEOPIGMENTS EN MICROGRAMMES PAR G. DE SEDIMENT SEC/' PIGBE106
110: 87X,'PHEO/M2=PHEOPIGMENTS EN MILLIGRAMMES PAR M2 DE SEDIMENT/' PIGBE107
111: 87X,'665 O/A=RAPPORT DES DENSITES OPTIQUES A 665 NM AVANT ET APRES PIGBE108
112: 8 ACIDIFICATION/' PIGBE109
113: 87X,'DELTA=RAPPORT DES DENSITES OPTIQUES A 430 ET 665 NM/' PIGBE110
114: 87X,'CHLA/PHE=RAPPORT DES QUANTITES DE CHLOROPHYLLE A AUX QUANTITES PIGBE111
115: 8 DE PHEOPIGMENTS/' PIGBE112
116: 87X,'CHL/P.T.=RAPPORT DES QUANTITES DE CHLOROPHYLLE A AU TOTAL CHLO PIGBE113
117: 8ROPHYLLE A PLUS PHEOPIGMENTS') PIGBE114
118: 3 FORMAT(A4,I6,AZ,I2,3X,9(F7.4)) PIGBE115
119: END PIGBE000

```

```

1: SUBROUTINE VAR(D,AM,V,ET,ERM,CV,NV,NOBS) VAR 0000
2: C ..... VAR 0010
3: C BUT : CALCUL DES MOYENNES,VARIANCES,ECARTS-TYPE,ERREUR- VAR 0020
4: C STANDARD,COEFFICIENT DE VARIATION D'UNE MATRICE VAR 0030
5: C DE DONNEES. VAR 0040
6: C ..... VAR 0050
7: C ..... VAR 0060
8: C / DESCRIPTION DES PARAMETRES : VAR 0070
9: C NV = NOMBRES DE VARIABLES (AXES) VAR 0080
10: C NOBS = NOMBRE D'OBSERVATIONS (POINTS) VAR 0090
11: C D = MATRICE DES DONNEES (NV COLONNES,NOBS LIGNES) VAR 0100
12: C STOCKEE SOUS FORME DE VECTEUR -(SUITE DES COLONNES) VAR 0120
13: C AM = VECTEUR DES MOYENNES VAR 0130
14: C ET = VECTEUR DES ECARTS-TYPES VAR 0140
15: C V = VECTEUR DES VARIANCES (NV) VAR 0150
16: C ERM= ERREUR STANDARD A LA MOYENNE VAR 0155
17: C CV = VECTEUR COEFFICIENT DE VARIATION VAR 0160
18: C ..... VAR 0170
19: C ..... VAR 0180
20: C DIMENSION D(NV+NOBS),AM(NV),V(NV),ET(NV),ERM(NV),CV(NV) VAR 0180
21: C ..... VAR 0190
22: C SOUS-PROGRAMMES DEMANDES : AUCUN VAR 0200
23: C ..... VAR 0210
24: C ..... VAR 0220
25: C - R E S E R V A T I O N - VAR 0230
26: C ..... VAR 0235
27: C DIMENSION D(1),V(1),AM(1),ET(1),ERM(1),CV(1) VAR 0240
28: C L=0;DO 1 I=1,NV;SOMX=0.,SOMX2=0.;DO 2 J=1,NOBS;L=L+1 VAR 0250
29: C X2=D(L)*+2;SOMX2=SOMX2+X2 VAR 0260
30: C SOMX=SOMX+D(L);FNOBS=FLOAT(NOBS);AM(I)=SOMX/FNOBS VAR 0270
31: C ..... VAR 0280
32: C CALCUL VARIANCES,ECARTS-TYPE,ERREURS STANDARD,COEF,VARIATION VAR 0290
33: C ..... VAR 0300
34: C V(I)=(SOMX2-(SOMX**2/FNOBS))/(FNOBS-1.);ET(I)=SQRT(V(I)) VAR 0310
35: C ERM(I)=ET(I)/SQRT(FNOBS);CV(I)=(ET(I)/AM(I)) *100 VAR 0320
36: C CONTINUE VAR 0330
37: C ..... VAR 0340
38: C RETURN VAR 0360
39: C END

```

```
11      SUBROUTINE LIGCOL(X1,X,J,NV)          LIGCOL01
12      DIMENSION X(1),X1(1)                LIGCOL02
13      I3=0;NT=NV+J                          LIGCOL03
14      DO 10 I1=1,NV                          LIGCOL04
15      DO 10 I2=I1,NT,NV                      LIGCOL05
16      I3=I3+1;X(I3)=X1(I2)                  LIGCOL06
17      10 CONTINUE
18      GO 12 I=1,NT                            LIGCOL07
19      12 X1(I)=X(I)                          LIGCOL08
101      RETURN                                LIGCOL09
111      END                                  LIGCOL10
```

* STATION	* P.HUM.	* P.SEC	*PROP.EAU	*PROP.SEC	* CHLA/G	* CHLA/M2	* PHEO/G	* PHEO/M2	* 665 O/A	* DELTA	*CHLA/PHE	*CHL/P.T.
*TK01 20270EC 1*	3.00	2.33	.2217	.7783	5.08	33.63	1.11	7.31	1.57	2.75	4.60	.82
*TK01 20270EC 2*	3.00	2.34	.2205	.7795	5.30	35.09	.81	5.34	1.61	2.69	6.58	.87
*TK01 20270EC 3*	3.00	2.35	.2169	.7831	5.49	36.51	.74	4.89	1.62	2.65	7.46	.88
* MOYENNES PIGMENTS					5.29	35.08	.88	5.85	1.60	2.70	6.21	.86
* VARIANCES					.04	2.07	.04	1.66	.00	.00	2.15	.00
* ECARTS-TYPE					.20	1.44	.20	1.29	.02	.05	1.47	.03
* ERREUR STANDARD					.12	.83	.11	.74	.01	.03	.85	.02
* COEFFICIENTS DE VARIATION					3.8%	4.1%	22.3%	22.0%	1.4%	1.8%	23.6%	3.7%
*TK02 20270EC 1*	3.00	2.18	.2731	.7269	8.90	51.75	4.23	24.61	1.47	2.57	2.10	.68
*TK02 20270EC 2*	3.00	2.22	.2612	.7388	8.61	50.86	4.27	25.22	1.47	2.55	2.02	.67
*TK02 20270EC 3*	3.00	2.21	.2617	.7383	8.97	52.96	4.50	26.55	1.47	2.59	1.99	.67
* MOYENNES PIGMENTS					8.82	51.86	4.33	25.46	1.47	2.57	2.04	.67
* VARIANCES					.04	1.11	.02	.98	.00	.00	.00	.00
* ECARTS-TYPE					.19	1.05	.14	.99	.00	.02	.06	.01
* ERREUR STANDARD					.11	.61	.08	.57	.00	.01	.03	.00
* COEFFICIENTS DE VARIATION					2.2%	2.0%	3.3%	3.9%	.3%	.8%	2.8%	.9%
*TK03 20270EC 1*	3.00	2.03	.3239	.6761	20.35	110.05	12.00	64.89	1.44	2.91	1.70	.63
*TK03 20270EC 2*	3.00	2.04	.3184	.6816	21.06	114.84	11.88	64.79	1.45	2.80	1.77	.64
*TK03 20270EC 3*	3.00	2.04	.3195	.6805	20.58	112.03	12.70	69.13	1.43	2.83	1.62	.62
* MOYENNES PIGMENTS					20.66	112.31	12.19	66.27	1.44	2.85	1.70	.63
* VARIANCES					.13	5.80	.19	6.13	.00	.00	.01	.00
* ECARTS-TYPE					.36	2.41	.44	2.48	.01	.06	.08	.01
* ERREUR STANDARD					.21	1.39	.25	1.43	.00	.03	.04	.01
* COEFFICIENTS DE VARIATION					1.8%	2.1%	3.6%	3.7%	.5%	2.0%	4.5%	1.7%
*TK04 20270EC 1*	3.00	2.06	.3131	.6869	.59	2.48	11.56	55.61	1.03	3.83	.04	.04
*TK04 20270EC 2*	3.00	2.07	.3097	.6903	.26	1.24	13.45	65.01	1.01	3.85	.02	.02
*TK04 20270EC 3*	3.00	2.08	.3059	.6941	.51	2.47	12.67	61.54	1.03	3.86	.04	.04
* MOYENNES PIGMENTS					.43	2.06	12.56	60.72	1.02	3.84	.03	.03
* VARIANCES					.02	.51	.90	22.62	.00	.00	.00	.00
* ECARTS-TYPE					.15	.71	.95	4.76	.01	.01	.01	.01
* ERREUR STANDARD					.09	.41	.55	2.75	.01	.01	.01	.01
* COEFFICIENTS DE VARIATION					34.6%	34.6%	7.6%	7.8%	.9%	.3%	39.5%	38.5%
*3A02230470CA11*	4.32	.78	.8204	.1796	8.74	11.77	31.87	42.92	1.15	3.96	.27	.22
*BA02230470CA12*	3.07	.88	.7145	.2855	6.52	13.96	31.08	66.55	1.12	3.96	.21	.17
*BA32230470CA21*	3.06	.94	.6946	.3054	3.76	8.61	25.59	58.61	1.09	4.61	.15	.13
*BA02230470CA22*	3.32	1.12	.6621	.3379	2.67	6.76	20.41	51.73	1.08	4.52	.13	.12
*BA02230470CA31*	3.72	1.27	.6590	.3410	2.42	6.19	18.54	47.41	1.08	4.53	.13	.12
*BA02230470CA32*	4.17	1.39	.6674	.3326	2.70	6.73	17.07	42.57	1.10	4.70	.16	.14
* MOYENNES PIGMENTS					4.47	9.00	24.09	51.63	1.10	4.38	.18	.15
* VARIANCES					6.71	10.10	41.06	89.39	.00	.11	.00	.00
* ECARTS-TYPE					2.59	3.18	6.41	9.45	.03	.33	.06	.04
* ERREUR STANDARD					1.06	1.30	2.62	3.86	.01	.13	.02	.02
* COEFFICIENTS DE VARIATION					58.0%	35.3%	26.6%	18.3%	2.5%	7.5%	32.4%	26.8%

P.HUM.=POIDS DU SEDIMENT HUMIDE EN G.

P.SEC.=POIDS DU SEDIMENT SECHE EN G.

PROP.EAU = PROPORTION D EAU

PROP.SEC = PROPORTION DE SEDIMENT SEC

CHLA/G= CHLOROPHYLLE A EN MICROGRAMMES PAR G,DE SEDIMENT SEC

CHLA/M2=CHLOROPHYLLE A EN MILLIGRAMMES PAR M2 DE SEDIMENT

PHEO/G= PHEOPIGMENTS EN MICROGRAMMES PAR G, DE SEDIMENT SEC

PHEO/M2=PHEOPIGMENTS EN MILLIGRAMMES PAR M2 DE SEDIMENT

665 O/A=RAPPORT DES DENSITES OPTIQUES A 665 NM AVANT ET APRES ACIDIFICATION

DELTA=RAPPORT DES DENSITES OPTIQUES A 430 ET 665 NM

CHLA/PHE=RAPPORT DES QUANTITES DE CHLOROPHYLLE A AUX QUANTITES DE PHEOPIGMENTS

CHL/P.T.=RAPPORT DES QUANTITES DE CHLOROPHYLLE A AU TOTAL CHLOROPHYLLE A PLUS PHEOPIGMENTS

\*STOP\* 0

## DEUXIEME PARTIE.

Jusque vers 1962, l'important travail de ODUM et al. (1958) mis à part, l'évaluation des teneurs pigmentaires dans les sédiments est souvent un mode accessoire d'approche de la biomasse microphytobenthique à laquelle on attache assez peu d'importance.

Les travaux de WETZEL (1962, 1963, 1964) sont le premier exemple à ma connaissance où l'étude des pigments chlorophylliens fonctionnels en tant qu'indicateurs des possibilités de photosynthèse, assortie de mesures de la production primaire par le  $^{14}\text{C}$  devient, pour les sédiments, un but en soi. Le tableau chronologique donné plus loin montre à l'évidence que la méthodologie s'affine dans le sens d'une meilleure discrimination entre pigments fonctionnels et pigments dégradés : à partir de 1967-68, à quelques exceptions près, le procédé d'acidification des extraits s'impose.

L'intérêt est donc à présent :

1°) - d'intensifier le nombre des mesures, qui sont encore actuellement très ponctuelles, grâce à la méthodologie simple et rapide qui permet d'estimer la chlorophylle a fonctionnelle et ses dérivés.

2°) - d'exploiter statistiquement les résultats.

3°) - de développer aussi les méthodes dans le sens d'une meilleure connaissance des autres pigments présents (chromatographie : CORCORAN (1957) cité par VALLENTYNE (1960), TAYLOR et GEBELEIN (1966), DALEY et al. (1973)). Le protocole exposé en II dans la première partie et le programme de calcul III m'ont permis d'augmenter le nombre des mesures à Nosy-Bé.

Trois points principaux me paraissent devoir être discutés et critiqués.

- Comment récolter le sédiment et en quelle quantité ?  
- Doit-on ou non sécher l'échantillon avant l'addition du solvant ?

- Comment exprimer les résultats ?

D'autres détails, évidemment, au cours de l'extraction, méritent d'être approfondis ou justifiés.

.../...

1 - Récolte du sédiment :

1.1. - Collecte :

Pour explorer un secteur côtier comprenant divers types de sédiments, le carottage, souvent seul utilisé, m'a paru insuffisant, surtout lorsqu'il consiste en quelques prises isolées comme c'est encore souvent le cas. Par l'observation visuelle du fond, on perçoit les répercussions que peuvent avoir la présence d'un petit invertébré, l'ouverture d'un terrier, la présence de ripple marks, un gros foraminifère riche en symbiontes végétaux, un débris de phanérogame, sur l'évaluation quantitative des pigments, fonctionnels ou non, faite sur une surface de quelques  $\text{cm}^2$  seulement.

a) - l'"écrémage" ou râclage "in situ" sur une faible épaisseur mais une surface importante (de l'ordre du mètre carré) est nécessaire pour donner une idée des teneurs moyennes. Pour apprécier l'hétérogénéité de la répartition (microdistribution), on peut aussi utiliser l'écramage dans les cases d'un quadrillage préétabli (PLANTE-CUNY, en préparation).

b) - les carottages sur une radiale à intervalles réguliers (BUNT et al. (1972), RIZNYK et PHYNNEY (1972)) peuvent également servir à une étude sur l'hétérogénéité en surface. Cette hétérogénéité est souvent considérée comme très importante. Par exemple, ODUM et al. (1958) la soulignent tout particulièrement (horizontal heterogeneity p. 68) : pour des "échantillons répétés" sur des "fonds vaseux adjacents" de la Laguna Madre (Texas), on donne 16 valeurs de teneurs en chlorophylle a ( $\text{g.m}^{-2}$ ) correspondant à 16 prélèvements effectués à 3 dates différentes (décembre 10 valeurs, janvier 3 valeurs, février 3 valeurs). Bien que les valeurs trouvées un même jour paraissent très hétérogènes à première vue, on s'aperçoit, par une analyse statistique que la variabilité due au jour du prélèvement est nettement supérieure à la variabilité due ~~aux~~ aux différents points de prélèvements le même jour. L'homogénéité des valeurs (moyennes et intervalles de confiance) apparaît pour une série de prélèvements aussi, si l'on prend seulement 3 résultats au hasard sur 10 dans la première série de prélèvements.

