

Détermination de la chlorophylle a par fluorimétrie

Rédigé par :

Isabelle Billy
Louise Oriol
Laure Mousseau
Ornella Passafiume

Evolution/Corrections :

Elsa Breton
Maïa Durozier

Visé par :

Philippe PINEAU,
responsable qualité national
Le : 31 Janvier 2023



I-Introduction

La mesure de la chlorophylle *a* est un indicateur de la biomasse phytoplanctonique du milieu marin. Ce pigment est présent chez tous les organismes photosynthétiques aérobies ; il est sensible à la lumière et à la température et peut être dégradé en présence d'acide.

La méthode fluorimétrique préconisée a été élaborée par Yentsch et Menzel (1963), puis Holm-Hansen et al (1965), et Strickland et Parsons (1972). Elle utilise la propriété qu'ont les pigments chlorophylliens d'émettre une fluorescence rouge lorsqu'ils sont excités par de la lumière bleue ou ultra-violette. Le fluorimètre doit donc être équipé d'une lampe émettant dans le bleu, d'un filtre d'excitation bleu (420-450nm) et d'un filtre d'émission rouge (> 665nm). La méthode présentée ici est basée sur la mesure de fluorescence de l'échantillon avant et après acidification. Rapide et simple d'utilisation, cette méthode est cependant très influencée par les chlorophylles accessoires et les phéopigments. Pour une mesure plus précise, il sera donc préférable d'utiliser une méthode spectrofluorimétrique sans acidification.

La formule de calcul de la concentration en phéophytine *a* est donc donnée à titre informatif. Les concentrations en chlorophylle *a* sont exprimées en $\mu\text{g/l}$, et la précision analytique requise est de +/- 15%.

II - Précautions particulières

La chlorophylle *a* est très sensible à une élévation de température, une forte intensité lumineuse et des vapeurs acides. Toutes les étapes doivent donc être réalisées le plus possible à l'abri de la lumière et de la chaleur et dans une atmosphère exempte de vapeurs d'acide.

La préparation des réactifs, mais également la préparation des échantillons, ainsi que la mesure au fluorimètre doivent se faire sous hotte aspirante afin d'éviter au manipulateur le contact avec les vapeurs toxiques d'acétone ; le préparateur doit porter gants et blouse. Il ne doit pas y avoir de manipulation d'acide sous cette hotte pour éviter toute contamination et toute dégradation des pigments par des traces d'acide.

III - Matériel et appareillage utilisés

- ✓ Bouteille de prélèvement Niskin
- ✓ Glacière et pains de glace pour le transport
- ✓ Flacons de prélèvement opaques
- ✓ Filtres GF/F de diamètre 25 mm ou 47 mm (adapté à la station)
- ✓ Pinces à bouts plats
- ✓ Tubes de stockage
- ✓ Tubes d'extraction à bouchage hermétique
- ✓ Baguette de verre à brisure nette
- ✓ Centrifugeuse 3000 tr/min réfrigérée
- ✓ Tubes de lecture
- ✓ Fluorimètre Turner Design 10-AU (recommandé)
- ✓ Spectrophotomètre
- ✓ Standard solide de chlorophylle (10-AU-904 ou 7000-904 chez Turner Designs par exemple)

IV - Produits chimiques utilisés

Acétone pure 99% qualité pour analyse.

HCl 37% qualité pour analyse.

Chlorophylle a (Sigma-Aldrich : *Anacystis nidulans* : ref C-6144 ou *Chlorophyll a from Spinach* : ref C-5753).

Pour les fiches de sécurité, consulter le site de l'Institut National de Recherche et de Sécurité :

<http://www.inrs.fr>

V - Préparation du matériel

Avant la sortie en mer, s'assurer de la présence à bord du bateau des flacons opaques propres et étiquetés ainsi que d'une glacière contenant des pains de glace pour le transport des échantillons.

VI - Prélèvement, conditionnement et conservation des échantillons

Les prélèvements d'eau de mer sont réalisés à l'aide de bouteilles Niskin.

L'eau est stockée dans des flacons opaques rincés 3 fois avec l'échantillon, en utilisant des tuyaux souples. Les échantillons d'eau de mer sont conservés au frais et à l'abri de la lumière (e.g. dans une glacière munie de pains de glace).

La filtration par *aspiration sous vide* doit être réalisée le plus rapidement possible après le prélèvement (pas plus de 2 heures). La rampe de filtration est reliée à une pompe à vide munie d'un manomètre. Le vide ne doit pas dépasser 0,2 bar de dépression (ou 150 mm de Hg).

