

CENTRE DE NOUMEA

--

OCEANOGRAPHIE

NOTES SUR L'UTILISATION DU DCMU EN FLUORIMETRIE

REMARQUES PRATIQUES

par

Hervé CARDINAL

--0--

MARS 1982

I - INTRODUCTION

La mesure de la fluorescence "in vivo" a été proposée comme moyen d'estimation de la biomasse phytoplanctonique du milieu océanique (Lorenzen, 1966). Ce type de mesure permet une détermination rapide des concentrations en chlorophylle et nécessite des volumes d'eau bien moindres que ceux utilisés en spectrophotométrie (Strickland et Parsons, 1972). Cependant, une grande variabilité des mesures a été observée surtout dans les rapports fluorescence "in vivo" / chlorophylle a et ce, aussi bien dans la nature qu'en cultures. Des modifications de l'état physique des chloroplastes, de l'état physiologique des cellules (Kiefer, 1973 a,b ; Estrada, 1974 ; Blasco et Dexter, 1972 ; Loftus et Seliger, 1975), de l'efficacité photosynthétique et de la composition pigmentaire sont les causes principales de cette variabilité.

L'action d'un desherbant chimique : le DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-I,I-diméthylurée, en bloquant la photochimie du photosystème-II permet d'envisager une réduction des erreurs et de trouver de meilleures estimations des taux de chlorophylle, dont on peut, de plus, obtenir une évaluation.

Néanmoins, l'utilisation de la fluorimétrie et l'emploi du DCMU demandent certaines précautions.

II - APPAREIL - TECHNIQUE DE MESURES

Mise au point par Yentsch et Menzel (1963), la méthode fluorimétrique consiste à mesurer la fluorescence émise à 670 nm par une solution acétonique de pigments excités à 430 nm.

II.1. - Appareil

Le fluorimètre utilisé lors des essais est le TURNER 111 muni d'une porte (Réf. 11080) rendue plus sensible en disposant du papier d'aluminium autour du porte-tubes. Une lampe bleue (T5 110-853) émet une lumière de spectre d'émission compris entre 400 et 520 nm avec un maximum de 405 à 436 nm.

Il y a deux filtres bleus primaires (Corning CS-5-60) d'absorption maximale à 420 nm et un filtre rouge secondaire (Corning CS-2-64) qui ne laisse passer que des longueurs d'ondes supérieures à 645 nm avec un maximum de transparence à 650 nm.

II.2. - Technique de mesures

D'après le manuel d'utilisation fourni par TURNER plusieurs précautions sont à prendre pour se servir du fluorimètre :

- Il faut laisser chauffer l'appareil 2 minutes mais si on travaille avec une excitation à des longueurs d'ondes autres que 365 nm, il vaut mieux attendre 45 minutes !.

- Les tubes utilisés ne doivent pas montrer des variations supérieures à 2 divisions lorsqu'on les tourne entre chaque mesure (A quelle échelle ?).

Les essais décrits ci-dessous ont été entrepris en tenant compte de ces conseils. La courbe I montre la décroissance de la fluorescence au cours du chauffage de l'appareil pour des tubes "fluorimétrie" c'est-à-dire fournis avec l'appareil et des tubes à hémolyse contenant 5 ml d'eau distillée chacun. Le zéro est fixé arbitrairement. La stabilité des courbes est obtenue après une heure de mesures. Il faudrait donc laisser chauffer le fluorimètre au moins 60 minutes. Si on tourne les tubes entre chaque mesure à la sensibilité 30, les tubes "fluorimétrie" ne présentent qu'une variation absolue de 2 ou 3 divisions contre 4 pour les tubes à hémolyse. Par conséquent, une attente d'une heure et l'emploi de tubes "fluorimétrie" minimiseraient les erreurs.

