

Calibration de l'ensemble des mesures de pigments GeP&CO par spectrofluorimétrie

(Yves Dandonneau, 14 février 2003)

Rappel

Les mesures sont faites selon la méthode de Neveux et Lantoine, en recherchant les coefficients de la combinaison linéaire des spectres (excitation – émission) des pigments purs qui minimisent la somme des carrés des écarts avec le spectre de l'échantillon naturel de pigments. Par rapport à cette méthode, les changements portent sur deux points : d'une part le calcul porte maintenant sur 806 mesures de fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 390 à 480 nm, par pas de 3, et d'émission de 620 à 720 nm, par pas de 4) au lieu de 24, et d'autre part on mesure maintenant 12 pigments, la chlorophylle *c3* et la phéophytine *c3* maintenant disponibles chez DHI (<http://www.c14.dhi.dk/PhytoplanktonPigmentStandards.htm>) s'ajoutant aux dix pigments traditionnellement mesurés par cette méthode : chlorophylle *a*, *b* et *c* (en fait : *c1+c2*), divinyl-chlorophylle *a* et *b*, et pheopigments correspondants. Malgré cet ajout, les 806 mesures de fluorescence permettent de surdéterminer fortement le système.

Les mesures sont faites sur un spectrofluorimètre HITACHI F 4500, équipé d'un système qui corrige les différences spectrales au niveau de la lampe, du photomultiplicateur, et des monochromateurs d'excitation et d'émission. Grâce à ce système, on devrait donc en principe obtenir un signal uniforme lorsqu'on mesure une substance imaginaire dont le rendement de fluorescence et le spectre d'émission seraient constants. Ce point est toutefois difficile à vérifier.

Moyens de contrôle

On a disposé d'un bâtonnet de méthacrylate de méthyle (Plexiglass®) polymérisé avec de la phéophytine *a*. Conservé à l'abri de la lumière, ce bâtonnet est stable en principe, et permet donc de surveiller les performances du spectrofluorimètre. La figure 1 montre

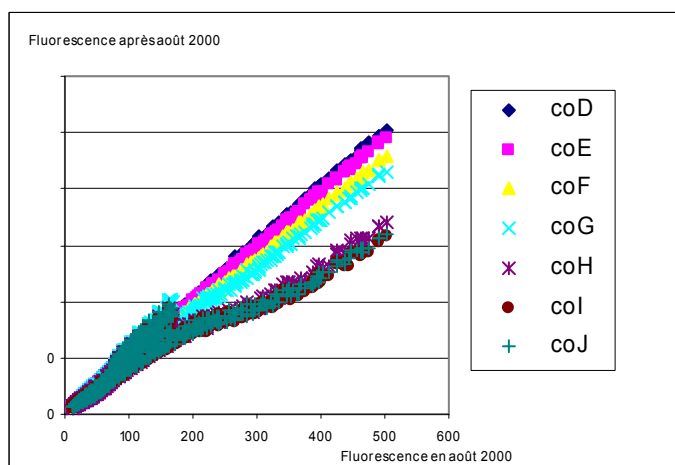


Figure 1 : évolution de la Fluorescence du bâtonnet de Phéophytine *a* après août 2000 (les mesures de GeP&CO D à J ont été réalisées respectivement en novembre 2000, Janvier, avril, juillet et Novembre 2001, janvier et Avril 2002).

que cette fluorescence n'a pratiquement pas varié jusqu'en janvier 2001, qu'elle a légèrement décré jusqu'en juillet 2001, puis beaucoup plus par la suite avec des indications de distorsions selon les régions du spectre d'excitation et d'émission.

L'autre moyen de contrôle consiste à effectuer se temps à autre des mesures sur des standards fournis par DHI. On trouve ainsi de la chlorophylle *a*, *b*, *c2*, de la phéophytine *a*, et de la divinyl-chlorophylle *a*. La comparaison des spectres de fluorescence de ces standards

avec ceux mesurés au début de l'expérience GeP&CO (en juillet 1999) ne donne pas toujours des résultats convergents. On voit (figure 2) que si la variation du rendement de fluorescence de notre appareil est assez uniforme sur l'ensemble du spectre pour la divinyl-chlorophylle *a*, il n'en est pas de même pour la chlorophylle *c2*. Toutefois, les contrôles effectués sur des