Utiliser des filtres Whatman GF/F (0,7 μ m de porosité) de 25mm ou 47mm de diamètre. Placer le filtre sur la base de filtration à l'aide de pinces à bouts plats. Placer l'entonnoir de filtration.

Homogénéiser le flacon de prélèvement par quelques retournements. Procéder à une agitation douce car une agitation vigoureuse risque d'éclater les cellules phytoplanctoniques.

Filtrer entre 0,1L et 1L (volume mesuré à l'éprouvette préalablement rincée à l'eau de l'échantillon), en fonction des caractéristiques du milieu.

Couvrir les entonnoirs et l'éprouvette, par exemple de papier aluminium, pendant la filtration. En fin de filtration, rincer l'entonnoir de filtration avec de l'eau de mer fraîchement filtrée et de salinité équivalente (il est toléré de ne pas faire cette étape de rinçage dans les eaux oligotrophes). Juste avant que le filtre ne vienne à sec, arrêter le vide (pour éviter l'éclatement des cellules).

Plier le filtre à l'aide des pinces, face chargée à l'intérieur. Éviter tout contact des pinces et des particules présentes sur le filtre.

VII - Conservation et stockage

Placer le filtre dans un tube d'extraction si l'analyse se fait immédiatement ou dans un tube de stockage identifié au numéro de l'échantillon ou dans du papier aluminium s'il est conservé au surgélateur.

Réaliser immédiatement l'extraction à l'acétone dans le tube d'extraction ou placer immédiatement le tube de stockage à -20°C (délai de conservation : 4 semaines maximum) ou à -80°C (délai de conservation : 3 mois) ou dans l'azote liquide à -196°C (délai de conservation : 1 an). [Chaque station devra préciser le lieu de stockage]. Si l'échantillon doit être déplacé, veiller à ce qu'il le soit toujours à température négative.

VIII - Préparation des réactifs :

Préparation de l'acétone à 90%

Dans une éprouvette de 1 litre, introduire 900ml d'acétone pure. Ajouter 100ml d'eau déionisée mesurés à l'aide d'une éprouvette de 100ml. Ne jamais compléter l'éprouvette de 1L contenant l'acétone par 100 ml d'eau directement à cause des différences de viscosité et de densité.

Boucher l'éprouvette, agiter, puis remplir le flacon du distributeur d'acétone à 90%. Verser le surplus d'acétone à 90% dans un flacon bien bouché, et stocker si possible, dans une armoire à solvant ventilée.

Attention : ne pas se placer sous la hotte à acide pour effectuer cette dilution !

Préparation de HCl 0,3N

Diluer 40 fois l'HCl 37% (12N) dans de l'eau déminéralisée : 2,5ml d'HCl pour 100ml de solution. Attention : verser d'abord la moitié de l'eau, ajouter l'acide puis compléter à 100ml avec l'eau déminéralisée.

IX - Préparation des échantillons :

Cette étape doit être réalisée le plus possible à l'abri de la lumière et de la chaleur. Cette phase doit également se faire sous une hotte, pour éviter les vapeurs toxiques d'acétone. Il ne doit pas y avoir de manipulation d'acide sous cette hotte pour éviter toute contamination et toute dégradation des pigments par des traces d'acide.

Extraction

Placer, à l'aide de la pince à bouts plats, les filtres encore congelés dans les tubes à centrifuger en verre. Penser à la numérotation.

Ajouter 2,5 à 5ml d'acétone 90% à l'aide d'une dispensette. Broyer le filtre à l'aide d'une baguette de verre à brisure nette. Compléter le volume d'extraction (5 à 10 ml) avec 2,5 à 5ml d'acétone 90%. Placer les tubes une nuit au réfrigérateur ($+4^{\circ}\text{C}$), sur un portoir recouvert de papier aluminium ou directement dans les plots de la centrifugeuse, afin de protéger les échantillons de tout choc lumineux.

Précautions particulières

Ne pas sortir du congélateur trop de filtres à la fois, et surtout ne pas les laisser décongeler sur la paillasse. Il est préférable de les conserver dans le congélateur ou à défaut dans la glace pilée le plus longtemps possible avant de les placer dans l'acétone.

X - Préparation de l'appareil :

Etalonnage du Fluorimètre :

L'étalonnage de l'appareil doit être réalisé 1 à 2 fois par an par exemple au retour d'un déplacement, mission ou après tout changement d'un élément de l'appareil (lampe, filtres...). **Voir Chapitre XVI p 6.** Allumer le fluorimètre 30mn avant de procéder aux mesures pour permettre la stabilisation de la ligne de base. L'idéal est de travailler sous lumière tamisée.