c) - l'étude des différentes tranches d'une carotte (1/2 ou 1 cm d'épaisseur suivant le diamètre du carottier et la consistance du sédiment) est indispensable. Elle est révélatrice de la répartition des divers pigments, aussi bien chlorophylle a que phéopigments, en épaisseur.

.../...

A titre d'exemple, voici des teneurs de chlorophylle a dans des carottes de sables coralliens étudiées centimètre par centimètre :

- sable assez grossier, agité par les vagues, profondeur 5 m :

Chl. a : en général décroissance régulière ;

10-1969	1er cm	138 mg.m <sup>-2</sup>
	2ème cm	126 mg.m <sup>-2</sup>
	8ème cm	50 mg.m <sup>-2</sup>
3-1970	1er cm	80 mg.m <sup>-2</sup>
	8ème cm	8 mg.m <sup>-2</sup>
6-1970	1er cm	30 mg.m <sup>-2</sup>
	12ème cm	16 mg.m <sup>-2</sup>
8-1970	1er cm	45 mg.m <sup>-2</sup>
	10ème cm	10 mg.m <sup>-2</sup>

au 16ème cm encore des traces de chlorophylle a fonctionnelle.

- sable plus fin, mode plus calme, profondeur 25 m :

3-1970	1er cm	20 mg.m <sup>-2</sup>
	6ème cm	quelques mg seulement

- sable fin, profondeur 38 m :

6-1970		2 mg.m <sup>-2</sup> sur 2 cm d'épaisseur
--------	--	---

- sable de couloir corallien assez grossier, profondeur 83 m :

4-1970	1er cm	10 mg.m <sup>-2</sup>
	2ème cm	4 mg.m <sup>-2</sup>

chlorophylle a présente jusque 2,5 cm d'épaisseur.

- vases : teneurs en chlorophylle a en général beaucoup plus faibles que sur les sables (toujours inférieures à 100 mg.m<sup>-2</sup> en surface), et sur une épaisseur moindre (de 1,5 à 3 cm seulement). Beaucoup plus de phéopigments en surface et en profondeur que dans les sables (PLANTE-CUNY, en préparation).

La présence de chlorophylle a fonctionnelle en épaisseur dans les sables s'explique assez bien par les remaniements fréquents que subissent de tels sédiments (vagues, courants) qui permettent aux organismes pigmentés de se trouver fréquemment en présence de lumière. De plus

.../...

comme l'ont montré certains auteurs (FENCHEL et STRAARUP (1971)), la lumière pénètre plus profondément au sein d'un sédiment grossier que d'un sédiment fin.

A l'inverse, les endroits vaseux sont assez rarement perturbés, donc les organismes végétaux sont plus concentrés en surface. Quand une agitation a lieu, elle trouble la couche d'eau sus-jacente de façon telle que la lumière pénètre encore beaucoup moins bien jusqu'aux organismes photosynthétiques. Les sédiments sont le siège de la décomposition de la matière organique et (cf. par ex. CALLAME, 1960, 1961), la remobilisation des sels nutritifs est meilleure dans des sédiments grossiers et agités que dans les vases pratiquement imperméables par temps calme.

Donc pour l'évaluation d'un "potentiel photosynthétique", il est essentiel, à mon avis, d'avoir une idée de la répartition de la chlorophylle a au sein même des sédiments, particulièrement ceux qui sont grossiers et agités.

Néanmoins, pour l'expression générale des résultats, il est préférable de ne tenir compte que de la couche superficielle (1 cm dans de nombreux travaux) dont les organismes sont susceptibles de profiter de la lumière à un moment donné, surtout si des mesures d'assimilation du  $^{14}C$  sont effectuées en parallèle.

#### 1.2.- Dimensions des échantillons :

- échantillons collectés : la dimension peut être très variable suivant les engins utilisés (cf. tableau). Il n'y a pas de problème de limites supérieures comparables à celles du phytoplancton (trop d'eau à filtrer pour recueillir des quantités suffisantes). Dans les sédiments fins, vase ou sable fin, il est essentiel de perturber le moins possible le film superficiel, que ce soit par carottage ou par raclage. C'est pourquoi j'ai pratiqué tous mes prélèvements à la main.

#### - échantillons sur lesquels a lieu l'extraction :

Dans le cas d'une étude exploratoire, on ne sait pas, a priori, quelle est la densité des microphytes, il faut souvent tâtonner. A l'oeil nu, on voit dans certains cas sur le fond les taches colorées en vert ou en brun des populations de diatomées, cyanophycées,



flagellés verts, etc... Cette répartition fréquente en taches peut avoir, évidemment, des répercussions sur les résultats c'est pourquoi j'effectue des pelletages au hasard quand il s'agit d'avoir des évaluations moyennes.

L'intensité de coloration de l'extrait chlorophyllien est très souvent imprévisible (exemple le 11-11-1969, zone d'eaux presque océaniques, fond de 67 m, sable du précontinent : chlorophylle a :  $37 \text{ mg.m}^{-2}$  ; phéopigments :  $3 \text{ mg.m}^{-2}$ ). C'est avec surprise que l'on voit parfois des sables dits "très propres" et brassés par les courants de marées, dont les extraits acétoniques sont très nettement colorés en vert. On sait que les diatomées peuplant ce type de sédiment sont très petites et intimement collées aux grains de sable (ROUND (1965) ; PLANTE-CUNY, sous-presse).

La proportion de pigments dégradés dans ces sables est presque nulle. Cette proportion est prévisible avec une certaine habitude des gradations de couleur du vert au brun dans les extraits acétoniques. Dans le cas d'extraits bruns, la présence d'autres pigments que les produits de dégradation de la chlorophylle a est, bien sûr, à envisager.

La règle générale devrait être une extraction sur une quantité donnant des densités optiques d'extraits acétoniques entrant dans des marges connues.

D'après WETZEL et WESTLAKE (1969), il serait souhaitable, pour améliorer l'exactitude des résultats, que les extraits acétoniques, dans une cuve de 1 cm de trajet optique, donnent des densités optiques lues entre 0,2 et 0,6. LORENZEN (1967) conseille 0,2 à 0,5. Pour RICHARDS et THOMPSON (1952) la limite supérieure indiquée est 0,8 de même que pour ORR et GRADY, 0,2 à 0,8 (1957). D'après VALLENTYNE (1955), les solutions obéissent à la loi de Lambert-Beer dans les marges de densités optiques de 0,03 à 0,6 et pour SMITH et BENITEZ (1955) entre 0,1 ou 0,2 et 0,8, "ces limites dépendant de la précision de l'appareil utilisé".

On pourra voir dans le tableau chronologique toutes sortes

- de tailles d'échantillons, en poids, en volumes.

- de quantités de solvants ajoutées.

On peut aussi choisir d'autres cuves (trajets optiques plus longs) en cas de trop faibles concentrations, mais cela m'a paru rarement nécessaire. Pour ma part dans des études régulières, au long des saisons par exemple, j'ai préféré fixer à 3 g la quantité de sable humide broyé ou

.../...

de vase humide, compte tenu de la capacité des tubes à centrifuger qui pouvaient ensuite recevoir 9 ml d'acétone. Dans des sédiments supposés très pauvres, j'ai parfois augmenté les quantités de sable ou diminué les quantités d'acétone.

A titre d'exemple nous avons effectué une analyse de variance sur des résultats (chlorophylle a en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  sable sec) provenant d'un sédiment considéré a priori comme très pauvre car situé à 87 m de ~~pro-~~ fondeur. Nous avons fait des extraits sur :

3 fois 4 g dans 6 ml d'acétone  
3 fois 6 g -"- 6 ml -"-  
3 fois 8 g -"- 6 ml -"-

Les densités optiques à 665 nm (corrigées pour la turbidité par lecture à 750 nm) ont varié entre 0,189 et 0,274. Dans l'analyse des résultats de chlorophylle a, la variance factorielle n'émergeait pas de la variance résiduelle et, au seuil de 95 %, les différences obtenues par les quantités croissantes de sable traitées n'étaient pas significatives.

Il m'est arrivé souvent aussi de voir les densités optiques diminuer très au-dessous de 0,2, par exemple dans une série d'extraits effectués sur des tranches de carotte. Dans de tels cas, je pense, la précision des faibles valeurs dût-elle en souffrir, qu'il est préférable de garder aux échantillons à comparer entre eux la même épaisseur ou le même poids au départ.

Remarques : En principe les tranches de 1/2 ou 1 cm coupées sur la carotte congelée sont traitées entièrement dans un tube avec une quantité convenable d'acétone. Cependant, il arrive, suivant la nature du sédiment, que l'on ne puisse faire des tranches bien régulières (sables très grossiers) en épaisseur ; dans de tels cas, je prélevais un poids précis (par ex. 3 g) dans le 1er, le 2ème, le 3ème centimètre etc... pour rendre les comparaisons plus exactes.

## 2 - Traitement de l'échantillon avant l'extraction :

### 2.1. - Le stockage :

Le stockage est souvent nécessaire. Les auteurs utilisent en général une conservation au froid et à l'obscurité, la moins

.../...

longue possible (12 h cf. tableau) ou la congélation qui est hautement souhaitable (HOLDEN (1965) - 20°, -30°).

## 2.2. - Le séchage :

Le séchage ou le non séchage des échantillons avant l'action du solvant est un point qui ne fait pas l'unanimité (cf. tableau, colonne 8).

La discussion de ce point me paraît essentielle pour des travaux visant à identifier la chlorophylle a fonctionnelle. L'extraction sur du sédiment frais paraît de loin préférable. En effet, on trouvera chez de nombreux auteurs et notamment dans les traités sur la biochimie des végétaux ou les chlorophylles (LEWIN (1962), GOODWIN (1965), VERNON et SEELY (1966) parmi les plus récents), une revue des dégradations que peuvent subir les pigments chlorophylliens. Le problème est complexe : la température, la lumière, le pH, la tension d'oxygène, la durée d'action de ces différents facteurs et sans doute bien d'autres éléments encore, ont une influence sur les modifications de structure des molécules de chlorophylle, et l'on comprend qu'il soit nécessaire de prendre des précautions pour évaluer des teneurs en chlorophylle a réellement fonctionnelle.

Le séchage, qu'il ait lieu à l'air ou à l'étuve (sous vide ou non), ne manque pas de provoquer des altérations variées, par voie enzymatique (chlorophyllase présente notamment dans certaines diatomées cf. BARRETT et JEFFREY 1964) ou par voie physico-chimique (STERN (1938) cité par ARONOFF (1953), VALLENTYNE (1960), HOLDEN (1965), CHICHESTER et NAKAYAMA (1965)).

Un autre point me paraît aussi très important à souligner : les phéopigments également sont transformés, surtout par oxydation, au cours du séchage, (ARONOFF (1953), CHICHESTER et NAKAYAMA (1965), cf. f2 p. 446 schéma de dégradation). Ayant pour ma part effectué les premiers essais sur des échantillons séchés à l'étuve, j'ai fait ensuite diverses expériences comparatives sur du sédiment frais ou séché.

Les résultats suivants concernent 48 échantillons provenant de 3 stations : St. 1, 5 m, sable grossier ; st. 2, 15 m, sable plus fin ; st. 3, 25 m, sable fin. Chaque partie aliquote a été traitée comme suit :

SHCB = sable humide congelé puis broyé immédiatement

.../...

avant action du solvant.

SSB = sable humide séché (étuve ordinaire 45° 24 h) puis broyé immédiatement avant action du solvant.

Les résultats sont exprimés en pourcentage des pigments extraits sur sable humide congelé broyé, les teneurs en pigments proprement dites ayant été ramenées au poids sec.

St. 1	Chl. <u>a</u>	Phéopigments
SHCB	100	100
SSB	43,8(± 10,9)	20,9(± 16)
St. 2		
SHCB	100	100
SSB	62,8(± 9,9)	40,6(± 14)
St. 3		
SHCB	100	100
SSB	64,2(± 7)	28,9(± 4,7)

Le séchage (chaleur + air) semble avoir une influence plus néfaste dans la première station que dans les autres, du moins sur la chlorophylle a. Une expérience effectuée à une date ultérieure a confirmé cette observation, expérience dans laquelle j'ai fait intervenir de plus un broyage avant le séchage. Les 3 stations sont les mêmes que précédemment. Les résultats sont également exprimés en % des pigments extraits sur sable humide broyé (SHCB). Les deux autres traitements sont les suivants :

SSB = sable séché en vrac pendant 14 h, étuve ordinaire 70°, broyé immédiatement avant action du solvant.

SBS = sable broyé humide puis séché à 70° pendant 9 h, ensuite, action du solvant.

St. 1	Chl. <u>a</u>	Phéopigments
SSB	64,6	62,9
SBS	37,1	32
St. 2		
SSB	75,6	60,2
SBS	35,7	28,5

.../...

St. 3

SSB	95,6	75,4
SBS	39,2	44,1

Si l'on hasarde une comparaison entre les deux expériences, bien que le nombre d'échantillons ne soit pas le même, on peut penser que, plus que la chaleur (45° au lieu de 70°) c'est la durée du séchage (24 h contre 14 h) et l'oxydation qui accentuent la dégradation de la chlorophylle a et des phéopigments. La deuxième expérience prouve bien qu'un broyage avant séchage a un effet désastreux sur les pigments, donc que le séchage de cellules non détruites, s'il ne peut être évité, est un moindre mal.

Par ailleurs on sait, bien que ce sujet demande encore des études plus approfondies, que les microphytes sont de plus grande taille sur les sables fins que sur les sables grossiers. Ceci pourrait expliquer que la dégradation de la chlorophylle a en particulier, soit plus forte dans les hauts niveaux par séchage (cellules plus petites, plus fragiles ?) alors que l'action sur les phéopigments semble plus anarchique, ceux-ci étant en majorité localisés, pense-t-on, dans les cellules ~~mortes~~ ou à l'extérieur des cellules. Là encore, ~~une~~ voie de recherche intéressante est ouverte.