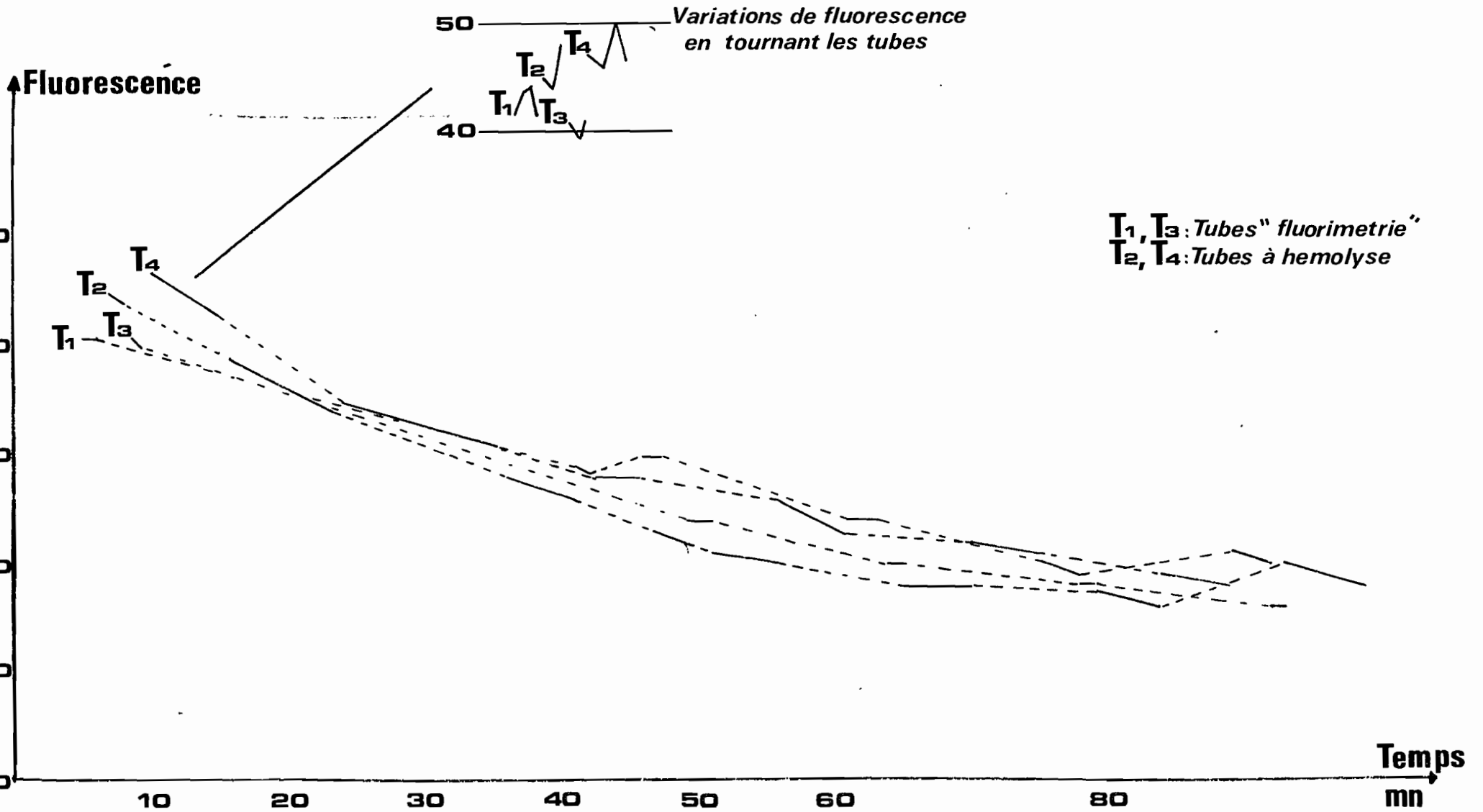
Pour étudier les variations de fluorescence "in vivo", il faut obtenir un zéro stable. Le choix d'un blanc se fera pour une fluorescence la plus basse possible et constante dans le temps.

II.3. - Choix d'un blanc

Certains chercheurs utilisent l'eau de mer filtrée comme blanc (Neveux et Juspin, 1981 ; Tranter, Parker et Vaudrey, 1979 a). Cette méthode permet de séparer la fluorescence due aux cellules intactes de la fluorescence émise par

Courbe 1

Variations de la fluorescence au cours du temps



des molécules de pigments libres. Mais une proportion de cellules mortes et de pelotes fécales ne photosynthétisant plus mais ayant des pigments réagissant à la lumière est retenue sur le filtre et interviendra dans la mesure au même titre que les cellules intactes. D'autre part, l'utilisation d'un tel blanc nécessite une filtration pour chaque échantillon car il est fort probable que les proportions de chlorophylle dissoute varient d'un échantillon à l'autre. Pour ces raisons, nous préférons ne pas utiliser comme blanc l'eau de mer filtrée.

Le tableau I met en évidence certains écarts entre les divers blancs utilisés : eaux distillée, bidistillée, déminéralisée et du robinet. Ces différences sont liées aux compositions moléculaires inégales des blancs. L'eau déminéralisée contient des sels organiques qui interfèrent dans la fluorescence émise. L'eau distillée est d'autant meilleure qu'elle est plus fraîche. Le vieillissement doit provoquer un développement algal et de champignons qui est mis en évidence par une hausse de la fluorescence en présence de DCMU.

Le choix d'un blanc de bonne qualité est donc important et il faut surveiller la constance de la fluorescence émise. La présence ou non de chlorophylle dissoute dans le blanc conditionnera ensuite, la signification des mesures.

