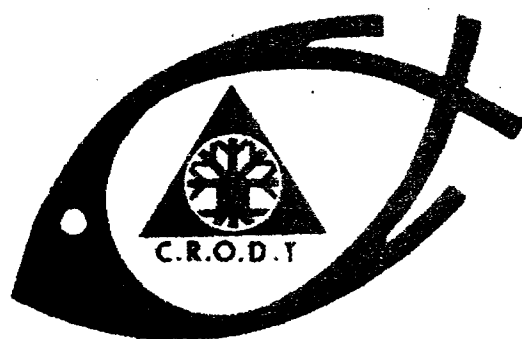


J. PAGES

DOSAGE FLUORIMÉTRIQUE  
DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS :  
ESSAI DE REVUE  
DES MODALITÉS TECHNIQUES



CENTRE DE RECHERCHES OcéANOGRAPHIQUES DE DAKAR - THIAROYE

INSTITUT SÉNÉGALAIS DE RECHERCHES AGRICOLES \*

ARCHIVE

N° 96  
Août 1981

# DOSAGE FLUORIMÉTRIQUE DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS : ESSAI DE REVUE DES MODALITÉS TECHNIQUES

par

Jean PAGES

## INTRODUCTION

La biomasse du phytoplancton est souvent déterminée par le biais de ses pigments chlorophylliens. La mesure de la concentration de ces pigments est déjà un procédé fort ancien, mais une rapide revue de la littérature fait cependant apparaître que, malgré divers essais de normalisation (SCOR-UNESCO, 1966), les modalités techniques sont loin d'être uniformes.

Nous avons tenté de rassembler ici un certain nombre de détails techniques cités par divers auteurs, afin d'obtenir une vue générale. Ceci ne saurait être une revue exhaustive, et encore moins critique, venant après les travaux publiés dans les "Ergebnisse der Limnologie" (Beiheft 14, 1980). Il s'agit plutôt d'un essai de mise au point, à usage interne, axé sur les détails matériels et prenant en compte quelques techniques récentes.

En outre, l'accent a été mis, volontairement, sur le dosage par fluorimétrie, plus adapté aux conditions de la haute mer et plus rapide ; la spectrophotométrie a été assez négligée.

## 1. FILTRATION

### 1.1. CHOIX DES FILTRES

Les membranes filtrantes permettent, du moins en théorie, de séparer des tailles différentes d'organismes (Faust et Correl, 1976 ; Venrick et al., 1977). En fait, le choix de la marque est assez capital ; les membranes Nuclepore semblent seules fournir des perforations réellement calibrées (Sheldon, 1972). La plupart des membranes, cependant, colmatent assez vite et peuvent, par leur dissolution ultérieure, apporter des substances parasites.

Les filtres en fibre de verre ont des caractéristiques de filtration plus satisfaisantes (Lenz et Fritsche, 1980). Leurs fibres améliorent la

destruction des cellules dans le cas où le filtre est broyé dans le solvant. Leur porosité est assez bien contrôlée (Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980). Il semble cependant que les filtres Gelman type A soient inférieurs aux filtres Whatman GF/C (Herbland, comm. pers.).

### 1.2. MODALITE DE LA FILTRATION

La dépression, lors de la filtration, ne doit pas dépasser  $1/10^e$  d'atmosphère (Aronson, 1978 ; Sharp, 1978).

L'addition d'une suspension de  $MgCO_3$  a été recommandée (Strickland et Parsons, 1968). L'utilité, ou même les bienfaits, d'une telle procédure, sont assez discutés pourtant (Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980 b).

### 1.3. CONSERVATION DES FILTRES

Certains auteurs signalent une baisse sensible de la teneur en chlorophylle, tant dans les extraits que sur les filtres (Blasco, 1973), même si ceux-ci sont lyophilisés (Lenz et Fritsche, 1980). Inversement, d'autres essais n'ont pu mettre en évidence de pertes sur des filtres congelés encore humides et conservés à  $-20^{\circ}C$  (Holm Hansen et Riemann, 1980). Des filtres ont été conservés de façon satisfaisante (moins de 20 % de pertes) à  $-15^{\circ}C$ , sur gel de silice, pendant 10 mois (Dufour, 1972).

