

Les Notes Techniques de l'URAPC

711.1

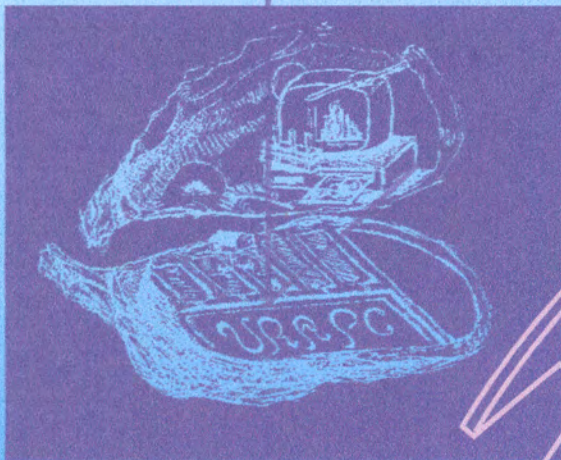


NT/URAPC/96-01-02-03

Les analyses biochimiques de protéines, lipides et glucides sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*
Amélioration des méthodes d'analyse
et réflexion sur la variabilité des résultats

Dosage des pigments Chlorophylliens par
Fluorimétrie

Comparaison de deux méthodes de dosage de la
matière organique. Analyse thermique par CHN
et analyse biochimique.



Razet, D
Faury, N
Geairon, P
Soletchnik, P
Goulletquer, P





57172

711.1

Type de rapport :	
Numéro d'identification du rapport : DRV/RA/rst/96-11	date de publication Novembre 96
Diffusion : libre	nombre de pages 40
Validé par :	bibliographie (Oui)
Adresse électronique :	illustration(s) (Oui)
- chemin UNIX :	langue du rapport française
- adresse WWW :	
Titre et sous-titre du rapport :	
Méthodes d'analyses de la matière organique ; méthodes biochimiques, méthodes d'analyse des pigments chlorophylliens et analyse thermique élémentaire.	
Titre traduit :	
Auteur(s) principal(aux) Razet Daniel ; Geairon Philippe ; Faury Nicole ; Soletchnik Patrick ; Gouletquer Philippe	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER/DRV RA/URAPC/La Tremblade
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	
Cadre de la recherche :	
Programme :	Convention :
Projet :	Autres (préciser) :
Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

Résumé :

Ce travail trouve son origine dans la volonté de mettre à jour et de préciser les méthodes analytiques mises en oeuvre au laboratoire URAPC de la Tremblade.

Une première partie est une réflexion sur les différents types de variabilité des résultats d'analyses biochimiques des protéines, lipides et glucides de la chair d'huître (*Crassostrea gigas*), et sur la signification des résultats dans le cas d'analyses globales de plusieurs individus (mélange des chairs), ou dans le cas de mesures individuelles, huître par huître. Selon le cas, l'interprétation zootechnique des résultats d'affinage en claire est différente!... La teneur en glucides inter-huîtres présente la plus grande variabilité.

La deuxième partie de ce rapport est consacrée à l'analyse de la chlorophylle *a* et des phéopigments. Les résultats comparatifs d'analyses effectuées sur plusieurs sources de chlorophylle à partir de deux types de fluorimètres (Turner et Jenway), conduit à remettre en cause l'utilisation de certains filtres à fort pouvoir absorbant, et à préciser les conditions d'étalonnage des appareils.

Dans la troisième partie de l'étude, les analyses biochimiques effectuées sur 3 sources différentes de matière organique (chair, matière organique en suspension et vase) sont comparées aux résultats obtenus par un analyseur thermique des éléments constitutants de la matière (CHN). Si les résultats sont cohérents entre les deux méthodes d'analyse pour les mesures de chair, un problème apparaît au niveau de l'analyse des lipides sur la matière organique en suspension dans l'eau, ainsi que sur celle contenue dans la vase. La méthode d'extraction des lipides dans ces deux derniers cas, est suspectée et doit être remise en cause.

Abstract :

The study aims to update and specify the analytical methods commonly used at URAPC/IFREMER laboratory in La Tremblade. The first part of this study focused on the various types of variability by using biochemical methods to assess oyster meat proteins, lipids and carbohydrates concentrations. Moreover, proximate biochemical composition of oyster meat was compared among individuals and within groups (homogenized pooled meat). Results showed that conclusions were affected by the way samples were prepared (individuals or pooled samples). The carbohydrates concentration among oysters showed the highest variability.

The second part of the study focused on chlorophyll *a* and pheophytin analysis. Several chlorophyll *a* origins were compared using Turner and Jenway fluorimeters. Several extinction filters commonly used affected significantly the estimates, therefore prompting to revalue fluorimeters calibrating procedures.

Comparison between three origins of organic matter (i.e., oyster meat, suspended particulate organic matter, sediment particulate matter) were carried out by using two types of analytical methods: chemical analysis and combustion analysis using a CHN/SO analyser. Although results showed correlated estimates between the two methods for oyster meat, no relationship was established between both lipids estimates from the suspended organic matter or from sediment. The uncorrelated estimates resulted from the lipids' extraction method which should be reviewed for this sample types.

Mots clés :

Méthodes d'analyses ; matière organique ; biochimie ; chlorophylle *a* ; analyse thermique.

Key words :

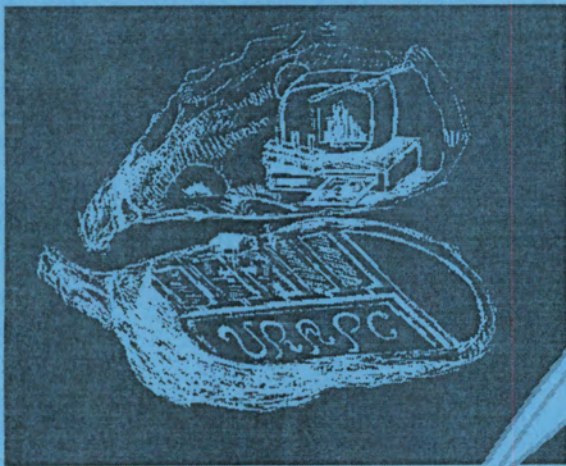
Analytical methods; organic matter; biochemical composition; chlorophyll *a*; combustion analysis.

Commentaire :

Les Notes Techniques de l'URAPC

NT/URAPC/96-01

Les analyses biochimiques de protéines, lipides
et glucides sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*
Amélioration des méthodes d'analyse
et réflexion sur la variabilité des résultats



Razet, D
Faury, N
Soletchnik, P
Geairon, P

**IFREMER**

Juin 1996

%%%

Les objectifs

%%%

- Effectuer une mise à jour des méthodes d'analyse des protéines, lipides et glucides sur la chair des mollusques.
- Tenter de mieux comprendre la forte variabilité des résultats d'analyses biochimiques dans leur capacité à « expliquer » la matière organique (poids sec de chair de bivalve).
- Préciser la variabilité liée à la méthode d'analyse (individuel ou « pool », au type de constituant biochimique (P, L ou G) et à l'huître elle-même (variabilité biologique).

%%%

Les résultats

%%%

- Une très forte variabilité biologique inter-huîtres de la teneur en glucides de la chair de l'huître est mise en évidence.
- La teneur en glucides de la chair des huîtres est significativement différente selon le secteur de claire (cadre expérimental).
- On constate une précision sensiblement équivalente pour les analyses de protéines, lipides et glucides.
- Le choix de la méthode : « pool » ou « individuel » ? Dans le cas de cette étude, les deux méthodes peuvent être considérées comme complémentaires ; L'analyse de variance par les « pools » d'huîtres permet de mettre en évidence des effets que l'analyse à partir des individus, ne permet pas d'obtenir. L'étude de la variabilité individuelle des différents composants biochimiques des huîtres montre combien la teneur en glucides caractérise chaque huître.
- Une mise à jour méthodologique du protocole d'analyse des glucides (échantillons de chair différents pour les analyses de glucides et de lipides), permet d'améliorer de 4 % le pourcentage de poids sec « expliqué » par les analyses de PLG sur la matière organique. Ce pourcentage de poids sec est de plus de 51 % dans le cas de cette étude.

Position du problème

Il existe une grande variabilité sur le pourcentage « expliqué » de la matière organique de chair de *Crassostrea gigas*, par les méthodes d'analyse des constituants biochimiques : protéines, lipides et glucides (PLG). Les données issues de la littérature présentent des valeurs comprises entre 23 et 68 % pour les protéines, 0,2-26 % pour les lipides et 0,2-33 % pour les glucides (tableau 1). Quelles sont les raisons d'un pourcentage parfois si faible ?

Devant cette grande hétérogénéité de résultats, il est utile de s'interroger sur ce qui relève de la variabilité biologique, et de la variabilité de manipulation. La variabilité biologique des résultats d'analyse des PLG concerne aussi bien la variabilité naturelle au sein d'une population, que la variabilité saisonnière des cycles biologiques annuels. Est-il pour autant « plausible » d'obtenir des résultats aussi variables que ceux présentés dans le tableau 1 ?

Tableau 1 : Revue bibliographique sur la composition biochimique en protéines, lipides et glucides de la chair de *Crassostrea gigas*.

Auteurs	Pays	Protéines (%)	Lipides (%)	Glucides (%)
Sekine <i>et al.</i> , 1929	Japon	23 - 52	-	3 - 26
Masumoto <i>et al.</i> , 1934	Japon	-	9 - 14	0,5 - 20
Tully, 1936	Colombie Britannique	46 - 55	12 - 16	12 - 25
Hatanaka, 1940	Japon	46 - 58	-	-
Lin, 1969	U.S.A.	38 - 64	-	12 - 30
Lee <i>et al.</i> , 1975	Korée	50 - 67	9 - 13	9 - 20
Gras et Gras, 1975	France	29 - 76	0,2 - 6	0,2 - 8
Walne et Mann, 1975	Ecosse	55 ± 3,3	-	11,6 ± 2,2
Riley, 1976	U.S.A.	34 - 44	16 - 17	17 - 27
Gras et Gras, 1976	France (pond)	35 - 63	4 - 26	3 - 8
Jeng <i>et al.</i> , 1979	Taiwan	48 - 68	6 - 18	0,2 - 14
Kim, 1980	Korée	39 - 66	15 - 21	0,4 - 33
Deslous-Paoli <i>et al.</i> , 1981a	France (pond)	35 - 56	8 - 23	0,5 - 10
Whyte et Englar, 1982	Colombie Britannique	30 - 62	4 - 14	22 - 30
Seaman, 1985	Allemagne	33 - 54	8 - 15	9 - 30
Maurer et Borel, 1986	France	-	6 - 22	1 - 23
Cette étude	France	29 - 52	6 - 20	0 - 4

d'après Deslous-Paoli et Héral (1988).

Un laboratoire de recherche de type URAPC doit faire face aux analyses biochimiques de plus de 1 000 échantillons par an, représentant environ 4 mois de travail pour un technicien et un coût en matériel de plusieurs milliers de francs. Devant le « poids » de ces analyses, il semble indispensable de bien définir la stratégie d'échantillonnage en fonction des résultats escomptés et des programmes menés. Quel est le bien-fondé du traitement analytique par regroupement des individus, ou par traitement individuel des huîtres. Quelle est également l'importance de la variabilité des résultats associés à la méthode d'analyse ?

A partir d'analyse de la chair d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*), cette note tente d'apporter des éléments de réponse aux questions évoquées ci-dessus.

Résultats servant de support à l'analyse statistique de la variabilité

Les huîtres, *Crassostrea gigas* sont issues d'expérimentations d'affinage en claires ostréicoles en 1994. Le test zootechnique porte sur une comparaison des performances d'affinage (croissance, indices de qualité) à différentes densités dans 4 claires ostréicoles de 450 m². Chacune des claires est séparée en 6 secteurs d'égales surfaces dans lesquels sont effectués des échantillonnages d'huîtres en fin d'expérimentation (Soletchnik *et al.*, 1995).

Les analyses biochimiques sont répliquées 3 fois sur des « pools » de 10 huîtres le 4 octobre à l'initiation de l'expérience, puis le 7 novembre et le 3 janvier pour les 4 claires 1, 2, 3 et 5. Le 8 février en fin d'expérimentation, des répliquats sont effectués pour chacun des 6 secteurs pour les claires 1, 2 et 5 (fig. 1). Pour la claire 3 et chacun des 6 secteurs, les analyses biochimiques sont réalisées huître par huître sur 10 huîtres. Le tableau 2 résume ces conditions expérimentales.

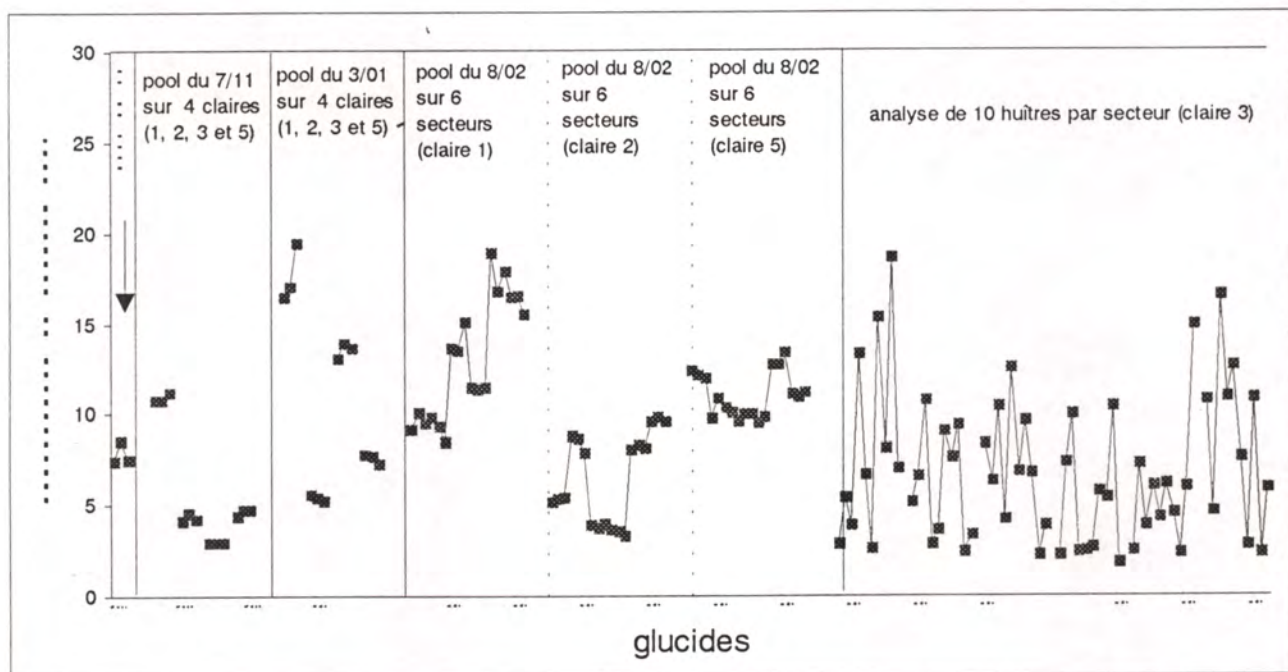


Figure 1: Plan d'échantillonnage des analyses effectuées.