HOLDEN (1965) écrit : "Beaucoup de déterminations de chlorophylle ont été faites sur du matériel séché à l'air à des températures entre 40° et 70°.... Le séchage à l'air comme préliminaire à l'extraction de la chlorophylle n'est pas recommandé car cela donne une perte considérable de chlorophylle grâce à la conversion en phéophytine, phéophorbides et en autres composés bruns de nature inconnue. De plus, les pigments sont plus difficiles à extraire que sur du matériel frais. Si, pour une raison quelconque, le tissu doit être séché, le séchage sous-vide à 70° est plutôt meilleur qu'à l'air et si le prix est raisonnablement bas, la lyophilisation est une alternative possible".... "L'ébullition aussi cause la détérioration des chlorophylles en phéophytines".

GOLTERMAN et CLYMO (1969) conseillent, si le séchage est obligatoire, l'obscurité à 0°C dans un dessiccateur. VALLENTYNE (1955) pour améliorer l'extraction des "chlorophylles sédimentaires" réhumidifie les échantillons séchés quelques heures avant l'acidification. FOGG et

BELCHER (1961) notent la diminution des pigments (produits de dégradation de la chlorophylle et caroténoïdes) dans du matériel humide conservé à l'air à la température de la pièce.

ODUM et ODUM (1955) pensent que la chlorophylle doit être extraite sur sédiment frais et "de préférence pas plus de 12 heures après la collecte. Du matériel séché au four montrait invariablement des valeurs plus faibles que celles du matériel frais". Pourtant les mesures sont faites à 670 nm sans acidification donc il s'agit de chlorophylle a "totale". Des expériences d'extractions sur des morceaux de Codium, séchés ou non, ont montré une "perte de 20 % de chlorophylle après séchage à 100°C pendant 6 h".

EATON et MOSS (1966) ont trouvé, au contraire, que le séchage (obscurité, à l'air, 3 h) des papiers au travers desquels avaient migré les microphytes mobiles pendant une journée n'affectait pas les spectres des extraits acétoniques dans le sens d'une dégradation ("similar to those obtained for extracts of fresh plant material"). Le spectre des extraits de vases séchées à l'air, au contraire, était comparable à celui des produits de dégradation. "Thus, it appears that contamination of the pigment extracted from the cells by degradation products in the mud is negligible". Il est évident cependant que la méthode du captage des cellules au travers d'un papier ou tissu n'est utilisable que dans quelques cas particuliers.

Quant à moi, il me paraît capital de souligner que les formules de LORENZEN utilisant le facteur 1,7, rapport entre les densités optiques à 665 nm lues avant et après acidification, sont valables pour des "extraits frais" comme le précise lui-même l'auteur (LORENZEN 1967). Les coefficients d'absorption spécifiques ayant servi de base à ces formules ont été évalués par VERNON (1960) dans l'acétone à partir des données de SMITH et BENITEZ (1955) dans l'éther, mais sur des extraits frais et nous verrons plus loin (2-4) que ce point a une grande importance.

Pourquoi tous les auteurs n'utilisent-ils pas systématiquement l'extraction des échantillons frais ? J'y vois deux raisons principales :

1°) - pour ramener la quantité de pigments trouvée à un poids sec de sédiment ; le poids sec est considéré, à juste titre, comme une base de référence plus valable que toute autre (poids humide, surface),

surtout pour des comparaisons.

2°) - pour ne pas diluer le solvant utilisé pour l'extraction.

Le premier point est facilement résolu si, lorsqu'on fait agir le solvant sur du sable humide on prend soin de passer à l'étuve une partie aliquote comme le font de nombreux auteurs (cf. tableau). Dans le protocole que je propose, on peut voir dans le point 3-3 que le contenu des tubes séchés est pesé après extraction des pigments ; donc on sait exactement à quel poids de sable sec on doit rapporter la quantité de pigments obtenue ; de plus la teneur en eau de chaque échantillon étant obtenue très précisément, on a exactement le volume de l'extrait acétonique (eau + acétone ajouté).

Le second point nécessite un examen critique. De nombreux auteurs laissent de côté la question de la teneur préalable du sédiment en eau. Cela me semble quelquefois abusif. Si on tente de ne pas la négliger, il faut, comme le recommandent GOLTERMAN et CLYMO (1969) et WESTLAKE (1969) "calculer cette teneur en eau" et "ajuster la dilution de l'acétone en conséquence".

Pour un sédiment qu'on manipule pour la première fois il est bon, en effet, d'évaluer au préalable la teneur en eau du sédiment essoré un temps donné sur papier (cf. I-1-2.1.1. et I-1-2.1.2.). L'expérience montre que pour des sédiments réétudiés périodiquement, les teneurs en eau sont comparables, d'une sortie à l'autre, si les temps d'essorage sont voisins. J'ai trouvé de 15 à 35 % d'eau pour les sables et jusque 56 % d'eau pour les vases. Si l'on veut parvenir à une concentration finale de l'acétone voisine de 90 %, il est facile d'établir des abaques à partir d'acétone 100 %, tenant compte du poids approximatif de l'échantillon frais (2 g, 3 g, 4 g,....) et de la quantité d'acétone à verser. Tout ceci ne doit pas forcément avoir un caractère très rigoureux. Les solvants en effet sont utilisés de manière diluée pour différentes raisons.

ARONOFF (1953) signale que "l'alcool et l'acétone sont généralement dilués avec 15 à 20 % d'eau pour prévenir l'excessive absorption de la chlorophylle sur la matrice. De l'eau supplémentaire provoque la formation de chlorophylle colloïdale ; en fait la teneur en eau du système ne doit pas excéder 22 % du volume".

ODUM et al. (1958) ont expérimenté sur des feuilles fraîches de diverses plantes terrestres en aboutissant à des extraits acétoniques à 80 et 90 %. A 663 nm ils constatent une diminution de 6 % entre l'absorption dans l'acétone à 90 % et l'acétone à 80 %.

TALLING et DRIVER (1963) de leur côté ont fait des comparaisons similaires à 660 et 665 nm d'extraits acétoniques à 80 et 90 % d'acétone d'égales quantités d'une culture de diatomées planctoniques : "We were unable to show an appreciable difference (>5 %) between the corresponding absorbances". La comparaison des coefficients d'absorption spécifiques chez les divers auteurs dans l'acétone 100 %, 90 %, 80 %, conduit TALLING et DRIVER à conclure qu'à 665 nm, les variations sont inférieures à 6 %<sup>‡</sup>.

Pour ma part, quelques extraits effectués sur des parties aliquotes d'un même sédiment avec de l'acétone 100 %, 90 %, 80 %, 70 % m'ont montré un grand écart entre les deux valeurs extrêmes et une différence presque nulle entre les échantillons à 80 ou 90 %. Il ne faudrait donc pas descendre en dessous d'une dilution acétonique de 80 %. Aussi, pour la partie superficielle de certaines carottes de vase, il est nécessaire d'éponger la tranche sur du papier par le dessous (pour ne pas perturber le film superficiel). "Une concentration finale d'au moins 80 % d'acétone (ou 90 % de méthanol) est nécessaire pour assurer l'extraction efficace des pigments et prévenir l'action de la chlorophyllase" (HOLDEN 1965).

Ma conclusion au deuxième point sera qu'il faut faire agir le solvant en concentration convenable, le plus vite possible, sur du sédiment non séché.

### 2-3. Le broyage :

Pour le sable, le broyage est nécessaire. En outre, il peut diminuer le temps d'extraction. J'ai déjà parlé plus haut p. 32 des petites cellules accrochées dans les interstices des grains. Des manipulations

.../...

---

‡ A ce propos, dans la retranscription des valeurs de coefficients d'absorption spécifiques de MAC KINNEY (1941) et VERNON (1960), deux erreurs se sont glissées dans le tableau de YENTSCH et MENZEL (1963), reproduites également dans GOLTERMAN et CLYMO (1969).

MAC KINNEY (1941) à 665 nm K = 80,91 au lieu de 76,0 dans l'acétone à 80 %  
VERNON (1960) à 665 nm K = 90,8 dans l'acétone 80 % et non  
dans l'acétone 100 %.



sur des parties aliquotes ont montré des différences de teneurs en chlorophylle a fonctionnelle de 20 à 30 % suivant que le sédiment est broyé ou non. Pour les phéopigments par contre, le broyage ne semble pas accroître le rendement. Mais, dans tous les cas, les résultats se sont montrés plus reproductibles après broyage. FENCHEL et STRAARUP (1971) soulignent l'efficacité de l'extraction par le broyage, également sur des sables. J'ai remarqué que pour les vases, par contre, les différences sont de quelques % seulement.

YENTSCH et MENZEL (1963) ont souligné aussi l'importance du broyage des filtres pour les pigments phytoplanctoniques étudiés par fluorescence. Ils déconseillent l'utilisation des ultra-sons car elle s'accompagne d'une forte élévation de température.

HOLDEN (1955), pour les tissus végétaux susceptibles de contenir des lipoxydases, conseille le broyage avec le solvant. Mais j'ai trouvé pratique, pour effectuer une pesée avant l'extraction (cf. II-2-1.2.-b) de broyer rapidement à la main (quelques minutes) ce qui est aisé avec du sable calcaire humide, de peser, d'ajouter une quantité connue d'acétone et de bien boucher le tube. Le tout doit être pratiqué "quickly and in dim light" (HOLDEN 1965). Quelques manipulations sur du sable quartzéux ont montré qu'un mortier d'agate était nécessaire. Les auteurs qui pratiquent le broyage le font avec ou sans solvant ; j'ai trouvé peu d'avis sur ce point et n'ai pas expérimenté moi-même.

#### 2-4. Solvant :

Le méthanol est en général reconnu comme étant un meilleur solvant de la chlorophylle que l'acétone (CECCALDI et BERLAND (1964), SCOR-UNESCO (1966), WETZEL et WESTLAKE (1969)). Mais, bien que dans le rapport de 1963, PARSONS (Annexe II p. 2) ait souligné l'urgence du problème de la détermination des coefficients d'absorption spécifiques dans le méthanol, il ne semble pas que cette voie ait été très suivie.

Les coefficients de MACKINNEY (1941) repris par HOLDEN (1965) pour donner les équations de calcul de chlorophylle a et b semblent contestables car ils ont été obtenus à partir de chlorophylle cristallisée redissoute très difficilement, comme le souligne l'auteur lui-même.

Ces coefficients sont donc assez difficilement utilisables pour des extraits frais. Cette question de biochimie a été discutée par SMITH

et BENITEZ (1955) et plus récemment par SEELY et JENSEN (1965). GOLTERMAN et CLYMO (1969) soulignent que les valeurs des absorptions spécifiques dans le méthanol ne sont pas encore bien connues et indiquent que des changements dans la structure de la chlorophylle se produisent très rapidement dans le méthanol.

En 1966, le rapport des experts de l'UNESCO sur l'étude des pigments des eaux marines conclut que l'acétone 90 % est en faveur actuellement car

- a) - la chlorophylle a y est plus stable.
- b) - la bande d'absorption dans le rouge y est plus aigüe.
- c) - le coefficient d'extinction y est plus élevé.

Le méthanol serait recommandé pour les cas de pigments difficiles à extraire. Personnellement, j'ai opté pour l'acétone. Facilement trouvé dans le commerce, il est très utilisé et de ce fait les résultats peuvent mieux se comparer entre eux ; les coefficients d'extinction à différentes concentrations sont connus et surtout en ce qui concerne les produits de dégradation ce qui n'est pas le cas du méthanol, à quelques exceptions près (LIVINGSTON et al. 1953).

Les problèmes annexes de l'addition de  $MgCO_3$ , diméthylaniline ou autres produits tels que  $NaHCO_3$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaOH$ ,  $CaCO_3$ , ajoutés au moment de l'extraction pour prévenir une éventuelle acidification, ne seront pas discutés ici (cf. VALLENTYNE (1955), PATTERSON et PARSONS (1963), HOLDEN (1965), UNESCO (1966)). Notons que OLAH (1972) juge inutile l'addition d'une base dans l'extrait car le sédiment en question est très riche en carbonate. VALLENTYNE (1955) évaluant que l'addition de  $CO_3Mg$  diminue de 20 % les teneurs en "Chlorophylles sédimentaires" alors que la diméthylaniline les augmente de 10 % par brunissement de l'extrait, le problème mériterait certainement un supplément d'expérimentation.

### 3 - Extraction, lectures, expression des résultats :

#### 3.1. - Extraction :

Obscurité et basse température ne sont pas contestées. Par contre, la durée d'action du solvant est assez variable selon les auteurs. Bien que WETZEL et WESTLAKE estiment qu'une durée de 30 à 60 minutes puisse être suffisante, j'ai pu constater que, pour mes propres échantillons, il n'en était rien. Cela dépend évidemment du poids de sédi-

.../...

ment traité, mais un système assez pratique consiste à agiter vigoureusement les tubes bouchés dès qu'on vient d'ajouter l'acétone, puis à les maintenir au froid et à l'obscurité, à les agiter de temps à autre durant la journée où a lieu une série d'extractions sans ouvrir les boîtes qui contiennent les tubes (cf. II 2-3), et à faire les mesures au spectrophotomètre le lendemain matin. La centrifugation horizontale des tubes bouchés est, à mon avis, un très bon moyen pour obtenir des extraits limpides à partir de sédiments broyés. On peut reprendre le culot de centrifugation par l'acétone : j'ai pour ma part, très rarement trouvé des teneurs significatives dans les résidus.

### 3.2. - Lectures :

La cuve témoin contient de l'acétone 90 % mais devrait, en toute logique, contenir de l'acétone dilué, partiellement au moins, avec de l'eau de mer et non avec de l'eau douce.

Les corrections de turbidité sont faites à 750 nm comme le pratiquent la plupart des auteurs. Cependant, VERNON (1960), TIETJEN (1968) comme VALLENTYNE et CRASTON (1957) préfèrent la densité optique de 700 nm. Le pic de bactériochlorophylles situé in-vivo à 740-750 nm se déplace dans l'acétone ou l'éther de 80 nm vers les plus faibles longueurs d'ondes (FENCHEL et STRAARUP 1971). La densité optique à 750 nm comme indice de turbidité de l'extrait, même dans le cas d'un sédiment riche en bactéries photosynthétiques, ne semble donc pas un mauvais choix.

J'ai déjà justifié dans la première partie la seule lecture à 665 nm avant et après acidification (I - 2). Je n'insisterai pas non plus ici sur le choix de l'acide, oxalique ou chlorhydrique (YENTSCH (1965a), HOLM-HANSEN (1965)). L'acide chlorhydrique est le plus souvent utilisé ; pour une cuvette spectrophotométrique de 2,5 ml, l'expérience m'a prouvé que 1 à 2 gouttes de HCL 1N suffisaient à la réaction. Il faut bien agiter les cuvettes bouchées et surtout rincer plusieurs fois après acidification avec des restes d'extraits non acidifiés ou de l'acétone. Un excès de concentration de l'acide augmente les densités optiques lues. Un temps d'attente trop long pour la lecture (au-delà de 10 mn) après l'addition de l'acide, fait varier les densités optiques de façon anarchique avec une tendance générale à la diminution. D'après PAMATMAT (1968) qui utilise les mesures en fluorescence, le temps d'attente est de 1 mn pour HCL 0,5 N contre 3 mn pour l'acide oxalique.