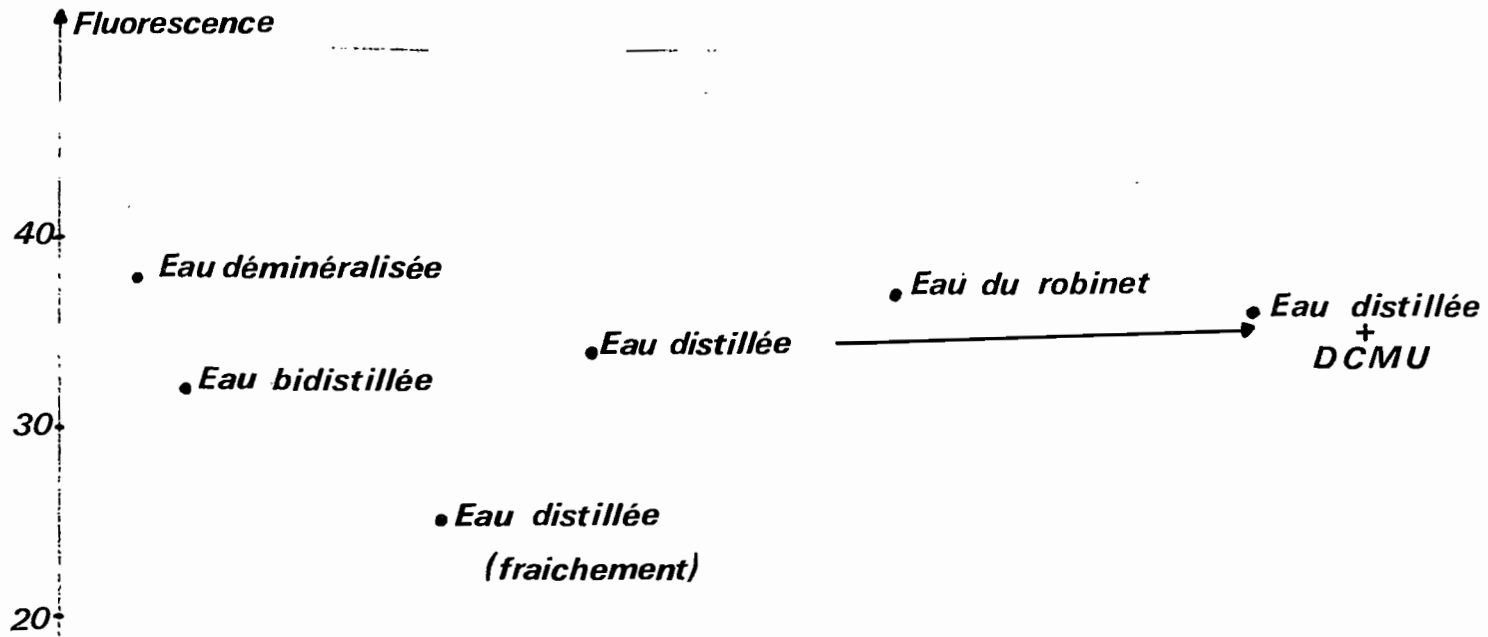
II.4. - Adaptation au noir

Les cellules végétales, d'abord placées à l'obscurité, puis brutalement éclairées, présentent en fonction du temps des variations du rendement de fluorescence (effet Kautsky). Ces changements de fluorescence associés à la photophosphorylation ont été décrits par plusieurs auteurs (Slovacek et Bannister 1973 ; Mohanty et coll., 1973 a,b).

La fluorescence mesurée est liée à l'efficacité d'absorption de la lumière par les collecteurs d'énergie des photosystèmes et à des facteurs de diffusion des radiations d'excitation et d'émission de fluorescence par l'ensemble hétérogène que représentent les particules et les populations naturelles présentes dans les échantillons. L'effet du phénomène d'induction dans les communautés phytoplanctoniques a été démontré (Harris 1978 ; Cullen et Roger 1979 ; Bannister et Rice 1968) mais s'il est vrai que cet effet puisse être décelable au cours d'une étude de cinétiques d'induction (Neveux et Jupin 1981 ; Govindjee et Papageorgiou 1971), il n'est pas primordial dans les mesures classiques effectuées au fluorimètre TURNER 111 (Loftus et Seliger 1975) où l'intensité d'éclairement est faible.

Tableau 1

**Comparaison de divers
blancs**



III - UTILISATION DU DCMU

III.1. - Le DCMU

Le DCMU, 3-(3,4 - dichlorophényl) - 1,1 - diméthylurée, est un herbicide d'origine américaine (Du Pont de Nemours). Il est vendu sous le nom de DIURON. C'est une poudre blanche peu soluble dans l'eau (42 ppm) mais 10 fois plus dans le méthanol, l'éthanol ou l'éthylène glycol (Izawa et Good, 1972). Son point de fusion est de 158° - 159°C.