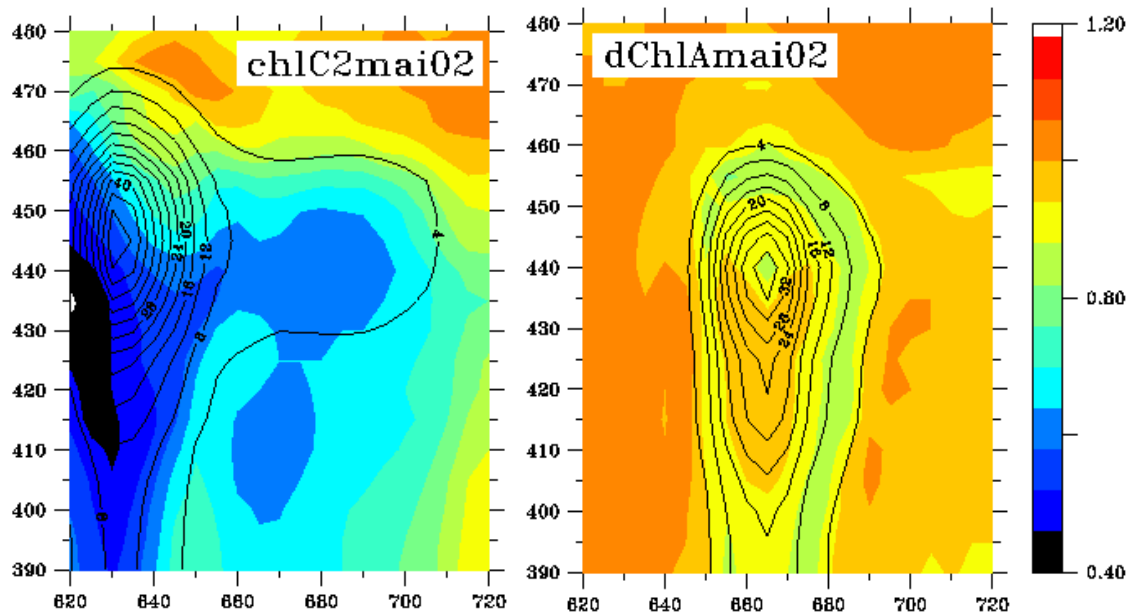


Figure 2 : Rapport de la fluorescence mesurée sur des standards de pigments en mai 2002 à celle mesurée en juillet 1999 (échelle de couleurs). On peut voir que si les déformations spectrales sont très fortes pour la chlorophylle *c2*, elles sont faibles pour la divinyl-chlorophylle *a*. Les contours représentent la fluorescence spécifique de référence d'une solution à 1 mg m⁻³, établie en juillet 1999.

standards de chlorophylle *a* ou *b*, ou de divinyl-chlorophylle *a* fournis par DHI, montrent qu'il n'y a pas eu d'évolution des capacités du spectrofluorimètre de nature à générer des déformations spectrales assez fortes pour influencer les résultats des mesures de pigments de manière significative. Les déformations spectrales observées pour la chlorophylle *c2* par rapport à la référence de juillet 1999 viennent très certainement du fait que cette référence était constituée en fait d'un mélange de chlorophylle *c1* et *c2*. De même, la déformation spectrale progressive observée sur le bâtonnet de phéophytine *a* est attribuée à une dégradation du pigment incorporé à ce bâtonnet, conservé à l'obscurité mais à température ambiante.

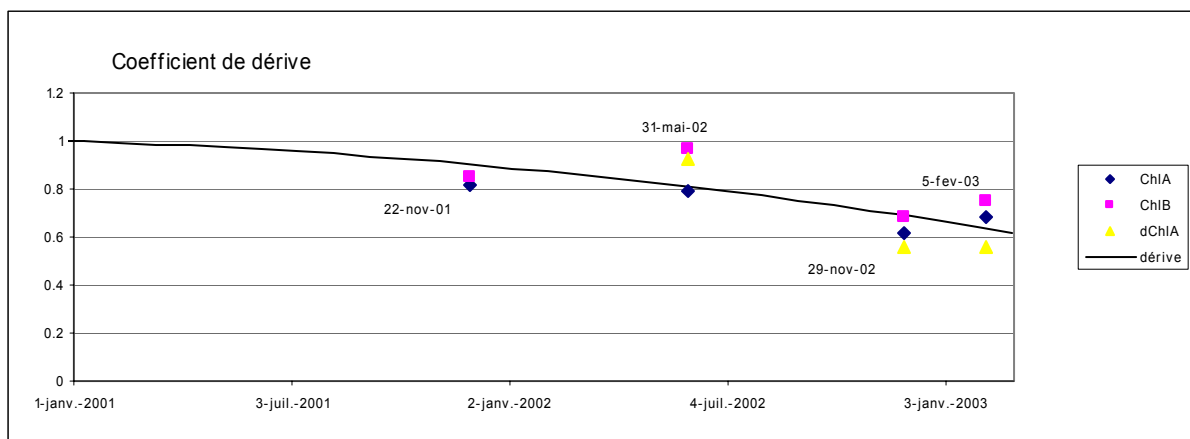


Figure 3 : dérive du spectrofluorimètre à partir du début 2001.

Le calcul final des concentrations en divers pigments ne comportera donc pas de correction spectrale, et la prise en compte d'une baisse du rendement du spectrofluorimètre se fera donc simplement au moyen d'un coefficient de dérive, fonction du temps. Cette dérive n'est appliquée qu'aux mesures réalisées à partir de début 2001, c'est-à-dire, à partir de la campagne GeP&CO_F. La formulation est la suivante :

$$C = 1 - 4.337 \cdot 10^{-7} \Delta t^2 + 1.36 \cdot 10^{-4} \Delta t$$

où Δt est le temps écoulé (en jours) depuis le 14 février 2000 au moment de la mesure. Avant le calcul de la concentration en pigments, les 806 mesures de fluorescence sont donc divisées par le coefficient C ainsi établi.

GeP&CO_A à GeP&CO_E :	C = 1
GeP&CO_F :	C = 0,97
GeP&CO_G :	C = 0,95
GeP&CO_H :	C = 0,93
GeP&CO_I :	C = 0,89
GeP&CO_J :	C = 0,84
GeP&CO_K :	C = 0,76
GeP&CO_L :	C = 0,70