Mesure du blanc

Le blanc constitué d'acétone à 90% est mesuré avant chaque série d'échantillon. Il permet de régler le zéro de l'appareil. Si le zéro de l'appareil n'est pas réglé lors des analyses et que les calculs de concentration en chlorophylle sont faits *a posteriori*, via une feuille de calcul, la fluorescence du blanc devra être soustraite à Fo et Fa.

Contrôle Qualité

La justesse des mesures doit être contrôlée à l'aide du standard solide de chlorophylle (Turner Designs 10-AU-904, Turner Designs Trilogy).

Ce standard doit être mesuré le jour de l'étalonnage puis chaque fois que l'on mesure un lot d'échantillons. Ce standard ne nécessite pas de condition spéciale de stockage. Il n'est sensible ni à la lumière ni à la température. Il est stable pendant des années. Ces mesures permettent de vérifier l'absence de dérive de l'appareillage et donc de valider l'adéquation avec la courbe d'étalonnage.

Noter les valeurs du standard solide sur la fiche de suivi « matériaux de référence » dans le dossier métrologie.

XI - Mesure

Sortir les tubes du réfrigérateur. Agiter les tubes.

Centrifuger 5 min à 3000 tours/min de préférence dans une centrifugeuse réfrigérée à +4°C. Remettre en suspension les morceaux de filtre qui se sont déposés sur les parois du tube. Centrifuger à nouveau 10 min. Prélever alors le surnageant et le transférer dans un tube de mesure. Mesurer la fluorescence **Fo**.

Rajouter entre 10 et 20µl d'HCl 0,3N par ml d'extrait acétonique. Agiter et mesurer la fluorescence **Fa** quand le signal est stable (2 minutes après l'ajout d'acide).

Contrôle Qualité

La justesse des mesures doit être contrôlée à l'aide du standard solide de chlorophylle (Turner Designs 10-AU-904 ou Turner Designs 7000-904). Ce standard doit être mesuré le jour de l'étalonnage puis chaque fois que l'on mesure un lot d'échantillons.

XII- Calcul de la concentration en chlorophylle a des échantillons :

Selon Holm-Hansen (1965) et Lorenzen (1967)

$$[Chla] = Kx \cdot (Fo/Fa)_{max} \cdot [(Fo - Fa) / ((Fo/Fa)_{max} - 1)] \cdot [v_{ext} / v_{filtré}]$$

$$[Pheo a] = Kx \cdot (Fo/Fa)_{max} \cdot Fa \cdot [1 - ((Fo/Fa) - 1) / ((Fo/Fa)_{max} - 1)] \cdot [v_{ext} / v_{filtré}]$$

[Chla] et [Pheo a]	concentration en chlorophylle a et en pheophytine a, [$\mu\text{g/L}$]
Fo	fluorescence de l'échantillon avant acidification
Fa	fluorescence de l'échantillon après acidification
Vext	volume de l'extrait acétonique, [L]
Vfiltré	volume de l'eau de mer filtré, [L]
(Fo/Fa) _{max}	rapport d'acidification de la chl a pure de l'appareil de mesure (cf. étalonnage du fluorimètre) = R _{max}
Kx	constante de calibration du fluorimètre

XIII - Critères qualités -Conformité

Pour l'étalonnage, les valeurs de R_{max} et Kx avec calcul de la moyenne et écart-type sont archivées (exemple : pour la station de Brest R_{mx} = 1.76 ± 0.03 et Kx = 0.811 ± 0.081). La conformité est vérifiée si l'écart entre la valeur du jour et la moyenne des valeurs archivées est inférieur ou égal à l'écart-type établi (exemple : pour la station de Brest 0.03 et 0.081 respectivement pour R_{mx} et Kx).

Pour la répétabilité, les valeurs de [Chla] de replicas d'échantillonnage, avec calcul de la moyenne et écart-type sont archivées. Leur conformité est vérifiée si l'écart-type est inférieur ou égal à la moyenne des écart-types archivés dans la station (exemple : pour la station de Brest : 0.073 $\mu\text{g/L}$).

XIV - Erreur Maximale Tolérée EMT - Incertitude

L'Erreur Maximale Tolérée est représentative de l'écart de reproductibilité de la mesure. Elle est estimée, à partir de la moyenne « des écart-types des réplicas d'intercomparaison archivés », étendue ensuite d'un facteur 2 ou t-Student (si n<30):

EMT	= Moyenne(Ecart-types archivés) * 2	si n>30
EMT	= Moyenne(Ecart-types archivés) * t-Student	si n<30

(exemple : pour la station de Brest EMT = 0.053 $\mu\text{g/L}$)

L'incertitude (U), n'ayant pas fait l'objet d'une étude exhaustive, est estimée en considérant la variabilité aléatoire maximale de l'EMT, étendue par un facteur 2. Elle est assimilable à la capacité de la méthode.