III.2. - Mode d'action

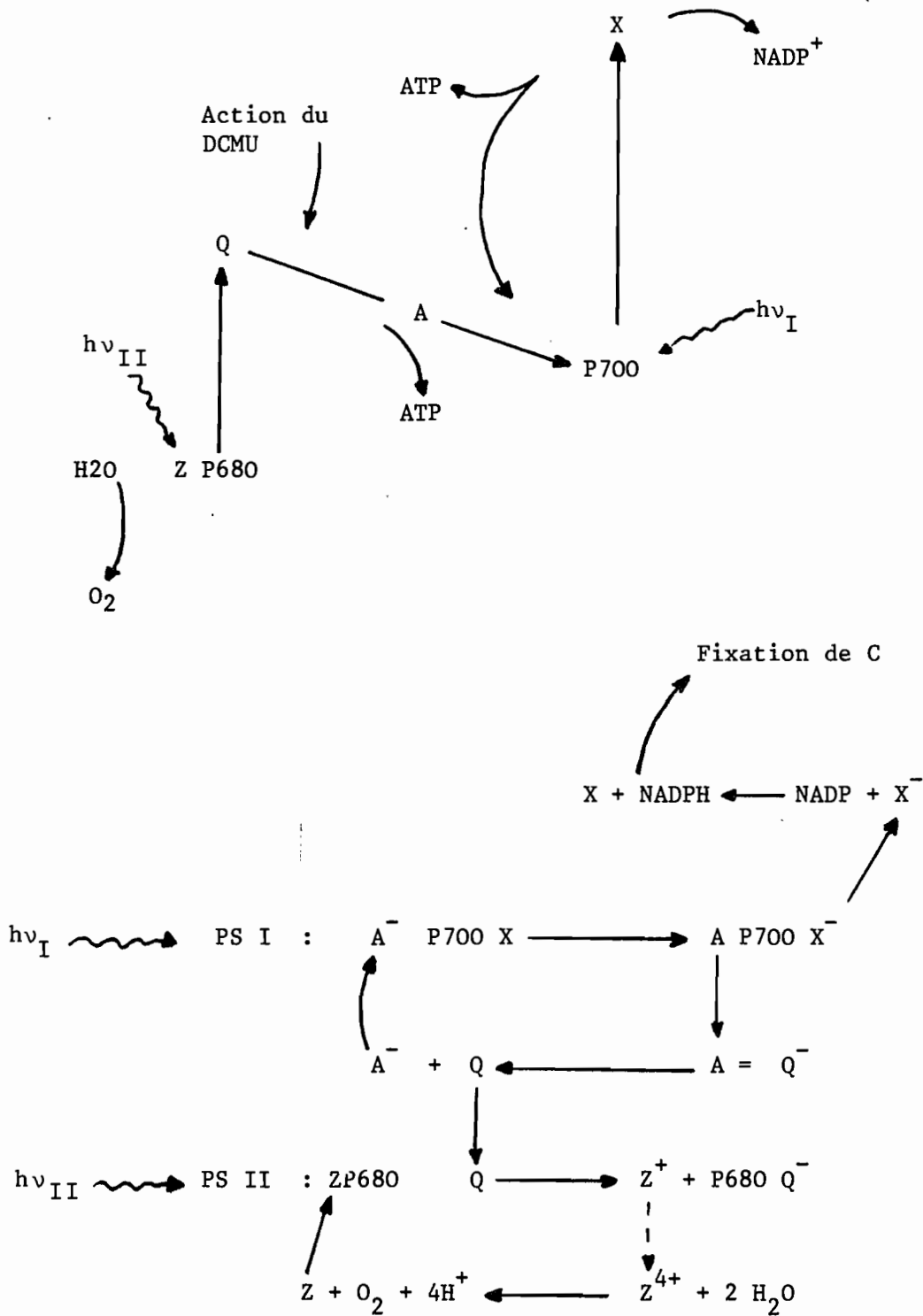
Cet herbicide a été décrit par Wessels et Van der Veen en 1956 comme un inhibiteur de la réaction de Hill. Bishop (1958) a montré une action du DCMU sur la photosynthèse par une inhibition de la formation d'oxygène .

De nos jours, il est admis que ce desherbant bloque la ré-oxydation du 1er accepteur d'électrons Q du photosystème II et donc la capture de l'énergie par les centres photochimiques de ce photosystème (Govindjee et Papageorgiou, 1971; Neveux et Jupin, 1981 ; Izawa et Good, 1972) : ce processus est décrit sur la figure 2. La fluorescence émise augmente jusqu'à une valeur maximale et l'augmentation donne une idée de la capacité qu'a la population autotrophique d'absorber des quanta de lumière (Tranter, Parker et Vaudrey 1979 a). Slovacek et Hannan (1977) ont démontré sur des cultures d'algues que la fluorescence était mieux reliée au taux de chlorophylle lorsque aux échantillons était ajouté du Diuron ; on aurait alors une meilleure estimation de la teneur en chlorophylle a . Mais cette estimation est sujette à des variations de l'absorption par unité de pigments dues à des changements de réponse aux conditions de lumière (Mayer 1971 ; Kiefer 1973 a,b). Kirk (1975) a aussi montré un effet de "package", les petites cellules absorbant plus de lumière que les grandes par unité de pigment.