Tableau 2 : Protocole expérimental d'analyse des huîtres.

Date	Echantillonnage	nombre d'huîtres
4 octobre 1994	analyse de 3 pools de 10 sur le lot initial	3 x 10
7 novembre 1994	analyse de 3 pools de 10 sur les 4 claires	3 x 10 x 4
3 janvier 1995	analyse de 3 pools de 10 sur les 4 claires	3 x 10 x 4
8 février 1995	analyse de 3 pools de 10 sur 6 secteurs de 3 claires	3 x 10 x 6 x 3
8 février 1995	analyse en individuel sur 10 huîtres de 6 secteurs d'une claire	10 x 6

Au total, 131 analyses de chacun des éléments biochimiques sont réalisées, pour un total de 870 huîtres.

Dans le contexte de cette expérience, les types de variabilité rencontrés sont les suivants :

<i>Variabilités liées à l'huître</i>		Type
Variabilité biologique saisonnière (entre 4 dates d'échantillonnage).....	A	
Variabilité biologique « inter-huîtres » (au sein d'une même condition).....	B	Type
<i>Variabilités liées au site d'élevage</i>		
Variabilité biologique « inter-claires » (4 claires en présence).....	C	
Variabilité biologique « intra-claires » et « inter-secteurs » (6 secteurs au sein d'une même claire)...	D	
<i>Variabilité liée à l'analyse</i>		Type
Variabilité inter-analyses. Comparaison entre les répliquats d'un type d'analyses biochimiques (protéines, lipides et glucides).....	E	

Dans le cadre de cette étude, l'important est de préciser les sources de la variabilité biologique entre les huîtres (type « B ») et celles liées aux répliquats d'analyse (type « E ») (fig. 2). Les autres sources de variabilité (« A », « C » et « D »), sont liées aux conditions d'expérimentation du test zooteknique d'affinage (Soletchnik *et al.*, 1995).

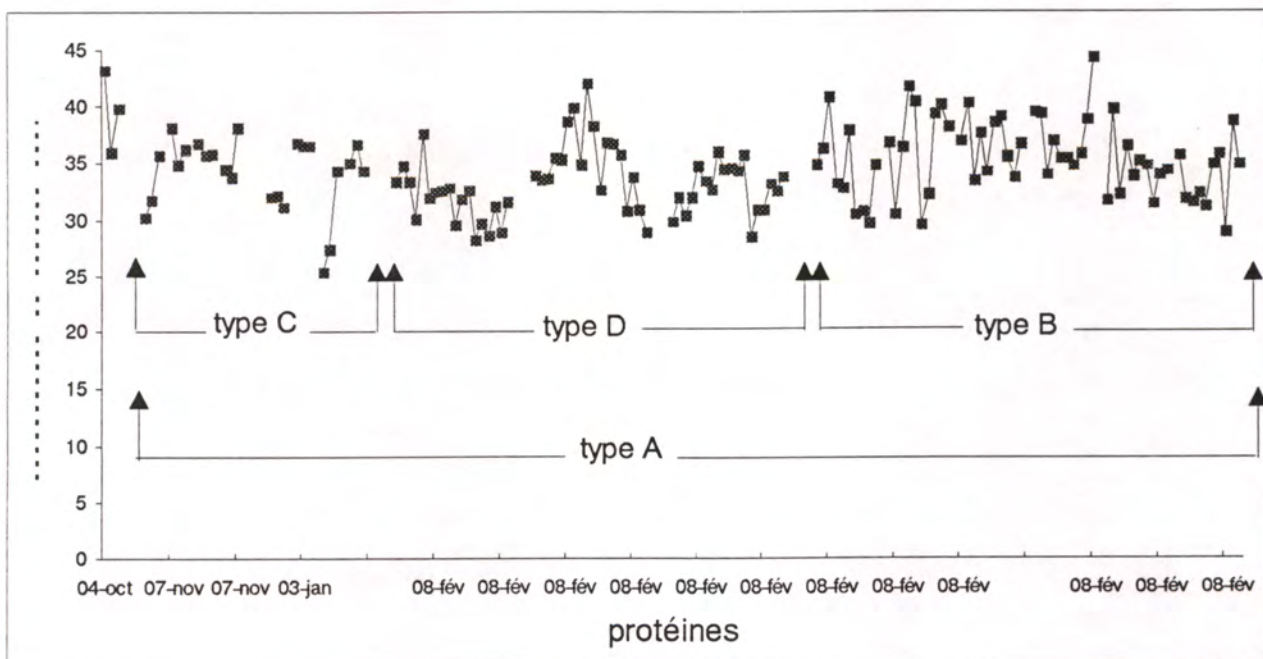


Figure 2 : Types de variabilité étudiée à travers les analyses.

Les traitements statistiques sont effectués à partir du logiciel « Statgraphics ».

Présentation générale des résultats d'analyses biochimiques

Les résultats obtenus sur l'ensemble des 4 périodes pour les 4 claires sont présentés sur la figure 3, dans l'ordre chronologique des échantillonnages. Cette figure présente la forte variabilité des mesures individuelles pour l'ensemble des analyses, mais plus encore pour les glucides et le glycogène, ainsi que des effets secteurs nets.

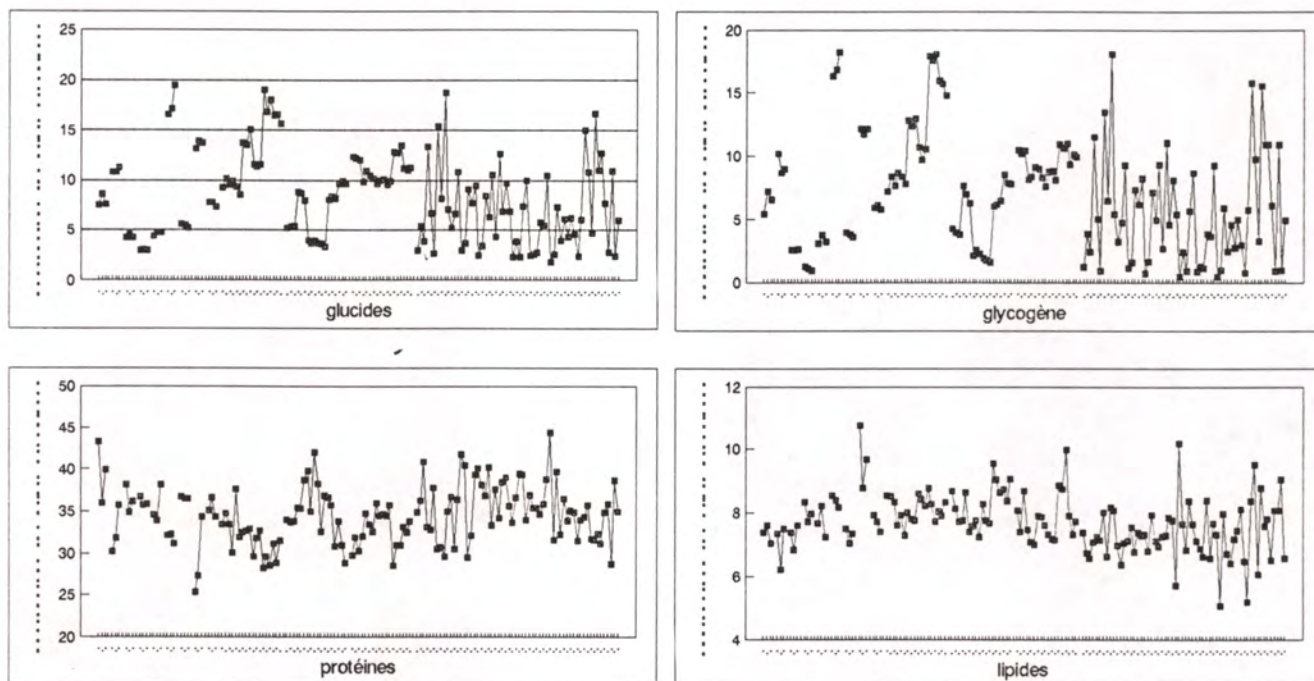


Figure 3 : Analyses biochimiques des protéines, lipides, glucides et glycogène. Résultats généraux.

Variabilité biologique liée aux claires et secteurs de claire le 8 février. Analyse en « pool » de 10 huîtres

Les résultats de l'analyse de variance à 2 facteurs (claires et secteurs) montrent que des différences significatives existent entre les secteurs et entre les claires pour les trois constituants biochimiques, exception faite de la teneur en lipides entre les trois claires (tableau 3).

Tableau 3 : Probabilité associée à l'analyse de variance (%) des effets secteurs et claires sur les analyses biochimiques.

		effet	
		secteur	claire
ANOVA	protéines	0,001	0,000
ANOVA	lipides	0,000	0,068
ANOVA	glucides	0,000	0,000

Les différences entre les secteurs apparaissent surtout au niveau des secteurs 5 et 6 plus riches en glucides et lipides, et plus pauvres en protéines (fig. 4, d, e, f). La claire 2 est celle qui apparaît comme la plus dissemblable des trois, avec une teneur plus élevée en protéines, et plus basse en glucides (fig. 4, a, b, c).

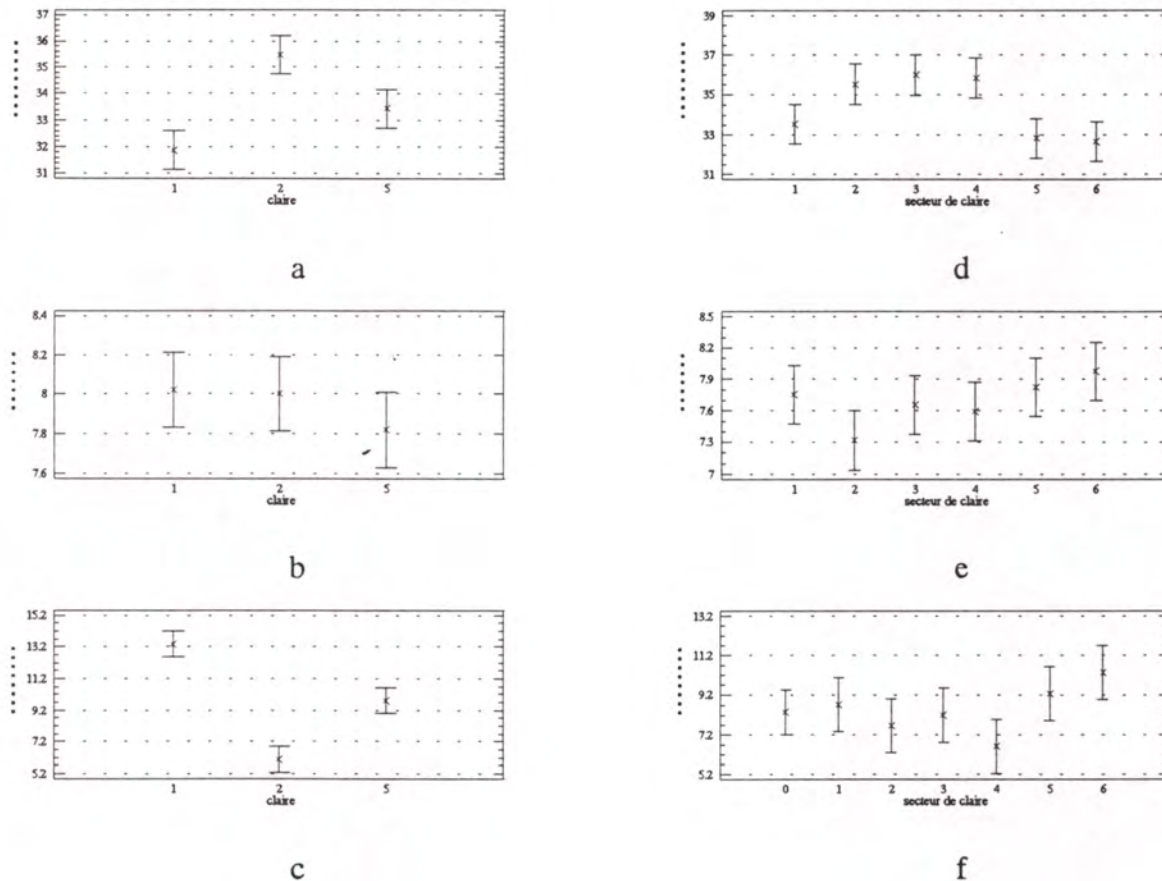


Figure 4 : Moyennes et intervalles de confiance des analyses de protéines (a, d), lipides (b, e) et glucides (c, f) pour les claires (a, b, c) et les secteurs de claires (d, e f).

Comparaison de l'effet secteur entre les claires 1, 2 et 5 (analyses par « pools ») et la claire 3 (analyses « individuelles») le 8 février. Stratégie d'analyse

Les claires 1, 2 et 5 présentent une réponse homogène vis à vis des lipides et des glucides, avec un effet secteur déjà noté (tableaux 1, 2 et 4). Cet effet se manifeste quand la mesure est répliquée à partir d'un pool de 10 huîtres. Par contre, pour la claire 3, à partir de mesures individuelles, aucune différence significative n'apparaît entre les secteurs de claires. La grande variabilité des réponses individuelles des huîtres (établie sur la claire 3), masquerait une différence nettement significative entre les secteurs, mise en évidence sur les autres claires (claires 1, 2 et 5). Si la réponse statistique semble probante, dire que l'analyse par « pool » (mélange de la chair de plusieurs huîtres) est plus riche en informations que l'analyse individuelle, peut paraître surprenante... Le débat est ouvert !...

Tableau 4 : Résultats des analyses de variance selon les secteurs de claires ; claires 1,2 et 5 : triplicats de pools de 10 huîtres. claire 3 : 10 mesures d'huîtres en individuel par secteur.

claire	1		2		5		3	
méthode	pool		pool		pool		individuel	
protéines	0,052	NS	0,053	NS	0,002	**	0,043	*
lipides	0,026	*	0,009	**	0,000	***	0,256	NS
glucides	0,000	***	0,000	***	0,000	***	0,293	NS

Ce résultat montre comment le choix méthodologique influe directement sur la qualité du résultat. Le travail qui suit a comme objectif de préciser les différentes sources de variabilité.