.../...

Après acidification, il m'est arrivé de trouver assez souvent à 750 nm un certain trouble,  $DO = 0,06$  par exemple, et toujours sur des extraits provenant de substrats vaseux. J'ai toujours déduit ces "tubidités" de la lecture à 665 nm mais il n'est pas certain que ce soit à bon escient. Je n'ai pas de réponse à fournir actuellement à ce problème, l'analyse de divers résultats devant encore me permettre d'approfondir la question. Il se peut aussi que des réactions chimiques aient lieu dans le cas des vases, provoquant la formation de colloïdes.

La lecture d'une densité optique à 430 nm ne m'a pas paru superflue puisqu'elle correspond au pic le plus important de la chlorophylle a (absorption maximale dans le bleu = "Soret band", cf. Ière partie I - 2 et figures 1 et 2). HOLT (1965) indique qu'une "mesure de la pureté de la chlorophylle est le rapport entre les absorptions des maxima dans le bleu et dans le rouge qui, dans le cas de la chlorophylle a est de 1,31 à 1,32" le solvant étant ici l'éther. PERKINS et ROBERTS (1964) trouvent 1,11 à 1,20 dans l'éther contenant un peu d'eau douce ou de méthanol et 1,31 dans l'éthyl éther. Si l'on calcule chez SMITH et BENITEZ (1955) le rapport  $DO\ 430/DO\ 662$  dans l'éther, toujours pour la chlorophylle a, on trouve 1,303. D'un tableau publié par SEELY et JENSEN (1965) pour 40 solvants différents, on peut déduire, pour l'acétone qui nous intéresse plus particulièrement  $DO\ 430/DO\ 662 = 1,227$ . Cette donnée est importante.

Il est bien évident que dans des extraits acétoniques de pigments issus des sédiments, la lecture à 430 nm interfère avec beaucoup d'autres pigments, caroténoïdes surtout. Je pense donc que l'idée de faire du rapport  $DO\ 430/DO\ 665$  "une expression approximative de la diversité des pigments" (MARGALEF 1963) qu'on relie éventuellement à la diversité spécifique, à la biomasse, à la production primaire, peut être heureusement exploitée.

Elle l'a été dans les recherches phytoplanctoniques (à titre d'exemple citons MARGALEF (1960 b, 1961 et travaux suivants), SOURNIA (1968), WAUTHY et LE BOURHIS (1966), TRAVERS (1971) qui signalent que IIZUKA et al., dès 1960 également, "envisageaient l'intérêt du rapport des valeurs des densités optiques à 435 et 670 nm") Dans le domaine benthique, MARGALEF (1960a) en fait également état et j'ai, pour ma part, effleuré le sujet (PLANTE-CUNY (1973), valeurs voisines de 3, corrélations négatives très hautement significatives avec la production primaire). Dans l'avenir,

.../...

la signification possible de ce rapport ainsi que des rapports chlorophylle a/phéopigments seront approfondis.

Note 1. : Le travail de KROUT, J.E. (1971) (Thèse : Graduate School of Oceanography. University of Rhode Island, Kingston) "Pigment and pigment ratio 430 nm/665 nm. Distributions in several marine environments" ne m'est actuellement pas parvenu.

Note 2. : Le rapport DO 665 o/DO 665 a est utilis~~é~~ et peut être très rapidement évalué au cours même des lectures spectrophotométriques. Il donne une très bonne idée préliminaire du rapport Chl. a/Phéo et présente pratiquement les mêmes corrélations que ce dernier avec la production primaire (PLANTE-CUNY 1973).

### 3-3. - Expression des résultats :

Le tableau chronologique montre à l'évidence qu'il n'y a guère de standardisation dans l'expression des résultats.

Compte-tenu des moyens de calcul actuels, il me semble intéressant de ramener les teneurs pigmentaires à un poids sec de sédiment, qui est la manière la plus rigoureuse de faire, mais aussi à une surface de sédiment en place, donc humide, ce qui est une manière plus expressive. En II1-2.1.2. de la Ière partie, j'ai exposé comment j'évaluais assez sommairement le poids spécifique d'un ~~sable essaré~~ collecté par "écoupage" sur 0,5 à 1 cm d'épaisseur pour pouvoir rapporter les teneurs à une surface. Pour des carottages évidemment, la surface de sédiment humide étant connue, le problème est facilement résolu. L'expression en µg par g de sédiment sec reste la meilleure pour faire des comparaisons entre des sédiments de granulométrie différente et des travaux différents.

### CONCLUSION.

L'analyse pigmentaire par spectrophotométrie, envisagée d'une manière intensive, constitue une méthode intéressante d'appréciation de la biomasse végétale dans les sédiments marins.

On n'obtiendra cependant des résultats dignes de confiance que si l'on se soumet à certains impératifs :

- tenir compte des caractères du milieu étudié dans l'application des techniques : distribution verticale et horizontale des

.../...

microphytes, non perturbation de l'interface eau-sédiment.

- éviter, autant que possible, l'altération des pigments après prélèvement par l'exposition des sédiments à la lumière, à la dessiccation, à la chaleur, etc...

- tenir toujours compte des produits de dégradation dans l'expression des résultats.

#### REMERCIEMENTS.

Je suis très reconnaissante à M. TRAVERS qui a bien voulu corriger le manuscrit de ce document, ainsi qu'à M. STEQUERT de la mission ORSTOM de Nosy-Bé qui a assuré la mise en page et la correction des stencils. R. PLANTE et moi-même remercions sincèrement G. JAYME d'avoir revu le programme de calcul.

TABLEAU CHRONOLOGIQUE :

Evolution des méthodes d'extraction et de mesures par spectrophotométrie,  
des pigments végétaux photosynthétiques et de leurs produits de  
dégradation sur des substrats meubles marins ou lacustres.

---

1	2	3
AUTEURS Date de publication des travaux	BUT DE L'ETUDE DES PIGMENTS -pigments chlorophylliens totaux -chlorophylle fonctionnelle -indice de biomasse végétale -indice de production primaire	LOCALISATION Etude des pigments limitée ou non à des sédiments
VALLENTYNE J.R. 1954 VALLENTYNE et CRASTON 1957 VALLENTYNE J.R. 1960	Chlorophylle comme fossile biochimique seulement : méthodologie de référence pour de nombreux auteurs. "sedimentary chlorophyll degradation products" (SCDP) - pigments chlorophylliens totaux.	vases lacustres (Connecticut)
ODUM, H.T. et ODUM, E.P. 1955	Indice de production primaire	tous les éléments du complexe biocœnotique d'un récif corail- lien, les passées sableuses en particulier. (atoll Eniwetok)
FIGUERAS, A. 1955 1956 1960	"pigments des plages comme indice de pro- duction" dans des études préalables ("standing crop")	partie superficielle des sables marins (ria de Vigo) Espagne
MOUL, E.T. et MASON, D. 1957	dans le cadre de l'étude des populations de diatomées	sables et vaseuses marins (Barnstable harbor) (Woods Hole)
ORR, W.L. et J.R. GRADY 1957 ORR, W.L., EMERY, K.O. et GRADY 1958	"chlorophyll derivatives" comme indice de préservation de la matière organique dans les sédiments.	sédiments marins de 0 à + de 3500 m (côte Californie S.)
ODUM, H.T., W. Mc CONNELL et W. ABBOTT 1958	"chlorophylle a" de diverses communautés rôle dans la production primaire	phytoplancton + phanérogames marines vase molle de la Laguna Madre (TEXAS) vase de surface, Aransas Bay (TEXAS)
LAEVASTU, T. 1958	"pigments in sediments" - produits de dé- gradation des chlorophylles comme indices écologiques.	sédiments marins divers + cu - grossiers archipel San Juan état de Washington (USA)
POMEROY, L.R. 1959	productivité des algues microscopiques ("standing crop")	sédiments intertidaux côte de Georgie (S-E, USA)
GORHAM, E. 1959 1960 1961	"chlorophyll derivatives" des sédiments en rapport avec fertilité actuelle de l'eau	surface de la vase lacs (G.B.)



1- COLLECTE DES ECHANTILLONS			2- EXTRACTION DES PIGMENTS		
Type de collecte	Dimensions	Séchage	sur échantillon	broyage ou	solvants %
-carottage -raclage de surface -autres types -stockage	-épaisseur -surface -volume -poids	pour évaluation de teneur en eau en vue de résultats/pds sec partie aliquote, temp.	humide ou sec	non obscurité climatisation	addition d'un élément basique
drague d'Eckman ou "Livingstone piston sampler" modifié éch. mélangé, partie aliquote conservée à l'obscurité à 4°C	2g environ de vase humide homogénéisation à la spatule	une moitié pesée au mg près 100°C 20 heures	autre moitié pesée au mg près (humide) placée dans tubes 25mm Ø 150 mm hauteur	non (recommandé si sable grossier)	+ 30 ml acétone 90% contenant 0,5% de diméthylaniline (0,2% si extrait trop clair)
"sable d'une surface mesurée"	1 à 4 cm <sup>2</sup>	-	sur éch. humide de préférence pas plus de 12 h après collecte	broyage mortier	lavages successifs 20 ml acétone
carottage, tubes verre sur 1 cm épaisseur Ø 3,5 cm ou 1,8 cm	S = 9,6 cm <sup>2</sup> V = 9,6 cm <sup>3</sup> ou 2,54 cm <sup>3</sup>	-	sable humide	-	acétone, volume égal au volume de sable
carottage congélation	Ø 2,5 cm épaisseur 6 cm	-	sur tranches découpées	-	acétone
sable humide stocké à 5°C	10 à 200 g de sédiment humide	oui	sable humide	extraction complexe agitation + solvant	acétone + chloroforme sans exposition à lumière à la fin 100 ml chloroforme
non détaillé carottage + congélation	épaisseur 1 cm (mesure de l'épaisseur de la zone eutrophotique)	-	vase humide	broyage recommandé	acétone 90 % acétone 80 % + CO <sub>3</sub> Mg
carottes (carottier par gravité) conservées bien fermées	"carottes courtes"	séchage sous vide sur SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> dilué	séchage à l'air	-	0,5 à 1 g de sédiment séché à l'air + 5 à 10 ml acétone 90 %
référence quasi totale à la méthode de Vallentyne 1955					
"Jenkin surface sampler" - raclage sur 5 cm d'épaisseur	1 à 2 g de vase fraîche	100 à 110°C	vase humide	agitation mécanique 3 l de 5 à 10 mn	20 à 30 ml acétone 90 % jusque 100 ml subst. basique jugée inutile

10	11	12	13	14	15
3- SPECTROPHOTOMETRIE					
!durée !température !obscurité	!filtration ou !centrifugation! !de la solution! !(vitesse)	!données sur l'ap- !pareillage	!cuves !trajet optique !témoins	!lecture des densités optiques! !longueurs d'ondes !corrections de turbidité	!détermination des pig- !ments détritiques (mo- !dalités, acidifica- !tion, HCl ?, non a- !cid.)
d'un jour à l'autre avec a- gitations occa- sionnelles ré- sidu repris	filtration papier Whatman n° 50	(1955) Beckman D.U. (1957) Beckman DK2 (spectre visible)	cuves quartz TO 1 cm verre témoin avec solvant	667 nm (DO entre 0,030 et 0,6) 1957 700 nm comme background! maxi absorption 663 quelque- fois	pas acidification
-	filtration	Coleman 6 portatif puis Beckman DU	-	670 nm	pas acidification
12 h	-	colorimétrie	-	-	pas acidification
-	-	colorimétrie	-	-	-
!4 extractions !semi-obscurité	!filtration	!Beckman DU	!TO 1 cm	!spectre de 600 à 700 !maxi à 668 nm !DO de 0,2 à 0,8	!comparaison des ex- !traits avec phéophy- !tine <u>a</u> fabriquée à !partir de chl <sub>a</sub> + HCl
!24 h à 5°C !obscurité	!filtration é- !ventuelle	!Beckman DU !Bausch et Lomb !"Spectronic 20" !(bandes larges)	TO 1 cm	665 nm (D.O. 0,08 à 0,95) quelquefois 665, 645, 630 nm ("but time consuming")	non
!18 h !secoué plu- !sieurs fois	!centrifugation!	!Beckman DU !+ chromatographie !sur colonne	-	!665, 645, 630 nm	non
-	-				non
-	!filtration !réextraction !sur résidu	!Unicam SP 500	!cuves verre !1 cm !témoin solvant !pur	!spectre (mesures tous les 10 !nm) !pic vers 667 nm !correction "back ground"	non

16	17	18	19	20
4- RESULTATS				
<p>formules de calcul des teneurs pigmentaires</p>	<p>chlorophylles seules ou avec produits de dégradation</p>	<p>expression des teneurs pig. unités, poids sec, hum., S</p>	<p>rappports</p>	<p>quelques résultats rapportés au m<sup>2</sup></p>
<p>une DO de 0,100 à la longueur d'onde du maxi. d'absorption (dans le rouge), dans une cuve de TO 1 cm, pour 10 ml de sol- vant - 1 SCDP. 1 SCDP = env. 27 µg phéophytine a</p>	<p>pigments chlorophyl- liens totaux chlorophylles + pro- duits de dégradation</p>	<p>unités arbi- traires SCDP par g de poids sec ou par g de matière com- bust.</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>courbe calibrée. DO 670 nm re- liée directement à biomasse végétale (poids sec de <u>Codium</u>) standards chimiques de référé- nce de Harvey</p>	<p>pigments chlorophylli- ens totaux</p>	<p>"biomass" g de matière vi- vante sèche par m<sup>2</sup></p>	<p>•</p>	<p>-</p>
<p>référence aux standards de Harvey 1934 (HPPU)</p>	<p>pigments totaux</p>	<p>Unités Patron Harvey U.P.H. . cm<sup>-2</sup></p>	<p>-</p>	<p>si 1HPPU = 0,13 µgChl on a 13 à 91 mg.m<sup>-2</sup> si 1HPPU = 0,88 µgChl on a 88 à 616 mg.m<sup>-2</sup></p>
<p>-</p>	<p>pigments totaux</p>	<p>chlorophylle g.m<sup>-2</sup></p>	<p>-</p>	<p>948 mg.m<sup>-2</sup></p>
<p>coefficient d'extinction phéophytine a dans le chloro- forme = 501.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup></p>	<p>"green porphyrin pig" groupe de la chloro- phylle et des dérivés qui ont une forte ab- sorption dans le rouge</p>	<p>parts de phéophy- tine par millions de parts de séd. sec (p.p.m.)</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>Richards et Thompson 1952 modifiée ou dans acétone 90 % Chla mg.l<sup>-1</sup> = 13,4d665</p>	<p>Chl a y compris la non- fonctionnelle ("all chlorophyll A and re- lated substances that affect the 665 nm spectrum" if they occur within the euphotic zone")</p>	<p>g.m<sup>-2</sup></p>	<p>-</p>	<p>vases de la lagune 10 à 120 mg.m<sup>-2</sup> jusque 500 mg</p>
<p>Richards et Thompson 1952 seulement Chl a</p>	<p>chlorophylle a y compris produits d'oxydation et d'hy- dratation de Chl a</p>	<p>"pigments units" (PU/g séd. sec 1PU = 1 µg pig.</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>cf. Vallentyne 1955</p>	<p>-</p>	<p>Sedimentary chlo- rophyll Units/g pds sec</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>référence à Vallentyne 1955 (erreur dans publication 1960 à rectifier : 10 ml de solvant au lieu de 100 ml)</p>	<p>-</p>	<p>Chlorophyll deri- vatives Units/g de poids sec</p>	<p>DO 410/DO 350 Indice de ferti- lité</p>	<p>-</p>

1	2	3
! FOGG, G.E. et BELCHER, J.H. 1961	! "acétone-soluble pigments" ("chlorophyll degradation products + carotenoids") ! histoire écologique du lac	! vase, lacs (G.B.)