U	= 2*EMT
----------	---------

(exemple : pour la station de Brest U = 0.106 $\mu\text{g/L}$).

XV - Entretien du matériel :

Rincer la rampe de filtration ainsi que les systèmes de filtration, l'éprouvette et les flacons de prélèvement à l'eau déionisée. Effectuer un dernier rinçage à l'eau déionisée.

Les tubes et matériel en verre sont nettoyés à l'eau déionisée et séchés à l'étuve (tubes renversés sur les portoirs). Les éprouvettes, flacons et tubes sont stockés à l'abri de la poussière.

XVI - Conservation et entretien de l'appareillage

Eteindre l'appareil après utilisation prolonge la durée de vie de la lampe. Eviter les éclaboussures d'échantillon, d'acétone ou d'acide dans le porte échantillon. Si cela se produisait, nettoyer délicatement à l'aide d'un papier non pelucheux.

XVII - Evacuation des essais et déchets

L'acétone usagée est conditionnée dans des containers de recyclage prévus à cet effet.

XVIII- Etalonnage du fluorimètre

L'étalonnage s'effectue 1 à 2 fois par an. Cette phase doit être réalisée le plus possible à l'abri de la lumière et de la chaleur.

Détermination de la concentration de la solution-mère de chlorophylle a par spectrophotométrie :

Diluer le contenu de l'ampoule de chlorophylle a (*Anacystis nidulans* : 1mg ; ref C-6144 ou chlorophyll a from Spinach : 1mg ; ref C-5753 chez Sigma-Aldrich) dans 100ml d'acétone à 90%.

Diluer 20 fois cette solution : 5ml de la solution mère + 95ml d'acétone à 90%.

Régler le zéro du spectrophotomètre avec l'acétone à 90%. Vérifier la pureté de la solution de chlorophylle a en effectuant un spectre d'absorption entre 700 nm et 400nm. Les pics d'absorption doivent se situer à 432 nm et 664 nm (voir annexe 1). On doit bien entendu éviter la contamination par la phéophytine a. En général, le rapport des absorptions à 432/410 nm est proche de 1,25. Vérifier que le spectre ne présente pas le moindre léger pic à 505 nm. Sinon, il y a contamination par la phéophytine et la solution ne peut pas être utilisée comme standard.

Si la solution est pure, mesurer la densité optique (Do) de la solution à 664 nm (vérifier au préalable la calibration du spectrophotomètre).

En déduire la concentration réelle de la solution (équation de Beer-Lambert) :

$$Do = \epsilon \cdot L \cdot C$$

ϵ : coefficient d'absorption spécifique = 87,67
 L : longueur du trajet optique en cm
 C : concentration en g/l

Diluer alors cette solution afin d'obtenir une Do inférieure ou égale à 0,02. C'est la condition nécessaire pour que la relation entre la concentration et la fluorescence soit toujours linéaire.

Etalonnage du fluorimètre :

Préparer ensuite la gamme étalon suivante :

N° Tube	<u>Solution I chl a (ml)</u>	<u>Acétone à 90% (ml)</u>
1	6	0
2	5	1
3	4	2

4	3	3
5	2	4
6	1	5
7	0.6	5.4
8	0.3	8.7 (solution II)
Solution II		
9	2	4
10	1	5

Régler le zéro de fluorescence sur le solvant.

Mesurer pour chaque tube la fluorescence F_0 avant acidification et F_a après acidification (ajouter entre 10 et 20 μ l d'HCl 0,3N par ml d'extrait acétonique, agiter et laisser agir l'acide entre 2 et 3 minutes).

Tracer la droite : $F_0 = Kc.Ca$

Avec, sur l'axe des X les concentrations en chlorophylle a des différentes solutions C_a et sur l'axe des Y les fluorescences correspondantes F_0 .

En déduire la constante de calibration $Kx = 1/Kc$.

Faire le rapport F_0/F_a pour chaque dilution. Faire la moyenne de ces rapports : $(F_0/F_a)_{max}$.

Noter ces valeurs sur la fiche de suivi « calibration » dans le dossier métrologie.

XIX - Bibliographie :

Aminot A., Kérouel R., (2004). Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 336 p.