Etude de la variabilité des résultats

Le tableau 5 présente la variabilité résiduelle à l'effet secteur le 8 février, pour les claires 1, 2 et 5. Le résultat de 1 à 5 % de variabilité résiduelle pour les glucides montre que l'effet secteur sur le facteur constituant biochimique est prépondérant devant les autres sources de variabilité. Ceci sous entend également que la précision de l'analyse biochimique est satisfaisante devant l'étude du phénomène que l'on recherche (effet secteur). Pour les lipides et protéines, l'effet secteur n'intègre que partiellement la variabilité de la réponse, puisque 20 à 39 % de la variabilité résiduelle subsiste alors que l'effet secteur demeure significatif (tableaux 4 et 5). Par contre, avec 44 % de variance résiduelle, l'effet secteur n'est plus significatif pour la teneur en protéines de la chair des huîtres dans les claires 1 et 2.

Tableau 5 : Taux de variance résiduelle des analyses de variance des protéines, lipides et glucides, selon le facteur « secteur de claire » le 8 février. Anova sur 6 secteurs de claires avec 3 réplicats de pools d'huîtres par secteur (claires 1,2 et 5), et avec 10 mesures individuelles (claire 3).

claire	1	2	5	3
méthode	pool	pool	pool	individuel
protéines	44	44	24	81
lipides	39	32	20	90
glucides	3	<1	5	90

Un effet secteur très net est observé pour la teneur en glucides de la chair des huîtres.

La question suivante peut alors être posée : L'analyse est-elle plus imprécise pour les autres constituants biochimiques ?

Les **coefficients de variation** des protéines, lipides et glucides des huîtres des différents secteurs de claire, sont respectivement compris entre (0,5-9,3) ; (1,1-8,0) et (0,7-7,5) pour les claires 1, 2 et 5 (tableau 6). Ces résultats traduisent « à priori » une dispersion homogène de la variance pour chacun des composants biochimiques, soit une fiabilité de réponse de l'analyse d'un ordre de grandeur semblable.

Tableau 6 : Valeurs des coefficients de variation des mesures effectuées par secteur de claire.

secteur	1	2	3	4	5	6
claire 1. mesures par « pool »						
prot	2,29	11,8	0,63	5,07	2,67	4,80
lip.	1,41	4,21	1,83	2,28	6,49	2,80
gluc.	4,76	7,49	6,31	0,70	5,95	3,36
claire 2. mesures par « pool »						
prot	0,51	5,30	9,26	8,18	9,12	8,00
lip.	5,97	7,95	3,46	4,12	5,10	4,00
gluc.	1,78	5,48	3,84	6,11	1,62	1,62
claire 5. mesures par « pool »						
prot	3,72	4,21	4,83	1,99	4,57	2,10
lip.	7,99	3,47	2,04	1,18	7,41	4,06
gluc.	1,65	5,06	2,85	2,80	3,16	1,24
claire 3. mesures « individuelles »						
prot	10,33	11,94	6,42	8,33	7,19	8,71
lip.	8,26	5	14,8	9,10	16,6	14,7
gluc.	65,6	49,1	44,7	63,8	61,5	54,2

On constate une précision sensiblement équivalente pour les analyses de protéines, lipides et glucides.

Le choix d'effectuer les analyses biochimiques à partir d'un « pool » d'individus amène à des conclusions différentes de celles obtenues à partir de l'analyse biochimique des huîtres traitées individuellement (tableau 4). Le tableau 5 précise ces résultats avec une variance résiduelle forte de 80-90 % pour les protéines, lipides ou glucides. La variabilité biologique inter-huîtres masque toute autre information. Le coefficient de variation des mesures effectuées individuellement est de 6-12 % pour les protéines, 5-17 % pour les lipides, et 49-64 % pour les glucides (tableau 6). La dispersion très forte pour l'analyse des sucres traduit l'importante variabilité biologique de la teneur en glucides des individus.

Une très forte variabilité biologique inter-huîtres de la teneur en glucides de la chair de l'huître est mise en évidence.

Amélioration qualitative apportée à la méthode d'analyse des glucides

Les résultats d'analyses de glucides effectuées sur les réplicats de pools d'huîtres (4 octobre, 7 novembre et 3 janvier) mettent en évidence un effet « technique analytique ». Les mesures de glucides effectuées à partir du culot d'analyse des lipides donnent des résultats systématiquement inférieurs à ceux obtenus en « direct » à partir de la chair d'huître lyophilisée (fig. 5).

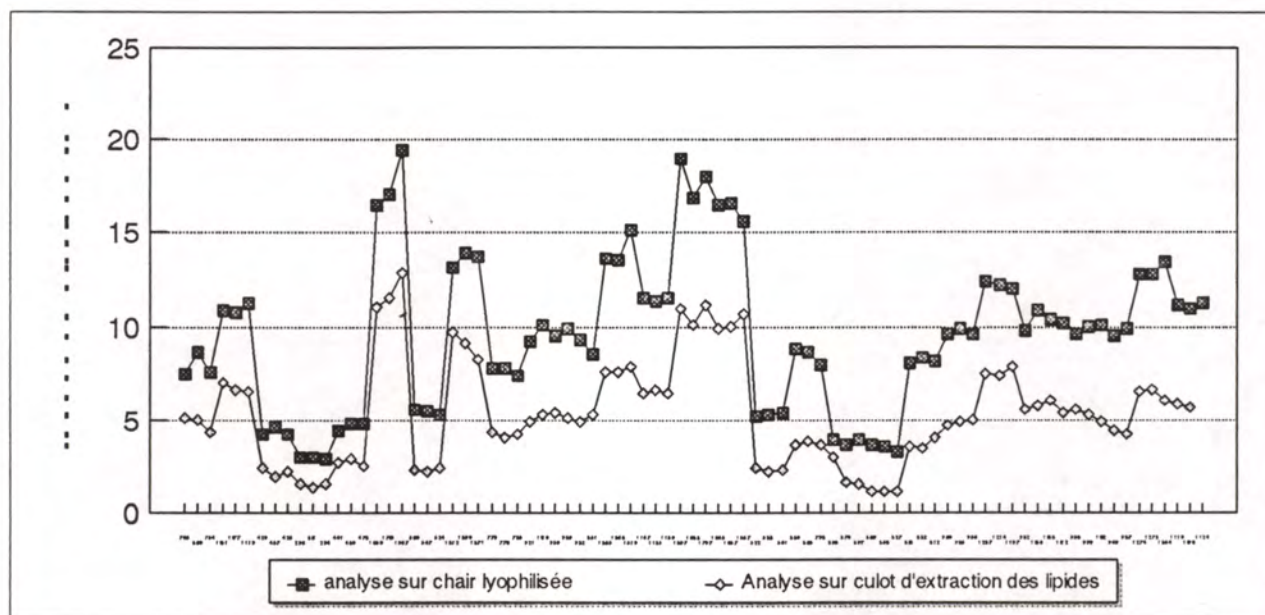


Figure 5 : Résultat d'analyses des glucides selon deux méthodes.

L'amélioration méthodologique apportée donne des teneurs en glucides comprises entre 2,9 et 19,5 %, (moyenne de 9,6 %), celles-ci variant de 1,1-12,8 % (moyenne de 5,3 %) dans le cas d'analyse sur culot d'extraction de lipides. Le facteur multiplicatif est de 1,8 entre les deux méthodes d'analyse, et permet ainsi de passer de 47,1 à 51,3 % de poids sec expliqué par l'analyse des PLG.

Il est à noter que les cendres représentent environ 10-15 % de la chair d'huître « non expliquée ». D'autre part, les résultats d'analyses biochimiques (annexes) sont mesurés à partir d'étalons albumine de boeuf, acide tripalmitique et glucose, éléments qui ne sont évidemment pas tous représentés dans la chair d'huîtres !...

Conclusion

→ Le choix de la méthode : « pool » ou « individuel » ? Dans le cas de cette étude, les deux méthodes peuvent être considérées comme complémentaires ; L'analyse de variance par les « pools » d'huîtres permet de mettre en évidence des effets que l'analyse individuelle, ne permet pas de décrire. L'étude de la variabilité individuelle des différents composants biochimiques montre combien la teneur en glucides caractérise chaque huître.

→ La qualité d'analyse est sensiblement équivalente pour les protéines, lipides ou glucides.

→ La modification du protocole d'analyse des glucides, permet d'améliorer de 4 % le pourcentage de poids sec « expliqué » par les analyses de PLG. Le pourcentage de poids sec expliqué est de plus de 51 % dans le cas de cette étude.

Le tableau ci-dessous résume l'importance relative des différentes sources de variabilité.

source de variabilité	protéines	lipides	glucides
A (saison)	Pas étudiée dans le cadre de cette étude		
B (huîtres)	+	+	+++
C (claires)	+	0	+
D (secteurs)	+	+	+++
E (triplicats analyses)	sensiblement équivalente		

(0 : pas d'effet ; + : effet faible ; ++ : effet fort)

Dans le cadre de cette expérimentation d'affinage, la teneur en protéines, lipides et glucides des huîtres, permet de discriminer les différents secteurs de claire dans le cas des analyses par « pools ». Cette sélection devient difficile ou impossible dans le cas des analyses huître par huître. Selon le type de stratégie d'échantillonnage envisagée pour les P L G (pool ou individuel), les résultats peuvent donc différer significativement ainsi que leur interprétation !..

Ce résultat n'est pas en contradiction avec l'analyse statistique de la **moyenne** réalisée par Mazurié (1995) qui montre que la moyenne obtenue à partir de pools ou à partir d'individus, est équivalente. L'information apportée par cette étude est complémentaire.

Au sein d'un même secteur de claire (soit en considérant une population homogène), le coefficient de dispersion « biologique » de la teneur en glucides, est 5 à 8 fois supérieur à celui lié aux mesures de protéines et de lipides. La variabilité naturelle, individuelle de la teneur en glucide, est forte au sein d'une population supposée « homogène ». La teneur en glucides est une caractéristique propre à chaque huître et constitue de ce fait un indicateur biologique « sensible ». Réduire la variance de ce paramètre au cours des élevages permet de contrôler l'amélioration de la qualité des huîtres et la gestion des élevages.

Références

- Bligh E. G. and W. F. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911-917.
- Dubois M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- Lowry O. H., N. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

- Marsh J. B. and D.B. Weinstein, 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.*, 7: 574-576
- Mazurié J., 1995. Optimisation du protocole REMORA. Avantages et inconvénients des mesures ou analyses groupées. Application aux analyses biochimiques. Note du laboratoire IFREMER de la Trinité sur Mer, 10 p.
- Razet D., 1976. Dosage des protéines dissoutes ou particulières d'après la méthode de Lowry. Note technique interne de l'ISTPM, 4p.
- Soletchnik P., D. Razet, P. Gouletquer, P. Geairon, O. Le Moine et N. Faury, 1995. Analyse de la capacité trophique de l'écosystème claire ostréicole dans le cadre de l'affinage de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Bassin de Marennes - Oléron). *RIDRV- 24- 95/ La Tremblade*, 43p.

Méthode d'analyse des PROTEINES

Méthode de Lowry *et al.*, 1951

PRINCIPE

Les protéines sont formées de longues chaînes polypeptidiques (structure primaire). Elles sont présentes sous cette forme dans l'eau de mer avec une solubilité très variable. Certaines (comme l'albumine) sont solubles dans l'eau pure, d'autres ne se dissolvent qu'en présence de sels neutres ou lorsque le milieu est légèrement acide ou faiblement alcalin. Enfin, des protéines sont insolubles dans l'eau (ex : les scléroprotéines).

En fait, cette méthode nous donne une évaluation de la quantité de protéines. Cette estimation est donnée par le dosage de deux acides aminés : le tryptophane et la tyrosine.

Pour ce faire, la méthode de Lowry *et al.* (1951), appliquée aux sérums humains, a été modifiée pour déterminer les traces de protéines en augmentant les proportions des réactifs (Razet, 1976).

Au cours des étapes, les protéines sont hydrolysées dans un milieu basique. Il se forme une réaction de type biuret. Elle est caractérisée par une coloration violette observée après addition d'une solution alcaline de CuSO_4 . Le réactif de Folin-Ciocalteu permet d'amplifier la couleur obtenue et de déceler les complexes tryptophanes et tyrosines. Les autres acides aminés ne sont pas décelables par la méthode de Lowry.

Cette méthode est plus sensible et plus facilement reproductible que celle de biuret.

MATERIEL

- Tube polyéthylène cristal de 110 x 15 mm : 2 par analyse

- Produits chimiques

* NaOH 1N : 10 cc par analyse et gamme étalon (environ 30 cc)

* H_2SO_4 1N : 0,5 cc par analyse

* NaOH 0,1N et Na_2CO_3 à 2 % : compter environ 5 cc par analyse (Volume voisin de la

Solution D finale)

* CuSO_4 à 0,5% : préparer environ 3 % du volume de Na_2CO_3

* Tartrate de Na ou de K : à 1 % : préparer environ 3 % du volume de Na_2CO_3

* Réactif de Folin : 0,5 cc par analyse

EXTRACTION

- Peser 5 à 10 mg de chair lyophilisée dans un tube cristal de 10 ml

- Ajouter 10 cc de NaOH 1N

- Homogénéiser à l'aide d'une spatule et d'un agitateur mécanique (rincer la spatule entre chaque échantillon)

- Boucher le tube et mettre 30 mn à 60°C ou une nuit à température ambiante

PREPARATION

- Dans un tube cristal de 10 ml introduire :

* 0,5 ml de la solution échantillon ou étalon

* 0,5 ml de H_2SO_4 1N pour ramener à pH neutre

REACTIF

SOLUTION A : 2 % de Na_2CO_3 (carbonate de Sodium anhydre) dans une solution de NaOH à 4g/l, soit 0,1N

SOLUTION B : CuSO_4 (Sulfate de Cuivre) à 0,5% dans H_2O distillée

SOLUTION C : Tartrate de Sodium ou de Potassium à 1 % dans H_2O distillée

SOLUTION D : elle doit être préparée au dernier moment car elle ne se conserve que quelques heures :

- * 100 ml de SOLUTION A
- * 2 ml de SOLUTION B
- * 2 ml de SOLUTION C

Réactif de FOLIN CIOACALTEAU : Vérifier le titre de la solution du commerce et la ramener à N avec de l'eau distillée. Après titrage avec NaOH et Phénolphtaléine, la diluer (2 fois environ)

ETALON

- Faire une gamme étalon préparée de NaOH 1N de 0 à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à partir d'albumine de boeuf à 10 g/dl (100 mg/cc). Faire une solution fille à 1 mg/ml.