! SANDERS, H.L., GOUDSMIT, E.M., ! MILLS, E.L. et HAMPSON, G.E. 1962	! évaluation de la biomasse végétale	! étude globale du benthos ! flaques intertidales ! (Barnstable Harbor, Mass. USA)
! WETZEL, R.G. 1962 ! 1963 ! 1964	! "Functional chlorophyll" dans des mesures ! de production primaire du "periphyton" ! (standing crop)	! sédiment + macrophytes + phyto- ! plancton ! Grand Lac BORAX (Californie)
! GOLDMAN, C.R., MASON, D., ! WOOD, B.J.B. 1963	! complément d'une étude sur le phytoplancton ! (production primaire) ! "chlorophylle" et caroténoïdes	! vases de deux petits lacs ! (Antarctique)
! PATTERSON, J. et PARSON, J.R. 1963	! distributions comparées de chlorophylle <u>a</u> ! et produits de dégradation	! vase littorale (Canada) ! + eau de mer ! + cultures dinoflagellés ! diatomées ! + plancton total
! YABLONSKAIA, E.A. 1964	! importance du phytoplancton et du phyto- ! benthos dans la chaîne alimentaire	! microphytobenthos de la mer ! d'Aral
! TAYLOR, W.R. et GEBELEIN, C.D. 1964 ! 1966	! indice du matériel végétal présent dans un ! écosystème	! sables et vases ! sédiments intertidaux ! (Barnstable Harbor, Mass.)
! BURKHOLDER, R., REPAK, A. ! et SIBERT, J. 1965	! dans le cadre de l'étude totale d'une com- ! munauté de microorganismes ! (production primaire)	! sables et vases, zone interti- ! dale ! Long Island Sound (N-Y, USA)
! SAWADA, Y. et UYENO, F. 1966 ! UYENO, F. et al. 1970 ! UYENO, F., FUNAHASHI, S. ! et TSUDA, A. 1970	! étude des relations entre fèces d'huîtres ! perlées et conditions du fond	! vases d'estuaires ! Ago Bay (Japon) ! + phytoplancton
! EATON, J.W. et MOSS, B. 1966 ! MOSS, B. 1967 ! MOSS, B. et ROUND, F.E. 1967 ! MOSS, B. 1968 ! MOSS, B. 1969	! étude des populations d'algues "épépé- ! liques et épipsammiques" ! ("standing crop")	! sédiments submergés divers ! surtout vases, marais ! près de Bristol (G.B.)
! PAMATMAT, M. 1968	! "standing stock" dans une communauté ben- ! thique de sable	! sable intertidal ! False Bay (Washington, USA)

4	5	6	7	8	9
!carottages + "Jenkin !surface sampler" !stockage à -20°C	!environ 1 g de vase !fraîche	-	!vase humide	-	!9 à 10 ml acétone
"!écrémage" surface !sédiment	!épaisseur 1 cm !V : 1 cm <sup>3</sup>	-	!sable humide	-	!acétone
!carottages par paires !au hasard	!1er cm de surface !1/25 m <sup>2</sup> !(400 cm <sup>2</sup> )	!80°C !jusqu'à poids !constant	!sédiment humide	-	!1er éch. acétone !aqueux à 90 % alcalin !pH 9,5 !2ème éch. acétone !aqueux à 90 % acide !pH 6
!carottages	!2,4 cm <sup>2</sup>	-	!sédiment !essoré !humide	-	!8 ml acétone 90 %
			!humide		!acétone 90 % !+ diméthylaniline
!la publication n'a pu être consultée mais seulement une analyse succincte dans "Referativnyi Zhurnal"					
!carottages !(+ mesures de pénétra- !tion lumineuse)	!Ø 3,5 cm !1er mm de surface !puis 5 tranches de !1 cm		!humide		!20 ml méthanol 3 fois !+ éther et propanol
!carottage !(ou raclage à marée !basse)	!épaisseur 3 à 4 mm !transport en boîte !à glace	!non	!humide	!100 à 300 !mg mis en !suspension !dans	!10 ml acétone 90 % !+ CO <sub>3</sub> Mg dans tubes !à centrifuger !bouchés
!carottage type K.K. !(?)	!Ø 4 cm (12 cm <sup>2</sup> ) !tranches 0 à 0,5 cm! !0,5 à 2,5 cm !2,5 à 4,5 cm !4,5 à 6,5 cm	!60°C	!humide		!10 ml acétone !90 %
!carottage + succion !+ "F.B.A. automatic !mud sampler"	!S = 61 cm <sup>2</sup> ou !45 cm <sup>2</sup> !2 cm épaisseur ou !5 mm	!"tissue trapping me- !thod"; capte les !algues vivantes mo- !biles	!séchage à l'air !(3 h) des morceaux !de tissu !ou !sable ou vase !séchés à l'air	!broyage !obscurité !"sonica- !tion"	!environ 25 ml acé- !tone 90 % !+ CO <sub>3</sub> Mg
!carottage	!Ø 1,6 cm (2 cm <sup>2</sup> ) !tranches de 1 mm !puis de 1 cm d'é- !paisseur jusque !10 cm	!non	!sédiment frais !conservé 36 h !maxi !température de la !pièce dans le noir	!broyage !5 mm !mortier !porcelaine	!100 mg CO <sub>3</sub> Mg !+ 10 ml acétone !90 %

10	11	12	13	14	15
température de la pièce	extraction sur résidu non nécessaire	Unicam SP 500 chromatographie sur papier	cuve 1 cm témoin, solvant pur	spectre de 380 à 700 nm pic à 667	non
-	-	-	-	lecture des DO à 660 nm	non
obscurité totale 4°C	centrifugation 2500 r.p.m. 10 à 15 mn	Beckman DU	cuves 10 cm	DO 750 (turbidité) 665 645 630 510 480	acidification pour transformer chlorophylle <u>a</u> en phéophytine <u>a</u>
obscurité 24 h 4°C	-	-	-	665 630	non
référence à méthode spectro. de Creitz et Richards 1955		chromatographie Smith et Benitez 1955 Strain 1958			non
		Beckman DU après extraction chromatographie sur papier (Jeffrey), (1961)		657, 472, 470, 440 nm	non
24 h 10°C	centrifugation	spectro. méthode Creitz et Richards 1955	-	665 645 630 nm	non
-	-	spectrophotomètre	10 1 cm	spectre de 350 à 700 nm lecture à 665	0,1 ml HCl 8N
20 h 3-4°C obscurité	centrifugation 10 mn 3000 g	spectrophotomètre	10 1 cm	665 430 410 nm	HCl 5 %
répétition des broyages	décantation ajustement volume 50 ml obscurité	spectrophotomètre fluorimètre	10 1 cm	750 pour correction 665, 645, 630	acide oxalique puis 0,5N HCl

16

17

18

19

20

Vallentyne 1955	chlorophylle et dérivés + caroténoïdes	ICOP units/ !g poids sec ou !par g de matière !combustible	-	-
?	Chl <u>a</u> + dérivés !(chl. fonctionnelle !car 1er cm seulement !et potentiel redox po- !sitif)	mg.m <sup>-2</sup>	-	chl <u>a</u> "totale" de 147 à 770 mg.m <sup>-2</sup>
Richards et Thompson 1952 + estimation du coefficient d'extinction de phéophytine <u>a</u> dans acétone 90 %	"Chlorophylle <u>a</u> fon- tionnelle" - total dont est dé- duite la chl <u>a</u> non fonctionnelle	mg.m <sup>-2</sup>	-	Chl <u>a</u> fonctionnelle !100 à 580 mg.m <sup>-2</sup> !(épaisseur 1 cm)
	à 630 interférence avec phycobillines de cyanophycées très a- bondantes	"Résultats semi- quantitatifs"		
référence à méthode de Creitz et Richards 1955	chlorophylle <u>a</u> et chlorophyllide <u>a</u> phéophytine <u>a</u> phéophorbide <u>a</u>	chl <u>a</u> en % du to- tal Chl <u>a</u> + pro- duits de dégra- dation		
nombreuses formules pour les différents pigments	Chl <u>a</u> , phéophytine <u>a</u> Chl <u>c</u> diatoxanthine fucoxanthine carotènes	mg.m <sup>-2</sup>	-	Chl <u>a</u> fonctionnelle !227 à 530 mg.m <sup>-2</sup> !(dans 1,1 cm d'épaisseur)
formules PARSONS et Strickland 1963	Chl <u>a</u> (y compris pro- duits de dégradation)	!mg.kg <sup>-1</sup> de sédi- !ment humide	-	-
comparaison avec spectre de la phéophytine seule	-chlorophylle (y com- pris dérivés) -phéopigments seuls	!µg.g <sup>-1</sup> de vase humide et de vase sèche	-	!1 à 300 µg.g <sup>-1</sup> vase sèche (phéophytine)
Moss 1967	!% entre chlorophylles !et phéopigments	!1967 unités arbi- !trales	-	Chl <u>a</u> fonctionnelle !2 à 229 mg.m <sup>-2</sup>
Vernon 1960	-Chl <u>a</u> seule -phéophytine seule	!1968 !1969 mg.m <sup>-2</sup>	-	épaisseur 2 cm
Strickland et Parsons 1960	Chl <u>a</u> y compris les produits de dégrada- tion	!µg. 2 ml <sup>-1</sup> de sé- !diment frais	Fo/Fa	Chl <u>a</u> "totale" !100 mg.m <sup>-2</sup> !(épaisseur 2 mm)
Yentsch et Menzel 1963 puis en 1965 rapport Fo/Fa				

1	2	3
STEELE, J.H. et BAIRD, I.E. 1968	étude de production primaire d'une plage de sable	sables 0 à 13 m Loch Ewe (Ecosse)
TIETJEN, J.H.	1968 chlorophylle et phéopigments comme indice 1970 de source de nourriture	sédiments d'estuaire (Connecticut et Rhode Island) Est USA
HARGRAVE, B.T.	1969 production algale d'une communauté ("standing crop")	Vase du Lac Marion (Colombie britannique)
méthodologie seule WETZEL, R.G. et WESTLAKE, D.F. in VOLLENWEIDER, R.A.	1969 IBP Handbook n° 12, ch. 2.32 c), chloro- phylle <u>a</u> - mesure indirecte de la biomasse	"periphyton" - tous organismes végétaux, sauf macrophytes, vivant dans l'eau sur des subs- trats immergés
LEACH, J.H.	1970 dans une étude de la production algale d'une vase intertidale ("standing crop")	vase d'estuaire N-E Ecosse
HICKMAN, M. et ROUND, F.E. ROUND, F.E. et HICKMAN, M.	1970 dans une étude de la production primaire 1971 d'algues épipsammiques et épipéliques ("standing crop")	vases et sables, lac près de Bristol (G.B.)