## 2 . E X T R A C T I O N

Plusieurs solvants ont été employés pour extraire les pigments. L'acétone est le plus fréquemment utilisée, mais d'autres solvants ont été recommandés.

### 2.1. ACETONE

Le mélange le plus fréquent est l'acétone à 10 % d'eau ("acétone 90 %"). Certains auteurs emploient des mélanges à 85 ou 80 %. Baudouin et Scoppa (1971) utilisent l'acétone 85 % saturée de  $MgCO_3$ .

Afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction, Stauffer et al. (1979) préconisent un mélange acétone-DMSO (a:a) (1). Le broyage des filtres a été recommandé (Strickland et Parsons, 1968) mais semble d'une efficacité discutable (Holm Hansen et Riemann, 1978) et peut même augmenter la variabilité (Dufour, 1972).

Un des principaux désavantages de l'acétone est sa faible efficacité d'extraction sur de nombreuses formes planctoniques.

---

(1) Le DMSO fluoresce fortement avec  $\lambda_{exc} = 405$ ,  $\lambda_{emi} = 525$  nm

## 2.2. METHANOL

Plusieurs auteurs recommandent, comme plus efficace, le méthanol, soit bouillant pendant 30 s (Heaney, 1978 ; Stauffer et al., 1979 ; Riemann, 1980), soit plus simplement à froid (Berland et al., 1970 ; Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980 a et b). Un broyage du filtre est alors inutile.

Le comportement des pigments dans le méthanol acidifié peut présenter quelques problèmes (Marker et al., 1980 a ; Nusch, 1980). Les vapeurs de méthanol sont assez toxiques (Nusch, 1980).

## 2.3. ETHANOL

L'éthanol bouillant est employé par quelques auteurs (Moed et Hallegraef, 1978 ; Marker et al., 1980 a ; Nusch, 1980). Le bon comportement lors de l'acidification est intéressant. Le prix réduit est un argument supplémentaire.

# 3. ACIDIFICATION

Pour transformer les chlorophylles en phéopigments, divers agents peuvent être employés. La chaleur (100°C) a été employée (White et al., 1972). Plus fréquent, car plus simple, est l'emploi de l'acidification, par un acide minéral fort ou un acide organique.

## 3.1. MODALITES

### 3.1.1. HCl

La procédure la plus fréquente consiste à additionner un volume faible de HCl dilué à l'échantillon. Les conditions opératoires sont souvent décrites avec une surprenante imprécision, tant sur le volume ("quelques gouttes") que sur la concentration ("dilué", "de 0,5 à 1 N"). Holm Hansen et Riemann (1978) recommandent une concentration finale de  $3,10^{-3}M$  HCl, agissant 3 min. Le pH intervient fortement, à la fois sur les spectres des différents pigments et sur la vitesse de transformation des chlorophylles : la chl b se transforme en phéo b 5 à 9 fois plus lentement que la chl a en phéo a (Holm Hansen et Riemann, 1978). Moed et Hallegraef (1978) indiquent un pH souhaitable de 2,6 à 2,8. Pour un même volume d'HCl, le pouvoir tampon des différents solvants décroît dans le sens éthanol-méthanol-acétone 80 %-acétone 90 %.

Pour des dosages ultérieurs en spectrométrie, l'extrait sera neutralisé (Holm Hansen et Riemann, 1978 ; Marker et al., 1980 b).

### 3.1.2. Acide oxalique

Afin de limiter les risques d'acidification excessive, certains auteurs préconisent l'emploi de l'acétone saturée d'acide oxalique, à raison de 2 à 5 % de l'échantillon (Baudouin et Scoppa, 1971). La réaction est beaucoup plus lente (Holm Hansen et al., 1965) ; il est possible que ce soit une raison du peu de succès de la méthode.











sance in situ (Heaney, 1978) ou in vitro (Dufour, comm. pers.). Le "fluorescence number" (Kiefer, 1973 a) varie très fortement avec la lumière (Heaney, 1978). La photoinhibition se manifeste nettement (Kiefer, 1973 b ; Heaney, 1978) à des intensités lumineuses faibles. Son mécanisme est double (Kiefer, 1973 a ; Harris et Piccinin, 1977).