- Préparer la gamme (pour un volume de 2 cc) :

- * 0,1 cc de 1 mg/ml dans 1.9 ml de NaOH
- * 0,2 cc 1,8 ml de NaOH
- * 0,3 cc 1,7 ml de NaOH
- * etc...

- Reprendre 0,5 cc de ces dilutions et ajouter les réactifs

DOSAGE

- Sur la préparation-échantillon ajouter :

- * 5 cc de la solution D - attendre 10 mn
- * 0,5 cc de Réactif de FOLIN

* Homogénéiser à l'aide de l'agitateur magnétique

attendre 1 heure 30 pour le développement de la coloration. S'il se produit un précipité blanc, le faire disparaître par addition de 1 ml de Tartrate de Sodium (280 g/l)

- Lire à 750 nm (cuve de 10 mm)

Méthode d'analyse des LIPIDES

Extraction & Purification selon la Méthode de Bligh et Dyer (1959)

Dosage selon la Méthode de Marsh et Weinstein

PRINCIPE

Contrairement aux glucides, les lipides forment un groupe de composés très hétérogène. Ils ont été réunis en raison de leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques (éther, acétone, mélanges chloroformes-alcools...). Mais ces critères de solubilité ne sont pas absolus. Ainsi a-t-on défini les lipides comme des composés comportant dans leur molécule une chaîne aliphatique ((- CH₂-)_n) d'au moins 8 atomes de carbone en général.

Ceci regroupent alors : les acides gras (ex : l'acide palmitique), les glycérolipides (ex : la lécithine), les sphingolipides (ex : la sphingomyéline), les cériques (ex: les cires végétales ou d'insectes) et les lipides polyisopréniques (ex : cholestérol, pigments (carotènes), vitamines A...).

Cette grande variété montre l'importance des lipides dans le métabolisme des êtres vivants. Les triglycérides sont les plus importants chez les organismes vivants. Ils sont plus facilement stockables (insolubles) que les glucides sous forme de réserve d'énergie.

L'hydrolyse acide et à chaud permet de libérer les acides gras. Elle révèle la formation d'un complexe de coloration brune plus ou moins foncée en fonction de sa concentration. Cette coloration brune a un maximum d'absorption aux environs de 360 nm.

MATERIEL

- Tube en verre :
 - * 100 x 12 mm : 2 par analyse
 - * 110 x 15 mm : 1 par analyse
- Produits chimiques :
 - * Chloroforme : 2 ml par analyse
 - * Méthanol : 4 ml par analyse
 - * H₂O : 7 ml par analyse
 - * H₂SO₄ pur : 10 ml par analyse

PREPARATION

- Peser 5 à 10 mg de chair lyophilisée dans un tube en verre de 100 x 12 mm préalablement chloroformés.

- L'extraction est répétée 2 fois :

1) Ajouter 1 ml de chloroforme

2 ml de méthanol (ces 2 corps pourront être préalablement mélangés)
homogénéiser et centrifuger à 2000 tr/mn pendant 10 mn

- Pipeter le surnageant et le mettre dans un tube en verre de 110 x 15 mm préalablement chloroformés

2) Réintroduire dans le tube contenant la chair

1 ml de chloroforme

2 ml de méthanol (ces 2 corps pourront être préalablement mélangés)
homogénéiser et centrifuger à 2 000 tr/mn.

- pipeter de nouveau le surnageant et le mettre dans le tube (110 x 15)
- ajouter 4 ml de H₂O distillée
- homogénéiser et centrifuger à 2 000 tr/mn pendant 10 mn

- éliminer la phase supérieure (8cc)
- laisser la phase inférieure évaporer en étuve (36 à 42°C) ou sous flux d'azote

ETALON à faire lors de la préparation des échantillons

- Faire une gamme étalon dans du chloroforme à partir d'une solution mère d'**Acide Tripalmitique** à 1 500 µg/ml (attention: ne pas mettre de parafilm). Prélever des aliquots de sorte à obtenir des fractions de 0 à 1 500 µg. Faire évaporer.

DOSAGE

- Ajouter à l'extrait sec 10 ml de H₂SO₄ pur
- Mettre 20 mn à 200°C
- Refroidir
- Ajouter 3 ml de H₂O (réaction violente très exothermique).
- Prélever avec précaution 2 ml de la solution dans un tube à hémolyse en verre
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique
- Laisser refroidir et lire à 360 nm (cuve de 10 mm)

Méthode d'analyse des SUCRES TOTAUX ET GLYCOGENE

Méthode de Dubois *et al.*, 1956

PRINCIPE

En 1951, Dubois a démontré après expérimentation, que « le phénol en présence d'acide sulfurique concentré peut être utilisé pour déterminer par colorimétrie des micro-quantités d'oses et leurs dérivés, d'osides et de polyholosides présents dans l'eau de mer ». Cette méthode est simple, rapide, et donne des résultats reproductibles. Les réactifs sont bon marché et stables. De plus, la coloration brune-orangée est relativement stable.

Par cette méthode, nous avons dosé les oses et dérivés qui ont un maximum d'absorption à 490 nm tel que : D xylose (furfural), D mannose, D fructose, D glucose, D galactose, D galacturonique, D manurone, 2 desoxy d ribose, le saccharose, le maltose, le lactose et le raffinose.

MATERIEL

- Tube en verre 100 x 12 mm : 1 par analyse
- Tube en polypropylène 93 x 15 mm : 1 par analyse
- Produits chimiques :
 - * TCA à 15 % : 3 cc par analyse et gamme étalon (30 cc environ)
 - * Ethanol absolu : 4 cc par analyse
 - * H₂O : 0,5 cc par analyse
 - * H₂SO₄ : 5 cc par analyse
 - * Phénol à 5 % : 1 cc par analyse

PREPARATION

- Peser 5 à 10 mg de chair lyophilisée dans un tube en verre de 100 x 12 mm
- Ajouter 3 cc de TCA: Acide Trichloracétique à 15 %
- Homogénéiser à l'aide d'une spatule sur agitateur mécanique (rincer entre chaque tube)
- Laisser extraire 1 heure à 4°C
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique
- Centrifuger à 2 000 tr/mn pendant 10 mn

SUCRES TOTAUX

- Pipeter 0,5 cc du surnageant dans un tube en polypropylène de 10 cc

GLYCOGENE

- Pipeter 0,5 cc du surnageant dans un tube en polypropylène de 10 cc
- Ajouter 4 cc d'Ethanol absolu pour précipiter le glycogène
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique
- Centrifuger 10 mn à 2 000 tr/mn pendant 10 mn
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 0,5 cc de H₂O bouillante
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique

ETALON

- Faire une gamme-étalon de 0 à 500 µg/ml dans le TCA à 15 % à partir de **Glucose** concentré à 100 mg/dl

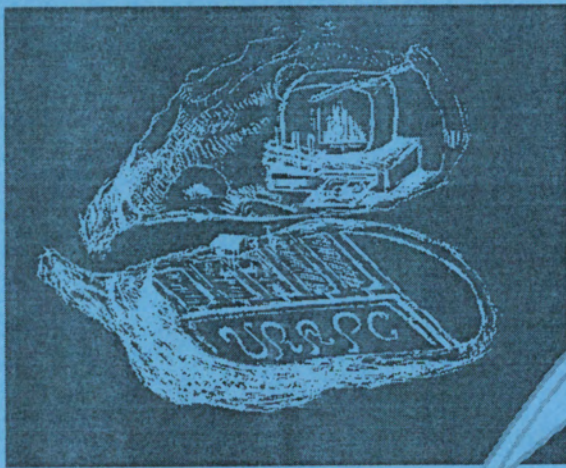
DOSAGE

- Ajouter 1 cc de phénol à 5 %
- Attendre 40 mn à température ambiante
- Ajouter 5 cc de H_2SO_4
- Attendre 10 mn
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique
- Lire à 490 nm (cuve de 10 mm).

Les Notes Techniques de l'URAPC

NT/URAPC/96-02

Dosage des pigments Chlorophylliens par Fluorimétrie



Faury, N
Razet, D
Soletchnik, P

 **IFREMER**

Juillet 1996

Les objectifs

- Effectuer une mise à jour des dosages des chlorophylle *a* et phéophytine *a*, par la méthode fluorimétrique, dans différents types d'échantillons (eau, biodépôts, phytobenthos).
- Comparer les résultats obtenus par deux fluorimètres : TURNER et JENWAY.
- Etudier la qualité de réponse du fluorimètre JENWAY.

Les résultats

- Les moyens de traitements mathématiques ont permis d'ajuster à un modèle multiplicatif la fonction entre la fluorescence et la concentration en chlorophylle *a*.
- Les filtres utilisés sur le fluorimètre TURNER conduisent à surestimer les mesures de pigments. La gamme de mesure du fluorimètre JENWAY, beaucoup plus large, permet d'éviter ce type d'erreur.
- Sur le fluorimètre JENWAY, les coefficients *F* et *r* sont constants quel que soit le gradient de fluorescence.
- L'étalon de mesures de la chlorophylle *a* et de la phéophytine *a* doit être de même nature que les échantillons à analyser.

Méthode de mesure des pigments chlorophylliens : chlorophylle *a* et phéophytine *a*

Le dosage en routine des pigments chlorophylliens est effectué au laboratoire depuis plusieurs années grâce au fluorimètre TURNER selon le protocole de Neveu (1973). Cette méthode a été préférée à la méthode spectrophotométrique de Lorenzen (1967) qui nécessite de filtrer d'importants volumes d'eau. La méthode fluorimétrique (Yentch et Menzel, 1963) permet des mesures rapides et précises. Sa sensibilité permet d'éviter la filtration de volumes importants d'échantillons. 50 à 100 cc d'eau de mer suffisent.

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution acétonique riche en chlorophylle *a* dont la concentration est tout d'abord déterminée par mesures spectrophotométriques. Elle va permettre ensuite de déduire les constantes du fluorimètre.

Il convient d'étalonner l'appareil à chaque nouvelle série de mesures afin de déterminer les constantes de celui-ci. En effet, les sources lumineuses ont une durée de vie courte (1 000 h). Leur énergie diminue avec le temps.

Préparation de la solution mère de pigments chlorophylliens. Dosages spectrophotométriques

- Filtrer une quantité d'eau de mer (préalablement préfiltrée à 250 μ) sur filtre en fibre de verre type *Whatman GFC* de 47 mm de diamètre. **Le volume doit être suffisant pour obtenir une densité optique à 665 nm comprise entre 0,300 et 0,400 en raison de la perte de linéarité entre concentration et fluorescence.**
- Broyer le filtre dans un mortier avec du sable de Fontainebleau et un volume précis d'acétone à 90 % (25 à 50 cc).
- Recueillir le soluté ainsi obtenu dans un tube à centrifuger et boucher
- Laisser extraire 4 heures au réfrigérateur
- Centrifuger à 3 000 g pendant 15 minutes
- Lire la densité optique à 665 nm et à 750 nm avec une cuve à faces parallèles de 50 mm de chemin optique (volume de l'étalon > 15 cc).

La solution acétonique de pigments chlorophylliens ainsi obtenue permet de déterminer de manière très précise, grâce à la loi de Lorenzen, la concentration en chlorophylle *a* et phéopigments (phéophytine *a*) (Neveu, 1973) :

$$[\text{Chl}a] = 26,7 \cdot (\text{DO } 665\text{av} - \text{DO } 665\text{ap}) / L$$

$$[\text{Phéo}a] = 26,7 \cdot (1,7 \cdot \text{DO } 665\text{ap} - \text{DO } 665\text{av}) / L$$

L = chemin optique

DO 665 av = (densité optique à 665 nm) - (la turbidité à 750 nm)

DO 665 ap = (densité optique à 665 nm) - (la turbidité à 750 nm après acidification par 100 μ l d'HCl 1N)

Les résultats sont exprimés en μ g de Chlorophylle *a* ou μ g de Phéophytine *a* par cc (centimètre cube) d'acétone.

Etalonnage du fluorimètre

Après les mesures spectrophotométriques, la solution acétonique de pigments chlorophylliens non acidifiée est lue au fluorimètre après dilution d'un facteur Z (de l'ordre de 20 à 50 selon le cas) afin d'obtenir une fluorescence avant acidification proche du maximum (90 par exemple), dans la zone la plus sensible du fluorimètre.

En mesure fluorimétrique, (Yentch et Menzel, 1963) :

$$[\text{Chla}] / Z = F \cdot r / (r-1) \cdot (F_a - F_b) \quad \text{en } \mu\text{g de chlorophylle } a \text{ par cc d'acétone}$$

$$[\text{Phéo}a] / Z = F \cdot r / (r-1) \cdot (r F_b - F_a) \quad \text{en } \mu\text{g de phéophytine } a \text{ par cc d'acétone}$$

F_a et F_b sont respectivement la fluorescence avant et après acidification par $50\mu\text{l}$ d'HCl 1N de 5 cc d'extrait dilué dans un tube à hémolyse.

F est une constante liée au photomultiplicateur, r est une constante de dosage liée à la lampe de l'ordre de grandeur de F_a/F_b mais égale à F_a/F_b dans le cas unique d'une solution de chlorophylle a pure.

Calculs de F et r

Le rapport $[\text{Chla}]/[\text{Phéo}a]$ est supposé constant quel que soit le facteur de dilution opéré après la lecture spectrophotométrique :

$$[\text{Chla}] / [\text{Phéo}a] = ([\text{Chla}] / Z) / ([\text{Phéo}a] / Z) = Q$$

Un système de 2 équations à 2 inconnues r et F est obtenu en reprenant les équations du dosage fluorimétrique :

$$F \cdot r / (r-1) \cdot (F_a - F_b) = Q \cdot (F \cdot r / (r-1) \cdot (r F_b - F_a))$$

$$F_a - F_b = Q \cdot (r F_b - F_a)$$

$$Q \cdot r \cdot F_b = F_a \cdot (Q+1) - F_b$$

d'où

$$r = (F_a \cdot (Q+1) - F_b) / Q \cdot F_b$$

On remplace r par sa valeur dans une des équations $[\text{Chla}]$ ou $[\text{Phéo}a]$ et on peut en déduire F .

Mode opératoire de la méthode fluorimétrique

- Pigments chlorophylliens en suspension dans l'eau

- Filtrer un volume(*) d'eau de mer (préalablement préfiltrée à 250μ) sur filtre en fibre de verre type *Whatman GFF* de 25 mm de diamètre après adjonction de 1 cc carbonate de Magnésium en suspension à 1 % pour une meilleure conservation des prélèvements.