ODUM, W.E.	1970 étude de la sélection des particules de nourriture chez <u>Mugil cephalus</u>	sable ou vase en place, et sé- diment dans l'estomac du pois- son
FENCHEL, T. et STRAARUP, B.J.	1971 distribution verticale des pigments photo- synthétiques ; relation avec la pénétration lumineuse	sables et vases peu profonds (Danemark)
COLOCOLOFF, M.	1972 dans une étude de production primaire (bio- masse végétale)	sables (2,5 à 12 m) région de Marseille (France)
BUNT, J.S., LEE, C.C. et LEE, E.	1972 productivité primaire des sédiments (pig- ments photosynthétiques)	sédiments tropicaux divers (3-60 m) Mer des Caraïbes
BOUCHER, D.	1972 dans une étude de production primaire (biomasse)	sables fins envasés (5-18 m) Concarneau (France)
OLAH, J.	1972 pigments photosynthétiques et pigments dé- gradés	sédiments du Lac Balaton (Hongrie)



4	5	6	7	8	9
carottage ou raclage sur la plage ou dans une petite benne	∅ 2,2 cm (S = 3,8 cm <sup>2</sup> ) épaisseur 2 cm	séchage sous-vide	sédiment séché sous-vide	1 à 7 g broyés au mortier d'agate	+ acétone 90 %
carottage + congélation	épaisseur 5 cm tranches de 1 cm	séchage de 0,5 cm <sup>3</sup> jusqu'à poids constant	sédiment frais	0,5 cm <sup>3</sup> prélevé dans tranche de 1 cm mortier 10 mn	10 ml acétone 90 % 0,1 mg CO <sub>2</sub> Mg dans mortier
carottage dans le sédiment récolté par un collecteur sp	∅ 5 cm 20 cm <sup>2</sup> hauteur 12,5 cm tranches 1 cm	50°C 24 h	sédiment frais	12 g environ dans tube	+ 15 ml acétone 90 % + 0,5 % diméthylamine + acide
			échantillon frais	broyage ou "sonication"	acétone 90 % CO <sub>2</sub> Mg ou 1 goutte NaOH
carottage	∅ 2,2 cm S = 3,8 cm <sup>2</sup> 20 cm de long	au four à 50°C 16 h	sédiment séché	1er cm broyé dans mortier 10,5 g pesé	+ 20 ml acétone 90 % + 0,1 g de poudre de CO <sub>2</sub> Mg
carottage et raclage de la surface de la carotte	60,7 cm <sup>2</sup> cf. Moss 15 mm épaisseur		séchage air, obscurité 12-3 h des morceaux de tissu ou des filtres		15 ml acétone 90 % + 0,3 g CO <sub>2</sub> Mg
raclage	1/2 cm épaisseur	séchage	sédiment frais	broyage mortier	+ acétone 90 %
carottage + raclage	∅ 2,6 cm (S = 5,3 cm <sup>2</sup> ) tranches 1 à 12 cm épaisseur 25 cm <sup>2</sup> , 1-3 mm épaisseur	séchage semi-obscurité, sous vide en dessiccateur	sédiment séché	sous-éch. broyés mortier porcelaine	15 ml acétone 90 % ou éther pour bactériochlorophylle
2 carottes conservées à l'obscurité au froid	∅ 2,6 cm (5,3 cm <sup>2</sup> ) 1er cm	séchage obscurité 40°C 36 h	sédiment sec	12 g + CO <sub>2</sub> Mg broyage 12 mn	+ 12 ml acétone 90 %
carottage 12 carottes à 1 m d'intervalle	∅ 3,5 cm 2,5 ou 1 cm superficielle	-	sédiment frais essoré sur papier	-	acétone 90 % 6 extractions
carottage	∅ 2,1 cm 20 cm de long	dans 1er cm 1 à 2 g séchage rapide 40°C	sédiment séché		15 ml acétone 90 %
carottage et benne Eckman	tranches de 2 cm	-	vase humide	5 g	+ 30 ml acétone 90 % CO <sub>2</sub> Mg jugé non nécessaire

10	11	12	13	14	15
-	-	spectrophotomètre pale fluorimètre Turner après 1965	-	<del>750 et 663</del> 750 et 663	non HCl
10 mn puis 12 h	centrifugation	spectro. Bausch et Lomb 505 ou Beckman DB-G fluori. Turner 110!	-	340 à 700 665 après acidification	3 g 1N HCl acide oxalique
12 h 5°C obscurité	centrifugation réextraction éventuelle	spectrophotomètre "Perkin-Elmer"	cuve quartz TO 1 cm témoin acétone! diméthylanil.	667 après acidification	1 goutte de 1N HCl
30 à 60 mn l'ombre ou obscurité basse temp.	centrifugation	spectrophotométrie	TO 1 cm	750 et 665 nm en principe avoir des DO entre 0,2 et 0,6	lire avant et après acidification 1 à 2 gouttes 1N HCl
16 h obscurité	centrifugation	spectrophotomètre	-	750, 663 avant et après acidification	2 gouttes HCl 10 %
24 h 3-4°C obscurité	centrifugation 10 mn 3000 g	spectrophotomètre	-	430, 410, 665 nm	HCl 5 %
-	filtration	Beckman DU	-	665, 645, 630 nm	non
5°C obscurité	centrifugation 2 mn 4000 t/mn	Bausch et Lomb Spectronic 20	TO 1 cm	spectres complets + 740-750 nm 665 nm	pas acidification
5°C obscurité 6 h	6000 t/mn 15 mn (réajustement volume acé- tone)	spectrophotomètre enregistreur	TO 4 cm (8 ml)	spectres 750, 665 avant et après acidification	HCl 1N 10 gouttes
quelques heures obscurité réfrigér.	-	spectrophotomètre	-	665 nm	oui
basse tempér. obscurité 12 h	centrifugation	spectrophotomètre	-	750, 665 avant et après acidification	oui
4°C obscurité 14 à 16 h plusieurs fois secoués	filtration ou centrifugation	spectrophotomètre "Spectromom 360"	-	spectres 750 et 665 avant et après acidification	HCl N 3 gouttes

16	17	18	19	20
!coefficient d'extinction à !663 nm Chl <u>a</u> (SCOR-UNESCO) !(89,31 l.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) !Yentsch et Menzel 1963	!Chl <u>a</u> + produits de !dégradation	!µg.g <sup>-1</sup> de sédiment !sec	!Chl <u>a</u> + phéo/phéo !Fo/Fa	!Chl <u>a</u> "totale" 0 à 20 µg.g <sup>-1</sup> !sédiment sec
!Yentsch et Menzel 1963	!Chl <u>a</u> + produits de !dégradation	!µg.g <sup>-1</sup> de sédi- !ment sec	!Fo/Fa	!Chl <u>a</u> "totale" 7 à 21 µg.g <sup>-1</sup> !sédiment sec
!réf. à Vallentyne 1955	!Chl <u>a</u> + produits de !dégradation	!"Sedimentary !Chlorophyll !Units"/g poids !sec sédiment	-	-
!µg Chl <u>a</u> par échantillon = 11,9 x 2,43 (D0o-D0a) x $\frac{V}{l}$ (coef. absorp. Chl <u>a</u> à 665 nm = 84 l.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) !µg phéopigments par éch. = 11,9(v/l).(1,7D0a)-Chl <u>a</u> cf. Talling et Driver 1963				
!Lorenzen 1967	!Chl <u>a</u> + phéo. !Chl <u>a</u> fonctionnelle	!µg.g <sup>-1</sup> sédiment !sec		!Chl <u>a</u> fonctionnelle !25 à 34 µg.g <sup>-1</sup> de sédiment !sec
!Moss 1967 a et b	!% entre Chl <u>a</u> et !phéopigments !Chl <u>a</u> !phéophytine <u>a</u>	!unités arbi- !trales	!!phéo/phéo + !Chl <u>a</u>	-
!Richards et Thompson 1952	!Chl <u>a</u> y compris !produits de dégrada- !tion	!µg.g <sup>-1</sup> sédiment !sec	-	!sédiment : Chl <u>a</u> totale !2-4 µg.g <sup>-1</sup> séd. sec !contenu stomacal : !350 µg.g <sup>-1</sup> séd. sec
!coefficient absorption spécif. !Chl <u>a</u> != 91 l.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	!Chl <u>a</u> y compris !produits de dégrada- !tion	!E 665.cm <sup>-3</sup> de sé- !ment ou !mg.m <sup>-2</sup>	-	!Chl <u>a</u> "totale" !1,5 à 93,2 mg.m <sup>-2</sup>
!Lorenzen 1967	!Chl <u>a</u> + chlorophyl- !lide <u>a</u> !phéopigments !(phéophytine <u>a</u> + !phéophorbide <u>a</u> )	!µg.g <sup>-1</sup> sable sec !mg.m <sup>-2</sup>	!Chl <u>a</u> /phéo.	!Chl <u>a</u> fonctionnelle !24 à 64 mg.m <sup>-2</sup> (moyennes) !1 cm épaisseur
!Strickland et Parsons 1968 !et Lorenzen 1967	!Chl <u>a</u> et phéophytine	!mg.m <sup>-2</sup>	!Chl <u>a</u> /Chl <u>a</u> + !phéo.	!Chl <u>a</u> fonctionnelle !3,2 à 22,4 mg.m <sup>-2</sup> !Chl <u>a</u> totale !20 à 200 mg.m <sup>-2</sup>
!Lorenzen 1967	!Chl <u>a</u> "active" !phéopigments	!mg.m <sup>-2</sup>		!Chl <u>a</u> fonctionnelle !27 à 900 mg.m <sup>-2</sup> !épaisseur 1 cm
!Strickland et Parsons 1968 !Moss 1967 !Lorenzen 1967	!Chl <u>a</u> !caroténoïdes !phéopigments	!µg.g <sup>-1</sup> !vase humide !1 gv.h. = 0,34 g !vase sèche	-	!Chl <u>a</u> fonctionnelle !29 à 71 mg.m <sup>-2</sup> (moyennes) !(couche superficielle)

1	2	3
! RIZNYK, R.Z. et PHINNEY, ! H.K. 1972 !	! étude de la communauté des microalgues ! (biomasse végétale) !	! sables intertidaux estuaire ! Oregon (USA) !
! PLANTE-CUNY, M.R. 1973 !	! dans une étude de production primaire !	! sables et vases, milieu tropical ! (5 à 83 m) ! Nosy-Bé (Madagascar) !
! DALEY, R.J., GRAY, C.B.J. ! et BROWN, S.R. 1973 !	! chlorophylle algale et dérivés sédimen- ! taires de la chlorophylle ! méthode quantitative de semi-routine !	! phytoplancton et sédiments !

4	5	6	7	8	9
carottage tous les 130 m	tranches de 1,3 cm	-	-	-	acétone
carottage	Ø 2,7 cm S 5,7 cm <sup>2</sup> tranches de 1 cm	80 à 100 °C	sable humide es- soré sur papier	broyage mortier obscurité	tube + pincée CO <sub>3</sub> Mg + 3 g sédiment + 9 ml acétone 90 % + bouchon
raclage ou "écrémage" congélation	sur ½ à 1 cm d'é- paisseur	lyophilisation		sonication	mélange acétone méthanol eau

10	11	12	13	14	15
-	-	Beckman DB-G	-	665, 645, 630 nm 430, 410 nm	oui
14°C				750	
!obscurité !24 h !plusieurs fois !secoués	!centrifugation! !4 à 5000 t/mn !10 à 15 mn	!Beckman DU	!cuve quartz !10 1 cm !témoin acétone!	!665 avant et après acidifi- !cation !430	!HCl 1N 2 gouttes
! -10°C	!filtration	!chromatographie !couches minces !puis !fluorimétrie			

16

17

18

19

20

!Parsons et Strickland 1963 !Moss 1967	!Chl <u>a</u> totale	! $\mu\text{g. cm}^3$ de ! sédiment ?	!Chl <u>a</u> /phéo.	
!Lorenzen 1967 !cf. dans ce document !A-2 adaptation au sédiment	!Chl <u>a</u> + chlorophyl- !lide <u>a</u> !phéopigments !(phéophytine <u>a</u> + !phéophorbide <u>a</u> )	! $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sédi- !ment sec ! $\text{mg.m}^{-2}$	!DO 665o/DO 665a !DO 430/DO 665 !Chl <u>a</u> /phéo. !Chl <u>a</u> /Chl <u>a</u> + !phéo.	!Chl <u>a</u> fonctionnelle ! 2 à 280 $\text{mg.m}^{-2}$ !épaisseur 1 à 1,5 cm
	!Chl <u>a</u> , <u>b</u> , <u>c</u> !et 18 dérivés	! $\mu\text{moles}$ de !pigments		!Chl <u>a</u> fonctionnelle

BIBLIOGRAPHIE.

=====

- ALDERSHOFF (W.G.), 1951. - Determination of chlorophyll content of a sample of Walvis Bay sediment. Third World Petroleum Congress, Hague, Section 1 : 412.
- ARONOFF (S.), 1950. - The absorption spectra of chlorophyll and related compounds. Chem. Rev., 47 (2) : 175-195.
- ARONOFF (S.), 1953. - The chemistry of chlorophyll (with special reference to foods). Adv. Food Res., 4 : 133-184.
- BARRETT (J.) & JEFFREY (S.W.), 1964. - Chlorophyllase and formation of an atypical chlorophyllide in marine algae. Plant Physiol., 39 (1) : 44-47.
- BELCHER (J.H.) & FOGG (G.E.), 1964. - Chlorophyll derivatives and carotenoids in the sediments of two English lakes. In Miyake, Y. & Koyama, T. eds. Recent researches in the fields of hydrosphere, atmosphere, and nuclear geochemistry. Maruzen. 39-48.
- BOGORAD (L.), 1962. - Chlorophylls. In Lewin, R.A. ed. Physiology and Biochemistry of Algae. Academic Press. 385-408.
- BOUCHER (D.), 1972. - Evaluation de la production primaire benthique en Baie de Concarneau. C.R. Acad. Sc. Paris, 275 (D) : 1911-1914.
- BROWN (S.R.), 1969. - Paleolimnological evidence from fossil pigments. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol., 17 : 95-103.
- BROWN (S.R.) & COLMAN (B.), 1963. - Oscillaxanthin in lake sediments. Limnol. Oceanogr., 8 (3) : 352-353.
- BUNT (J.S.), LEE (C.C.) & LEE (E.), 1972. - Primary productivity and related data from tropical and subtropical marine sediments. Mar. Biol., 16 (1) : 28-36.



- BURKHOLDER (P.R.), BURKHOLDER (L.M.) & RIVERO (J.A.), 1959. - Chlorophyll a in some corals and marine plants. Nature, 183 (4671) : 1338-1339.
- BURKHOLDER (P.R.), REPAK (A.) & SIBERT (J.), 1965. - Studies on some Long Island Sound littoral communities of microorganisms and their primary productivity. Bull. Torrey bot. Club, 92 (5) : 378-402.
- CALLAME (B.), 1960. - Etude sur la diffusion des sels entre les eaux sur-  
nageantes et les eaux d'imbibition dans les sédiments marins littoraux. Bull. Inst. océanogr. Monaco, 1181 : 1-19.
- CALLAME (B.), 1961. - Note sur les échanges de phosphates entre l'eau intersticielle des sédiments marins et l'eau qui les recouvre. Bull. Inst. océanogr. Monaco, 1201 : 1-8.
- CECCALDI (H.J.) & BERLAND (B.), 1964. - Contribution à l'étude des dosages quantitatifs du plancton. 2.- Lyophilisation ou filtration sur filtres "Millipore". Comparaison de la solubilité des pigments photosynthétiques de la diatomée Phaeodactylum tricornutum (Bohlin) par quelques solvants organiques à diverses concentrations. Rec. Trav. Sta. mar. Endoume, 35 (51) : 17-42.
- CHICHESTER (C.O.) & NAKAYAMA (T.O.M.), 1965. - Pigment changes in senescent and stored tissue. In Goodwin, T.W. ed. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press. ch. 16 : 439-457.
- COLOCOLOFF (M.), 1972. - Recherches sur la production primaire d'un fond sableux. 2.- Biomasse et production. Thèse de spécialité. Université d'Aix-Marseille : 1-98.
- CORCORAN (E.F.), 1957. - Ph D. Thesis, University of California, Los Angeles. (Chromatographic, spectral and chemical evidence for the presence of pheophytine a et b and pheophorbide a et b in marine sediments). In VALLENTYNE (J.R.) 1960.

- DALBY (R.J.), GRAY (C.B.J.) & BROWN (S.R.), 1973. - A quantitative semi-routine method for determining algal and sedimentary chlorophyll derivatives. J. Fish. Res. Board Can., 30 (3) : 345-356.
- EATON (J.W.) & MOSS (B.), 1966. - The estimation of numbers and pigment content in epipelagic algal populations. Limnol. Oceanogr., 11 (4) : 584-595.
- FENCHEL (T.) & STRAARUP (B.J.), 1971. - Vertical distribution of photosynthetic pigments and the penetration of light in marine sediments. Oikos, 22 (2) : 172-182.
- FIGUERAS (A.), 1955. - Les pigments des plages comme indice de leur production. Comunicacionnum 55. Shell fish Committee 43. International Council for the Exploration of the Sea : 1-3.
- FIGUERAS (A.), 1956. - Moluscos de las playas de la Ria de Vigo. I.- Ecologia y distribucion. Inv. Pesq., 5 : 51-87.
- FIGUERAS (A.), 1960. - Ecologia de moluscos y produccion de la playa de Areino. Bol. Real Soc. Espanola Hist. Nat., 58 (2) : 259-274.
- FOGG (G.E.) & BELCHER (J.H.), 1961. - Pigments from the bottom deposits of an english lake. New Phytologist, 60 (2) : 129-142.
- FOX (D.L.), 1944. - Biochemical fossils. Science, 100 (2589) : 111-113.
- FOX (D.L.) & ANDERSON (L.J.), 1941. - Pigments from marine muds. Proc. Nat. Acad. Sci., 27 : 333-336.
- FOX (D.L.), UPDEGRAFF (D.M.) & NOVELLI (D.G.), 1944. - Carotenoid pigments in the ocean floor. Arch. Biochem., 5 : 1-23.