Holm-Hansen O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes and J.D.H. Strickland (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer., 30(1) : 3-15

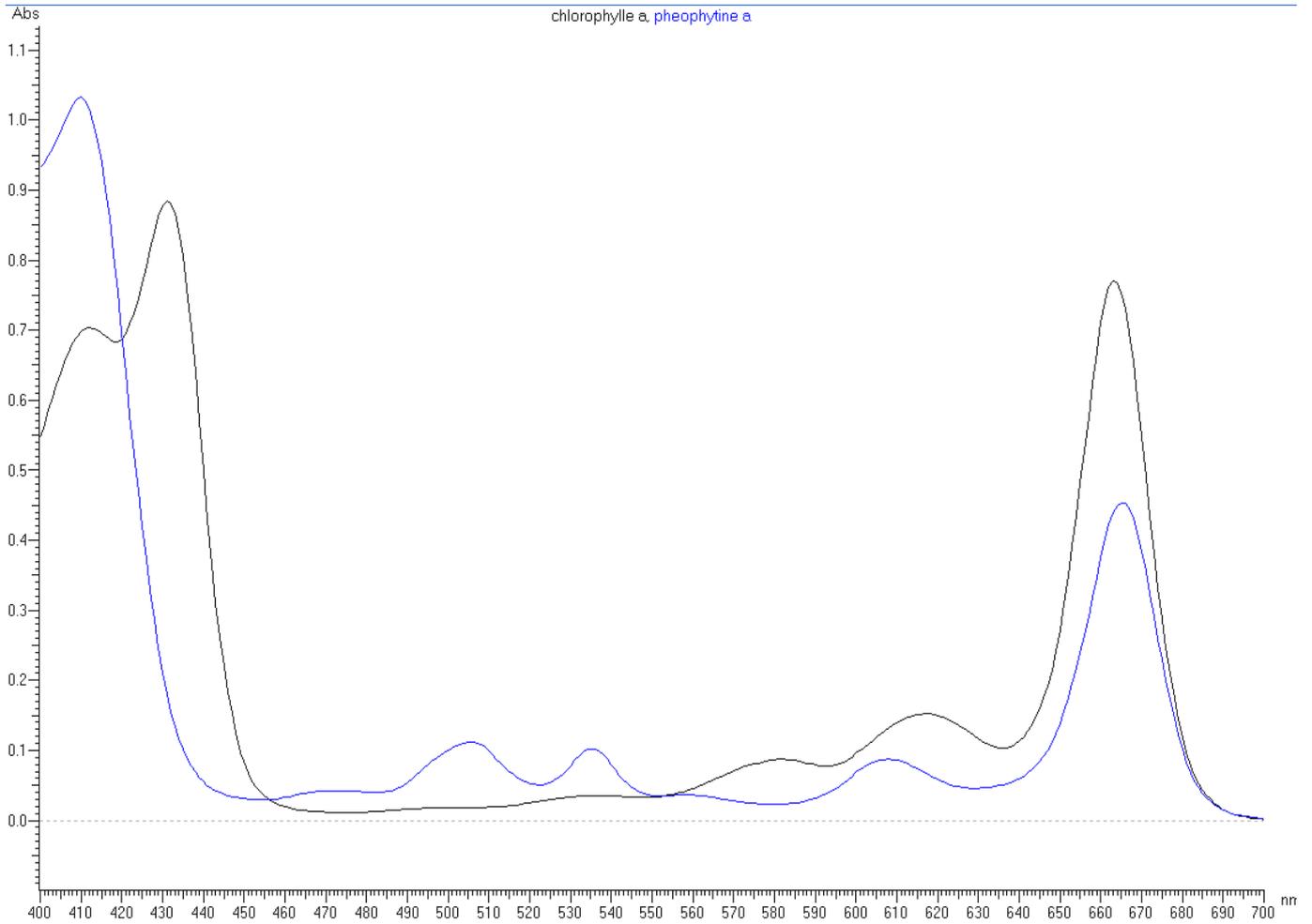
Lorenzen, C.J. (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments : Spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr. 12 : 343-346

Strickland, J.D. and T.R. Parsons (1997). A practical handbook of seawater analysis, 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Can. 167

Yentsch, C.S. and D.W. Menzel (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep-Sea Res., 10 : 221-231

Welschmeyer, N.A (1994). Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. Limnol.Oceanogr.,39(8) : 1985-1992

Annexe 1 : Spectres d'absorption de la chlorophylle a (en noir) et de la phéophytine a (en bleu) dans l'acétone à 90%



Procédure : protocole national chlorophylle a

Page 12 / 12

Annexe 4 : fiches de sécurité des produits chimiques

Pour les fiches de sécurité, consulter le site de l'Institut National de Recherche et de Sécurité :

<http://www.inrs.fr>

Acétone : <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%203>

HCl : <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%2013>