- Introduire le filtre dans un tube à hémolyse à vis avec 5 cc d'acétone à 90 %.
- Broyer le filtre avec une spatule métallique inoxydable ou une baguette de verre puis boucher le tube.
- Laisser extraire 4 heures au réfrigérateur.
- Centrifuger à 1 000g pendant 15 minutes.
- Transvaser le soluté dans un tube à hémolyse et lire **Fa** puis **Fb** (après acidification par 50 μ l d'HCl 1N).

Recommandations : La verrerie utilisée doit être très propre, sans trace d'acide. Les tubes utilisés pour la lecture au fluorimètre doivent être de même calibre. Les tubes seront le moins possible exposés à la lumière (lors du broyage ou de la lecture) car celle-ci entraîne une dégradation rapide des pigments chlorophylliens.

(*) Compte tenu de la grande sensibilité de l'appareil, les mesures destinées au fluorimètre nécessitent un volume filtré précis de l'ordre de 50 à 100 cc de sorte à ne pas saturer la lecture.

On calcule alors :

$$[\text{Chla}] = F \cdot r / (r-1) \cdot (F_a - F_b) \cdot (V_a/V_f) \cdot 1000$$

en μ g de chlorophylle *a* par litre d'eau de mer

où **Va** est le volume d'acétone (5cc dans ce cas) et **Vf** le volume filtré (50 cc couramment utilisé dans le bassin de Marennes-Oléron)

$$[\text{Phéoa}] = F \cdot r / (r-1) \cdot (r \cdot F_b - F_a) \cdot (V_a/V_f) \cdot 1000$$

en μ g de phéophytine *a* par litre d'eau de mer

- *Cas des biodépôts*

Certaines expériences écophysiologicals génèrent des productions de fécès et pseudofécès sur lesquels sont effectuées des mesures de pigments chlorophylliens.

Il suffit d'ajouter 0,5 cc de la production de biodépôts à 4,5 cc d'acétone pure pour avoir 5 cc d'extrait acétonique à 90 %. Un broyage à la spatule est conseillé pour broyer correctement les éléments phytoplanctoniques et obtenir un mélange homogène. Après les centrifugations, les mesures de fluorescences sont opérées comme ci-dessus.

- *Cas du phytobenthos*

Après carotage et découpage des 3 à 5 premiers millimètres de l'échantillon, un aliquot homogénéisé, de l'ordre de 50 mg de la couche superficielle de vase, est pesé (matière fraîche) et introduite dans un tube à hémolyse à vis.

L'extraction est ensuite opérée avec 5 cc d'acétone à 90 %, broyage, centrifugation, lecture de la fluorescence.

Les résultats sont ensuite rapportés à une unité de surface.

Etude comparée de deux fluorimètres

Equipement

Le laboratoire a récemment acquis un nouveau fluorimètre de marque JENWAY dont la gamme de mesure est plus étendue que celle du fluorimètre TURNER. Les deux appareils sont comparés à partir de 114 prélèvements discrets, réalisés dans le bassin de Marennes-Oléron dans le cadre des programmes REPHY et HYDRO (Suivi hydrobiologique du bassin conchylicole).

Les caractéristiques techniques des deux appareils sont les suivantes :

– *Fluorimètre Turner, modèle 112 :*

- * photomultiplicateur R136
- * lampe F₄T₅ (lampe bleue excitatrice avec un maximum d'émission voisin de 450 nm)
- * filtre d'excitation primaire coloré 430–450 nm
- * filtre d'émission secondaire coloré 650–680 nm
- * filtres (A, B, C, D, E) dont le rôle est de réduire l'intensité de fluorescence

– *Fluorimètre Jenway :*

- * lampe Xenon haute intensité
- * filtre d'excitation coloré 430–450 nm type Corning BG 28 avec filtre d'occultation 3 mm
- * filtre d'émission 650–680 nm type Kodack 29

La gamme des fluorescences lues sur le fluorimètre Jenway s'étend de 0 à 1 200. Dans le cas du fluorimètre Turner, la fluorescence maximale est de 118,0. Pour des fluorescences supérieures, des filtres A, B, C, D, E sont utilisés. Leurs pouvoirs absorbants sont respectivement de 96 %, 91 %, 81 %, 61 %, et 38 %. Les coefficients correcteurs ont été calculés à partir de 100 mesures. Leur valeurs respectives sont de 25 ; 11,4 ; 5,4 ; 2,6 et 1,6 avec des écarts-types importants pour A, B et C.

Les deux appareils ont des caractéristiques différentes. Les facteurs **F** et **r** sont calculés après étalonnage.

	TURNER	JENWAY
F	0,23.10 ⁻³	0,24.10 ⁻³
r	1,87789	1,68814

Résultats – Discussion

Le traitement des données a été abordé à l'aide du logiciel STATGRAPHICS. La relation entre les mesures de chlorophylle *a* et la fluorescence (fig. 1 et 2) est théoriquement de type linéaire (Neveu, 1973). Les relations linéaires sont hautement significatives ($R^2 = 0,94$ et $0,89$). Les relations entre la fluorescence et les concentrations de chlorophylle, s'ajustent aux modèles multiplicatifs suivants :

$$\text{FluoTurner} = 63,44 \cdot \text{Chla}^{0,819}$$

$$\text{FluoJenway} = 59,77 \cdot \text{Chla}^{0,765}$$

Les coefficients de corrélation sont respectivement de 0,97 et 0,96. Si l'ordonnée à l'origine de ces deux fonctions est du même ordre de grandeur (60 et 63), le coefficient allométrique est plus fort dans le cas du fluorimètre Turner (0,819) que dans le cas du Jenway (0,765). La chlorophylle *a* mesurée avec le Turner se trouve d'autant plus surestimée que les concentrations en pigments sont fortes.

La corrélation entre la fluorescence et la chlorophylle *a*, est optimale à partir d'un modèle multiplicatif par comparaison à un modèle linéaire.

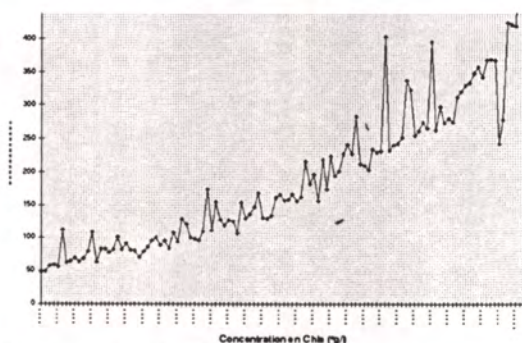


Figure 1 : Evolution de la fluorescence du Turner en fonction de la concentration en pigments.

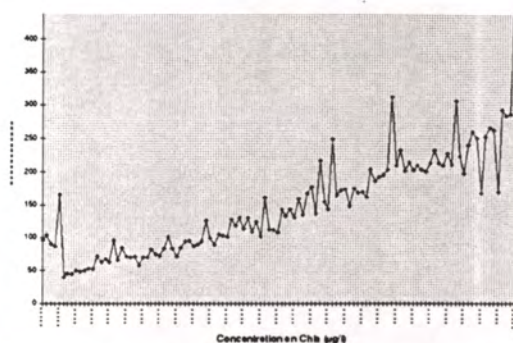


Figure 2 : Evolution de la fluorescence du Jenway en fonction de la concentration en pigments.

Afin d'expliquer ces différences, la comparaison des deux appareils est effectuée avec les différents filtres du fluorimètre Turner au moyen du test non paramétrique de Mann-Whitney et Wilcoxon (tableau 1).

Tableau 1 : Résultat du test « Comparaison de deux variables », niveau de probabilité, test significatif au seuil de 5% (*), de 1% (**), 1‰ (***) .

	Chlorophylle <i>a</i>			Phéopigments		
	Niveau de Probabilité	Significativité du test	Différence Turner-Jenway	Niveau de Probabilité	Significativité du test	Différence Turner-Jenway
Tous échantillons	0,12	NS	Jenway=Turner	0,0002	***	Jenway<Turner
Sans filtre (sur Turner)	0,20	NS	Jenway=Turner	0,012	*	Jenway<Turner
Avec filtre E (sur Turner)	0,87	NS	Jenway=Turner	0,002	**	Jenway<Turner
Avec filtre D (sur Turner)	0,004	**	Jenway<Turner	0,05	*	Jenway<Turner
Avec filtre C (sur Turner)	0,000	***	Jenway<Turner	0,7	NS	Jenway=Turner

Pour l'ensemble des échantillons, la comparaison des valeurs obtenues ne permet pas de mettre en évidence de différence significative au seuil de 5 % pour les chlorophylles *a*. Par contre, il apparaît une différence significative au seuil de 1 ‰ pour les phéopigments (tableau 1).

Le test révèle une différence significative au seuil de 1 % et 1 ‰ dans le cas de chlorophylle *a* lue respectivement avec les filtres D et C. Les chlorophylles *a* mesurées à partir de fluorimètre Turner sont significativement supérieures à celles mesurées à partir du fluorimètre Jenway.

Les phéopigments mesurés avec le fluorimètre Turner sont supérieurs à ceux mesurés avec le fluorimètre Jenway sauf dans le cas d'utilisation du filtre C (Turner).

Cette analyse statistique montre que :

- L'écart de mesure entre la chlorophylle *a* des deux appareils devient significatif avec le filtre D (pouvoir absorbant de 61 %). Il ne l'est pas avec le filtre E (pouvoir absorbant de 38 %).
- L'écart de mesure des phéopigments entre les deux appareils est significatif, sauf pour les échantillons analysés avec le filtre C !...

Les relations entre les valeurs de chlorophylle *a* et de phéopigments issues des deux instruments de mesure (Turner et Jenway) sont présentées sur les figures 3 et 4.

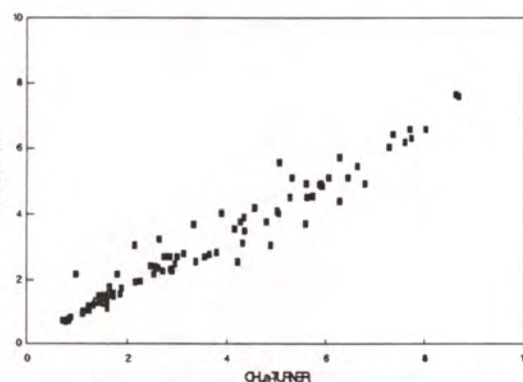


Figure 3 : Relation entre les Chlorophylle *a* ($\mu\text{g/l}$) des fluorimètres Turner et Jenway.

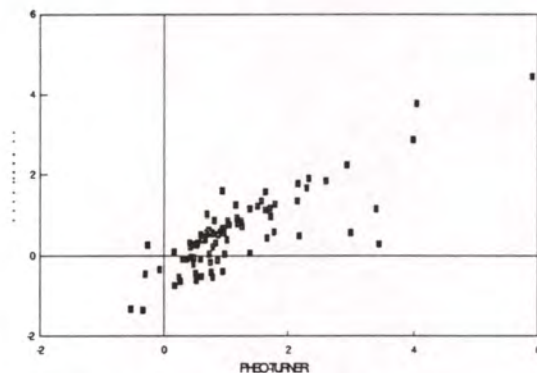


Figure 4 : Relation entre les Phéopigments ($\mu\text{g/l}$) des fluorimètres Turner et Jenway.

Pour ces deux variables, les fonctions de type linéaire s'écrivent :

- pour les chlorophylles *a*

$$\text{Chla}_{\text{Jenway}} = 0,65 + 0,72 \cdot \text{Chla}_{\text{Turner}}$$

- pour les phéopigments

$$\text{Pheo}_{\text{Jenway}} = -0,24 + 0,66 \cdot \text{Pheo}_{\text{Turner}}$$

Les coefficients de corrélation sont respectivement pour ces deux variables de 0,93 et de 0,84. La comparaison des pentes par analyse de variance et test de Fisher montre qu'elles ne diffèrent pas significativement alors que la probabilité d'avoir des ordonnées à l'origine semblables dans le cas des deux régressions, est inférieur à 1 ‰. Par contre, les mesures effectuées par le fluorimètre Jenway, surestiment de 40 et 50 % les mesures de Chlorophylle *a* et phéophytine. La différence pourrait être plus marquée pour les phéopigments (tableau 1 ; fig. 4) car il s'agit d'une mesure secondaire réalisée après acidification de l'échantillon. L'effet des filtres sur le fluorimètre Turner n'est pas neutre. Il semble réaliste de retenir l'hypothèse selon laquelle les filtres entraînent une surestimation des mesures de concentrations. Le fluorimètre Jenway serait un appareil donnant des mesures plus justes.

Etude des performances du photomultiplicateur du fluorimètre Jenway

Origine de l'étude : Reproductibilité imparfaite des lectures de chlorophylle a et de phéophytine a.

La nature des étalons est la suivante :

- Culture de phytoplancton dont l'espèce *Skeletonema costatum* est dominante. Ces cultures sont employées pour nourrir les élevages de l'écloserie et lors des expériences de physiologie.
- Eau douce stagnante où le phytoplancton s'est développé naturellement.
- Chlorophylle a pure du commerce (SIGMA).

Plusieurs dilutions de la solution mère ont été réalisées afin de couvrir la gamme de fluorescence comprise entre 0 et 1 000. Ceci n'était pas pratique sur le fluorimètre Turner où la mesure est comprise entre 0 et 100.

Il ressort de ces étalonnages que les coefficients F et r varient de façon considérable selon l'origine de l'étalon (tableau 2). Par contre, les coefficients restent stables le long de la gamme de fluorescence. La proportion de chlorophylle a varie selon les espèces rencontrées dans les cultures d'algues où la chlorophylle c est caractéristique des Diatomées et Chrysophycées et la chlorophylle b des Chlorophycées.

Tableau 2 : Calcul des facteurs r et F en fonction d'étalons de nature différente et dans la gamme de fluorescence de 15 à 1 000.

Fluorescence	Culture de Phytoplancton <i>Skeletonema costatum</i>		Eau douce		Chlorophylle a Sigma	
	r	F (x 10 ⁻⁵)	r	F (x 10 ⁻⁵)	r	F (x 10 ⁻⁵)
≈ 1000	1,99	25	1,65	32	1,66	31
≈ 600	1,99	24	1,65	31	1,66	31
≈ 300	1,99	24	1,64	31	1,65	30
≈ 150	1,99	23	1,65	29	1,66	31
≈ 75	1,98	23	1,64	29	1,64	32
≈ 30	1,97	23	1,63	30	1,64	30
≈ 15	1,92	22	1,63	30		

Il convient donc d'utiliser pour l'étalonnage l'eau de mer qui a servi aux expérimentations. Il suffira de filtrer un important volume d'eau et de le conserver dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les constantes F et r du photo-multiplicateur, varient dans une large plage, en fonction de la nature de la chlorophylle a.