- GOEDHEER (J.C.), 1966. - Visible Absorption and Fluorescence of Chlorophyll and its aggregates in Solution. In Vernon, L.P. & Seely, G.R. eds. The Chlorophylls. Academic Press. Sec. 2 (6) : 147-184.

- GOLDMAN (C.R.), MASON (D.T.) & WOOD (B.J.B.), 1963. - Light injury and inhibition in Antarctic freshwater phytoplankton. Limnol. Oceanogr., 8 (3) : 313-322.
- GOLTERMAN (H.L.) & CLYMO (R.S.), 1969. - Methods for chemical analysis of freshwaters. I.B.P. Handbook n° 8. Blackwell, Oxford & Edinburgh. 166 p.
- GOODEWIN (T.W.), 1965. - Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press. 573 p.
- GORHAM (E.), 1959. - Chlorophyll derivatives in woodland soils. Soil Sci., 87 : 258-261.
- GORHAM (E.), 1960. - Chlorophyll derivatives in surface muds from the english lakes. Limnol. Oceanogr., 5 (1) : 29-33.
- GORHAM (E.), 1961. - Chlorophyll derivatives, sulphur and carbon in sediment cores from two English Lakes. Can. J. Bot., 39 : 333-338.
- GORSCHKOVA (T.I.), 1938. - Organischer Stoff in den Sedimenten des Motovskij Busens. Trans. Inst. mar. Fish. Oceanogr. USSR, 5 : 71-84.
- HARGRAVE (B.T.), 1969. - Epibenthic algal production and community respiration in the sediments of Marion Lake. J. Fish. Res. Bd. Canada, 26 (8) : 2003-2026.
- HICKMAN (M.) & ROUND (F.E.), 1970. - Primary production and standing crops of epipsammic and epipelagic algae. Br. phycol. J., 5 (2) : 247-255.
- HOGETSU (K.) & ICHIMURA (S.), 1954. - Studies on the biological production of Lake Suwa. VI. The ecological studies on the production of phytoplankton. Jap. J. Bot., 14 (2) : 280-303.

- HOLDEN (M.), 1965. - Chlorophylle. In Goodwin, T.W. ed. Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Academic Press. 461-488.
- HOLM-HANSEN (O.), LORENZEN (C.J.), HOLMES (R.W.) & STRICKLAND (J.D.H.), 1965. - Fluoremetric determination of chlorophyll. J. Cons. perm. int. Explor. Mer., 30 (1) : 3-15.
- HOLT (A.S.), 1965. - Nature, properties and distribution of chlorophylls. In : Goodwin, T.W. ed. Chemistry and Biochemistry of plant pigments Academic Press. 3-28.
- IIZUKA (S.), SIMIZU (T.), KAZIHARA (T.) & IRIE (H.), 1960. - Spectrophotometric investigation of the plankton pigments. I. - Spectral absorption curves of absolute acetone extracts of natural plankton collections. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ., 9 : 52-55.
- JASTREBOVA (L.A.), 1938. - Chlorophyll in Meeressedimenten. Zusammenfassung. Trans. Inst. Mar. Fish. USSR, 5 : 189-224.
- JEFFREY (S.W.), 1968. - Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. Biochim. Biophys. Acta, 162 : 271-285.
- JEFFREY (S.W.), 1969. - Properties of two spectrally different components in chlorophyll c preparations. Biochim. Biophys. Acta, 177 (3) : 456-467.
- KLENOVA (M.V.) & JASTREBOVA (L.A.), 1938. - Chlorophyll in den sedimenten als Kennzeichen des Gasregimes des Wasserbeckens. Zusammenfassung. Trans. Inst. Mar. Fish. USSR, 5 : 65-70.
- KROUT (J.E.), 1971. - Pigment and pigment ratio (430 nm/665 nm) distributions in several marine environments. M. Sc. Th. Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island.

- LAEVASTU (T.), 1958. - The occurrence of pigments in marine sediments. J. Mar. Res., 17 : 325-334.
- LEACH (J.H.), 1970. - Epibenthic algal production in an intertidal mudflat. Limnol. Oceanogr., 15 (4) : 514-521.
- LEWIN (R.A.), 1962. - Physiology and Biochemistry of algae. Lewin. R.A. ed. Academic Press. 929 p.
- LIVINGSTON (R.), PARISER (R.), THOMPSON (L.) & WELLER (A.), 1953. - Absorption spectra of solutions of pheophytin a in methanol containing acid and base. J. Amer. Chem. Soc., 75 : 3025.
- LORENZEN (C.J.), 1967. - Determination of chlorophyll and phaeo-pigments : spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr., 12 (2) : 343-346.
- LUBIMENKO (V.N.) & RAUSER-CERNOUSSOVA (Mme), 1930. - Sur les restes fossiles de la chlorophylle dans les sédiments limoneux marins. C.R. Acad. Sci. Paris, 190 : 813-815.
- MACKINNEY (G.), 1941. - Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem., 140 (2) : 315-322.
- MARGALEF (R.), 1959. - Pigmentos asimiladores extraídos de las colonias de celentereos de los arrecifes de coral y su significado ecológico. Inv. Pesq., 15 : 81-101.
- MARGALEF (R.), 1960a. - Méthode d'extraction des pigments dans l'étude de la végétation benthique. Annales Sta. Centr. Hydrobiol. Appl., 8 : 99-104.
- MARGALEF (R.), 1960b. - Valeur indicatrice de la composition des pigments du phytoplancton sur la productivité, composition taxonomique et propriétés dynamiques des populations. Rapp. Proc. Verb. C.I.E.S.M.M., 15 (1) : 277-281.

- MARGALEF (R.), 1961. - Corrélations entre certains caractères synthétiques des populations de phytoplancton. Hydrobiologia, 18 (1-2) : 155-164.
- MARGALEF (R.), 1963. - Ecologie marine ; nouvelles vues sur de vieux problèmes. Année biol., 2 : 3-16.
- MARSH (J.A., Jr.), 1970. - Primary productivity of reef-building calcareous red algae. Ecology, 51 (2) : 255-263.
- MOSS (B.), 1967a. - A spectrophotometric method for the estimation of percentage degradation of chlorophylls to pheo-pigments in extracts of algae. Limnol. Oceanogr., 12 (2) : 335-340.
- MOSS (B.), 1967b. - A note on the estimation of chlorophyll a in freshwater algal communities. Limnol. Oceanogr., 12 (2) : 340-342.
- MOSS (B.), 1968. - The chlorophyll a content of some benthic algal communities. Arch. Hydrobiol., 65 : 51-62.
- MOSS (B.), 1969. - Algae of two Somersetshire pools : standing crops of phytoplankton and epipelagic algae as measured by cell numbers and chlorophyll a. J. Phycol., 5 (2) : 158-168.
- MOSS (B.) & ROUND (F.E.), 1967. - Observations on standing crops of epipelagic and epipsammic algal communities in Shear Water, Wilts. Brit. Phycol. Bull., 3 : 241-248.
- MOUL (E.T.) & MASON (D.), 1957. - Study of diatom populations on sand and mud flats in the Woods Hole area. Biol. Bull., Woods Hole, 113 : 351.
- ODUM (H.T.W.), McCONNELL (W.) & ABBOTT (W.), 1958. - The Chlorophyll "A" of Communities. Publ. Inst. mar. Sci. Univ. Texas, 5 : 65-96.

- ODUM (H.T.) & ODUM (E.P.), 1955. - Trophic structure and productivity at a windward coral reef community on Eniwetok Atoll. Ecol. Monog., 25 (3) : 291-320.
- ODUM (W.E.), 1970. - Utilisation of the direct grazing and plant detritus food chains by the striped mullet Mugil cephalus. In Steele, J.H. ed. Marine food chains, University of California Press. 222-240.
- OLAH (J.), 1972. - Studies on the photosynthetic pigments and their decomposition in the sediment of Lake Balaton and Lake Belsö. Annal. Biol. Tihany, 39 : 115-121.
- ORR (W.L.) & GRADY (J.R.), 1957. - Determination of chlorophyll derivatives in marine sediments. Deep-Sea Res., 4 (4) : 263-271.
- ORR (W.L.), EMERY (K.O.) & GRADY (J.R.), 1958. - Preservations of chlorophyll derivatives in sediments off Southern California. Bull. Amer. Ass. Petrol. Geol., 42 (5) : 925-962.
- PAMATMAT (M.M.), 1968. - Ecology and metabolism of a benthic community on an intertidal sand flat. Int. Rev. ges. Hydrobiol., 53 (2) : 211-298.
- PARSONS (T.R.), 1963. - The determination of photosynthetic pigments in sea water. A survey of methods. UNESCO report. NS 89 J, 12 p., Annex I : 4 p., Annex II : 4 p.
- PATTERSON (J.) & PARSONS (T.R.), 1963. - Distribution of chlorophyll a and degradation products in various marine materials. Limnol. Oceanogr., 8 (3) : 355-356.
- PERKINS (H.J.) & ROBERTS (D.W.A.), 1964. - On the relative intensities of the "blue" and "red" absorption bands of chlorophyll a. Biochim. Biophys. Acta, 79 : 20-29.

- PLANTE-CUNY (M.-R.), 1971. - Utilisation du  $^{14}\text{C}$  pour l'évaluation de la production primaire dans les sédiments marins. In "L'énergie nucléaire et ses applications biologiques à Madagascar". Colloque Tananarive mai 1971. Terre malg. N. spéc. 12 : 269-283.
- PLANTE-CUNY (M.-R.), 1973. - Recherches sur la production primaire benthique en milieu marin tropical. I - Variations de la production primaire et des teneurs en pigments photosynthétiques sur quelques fonds sableux. Valeur des résultats obtenus par la méthode du  $^{14}\text{C}$ . Cah. ORSTOM, sér. Océanogr., 11 (3) : 317-348.
- PLANTE-CUNY (M.-R.), sous-presse. - The size of diatoms living in submerged **tropical marine sands**. Beih. Nova Hedwigia, Second Symposium on recent and fossil marine diatoms, 4-9 sept. 1972, Simonsen, R. ed.
- POMEROY (L.R.), 1959. - Algal productivity in Salt Marshes of Georgia. Limnol. Oceanogr., 4 (4) : 386-397.
- QASIM (S.Z.), BHATTATHIRI (P.M.A.) & REDDY (C.V.G.), 1972. - Primary production of an Atoll in the Laccadives. Int. Rev. ges. Hydrobiol., 57 (2) : 207-225.
- RICHARDS (F.A.) & 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 (2) : 156-172.
- RIZNYK (R.Z.) & PHINNEY (H.K.), 1972. - The distribution of intertidal phytosammon in an Oregon estuary. Mar. Biol., 13 (4) : 318-324.
- ROUND (F.E.), 1965. - The epipsammon : a relatively unknown freshwater algal association. Brit. Phycol. Bull., 2 : 456-462.



- ROUND (F.E.) & HICKMAN (M.), 1971. - Phytobenthos sampling and estimation of primary production. In Holme, N.A. & McIntyre A.D. eds. Methods for the study of Marine Benthos. I.B.P. Handbook n° 16. Blackwell, Oxford & Edinburgh : 169-196.
- SANDERS (H.L.), GOUDSMIT (E.M.), MILLS (E.L.) & HAMPSON (G.E.), 1962. - A study of the intertidal fauna of Barnstable Harbor, Massachusetts. Limnol. Oceanogr., 7 (1) : 63-79.
- SANGER (J.E.) & GORHAM (E.), 1972. - Stratigraphy of fossil pigments as a guide to the postglacial history of Kirchner Marsh, Minnesota. Limnol. Oceanogr., 17 (6) : 840-854.
- SAWADA (Y.) & UYENO (F.), 1966. - Studies on the acetone extracts from marine mud and faeces of pearl oyster (Pinctada martensi). I- On the absorption spectra of acetone extracts. Bull. Natl. Pearl Res. Lab., 11 : 1298-1307;
- SEELY (G.R.), 1966. - The structure and chemistry of functional groups. In Vernon L.P. & Seely, G.R. eds. The Chlorophylls. Academic Press.: 67-109.
- SEELY (G.R.) & JENSEN (R.G.), 1965. - Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll. Spectrochim. Acta, 21 (10) : 1835-1845.
- SMITH (J.H.C.) & BENITEZ (A.), 1954. - Absorption spectra of chlorophylls. Carnegie Inst. Wash. Yearbook., 53 : 168-172.
- SMITH (J.H.C.) & BENITEZ (A.), 1955. - Chlorophylls : Analysis in Plant Materials. In Paech, K. & Tracey, M.V. eds. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Springer Verlag, vol. 4 : 142-196.
- SOURNIA (A.), 1968. - Variations saisonnières et nyctémérales du phyto-plancton marin et de la production primaire dans une baie tropicale, à Nosy-Bé (Madagascar). Int. Rev. ges. Hydrobiol., 53 (1) : 1-76.

- STEELE (J.H.) & BAIRD (I.E.), 1968. - Production ecology of a sandy beach. Limnol. Oceanogr., 13 (1) : 14-25.
- STERN (M.), 1938. - Pheophytin formation in leaf organs from the action of temperature. Kleine Mitt. Mitglied. Ver. Wasser., Boden u. Luft. hyg. 14, 39-53. C.A. 34 : 66-74.
- STERN (A.) & WENDELEIN (H.), 1936. - Uber die Lichtabsorption der Porphyrine : IV. Z. Phys. Chem., 175 : 405-437.
- STRICKLAND (J.D.H.) & PARSONS (T.R.), 1968. - A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Bd. Canada, Bull., 167 : 311 p.
- "- -"- , 1972 : 2ème édition.
- TALLING (J.F.) & DRIVER (D.), 1963. - Some problems in the estimation of chlorophyll a in phytoplankton. In Doty, M.S. ed. Proc. Conf. Primary Productivity Measurement. Marine and Freshwater, Hawaii 1961. U.S. Atomic Energy Comm. T.I.D. 7633 : 142-146.
- TAYLOR (W.R.) & GEBELEIN (C.D.), 1964. - Chromatographic analyses of plant pigments in intertidal sediments. Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole, 127 : 393.
- TAYLOR (W.R.) & GEBELEIN (C.D.), 1966. - Plant pigments and light penetration in intertidal sediments. Helgol. Wiss. Meeresunters., 13 (3) : 229-237.
- TIETJEN (J.H.), 1968. - Chlorophyll and Pheo-pigments in estuarine sediments. Limnol. Oceanogr., 13 (1) : 189-192.
- TIETJEN (J.H.), 1970. - Studies on the absorption spectra of plant pigments in estuaries. Hydrobiologia, 35 (3-4) : 420-430.
- TRASK (P.D.) & WU (C.C.), 1930. - Bull. Am. Assoc. Petrol. Geologists, 14 : 1451-1463.

- TRIVERS (M.), 1971. - Diversité du microplancton du Golfe de Marseille en 1964. Mar. Biol., 8 (4) : 308-343.