Si F_N est la fluorescence normale émise par un échantillon

F_D la fluorescence après addition de DCMU

la différence $\Delta F = F_D - F_N$ donne l'efficacité en fluorescence des protons utilisés en photochimie. ΔF est donc lié à la production primaire (Parker, Tranter et Vaudrey, 1979 a,b). Certains auteurs (Samuelsson et Oquist, 1977)



Modèle de l'action du DCMU sur la photosynthèse

(d'après Govindjee et Papageorgiou 1971)

Figure II

ont montré une corrélation nette entre l'incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ et l'augmentation de fluorescence mais ce coefficient de corrélation dépend de la nature et de l'état physiologique des algues (Roy et Legendre 1979 ; Neveux et Jupin 1981). Slovacek et Bannister (1973) ont montré sur des cultures de chlorelles une augmentation de fluorescence en présence de DCMU équivalente chez les cellules pourvues et carencées en CO_2 . La relation augmentation de fluorescence en présence de DCMU - activité photosynthétique n'est pas si évidente. Blasco et Dexter (1972) estiment que l'addition de DCMU pourrait servir d'indicateur d'un état physiologique moyen des cellules.

Cullen et Renger (1979) ont défini l'index de réponse en fluorescence (FRI) comme étant $\text{FRI} = \Delta\text{F}/\text{F}_\text{D}$. Cet index varie avec la profondeur et il existerait une corrélation FRI/Chlorophylle a. Néanmoins l'impossibilité de séparer la fluorescence de cellules mortes de la fluorescence "in vivo" entraîne un biaisage de F_D par excès et donc en général $\frac{\Delta\text{F}}{\text{F}_\text{D}}$ est estimé par défaut et ainsi la biomasse est surestimée et le taux de croissance sous-estimé.

III.4. - Solution alcoolique du DCMU

Pour utiliser des solutions de DCMU, il est nécessaire de connaître la concentration minimale qui provoque le maximum de fluorescence. Nous avons essayé 2 types de solutions : alcoolique et aqueuse.

Des essais de dissolution dans l'éthanol de DIURON ont montré un dépôt au fond du récipient tandis que la solution restait trouble. Pour cette raison, le DCMU utilisé a été purifié à partir du DIURON (80% de DCMU) par recristallisation dans un mélange benzène - méthanol (60/2 : V/V). Neveux utilise un mélange benzène-méthanol (60/1 : V/V). Son rendement doit être meilleur, mais si l'addition de 2 ml de méthanol solubilise très peu de DIURON, notre produit final est peut être plus pur.

III.4.1. - Méthode de purification

- . Peser exactement une quantité de DIURON de l'ordre de 0,9 g
- . Ajouter 60 ml de benzène
- . Ajouter 2 ml de méthanol
- . Chauffer jusqu'à dissolution
- . Filtrer rapidement sur filtre plissé (entonnoir préalablement chauffé à l'étuve)

- . Refroidir le filtrat
- . Filtration sur Büchner et papier filtre
- . Récupérer les cristaux à la spatule en évitant de gratter le filtre
- . Sécher à l'étude.

III.4.2. - Vérification du produit cristallisé

Le point de fusion des cristaux de DCMU a été vérifié (158-159°C).

Le spectre en Résonance Magnétique Nucléaire (figure 3) montre un produit pratiquement pur malgré la présence d'un pic à 1,6 ppm qui pourrait être de l'eau.

III.4.3. - Résultats

L'eau de mer utilisée provient de l'Anse Vata à proximité du laboratoire. Les différentes concentrations ont été effectuées à partir d'une solution mère à 10^{-3} M. La fluorescence "in vivo" de l'eau de mer est déterminée (FN) puis celle en présence de DCMU (FD). Les résultats sont mentionnés dans le tableau II.

La courbe N° 4 montre une augmentation du rapport FD/FN au-delà d'une concentration de $5 \cdot 10^{-7}$ M de DCMU puis une réponse maximum pour des concentrations supérieures à $4 \cdot 10^{-6}$ M.

La courbe pointillés représente les valeurs de FD/FN pour des additions successives de DCMU sur un même échantillon. A partir de 10^{-5} M, le rapport cesse pratiquement de croître. Ceci est peut-être dû au volume important d'éthanol versé (à $4 \cdot 10^{-5}$ M : 700 µl d'éthanol pour 5 ml d'eau de mer) qui entraînerait un empoisonnement des cellules. Mais il est possible aussi que le DCMU provoque au-delà de 10^{-5} M un effet secondaire : l'inhibition du photosystème I décrite par Izawa et Good (1972) mais pour des doses supérieures à 10^{-4} M.

III.5. - Solution aqueuse de DCMU

La préparation de solutions aqueuses de DCMU s'effectue à partir d'une solution concentrée à 0,188 M.