Remarque : Le rapport FA/FB permet d'évaluer la valeur de r et ainsi de vérifier que l'étalon est d'une nature proche de celle des échantillons.

Les valeurs de r sont identiques sur l'ensemble de la gamme pour un étalon donné avec un écart-type respectivement de 2,7 % ; 2,6 % et 1,5 % pour le *Skeletonema costatum*, l'eau douce, et la chlorophylle a « Sigma », quelle que soit la puissance du photomultiplicateur. L'erreur commise en utilisant un même couple de valeur de r et F sur toute la gamme entraîne une erreur proche de 2 %.

Conclusion

Les moyens mathématiques actuels ont permis d'ajuster la relation de type multiplicative entre la fluorescence et les pigments chlorophylliens. L'erreur liée à l'utilisation des filtres sur le fluorimètre Turner a été mise en évidence. Elle conduit à surestimer les valeurs de Chlorophylle a , d'autant plus fortement que les filtres ont un pouvoir d'absorption fort. L'effet des filtres A et B n'a pu être testé car ils sont rarement utilisés. L'appareil Jenway de part sa large gamme de mesures évite l'introduction de ce type de biais. Avec l'appareil Turner il conviendrait, pour des échantillons de concentration élevée en pigments chlorophylliens, d'effectuer des dilutions en solution acétonique afin d'éviter l'utilisation des filtres.

La constance selon un gradient de fluorescence des facteurs r et F souligne la qualité de la réponse du photomultiplicateur Jenway.

L'étalonnage doit être effectué avec une eau de même nature que celle à analyser.

Références

- Lorenzen C. J., 1967. Determination of chlorophyll and pheophytin, spectrophotometric equations *Limnol. Oceaogr.*, **12**: 343-346.
- Neveu J., 1973. Recherche sur la chlorophylle a et la phéophytine a , en milieu oligotrophe et en milieu eutrophe. Thèse 3ème cycle Paris 6, 150 p.
- Yentsch C. S and D.M. Menzel, 1963. A method for the determination of phytoplakton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep Sea Res.*, **10**: 221-231.

Les Notes Techniques de l'URAPC

NT/URAPC/96-03

Comparaison de deux méthodes de dosage de la matière organique. Analyse thermique et analyse biochimique.



Geairon, P
Razet, D
Soletchnik, P

 **IFREMER**

Sept. 1996

%%%

Les objectifs

%%%

- Etablir les relations entre deux méthodes d'analyse de la matière organique ; une méthode biochimique (mesures de protéines, lipides, glucides et glycogène), et une méthode thermique (mesure de carbone, hydrogène et azote).
- Comparer les deux méthodes d'analyse entre elles pour trois sources de matière organique : chair d'huîtres, matière particulaire en suspension (MPS) et vase.

%%%

Les résultats

%%%

- Les modèles les mieux ajustés entre les constituants biochimiques et élémentaires sont systématiquement des modèles réciproques doubles de type : $Y = 1 / (b + a/x)$.
- Les modèles corrélants lipides et carbone, protéines et azote, sont ajustés à 93–97 % pour la chair de l'huître.
- Les modèles corrélants protéines et azote sont bien moins robustes pour la matière particulaire en suspension (MPS) et la vase.
- Aucune relation n'apparaît entre les lipides et le carbone pour la MPS et la vase. La méthode d'analyse des lipides sur la MPS et la vase est remise en cause.
- Les deux éléments carbone et azote « expliquent » plus de matière organique que l'analyse biochimique des PLG, en particulier pour l'analyse de la matière organique contenue dans la vase.

Position du problème

Les méthodes d'analyse des protéines, lipides et glucides (PLG) dans l'eau de mer utilisées en routine dans le laboratoire, sont des méthodes anciennes (Johnson, 1941 ; Mukerjee, 1956 ; Hewitt, 1958 - d'après Strickland et Parsons, 1965 - ; Dubois *et al.*, 1956). Pour les lipides, la méthode la plus communément utilisée dans les laboratoires côtiers, est la méthode d'extraction de Bligh et Dyer (1959) suivie de la méthode de dosage de Marsh et Weinstein (1966). Pour les protéines, Lowry *et al.* (1951) travaillent sur le sérum du sang. Aucune méthode de dosage des protéines n'est pour l'instant satisfaisante. Toutes ne dosent que partiellement les protéines (Moal *et al.*, 1985). La méthode de Dubois *et al.* (1956), facile à mettre en oeuvre, est largement utilisée pour déterminer la teneur en glucides totaux dans l'eau de mer.

Dès 1976, l'estimation de la capacité trophique pousse l'équipe de l'ISTPM de La Tremblade à mettre au point une technique d'analyse des PLG en eau de mer (Razet, 1976). Les méthodes d'analyse des protéines et lipides sont adaptées aux faibles concentrations de matière organique présentes dans l'eau de mer. Le travail porte principalement sur la recherche et le dosage de réactifs permettant des mesures spectrophotométriques suffisamment sensibles (Razet, 1976).

Les analyses de chair de mollusques sont pratiquées avec plus ou moins de succès au laboratoire dès les années 1970, sur des quantités importantes de chair. Il faut par exemple 1g de chair pour analyser les glucides par la réaction chimique à l'antrone suivi d'un traitement sulfurique (Hewitt, 1958, d'après Strickland et Parsons, 1965).

Dans les années 80, les méthodes d'analyses des PLG sur l'eau, moins coûteuses que les méthodes originelles, et plus sensibles, sont elles-même adaptées à l'analyse des PLG sur la chair. Les lipides sont d'abord purifiés (Bligh et Dyer, 1959). La méthode d'analyse des protéines évolue avec un traitement au réactif de Folin et Ciocalteu (1927) (d'après Strickland et Parsons, 1965).

En 1992, le laboratoire s'équipe d'un autoanalyseur thermique d'éléments : carbone, azote, oxygène et hydrogène, Perkin Elmer.

Selon l'étude envisagée, les deux types d'analyse (biochimique ou thermique) peuvent s'avérer complémentaires. Il peut être justifié de se poser la question sur le choix d'un type d'analyse. Des corrélations peuvent être établies entre les deux méthodes (Gnaiger et Bitterlich, 1984). Les difficultés matérielles, les contraintes de temps et les charges de travail amènent une réflexion sur le choix de la méthode analytique (Mazurié, 1995).

Sans avoir l'ambition d'une étude chimique, cette étude tente de faire le point sur les méthodologies d'analyse mises en oeuvre au laboratoire de la Tremblade. Elle tente d'apporter quelques éléments de réponse à ces questions en confrontant les résultats obtenus avec les deux types d'analyse sur différentes sources de matière organique.

Matériel et méthode

1. Origine des prélèvements

Les analyses sur la chair d'huîtres proviennent d'une population de 94 huîtres constituées par moitié de triploïdes et de diploïdes.

85 prélèvements d'eau de mer (matière particulaire en suspension -MPS-) et 48 prélèvements de vase proviennent de l'expérimentation en claires ostréicoles de 1994.

2. Méthodes de prélèvement

Les échantillons de chair des mollusques sont égouttés, congelés individuellement, et lyophilisés pendant 36 heures. Les animaux sont pesés et un broyage (broyeur à bille pendant 15 mn) permet d'obtenir une poudre fine et homogène.

De 250 à 500 ml de d'eau sont filtrés sur filtres Whatman GFF (1 μ) pour l'analyse des échantillons de MPS.

Les échantillons de vase sont obtenus en traitant la couche superficielle d'une carotte de sédiment.

3. Méthodes analytiques

3.1. Méthodes d'analyse des PLG sur la chair

La méthode est détaillée dans la première partie de ce rapport (URAPC/NT96-01).

Mesure des protéines :

Une fraction d'environ 10 mg de poudre est ajoutée à 10 cc de soude 1N pour extraction dans un tube de 15 cc en polycarbonate pour une durée de 30 minutes à 60°C ou 24 heures à température ambiante. Un aliquot de 0,5 cc est neutralisé par 0,5 cc d'acide sulfurique 1N dans un autre tube. Une solution tamponnée de cuivre y est ajoutée, la réaction du biuret se développe alors, la révélation amplifiée de la couleur est assurée par le réactif de Folin et Ciocalteu. La mesure spectrophotométrique de la D.O à 750 nm est comparée à une série de standards à base d'albumine de boeuf.

Mesure des lipides :

Une fraction d'environ 10 mg de poudre est ajoutée à 1 cc de chloroforme et 2 cc de méthanol pour extraction et purification. Après homogénéisation et centrifugation le surnageant est pipeté dans un tube à hémolyse, le culot est conservé pour le dosage des glucides, un ajout de 4 cc d'eau à la phase organique après agitation et décantation permet la séparation de la phase lipidique chloroformée de la phase aqueuse. La partie aqueuse est éliminée par aspiration, le reste est évaporé sous atmosphère d'azote, le résidu constitue la phase lipidique qui subit ensuite une hydrolyse acide en milieu sulfurique pur dans un bloc chauffant à 200°C. Une coloration brune se développe, après dilution la D.O. est mesurée à 360 nm et comparée à une série d'étalons à base d'acide tripalmitique.

Mesure des sucres totaux (d'après la méthode de Dubois et al., 1956) :

Le culot de l'extraction des lipides est homogénéisé dans 3 cc de T.C.A. à 15 %. Après avoir laissé agir pendant une heure à 4°C et après homogénéisation, une centrifugation va éclaircir le surnageant. 0,5 cc sont prélevés et additionnés de 1 cc de phénol à 5 %. Après repos de 40 minutes, 0,5 cc d'acide sulfurique concentré sont ajoutés, une homogénéisation est effectuée et après 10 minutes d'attente, une lecture de la D.O. est alors opérée à 490 nm et comparée à des solutions étalons à structure de glucose ayant subi le même traitement.

Rq. L'analyse des glucides ne s'effectue plus à partir du culot d'extraction des lipides comme cela était encore le cas pour cette expérience.

Mesure du glycogène :

0,5 cc de la solution précédente (avec T.C.A.) sont mélangés à 4 cc d'éthanol absolu ayant la propriété de précipiter le glycogène. Après centrifugation et élimination du surnageant 0,5 cc d'eau bouillante distillée sont introduits pour redissoudre le glycogène cristallisé. Le même traitement phénol-sulfurique est opéré comme précédemment. La lecture de la D.O. est faite à 490 nm et comparée à des solutions étalons à base de glucose ayant subi le même traitement. Si les résultats sont exprimés en équivalent glycogène il est nécessaire de diviser la concentration équivalent glucose par 0,9.

3.2. Méthodes d'analyse des PLG sur la matière particulaire en suspension et la vase

Les prélèvements sont homogénéisés et préfiltrés sur 250 μm . L'analyse des glucides et des protéines (acides aminés) se fait sur 250 ml, l'analyse des lipides sur 500 ml. La méthode consiste à filtrer l'eau de mer sur fibre de verre (Whatman GFF 0,7 μm) pour conserver les lipides, les protéines et les glucides. Ces filtres sont ensuite broyés en présence de différents réactifs en fonction des protocoles utilisés. La mesure est faite sur les protéines et les glucides particuliers présents dans les organismes vivants ou les composés organiques, puisque les molécules dosées sont solubles dans l'eau de mer.

Dosages des protéines particulières selon la méthode de Lowry et al., 1951

La méthode de Lowry (1951) appliquée aux sérums humains, a été modifiée pour déterminer les traces de protéines en augmentant les proportions des réactifs (Razet, 1976) (protéines présentes dans l'eau de mer sous forme de déchets organiques ou d'organismes vivants)

Dosages des lipides particuliers selon la méthode de Marsh et Weinstein (1966)

Les lipides forment un groupe de composés très hétérogènes, contrairement aux glucides. Ils ont été réunis en raison de leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques (éther, acétone, mélanges chloroformes-alcools...).

L'hydrolyse acide et à chaud permet de libérer les acides gras de la matière organique filtrée. Elle révèle la formation d'un complexe de coloration brune plus ou moins foncée en fonction de sa concentration. Cette coloration brune a un maximum d'absorption aux environs de 360 nm.

Les densités optiques lues au spectrophotomètre sont à comparer à celles obtenues à partir d'une solution standard évaporée d'acide tripalmitique à des concentrations comprises entre 0 et 200 $\mu\text{g/ml}$.

Dosages des glucides particuliers selon la méthode de Dubois et al., 1956

En 1951, Dubois a déclaré, après expérimentation, que « le phénol en présence d'acide sulfurique concentré peut être utilisé pour déterminer par colorimétrie des micro-quantités d'oses et leurs dérivés, d'osides et de polyholosides présents dans l'eau de mer ». Cette méthode est simple, rapide, et donne des résultats reproductibles. Le principe est la formation de furfural ou d'hydroxyméthyl furfural en présence d'un acide minéral fort. Ces composés réagissent avec le phénol pour donner un complexe coloré. Les réactifs sont bons marchés et stables. De plus, la coloration brune-orangée est également très stable. Les densités optiques lues au spectrophotomètre sont à comparer à la courbe d'étalonnage du glucose à des concentrations comprises entre 0 et 200 $\mu\text{g/ml}$. Les sucres présents sont mis en équivalence avec le glucose. La concentration en glucide est déduite automatiquement de la courbe d'étalonnage par le spectrophotomètre.

3.3. Mesure du carbone et de l'azote élémentaires par le CHNS/O 2400

L'analyseur thermique CHNS/O 2400 permet de déterminer les quantités de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène présentes dans un échantillon. Pour cette étude, seules les concentrations en carbone et en azote présents dans les particules en suspension sont mesurées.

Principe :

L'échantillon (filtre et matière organique) contenu dans une petite capsule d'aluminium est introduit automatiquement dans un four maintenu à la température de 925°C et dans lequel passe un courant d'hélium. Lors de l'introduction, ce courant d'hélium est enrichi par une quantité déterminée d'oxygène pur pour permettre la combustion éclair (Flash combustion) de la capsule et de l'échantillon. Les gaz de combustion, entraînés par le courant d'hélium, passent sur un catalyseur (Cr_2O_3) qui les oxyde en CO_2 et NO_2 . Ces gaz résultants sont ensuite réduits (colonne de cuivre à réduction à 640°C) pour éliminer l'excès d'oxygène et réduire NO_2 en N_2 . De plus, ils sont homogénéisés et contrôlés afin que leur pression, température et volume soient constants. Ces gaz sont ensuite séparés par chromatographie en phase gazeuse et quantifiés en fonction de leur conductivité thermique.

Le CHN utilisé est un PERKIN-ELMER Série II CHN/O Analyser qui se compose d'un CHN, d'une microbalance, d'une unité centrale et son clavier, d'un moniteur couleur et d'une imprimante.