La mesure de la IVF ne résoud donc pas le problème de la détermination de la biomasse planctonique. En outre, de nombreux travaux effectués sur la IVF ne tiennent pas compte de la fluorescence dissoute, dont l'importance n'est pas négligeable parfois (Herbland et Voituriez, 1977 ; Heaney, 1978 ; Cullen et Renger, 1979). Suivant le type de filtre employé, des débris cellulaires ou des cellules de petite taille peuvent passer dans le filtrat (Herbland, comm. pers.) et entraîner une sur-évaluation sérieuse de la fluorescence dissoute.

#### 4.3.3. Emploi de la DCMU

Les variations vues ci-dessus du "fluorescence number" K correspondent à un rendement de fluorescence ("fluorescence yield") variable.

Ce rendement est fonction inversé du taux de transport d'électrons pour la photosynthèse (Kiefer, 1973 a) ; le rendement de fluorescence est en compétition avec le rendement chimique (Butler, 1966). Une mesure fiable de la chlorophylle par IVF implique un découplage, par blocage chimique in vivo (Duysens et Sweers, 1963), qui équivaut au découplage réalisé, autrement, par l'extraction acétonique. La DCMU (1) réalise ce blocage au niveau de la réaction de Hill (Fleischhacker et Senger, 1978).

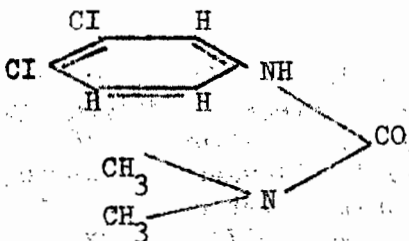
Les concentrations finales réalisées sont variables :  $10^{-5}M$  (Fleischhacker et Senger, 1978 ; Samuelson et al., 1978 ; Kulandaivelu et Daniell, 1980),  $3.10^{-6}M$  (Cullen et Renger, 1979), 3 à  $10.10^{-6}M$  (Slovacek et Hannan, 1977). Les délais de réaction, et d'observation, varient de 30 s (Cullen et Renger, 1979 ; Kulandaivelu et Daniell, 1980) à 10 min (Samuelson et al., 1978). La production d' $O_2$  est totalement stoppée après 2,5 min même sur des formes cuirassées (Slovacek et Hannan, 1977). Des délais de 4 à 14 s sont probablement insuffisants, et expliqueraient certains résultats décevants in situ (Roy et Legendre, 1980).

La fluorescence est mesurée sans DCMU ( $F_N$ ) et avec DCMU ( $F_D$ ). On calcule, soit le rapport  $F_D/F_N$  (Roy et Legendre, 1980), soit un "fluorescence response index", FRI :

$$FRI = (F_D - F_N) / F_D$$

Une valeur nulle de FRI, correspondant à une absence d'effet de la DCMU, indique une capacité photosynthétique nulle.

(1) DCMU : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthyl-urée



fabriquée par K & K

vendue par O.S.I. (154 FF/100 g)

ou Touzart et Matignon











TABLEAU I.- Valeur du facteur  $\alpha$  acide

	chl <u>a</u>	Réf.*
2,2	valeur moyenne	(1)
1,7	acide oxalique, 3 min	(2)
6,0	excitation à 445 nm	(3)
12,8	excitation à 438 nm : extrapolé à largeur de bande nulle	
0,9-3,0	suitant acide employé et temps	(4)
1,42	avec photomultiplicateur R 136	(5)
3,07		(6)
2,0-11,5	excitation entre 430 et 450 nm, largeur de bande 10 nm	(7)

	chl <u>b</u>	
0,42		(5)
0,5		(6)

	chl <u>c</u>	
1,73	filtre	(5)
2,4	filtre CS 2-64	(4)
5,8	filtre CS 2-60	
14,1		(6)