<u>Concentration</u>	<u>Nombre de mesures</u>	<u>Moyenne FD/FN</u>
$5 \cdot 10^{-7}$ M	4	0,99
$9 \cdot 10^{-7}$ M	6	1,16
10^{-6} M	5	1,17
$2 \cdot 10^{-6}$ M	9	1,31
$4 \cdot 10^{-6}$ M	5	1,52
10^{-5} M	7	1,56
$2 \cdot 10^{-5}$ M	4	1,55
$3 \cdot 10^{-5}$ M	5	1,56
$4 \cdot 10^{-5}$ M	6	1,62

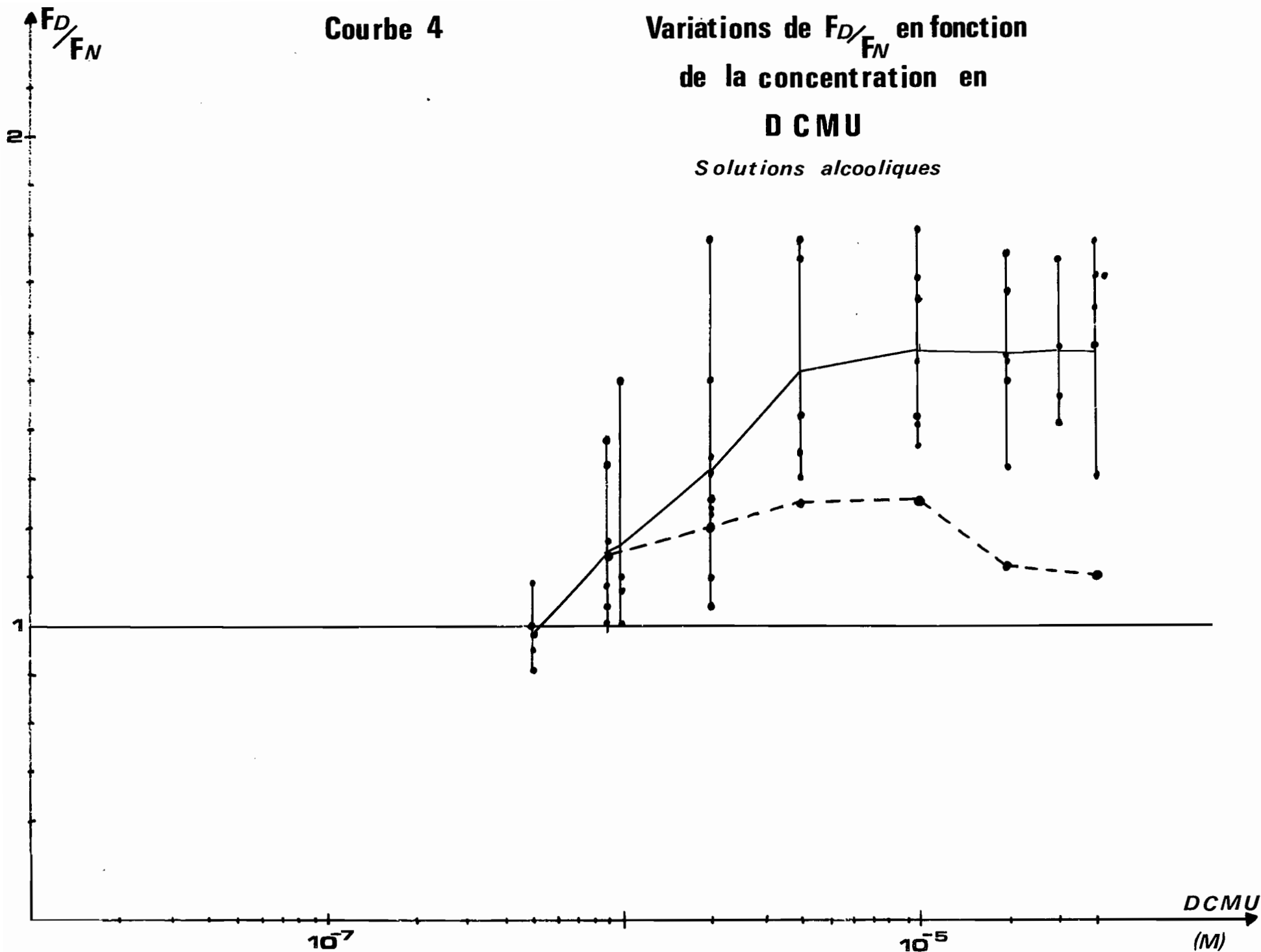
FD/_{FN} : fluorescence émise en présence de DCMU / Fluorescence "in vivo"

TABLEAU II - Valeurs du rapport FD/_{FN} en fonction de la concentration en DCMU (solution alcoolique).

Courbe 4

Variations de F_D/F_N en fonction
de la concentration en
DCMU

Solutions alcooliques



Pour permettre une meilleure solubilisation, cette solution mère est chauffée jusqu'à ébullition puis filtrée sur filtre sans cendre et refroidie. Mais la concentration de la solution obtenue en DCMU n'est pas connue exactement et il convient donc de déterminer pour chaque solution nouvelle de DCMU, la concentration minimale qui provoque le maximum de fluorescence.

Des essais ont été effectués sur de l'eau de mer provenant du large de Nouméa (courbe 5). Les résultats sont les suivants.

III.5.1. - Résultats

Le rapport fluorescence avec DCMU/fluorescence "in vivo" (FD/FN) montre une augmentation à partir de 10^{-7} M de DCMU puis est stable entre 10^{-6} M et 10^{-4} M. Pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M, une grande dispersion des résultats apparaît avec une tendance moyenne à décroître.