Dans le cas d'analyse d'eau de mer (MPS), un volume de 125 ml d'eau de mer est filtré. Pour la chair, une fraction aliquote de l'ordre de 2 mg est introduite dans une nacelle en étain, pesée sur microbalance au 1/10 de μg . Les échantillons sont ensuite disposés dans le distributeur de l'autoanalyseur PERKIN ELMER 2400 série II CHN mode. Les résultats sont exprimés alors en mg de carbone d'hydrogène et d'azote par animal.

Résultats

Pour les trois sources de matière organique (chair, MPS et vase), les modèles établis entre lipides, glucides et carbone et entre protéines et azote (tableau 1), sont mieux ajustés par le modèle réciproque double de type :

$$Y = 1 / (b + a/X) \text{ que par un modèle linéaire : } Y = b + aX.$$

Les coefficients de corrélation obtenus avec ce dernier modèle sont de 5 % à 20 % supérieurs à ceux obtenus avec le modèle linéaire (sauf dans le cas du modèle : glucides f (carb.)) (tableau 1).

Tableau 1 : Relations entre les analyses de carbone et azote (CN) et les analyses biochimiques (protéines, lipides et glucides -PLG) pour les trois sources de matière organique (chair, MPS et vase)

analyses	relations	coefficient de corrélation		coefficients du modèle double réciproque: y = 1/(a+b/x)	
		modèle linéaire (1)	double réciproque (2)	a	b
chair	lipides f(carb.)	88,5	93,0	0,0105	4,231
	protéines f(azot.)	90,4	97,0	0	0,255
	glucides f(carb.)	29,1	18,0	0,052	9,573
	PLG f(carb.)	92,7	97,5	0	0,891
	CHN f(PLG)	91,6	97,2	0	0,831
eau de mer	lipides f(carb.)	0,5	0,4	pas de modèle	significatif
	protéines f(azot.)	52,7	58,6	0,285 (NS)	0,361
	glucides f(carb.)	24,6	12,6	0	0,0360
	PLG f(carb.)	30,9	39,6	0,494	1,624
	CN f(PLG)	37,8	47,3	0,445	0,232
vase	lipides f(carb.)	0,2	0,4	pas de modèle	significatif
	protéines f(azot.)	49,9	55,6	3,68	0,298
	glucides f(carb.)	21,3	40,1	-83,74	32,5
	PLG f(carb.)	38,5	55,4	1,809	1,670
	CN f(PLG)	46,2	61,7	0,879	0,310

* Le modèle de glucides f(carb.) est le moins bien ajusté pour la chair (fig. 1c). Ce résultat reflète le biais méthodologique d'analyse des glucides à partir du culot d'extraction des lipides (NT/URAPC/96-01). Ce biais analytique n'existe pas dans le cas des analyses d'eau (MPS) et de vase.

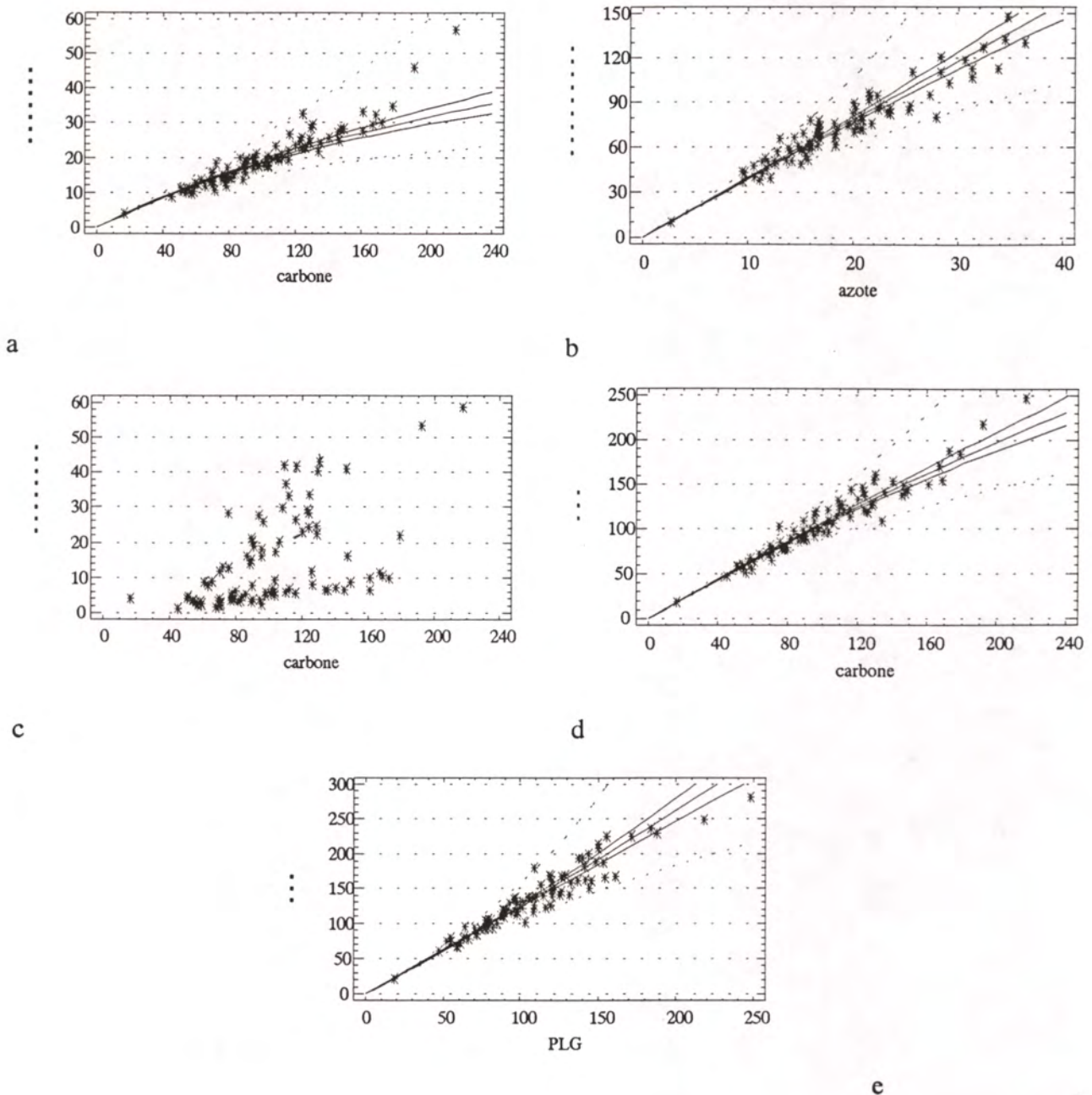


Figure 1 : Régressions réciproques doubles entre les composants de la **chair d'huîtres**.

* Sur la chair, les modèles d'ajustement entre les constituants biochimiques et l'analyse élémentaire sont hautement significatifs ($93 \% < R^2 < 97 \%$) (tableau 1), sauf pour l'analyse des glucides (fig. 1c). La situation est tout autre pour les analyses de matière organique à partir des échantillons de MPS ou de la vase (fig. 2 et 3). Si les modèles protéine f (azote) ont un coefficient de corrélation de 56 - 59 %, les coefficients de corrélation entre la teneur en lipides et le carbone, sont proches de 0. **Aucun modèle significatif ne peut être appliqué à ces données** (tableau 1 ; fig. 2a et 3a).

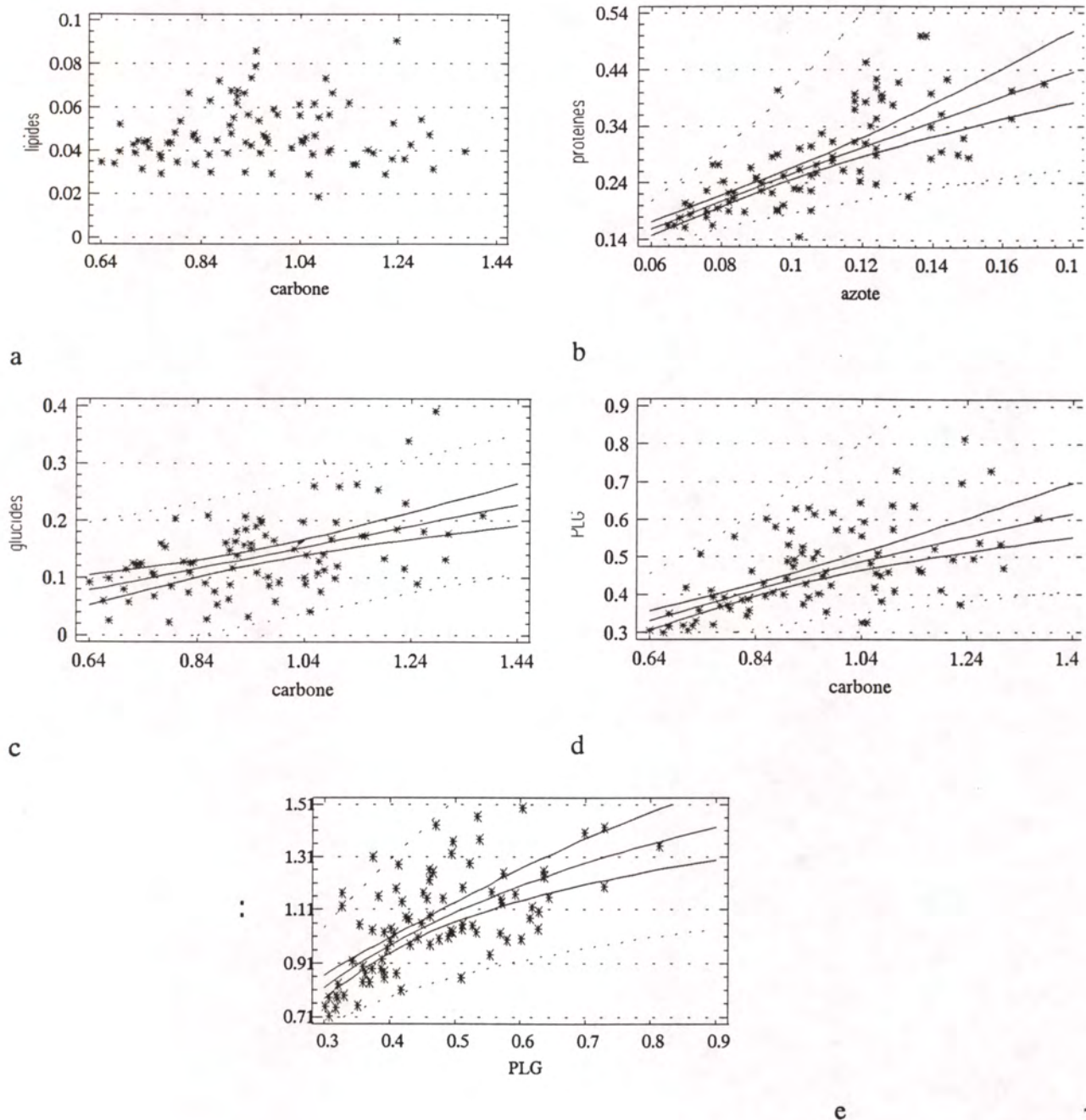


Figure 2 : Régressions réciproques doubles entre les composants organiques de la **matière particulaire en suspension (MPS)**.

* Les relations entre glucides et carbones (glucides f (carb.)) sont moins bien ajustées. Les coefficients de corrélation entre les deux variables glucide et carbone, sont respectivement de 18,0 ; 12,6 et 40,1 pour la chair, la matière particulaire en suspension et la vase (tableau 1).

* Le carbone peut s'exprimer en fonction des constituants biochimiques : prot., lip. et gluc (tableau 2). Si le coefficient de corrélation est de 95,7 % pour la chair, les modèles sont moins bien ajustés pour la MPS et la vase (38,8 et 43,0 %). Pour ces deux modèles, les

coefficients associés aux lipides ne sont pas significatifs. On retrouve là l'absence d'ajustement entre les lipides et le carbone (fig. 2a et 3a).

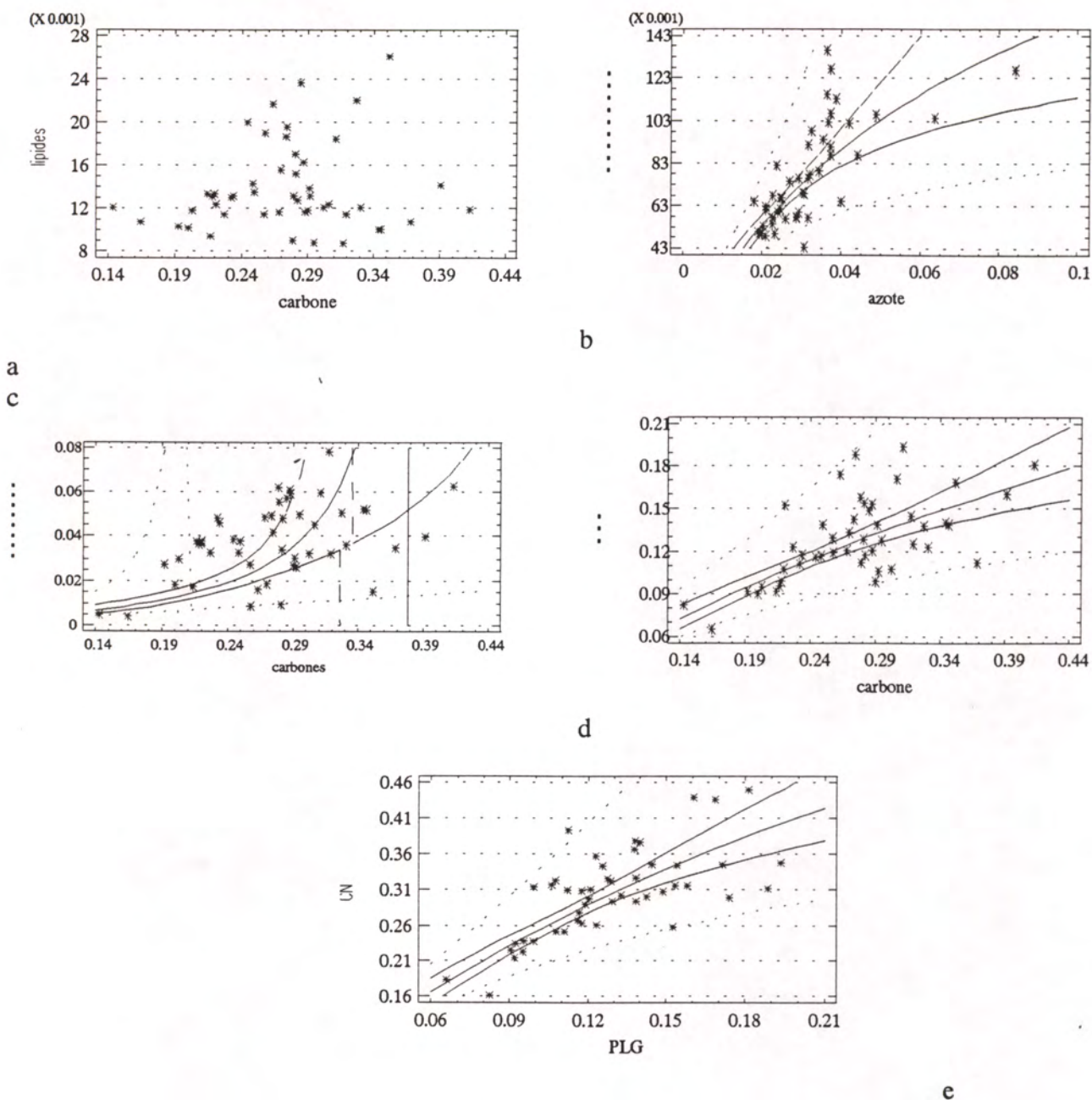


Figure 3 : Régressions réciproques doubles entre les composants organiques de la vase.