- UNESCO, 1966. - Determination of photosynthetic pigment in seawater. Report of SCOR/UNESCO Working Group 17, which met from 4 to 6 June 1964, UNESCO Paris : Monographs on Oceanographic Methodology, 1 : 69 p.
- UYENO (F.), FUNAHASHI (S.) & TSUDA (A.), 1970. - Preliminary studies on the relation between faeces of pearl oyster (Pinctada martensi (Dunker)) and bottom condition in an estuarine pearl oyster area. J. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie, 8 (2) : 113-137.
- UYENO (F.), KAWAGUCHI (K.), TERADAN (N.) & OKADA (T.), 1970. - Decomposition, effluent and dieposition of phytoplankton in an estuarine pearl oyster area. Rep. Fish. Mie Univ., 7 (1) : 7-41.
- VALLENTYNE (J.R.), 1954. - Biochemical limnology. Science, 119 : 605-606.
- VALLENTYNE (J.R.), 1955. - Sedimentary chlorophyll determinations as a paleobotanical method. Can. J. Botany, 33 : 304-313.
- VALLENTYNE (J.R.), 1960. - Fossil pigments. In Allen, M.B. ed. Comparative biochemistry of photoreactive systems. Academic Press.: 83-105.
- VALLENTYNE (J.R.) & CRASTON (D.F.), 1957. - Sedimentary chlorophyll degradation products in surface muds from Connecticut Lakes. Can. J. Botany, 35 : 35-42.
- VERNON (L.P.), 1960. - Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. Anal. Chem., 32 : 1144-1150.
- VERNON (L.P.) & SEELY (G.R.), 1966. - The Chlorophylls. Academic Press, 679 p.

- VOLLENWEIDER (R.A.), 1969. - A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments, including a chapter on bacteria. I.B.P. Handbook n° 12, Blackwell, Oxford & Edinburgh, 213 p.
- WAUTHY (B.) & LE BOURHIS (J.), 1966. - Considérations sur l'étude des pigments du phytoplancton marin en zone tropicale oligotrophe. Cah. ORSTOM, sér. Océanogr., 4 (4) : 3-19.
- WAUTHY (B.) & LE BOURHIS (J.), 1967. - Sur l'importance relative des chlorophylles a et c dans la composition pigmentaire du phytoplancton en zone tropicale oligotrophe. Cah. ORSTOM, sér. Océanogr., 5 (1) : 59-64.
- WESTLAKE (D.F.), 1969. - Macrophytes. In Vollenweider, R.A. ed. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. I.B.P. Handbook n° 12, Blackwell, Oxford & Edinburgh : 25-32.
- WETZEL (R.G.), 1962. - A comparative study of the primary productivity of higher aquatic plants, periphyton, and phytoplankton in a saline lake. Ph. D. Dissertation. University of California, Davis.
- WETZEL (R.G.), 1963. - Primary productivity of periphyton. Nature, 197 : 1026-1027.
- WETZEL (R.G.), 1964. - A comparative study of the primary productivity of higher aquatic plants, periphyton, and phytoplankton in a large, shallow lake. Int. Rev. ges. Hydrobiol., 49 (1) : 1-61.
- WETZEL (R.G.) & WESTLAKE (D.F.), 1969. - Periphyton. In Vollenweider, R.A. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. I.B.P. Handbook n° 12, Blackwell, Oxford & Edinburgh : 33-40.

- YABLONSKAYA (E.A.), 1964. - (The problem of the importance of the phytoplankton and phytobenthos in the food chain of organisms of the Aral Sea) in Russian. In The stocks of Marine Plants and their Use. Moscow : 71-91.
- YENTSCH (C.S.), 1965a. - Distribution of chlorophyll and phaeophytin in the open ocean. Deep-Sea Res., 12 (5) : 653-666.
- YENTSCH (C.S.), 1965b. - The relationship between chlorophyll and photosynthetic carbon production with reference to the measurement of decomposition products of chloroplastic pigments. In Goldman C.R. ed. Primary productivity in aquatic environments. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 18 Suppl. University of California Press, Berkeley : 325-346.
- YENTSCH (C.S.), 1966. - The measurement of chloroplastic pigments. Thirty years of progress ? In Golterman, H.L. & Clymo, R.S. eds. Chemical environment in the aquatic habitat. N.V. Noord-Hollandsche Uitgevers. Maatscappij. Amsterdam. 255-270.
- YENTSCH (C.S.) & MENZEL (D.W.), 1963. - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep-Sea Res., 10 (3) : 221-231.

D O C U M E N T S    D E J A    P A R U S

---

- N° 1 - PITON (B.), PRIVE (M.), TERAY (A.) - Août 1968.  
Résultats des observations physico-chimiques des croisières 6814 et 6823 du "VAUBAN". 4 p., 2 fig. ht., 19 p. ht.
- N° 2 - CHABANNE (J.), PLANTE (R.), LABOUTE (P.) - Octobre 1968.  
Résultats des chalutages (crevettes et poissons) en Baie d'Ambaro (côte N.W.). Mars 1965 - Février 1967. 57 p., 2 fig. ht.
- N° 3 - FRONTIER-ABOU (D.) - Octobre 1968.  
Etude du muscle de trois espèces de Carangidés : composition globale et résultats statistiques. 10 p.
- N° 4 - CHABANNE (J.), LABOUTE (P.) - Novembre 1968.  
Résultats de la pêche à la traîne sur le plateau continental de la côte nord-ouest (Avril 1965 à Octobre 1968). 17 p., 2 fig. ht.
- N° 5 - PITON (B.), PRIVE (M.), TERAY (A.) - Juin 1969.  
Résultats des observations physico-chimiques en Baie d'Ambaro de Janvier 1968 à Juin 1969. 6 p., 71 p. ht.
- N° 6 - PITON (B.), PRIVE (M.), TERAY (A.) - Août 1969.  
Résultats des observations physico-chimiques en Baie d'Ampasindava, sur le plateau continental et au large de la côte nord-ouest de Madagascar, de Décembre 1967 à Janvier 1969. 6 p., 50 p. ht.
- N° 7 - FRONTIER (S.) - Septembre 1969.  
Méthodes d'analyse statistique applicables à l'écologie du plancton. 33 p., 7 fig. ht.
- N° 8 - FRONTIER-ABOU (D.), VOLAMORA (M.A.) - Octobre 1969.  
Données numériques sur 31 espèces de poissons comestibles de la région de Nosy-Bé : mensurations, composition globale du muscle blanc, valeurs caloriques, corrélations. 74 p.
- N° 9 - PETIT (D.), BHAUD (M.), BINET (D.), BOUR (W.), DESSIER (A.), FRONTIER (S.), LABOUTE (P.) - Novembre 1969.  
Le filet "Lucifer". Description - Manoeuvre - Performances. 10 p., 7 fig. ht.
- N°10 - PLANTE-CUNY (M.R.) - Janvier 1970.  
Données méthodologiques pour aborder la production primaire dans les sédiments marins. 36 p.
- N°11 - FRONTIER-ABOU (D.), VOLAMORA (M.A.) - Février 1970.  
Données numériques sur 110 individus de l'espèce Caranx ignobilis : mensurations, composition globale des muscles blanc et rouge, du foie et des gonades. 25 p.
- N°12 - CHABANNE (J.) - Février 1970.  
La pêche à la traîne sur la partie nord-ouest du plateau continental de Madagascar. 19 p., 3 fig. ht.

- N°13 - FRONTIER-ABOU (D.) - Décembre 1972.  
Techniques d'étude d'organismes marins et de farines de poissons : composition globale et lipides. 82 p., 9 fig.
- N°14 - CHABANNE (J.), PLANTE (R.) - Juin 1970.  
La pêche au chalut des crevettes Penaeides sur la côte ouest de Madagascar - Méthodes utilisées dans l'étude de la pêcherie. 15 p., annexes 10 p.
- N°15 - FRONTIER-ABOU (D.) - Juin 1970.  
Dosage de l'azote sur 60 échantillons de sédiments superficiels de la Baie d'Ambaro. 16 p.
- N°16 - DANIEL (J.), DUPONT (J.), JOUANNIC (C.) - Juin 1970.  
Etude de la relation entre le carbone organique et l'azote dans les sédiments de la baie d'Ambaro. 11 p., 9 fig. ht.
- N°17 - MAGNIER (Y.), PITON (B.), TERAY (A.), AH-KAM (D.) - Juillet 1970.  
Résultats des observations physico-chimiques en baies d'Ambaro et d'Ampasindava de Juin 1969 à Février 1970. 66 p., 3 fig. ht.
- N°18 - ANONYME - Août 1970.  
Organisation de la Bibliothèque de Nosy-Bé. 15 p., 2 p. ht.
- N°19 - PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Octobre 1970.  
Distributions horizontales et verticales de quelques propriétés physiques et chimiques en baie d'Ambaro. 3 p., 26 p. ht.
- N°20 - PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Février 1971.  
Sur la détermination de la chlorophylle "a" dans l'eau de mer côtière tropicale. 14 p., 9 fig. ht.
- N°21 - MAGNIER (Y.), PITON (B.) - Avril 1971.  
Observations physico-chimiques faites par le "VAUBAN" le long de la côte nord-ouest de Madagascar de janvier à septembre 1970. 8 p., 118 p. ht.
- N°22 - CHABANNE (J.), PRADO (J.) - Juillet 1971.  
Etude des concentrations de poissons obtenues par la lumière dans la région de Nosy-Bé - Madagascar. 19 p.
- N°23 - CHABANNE (J.), PLANTE (R.) - Octobre 1971.  
Etude des rendements de la pêche au chalut des crevettes Penaeides sur la côte N.W. de Madagascar de 1966 à 1970. 19 p., 10 fig. ht., 4 annexes ht., 6 tabl. ht.
- N°24 - BOUR (W.), FRONTIER (S.), PETIT (D.) - Novembre 1971.  
Zooplankton d'une baie eutrophique tropicale.  
- 1. Indications préliminaires par FRONTIER (S.).  
- 2. Méthodologie des prélèvements par PETIT (D.) et BOUR (W.).  
- 3. Situation écologique de la baie d'Ambaro : Etude d'une radiale côte-océan par FRONTIER (S.), BOUR (W.), PETIT (D.).  
- 4. Cycle annuel des poids secs par PETIT (D.) et FRONTIER (S.).  
- 5. Etude statistique de la dispersion du plancton par FRONTIER (S.).  
95 p., 67 p. ht.

- N°25 - MARCILLE (J.) - Février 1972.  
Les stocks de crevettes Pénéides côtières malgaches. 14 p., 10 fig.
- N°26 - MAGNIER (Y.), PITON (B.), CITEAU (J.) - Avril 1972.  
Observations physico-chimiques faites par le "VAUBAN" dans l'Océan Indien de novembre 1970 à mars 1971. 1 fig. ht., 127 p. ht.
- N°27 - CHABANNE (J.) - Mai 1972.  
Etude sur la biologie des Caranx ignobilis, Caranx sexfasciatus et Caranx melampygus de la région de Nosy-Bé. 42 p., 8 fig., 2 p. ht.
- N°28 - FRONTIER (S.) - Juin 1972 (Suite du Doc. n° 24).  
Zooplancton d'une baie eutrophique tropicale.  
- 6. Répartition spatiale et annuelle de quelques taxons.  
Première partie :  
Cladocères, Euphausiacés, Mollusques.  
14 p., 50 fig.
- N°29 - CITEAU (J.) - Juillet 1972.  
Analyse du molybdène dissous dans l'eau de mer. 14 p., 4 fig.
- N°30 - MAGNIER (Y.), PITON (B.), CITEAU (J.) - Janvier 1973.  
Bathythermogrammes recueillis par le "VAUBAN" de 1968 à 1972 dans l'ouest de l'Océan Indien sud-équatorial. En avant-propos : aperçu thermique de la région et remarques sur la thermocline. 16 p., 14 fig., 61 p. ht.
- N°31 - CITEAU (J.), PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Mars 1973.  
Sur la circulation géostrophique dans l'ouest de l'Océan Indien sud-équatorial. 29 p., 17 fig.
- N°32 - LE RESTE (L.) - Mars 1973.  
Zones de ponte et nurseries de la crevette "Penaeus indicus"  
H. Milne Edwards le long de la côte nord-ouest de Madagascar.  
11 p., 16 fig. ht.
- N°33 - ANONYME - Mars 1973.  
Publications du Centre O.R.S.T.O.M. de Nosy-Bé. Liste mise à jour au 31 décembre 1971. 104 p.
- N°34 - CITEAU (J.), PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Avril 1973.  
Observations physico-chimiques faites par le "VAUBAN" dans l'Océan Indien au large du Cap d'Ambre et de Juan de Nova, de mai 1971 à mars 1972. 154 p., 2 fig. ht.
- N°35 - MARCILLE (J.), VEILLON (P.) - Avril 1973.  
La pêche crevettière à Madagascar. Evolution des stocks. 28 p., 15 fig.
- N°36 - MARCILLE (J.), VEILLON (P.) - Mai 1973.  
Prospections et pêches thonières au nord et à l'ouest de Madagascar en 1972. 31 p., 16 fig.



- N°37 - VEILLON (P.) - Septembre 1973.  
Analyse des effets de la fermeture de la pêche crevetteière décidée dans certaines zones de Madagascar, du 17 décembre 1972 au 15 février 1973. 16 p., 8 fig.
- N°38 - IBANEZ (F.) - Août 1973.  
Un programme FORTRAN IV d'étude des structures écologiques marines par un modèle dérivé de l'analyse factorielle. 91 p., 23 fig.
- N°39 - FRONTIER-ABOU (D.) - Décembre 1973.  
Note préliminaire sur un essai de fabrication artisanale de nuoc-mam à partir des résidus de l'industrie crevetteière. 21 p., 3 fig.
- N°40 - POULAIN (J.-F.), PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Décembre 1973.  
Compte-rendu de la campagne "GLORIEUSES" du N.O. "VAUBAN", du 2 au 12 mai 1973. 12 p., 12 pl. h.t. + annexe.
- N°41 - STEQUERT (B.), POULAIN (J.-F.) - Décembre 1973.  
Résultats d'essais de pêche d'appât vivant aux Comores effectués avec le N.O. "VAUBAN" de juin à novembre 1973. 48 p., 17 fig.
- N°42 - CROSNIER (A.), JOUANNIC (C.) - Décembre 1973.  
Note d'information sur les prospections de la pente continentale malgache effectuées par le N.O. "VAUBAN". Bathymétrie - Sédimentologie - Pêche au chalut. 18 p., 1 fig., 2 tabl. + 13 pl. h.t.
- N°43 - MARCILLE (J.), STEQUERT (B.) - Avril 1974.  
La pêche crevetteière à Madagascar en 1973 - Evolution des stocks et des pourcentages des différentes espèces dans les captures. 40 p., 14 fig., 6 tabl.
- N°44 - LAVAL (Ph.) - Juin 1974.  
Un programme FORTRAN IV de représentation perspective d'un modèle à trois dimensions pour les analyses multivariées. 24 p., 4 fig.