Les valeurs de FD/FN sont peu élevées en comparaison de celles rapportées dans la littérature (Dandonneau et al., 1982, Tranter, Paker et Vaudrey 1979 a).

IV - CONCLUSION

Le fluorimètre TURNER 111 est un appareil bien adapté à des mesures rapides sur de petits volumes. Mais son utilisation demande quelques précautions comme la propreté des tubes, la qualité des blancs.

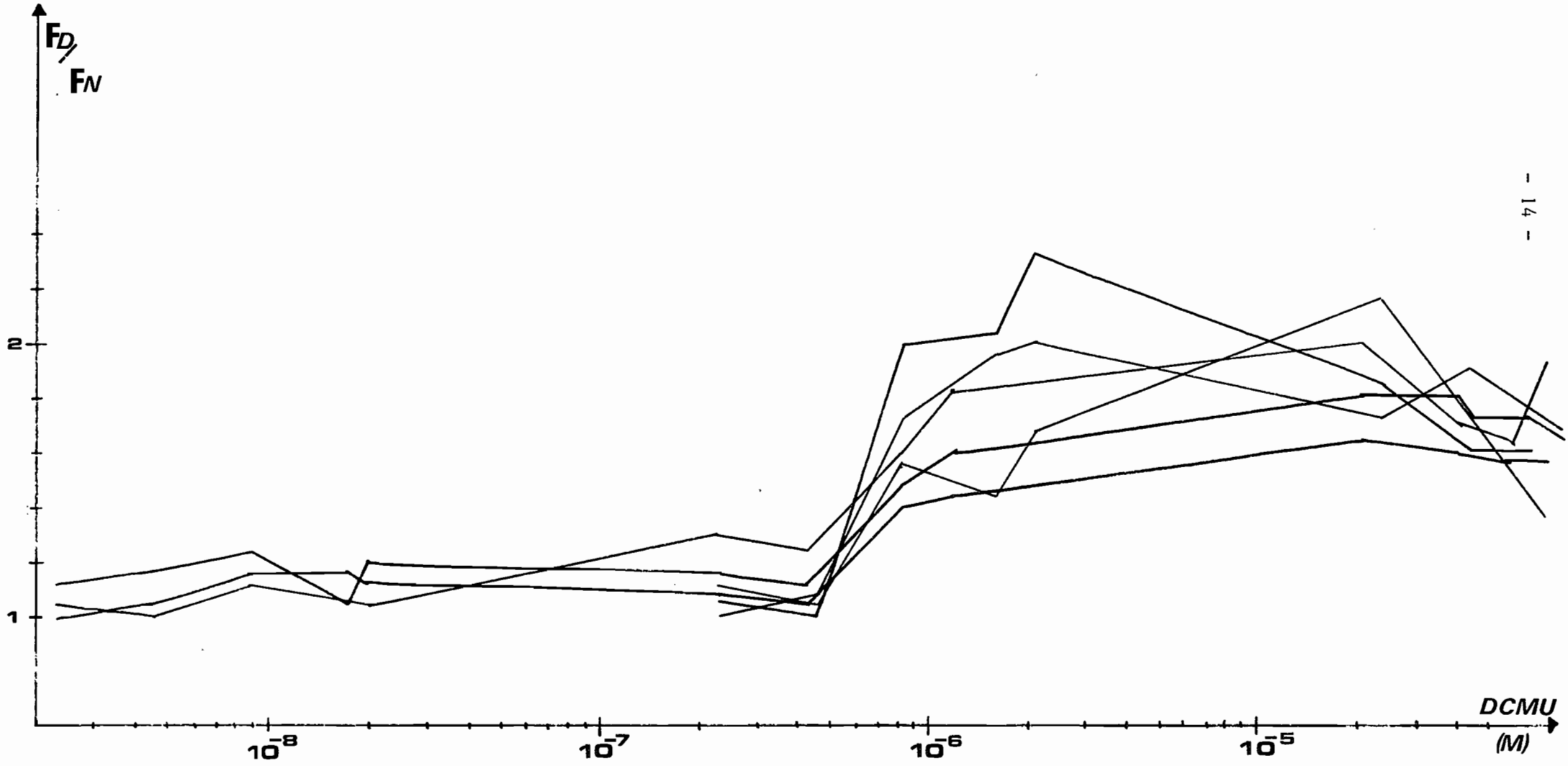
Nos essais pour déterminer des concentrations de DCMU provoquant le maximum de fluorescence ont montré qu'il est nécessaire d'avoir une eau où la densité cellulaire soit suffisante pour obtenir des rapports FD/FN décelables. Néanmoins il a été possible de déterminer des concentrations minimales de DCMU à verser que ce soit en solution alcoolique ou aqueuse.

Les premiers essais de l'emploi de solution aqueuse de DCMU durant des campagnes en mer sont prometteurs : Les profils de FD/FN publiés par Dandonneau et al. (1982) montrent tous un maximum, situé la plupart du temps au voisinage du maximum de chlorophylle, et qui peut être relié au maximum de production primaire. Ces essais seront appliqués en routine au cours des campagnes à venir.