Tableau 2 : Relations linéaires entre le carbone et les différents constituants biochimiques.
() : niveau de probabilité.

modèle: carb. f (PLG).					
carb = a (prot) + b (lip) + c (gluc) + cte					
	R ²	a	b	c	cte
chair	95,7	0,756 (0,000)	2,169 (0,000)	0,192 (0,000)	0,277 (0,912)
hydro	38,8	0,847 (0,000)	-1,956 (0,105)	1,386 (0,000)	0,620 (0,000)
vase	43,0	1,102 (0,000)	-0,014 (0,994)	1,740 (0,000)	0,124 (0,000)

* Si la pente des relations pour la chair et la matière particulaire en suspension (MST) est proche de 1, cette pente est de 1,46 dans le cas de la vase (tableau 3). A nouveau on peut s'interroger sur la différence de réponses entre la MPS et la vase... Dans les deux cas de figure (chair et MPS), l'analyse élémentaire de seulement deux constituants de la matière organique organique (C et N), permet d'expliquer autant de matière que l'analyse biochimique. Dans le cas de la vase, l'analyse thermique élémentaire est presque 50 % plus "explicative" que l'analyse biochimique (tableau 3).

Tableau 3 : Relations linéaires entre les analyses de carbone et azote (CN) et les analyse biochimiques (PLG). () : niveau de probabilité.

modèle: CN = a (PLG) + b			
	R ²	a	b
chair	91,3	1,058 (0,000)	6,91 (0,076)
MPS	37,7	1,021 (0,000)	0,586 (0,000)
vase	46,2	1,458 (0,000)	0,118 (0,000)

Discussion

* Méthodes d'analyse des protéines

Au laboratoire de la Tremblade, la méthode d'analyse des protéines évolue d'une méthode de Biuret - Lowry, à cette même méthode complétée de celle de Folin et Ciocalteu (1927) (d'après Strickland et Parsons, 1965) dont le principe est de laisser réagir une réaction de phénol sur les protéines dont la composition est proche de la tyrosine et du tryptophane. Dans la méthode de dosage de l'azote par la méthode de Nessler - Kjeldahl (Johnson, 1941 d'après Strickland et Parsons, 1965), le coefficient de conversion moyen entre l'azote et les protéines est de 6,25 (Strickland et Parsons, 1965). Il est réévalué à 5,8 par Gnaiger et Bitterlich en 1984. Dans le cas de cette étude, le coefficient est de 2,43 pour le seston, alors que l'azote est dosé par un autoanalyseur thermique. Les coefficients de conversion sont obtenus en considérant un modèle linéaire approximatif entre les deux variables azote et protéines. Ce coefficient est de 3,48 pour la chair, 2,43 pour l'eau, et 1,43 pour la vase. Deux

hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer l'écart des rapports: protéines/azote en comparaison avec les valeurs de Strickland et Gnaiger : environ 50 % des protéines seulement sont dosées par la méthode de Lowry, et le dosage est d'autant plus mauvais que l'on passe de la chair à l'eau, et de l'eau à la vase..., soit la matière organique est riche en azote d'origine non protéique (Gnaiger et Bitterlich, 1984), et ce rapport baisse d'autant plus quand on passe de l'eau (2,43) à la vase (1,43).

Sur des méthodes comparées entre biuret, Lowry *et al.* (1951), Bradford (1976) et le dosage à la fluorescamine, Moal *et al.* (1985) concluent à l'imperfection de l'ensemble des dosages qui ne peuvent approcher une valeur absolue de protéines.

* Méthodes d'analyse des carbohydrates

La détermination de la teneur en glucides totaux dans l'eau de mer est classiquement réalisée par la méthode de Dubois (1956). La qualité des mesures peut toutefois être améliorée en utilisant les corrections de Gerchakov et Hatcher (1972) ou Delmas (1981) (d'après Moal *et al.*, 1985). Mopper (1987) (dans une étude comparative présentée par Moal *et al.*, 1985) montre comment les analyses peuvent être optimisées différemment entre des échantillons de vase et de matière organique en suspension. Une revue de la variabilité méthodologique obtenue au cours de différentes études, permet de comprendre l'intérêt d'une standardisation de la méthode d'analyse. La variante apportée par Malara et Charra (1972), est retenue dans le protocole analytique préconisé par Moal *et al.* (1985).

Pour l'eau de mer, l'analyse des carbohydrates est riche en informations sur l'origine, l'ancienneté de la matière organique particulière (Chevolot *et al.*, 1985) et dépasse largement l'intérêt d'une détermination quantitative du carbone élémentaire.

* Méthodes d'analyse des lipides

La méthode d'extraction de Bligh et Dyer (1959) est la plus largement répandue en océanographie. Elle est considérée comme l'une des meilleures sur le plan de l'efficacité d'extraction et la reproductibilité des résultats (Moal *et al.*, 1985). La méthode de dosage de Marsh et Weinstein (1966), utilisée dans cette étude, semble équivalente à celle de d'Amenta (1964) (d'après Moal *et al.*, 1985). Cette méthode a été validée en comparant ses résultats à des mesures énergétiques de combustion à la bombe calorimétrique (Deslous-Paoli *et al.*, 1988). L'une ou l'autre de ces deux méthodes colorimétriques exigent un extrait lipidique sans contaminant.

Parmi les analyses biochimiques, la méthode d'analyse des lipides est probablement la plus simple et la moins controversée. Pourtant, dans cette étude, c'est avec ce composant biochimique particulier qu'apparaît l'absence de corrélation avec le carbone, dans le cas de la matière organique contenue dans le seston et dans la vase. L'hypothèse retenue est celle d'une imprécision méthodologique lors de l'extraction, qui demande une remise en cause de méthode.

Conclusion

Cette étude tente de comparer, sur la base de quelques exemples, les analyses élémentaires et les analyses biochimiques. Dans le cas de la chair de l'huître les modèles (lipides f(carbone) et protéines f(azote)) sont bien ajustés et simples. Les modèles inverses peuvent se calculer aisément. Pour les études à venir, la correction méthodologique apportée aux dosages des glucides doit permettre de renforcer la robustesse du modèle : glucide f(carbone).

L'analyse élémentaire semble plus fiable pour doser quantitativement la matière organique quelle que soit son origine. Elle peut donc avantageusement se substituer aux analyses de PLG pour déterminer la valeur énergétique de la matière organique. Les limites des analyses biochimiques, dont les références étalon sont très spécifiques de constituants biochimiques peu représentés dans le milieu marin, ont déjà été largement évoquées. Toutefois, l'information apportée par l'analyse biochimique de la matière organique, n'est pas restrictivement énergétique. La biochimie décrite grâce aux mesures de PLG apporte bien des informations biologiques (tant pour la chair que pour d'autres sources de matières organiques) que l'analyse thermique ne peut amener. Un manque de précision notable existe toutefois sur les résultats biochimiques, principalement sur le dosage des protéines, et ces résultats doivent être considérés avec circonspection...

Pour les autres composants biochimiques (lipides et glucides), les relations avec le carbone sont significatives. Une évaluation similaire sur d'autres conditions expérimentales doit être envisagée.

Enfin, cette étude a montré combien la mesure de lipides en eau de mer et dans la vase est imprécise. Ce résultat remet en cause la méthode même d'analyse des lipides dans la matière particulaire en suspension et dans la vase.....

références

- Bligh E. G. and W. F. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911-917.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical biochemistry.*, **72**: 248-254.
- Chevolot L., W. Senior et P. Courtot, 1985. Origine des carbohydrates particuliers et problèmes posés par le dosage des sucres : premiers résultats concernant la rade de Brest. *Océanis*, **11**: 367-382.

- Deslous-Paoli J.M., M. Héral, M. Jousset, S. Boromthanasat, P. Gouilletquer and P.G. Sauriau, 1988. Total lipid content and lipid energetic values of bivalve molluscs. *Comp. Bioch. Physio.* **89 B** (1): 51-53.
- Dubois M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- Gnaiger E. and G. Bitterlich, 1984. Proximate biochemical composition and coloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia*, **62**: 289-298.
- Lowry O.H., N. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Malara, G. et R. Charra, 1972. Dosage des glucides particuliers du phytoplancton selon la méthode de Dubois. Note de travail n° 6. Université de Paris VI. Station zoologique. Villefranche-sur-mer.
- Marsh J.B. and D.B. Weinstein, 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.*, **7**: 574-576
- Mazurié J., 1995. Optimisation du protocole REMORA. Avantages et inconvénients des mesures ou analyses groupées. Application aux analyses biochimiques.
- Moal J., J.F. Samain, J.F. Le Coz et J.Y. Daniel, 1985. Protéines, glucides, lipides particuliers: aspects méthodologiques. *Océanis*, **5** : 487-502
- Razet D., 1976. Dosage des protéines dissoutes ou particulières d'après la méthode de Lowry. Note technique interne de l'ISTPM, 4p.
- Strickland and Parsons, 1965. A manual of sea water analysis. *Fisheries research board of Canada*, **125**, 203p.

Remerciements :

Les auteurs tiennent à remercier Sylvie Taillade pour sa contribution technique aux activités de l'équipe.

N°RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUS	NB PAGES	TIRAGE
96-01	DRV/RA	RA/LA TRINITE	E.GOYARD	REMORA 93 : ANALYSE DES RESULTATS DE LA PREMIERE ANNEE DU RESEAU DE SUIVI DE LA CROISSANCE DE L'HUITRE CREUSE SUR LES COTES FRANCAISES	jan-96	Libre	60	?
96-02+A3	DRV/RH	RH/SETE	M.TAQUET, Y.GUENNEGAN, J.BERTRAND	INVENTAIRE ET ORGANISATION DES DONNEES HALIEUTIQUES. REALISATION D'UN OUTIL DOCUMENTAIRE	jan-96	Libre	121	30
96-03	DRV/RA	RA/PORT EN BESSIN, RA/ LA TREMBLADE	M.ROPERT, P.GOULLETQUER, J.P.JOLY, P.GEAIRO, S.LEBOURHIS, E.LEGAGNEUR, F.RUELLE	DEVELOPPEMENT ET PROLIFERATION D'UNE POPULATION D'ANNELIDES TUBICOLES LANICE CONCHILEGA ASSOCIE A LA CONCHYLICULTURE EN BAIE DES VEYS (BAIE DE SEINE OCCIDENTALE)	jan-96	Libre	66	100
96-04	DRV/RH	RH/L'HOUMEAU	R.GUICHET	LE MERLU EUROPEEN (MERLUCCIOUS MERLUCCIOUS) - BILAN DES CONNAISSANCES BIOLOGIQUES - EVOLUTION DE L'EXPLOITATION - EVALUATIONS DES STOCKS ET MESURES DE GESTION	avr-96	Libre	55	50
96-05	DRV/RA	RA/LA TREMBLADE	P. SOLETCHNICK, P. GEAIRO, D. RAZET, P. GOULLETQUER	PHYSIOLOGIE DE LA MATURATION ET DE LA PONTE CHEZ L'HUITRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	avr-96	Libre	32	50
96-06	DRV/RA	RA/BOUIN	J. HAURE, M. NOURRY, N. LE BAYON, J.P. BAUD	CONTRÔLE DES PERFORMANCES DES SOUCHES D'HUITRES PLATES RESISTANTES AU PROTOZOIRE <i>BONAMIA OSTREAE</i> . 2ème année.	mai-96	Libre	36	60
96-07	DRV/RH	RH/NANTES-DEL/BREST	D.HALGAND, G.ARZUL, E. ERAD-LE DENN, L. FIANT, J.HUET, F. QUINIOU, F.ROGER	SURVEILLANCE ECOLOGIQUE ET HALIEUTIQUE DE L'ENVIRONNEMENT MARIN DU SITE DE LA CENTRALE DE PENLY (MANCHE EST) : ANNEE 1995	jun-96	Restreinte	138	38
96-08	DRV/RA	RA/NOIRMOUTIER	V.BUCHET, A. BLUTEAU	ETUDE D'UN ELEVAGE INTEGRE BARS-HUITRES. INFLUENCE DE DEUX GESTIONS HYDRAULIQUES DE L'ELEVAGE PISCICOLE SUR LE PREGROSSISSEMENT D'HUITRES.	jul-96	Libre	36	60
96-09	DRV/RA	RA/TRINITE	E.GOYARD & coll	REMORA 94 : ANALYSE DES RESULTATS DE LA SECONDE ANNEE DU RESEAU DE SUIVI DE LA CROISSANCE DE L'HUITRE CREUSE SUR LES COTES FRANCAISES	jul-96	Libre	62	100
96-10	DRV/RA	RA/LA TREMBLADE	M.J. DARDIGNAC	LA MYTILICULTURE DANS LE PERTUIS BRETON : SYNTHÈSE DES TRAVAUX REALISES DE 1980 A 1992.	sep-96	Libre	95	60
96-11	DRV/RA	RA/LA TREMBLADE	D. RAZET, P. GEAIRO, N. FAURY, P. SOLETCHNIK, P. GOULLETQUER	METHODES D'ANALYSES DE LA MATIERE ORGANIQUE ; METHODES BIOCHIMIQUES, METHODES D'ANALYSE DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS ET ANALYSE THERMIQUE ELEMENTAIRE	nov-96	Libre	40	60



IFREMER

Siège social : 155, Rue Jean-Jacques Rousseau - 92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
Tél. 46 48 21 00