Courbe 5

Variations de F_D/F_N en fonction
de la concentration en
DCMU

Solutions aqueuses



BIBLIOGRAPHIE

- BANNISTER, T.T., RICE G., 1968 - Parallel time courses of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 55-580.
- BISHOP, N.I., 1958 - The influence of the herbicide DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 27, 205-206.
- BLASCO, D., DEXTER, R.N., 1972 - Diuron enhanced fluorescence. *Spec. Rep. Dep. Oceanogr. Univ. Wash.* 52, 103-108.
- CULLEN, J.J., RENGER, E.H., 1979 - Continuous measurement of the DCMU - Induced Fluorescence Response of Natural Phytoplankton Populations. *Mar. Biol.* 53, 13-20.
- DANDONNEAU, Y., CHABERT, L., CREMOUX, J.L., DONGUY, J.R., FERRER, H., WAIGNA, P., WALLICO, H., 1982 - Résultats de la campagne Hydrothon 6 à bord du N.O. Coriolis 07-17 août 1981. *Cah. ORSTOM, sér. océanogr.* 24.
- ESTRADA, M., 1974 - Photosynthetic pigments and productivity in the upwelling region of N.W. Africa. *Tethys*, 247-260.
- GOVINDJEE, PAPAGEORGIOU, G., 1971 - Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : fluorescence transients. *Photophysiology VI* pp. 1-46 ed. by A.C. GIESE, N.Y., *Academic Press*.
- HARRIS, G.P., 1978 - Photosynthesis, productivity and growth : The physiological ecology of phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. (Beih. Ergebn. Limnol.)* 10, 1-171.
- IZAWA, S., GOOD, N.E., 1972 - Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Meth. Enzym.* 24(B), 355-357.
- KIEFER, D.A., 1973 a - Fluorescence properties of natural phytoplankton populations. *Mar. Biol.* 22, 263-269.
- KIEFER, D.A., 1973 b - Chlorophyll a fluorescence in marine centric diatoms : responses of chloroplasts to light and nutrient stress. *Mar. Biol.* 23, 39-46.
- KIRK, J.T.O., 1975 - A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. *New Phytol.* 11-20.
- LOFTUS, N.E., SELIGER, H.M., 1975 - Some limitations of the in vivo fluorescence technique. *Chesapeake Sci.* 16, 79-92.
- LORENZEN, C.J., 1966 - A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.* 13, 223-7.

- MAYER, F., 1971 - Light-induced chlorophyll contraction and movement. In "Structure and Function of Chloroplasts" (Ed. Martin Gibls) p. 286 (Springer-Verlag : Berlin).
- MOHANTY, P. and GOVINDJEE, 1973 a - Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in *Anacystis nidulans* II. The fast changes and the effect of photosynthetic inhibition on both the fast and slow fluorescence induction. *Plant and cell Physiol.* 14, 611-629.
- MOHANTY, P., GOVINDJEE, 1973 b - Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in *Anacystis nidulans* I. Relationship of slow fluorescence changes with structural changes. *Biochim. Biophys. Acta* 305, 95-104.
- NEVEUX, J., JUPIN, H., 1981 - Une approche vers l'estimation de la production potentielle du phytoplancton par analyse des cinétiques d'induction de fluorescence. *Mar. Biol.* 63, 13-21.
- ROY, S., LEGENDRE, L., 1979 - DCMU-enhanced fluorescence as an index of photosynthetic activity in phytoplankton. *Mar. Biol.*, 55, 93-101.
- SAMUELSSON, G., OQUIST, G., 1977 - A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on in vivo chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.* 40, 315-19.
- SLOVACEK, R.E., BANNISTER, T., 1973 - The effects of carbon dioxide concentration on oxygen evolution and fluorescence transients in synchronous cultures of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 292, 729-740.
- SLOVACEK, R.E., HANNAN, P.J., 1977 - In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll a. *Limnol. Oceanogr.* 22, 919-925.
- STRICKLAND, J.D.H., PARSONS, T.R., 1972 - A practical handbook of sea water analysis. Second edition *Bull. Fish. Res. Bel Can.* 167, 310 pp.
- TRANter, D.J., PARKER, R.R., VAUDREY, D.J., 1979 a - In vivo chlorophyll a fluorescence in the vicinity of warm-core eddies off the coast of New South Wales, 1 September 1978, CSIRO, *Aust. Div. Fish. Oceanogr. Rep.* 105.
- TRANter, D.J., PARKER, R.R., VAUDREY, D.J., 1979 b - In vivo chlorophyll a fluorescence in the vicinity of warm-core eddies off the coast of New South Wales. 3 November 1978, CSIRO, *Aust. Div. Fish. Oceanogr. Rep.* 112.
- WESSELS, J.S.C., VAN DER VEEN, R., 1956 - The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 548-549.
- YENTSCH, C.S., MENZEL, D.W., 1963 - A method for the determination of phytoplankton, chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, 10, 221-231.