



Détection de Chlorophylle

Réalisation d'un fluorimètre

Frédéric BOUCHAR (TENUM Toulouse)
Document de travail - Janvier 2012

Version 1.0

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



Table des matières

1.Introduction.....	3
2. La chlorophylle.....	3
Pourquoi tenter de la mesurer ?.....	3
3.Principe de mesure.....	4
La fluorescence.....	4
Choix des composants.....	5
Réalisation de solutions de chlorophylle.....	6
Exemple de dosage :.....	6
Méthode d'étalonnage.....	7
4.Réalisation de l'instrument de mesure.....	9
Étude électronique.....	9
Étude mécanique.....	10
Réalisation électronique.....	11
Les composants.....	11
Étalonnage.....	13
5.Les fluorescences des plantes.....	15
Les chlorophylles.....	15
La fluorescence de la chlorophylle.....	16
6.Références.....	18

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



1. Introduction

Ce document a pour objectif d'initier une nouvelle expérience embarquée à bord d'une bouée équipée d'une carte Mango. Cette première version est basique, non exhaustive et sera enrichie des retours, des approfondissements et des vécus de chacun.

Cette expérience est réalisable par des jeunes de niveau lycée.

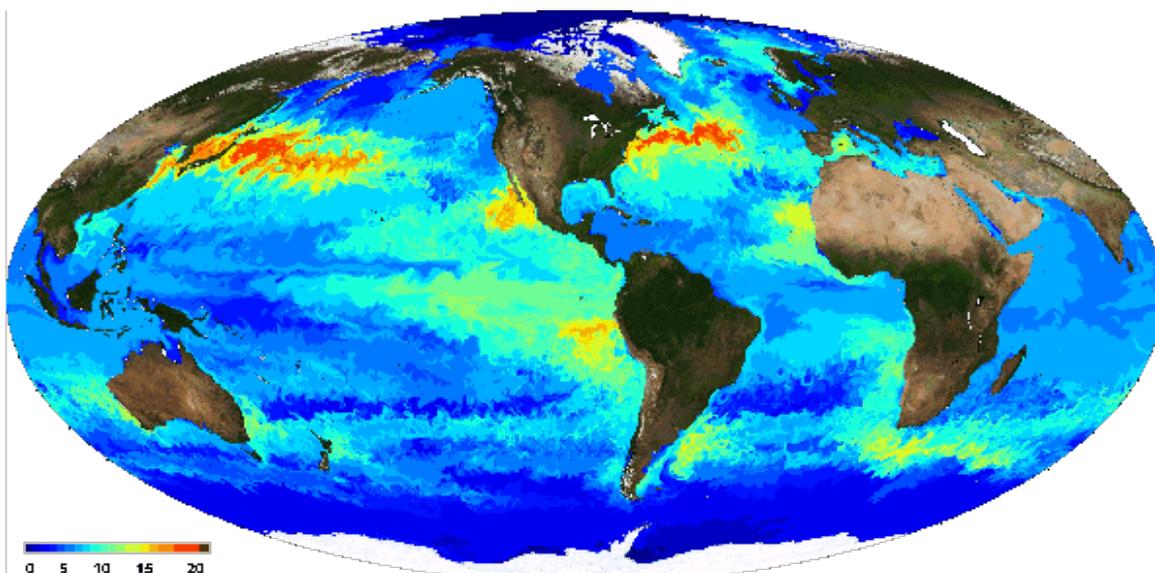
Il est important de me signaler toute erreur, faute d'orthographe ou ambiguïté présente dans ce document. Vous trouverez mes coordonnées en fin de document. Merci de votre aide.

2. La chlorophylle

Pourquoi tenter de la mesurer ?

Dans le milieu aquatique, la chlorophylle peut être utilisée comme un indicateur de biomasse, sa présence est liée à celle du phytoplancton.

Le phytoplancton est composé de plantes microscopiques et de bactéries. Il joue un rôle prépondérant dans les processus géochimiques de la Terre.



Distribution de phytoplancton dans les océans du globe. Image Oliver Jahn, Chris Hill, Stephanie Dutkiewicz, and Mick Follows (MIT) and the ECCO2 Project (MIT/NASA)]

Les teneurs en chlorophylle varient dans de fortes proportions pendant la saison de croissance et sont susceptibles de fluctuer d'une année à l'autre en raison de nombreux facteurs.

Premier maillon de la chaîne alimentaire des océans, responsable de la moitié de la photosynthèse terrestre, le phytoplancton est sous haute surveillance : sa santé est cruciale pour l'avenir des océans et de leur capacité à stocker du CO₂ !

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



3.Principe de mesure

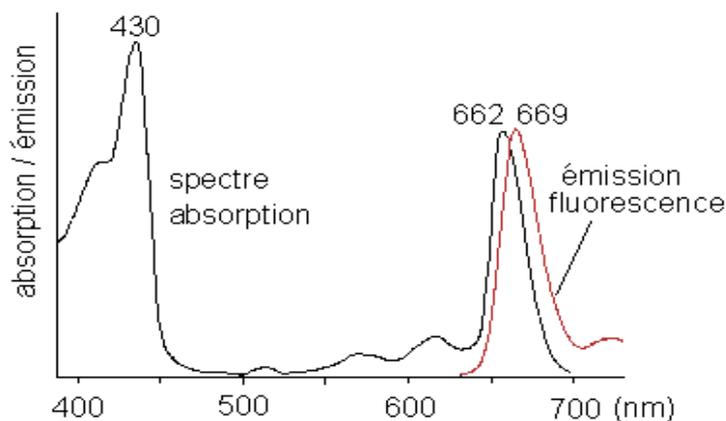
La fluorescence

Lors de la mort naturelle d'une cellule du phytoplancton, les chloroplastes libèrent la chlorophylle qui reste encore active pendant quelques temps.

Nous allons utiliser sa propriété de fluorescence pour détecter la chlorophylle.

Le principe est d'éclairer le milieu à étudier avec une lumière ultraviolette et de mesurer la lumière émise par fluorescence dans le rouge. La fluorescence rouge est émise uniquement par la **chlorophylle a**.

Voici le phénomène de fluorescence de la chlorophylle représenté sur un spectre lumineux :



Plus précisément, il faut éclairer avec une lumière d'une longueur d'onde au alentour du 430nm et mesurer dans une longueur d'onde de 669nm.

La détection est faite grâce à une photodiode qui produit un courant proportionnel à la luminosité reçue dans la gamme du spectre à laquelle elle est sensible. Ce courant est converti en tension et amplifié pour pouvoir être lu par la carte d'acquisition.

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



Choix des composants

Nous utiliserons une DEL pour émettre les UV et une photodiode pour mesurer la fluorescence rouge.

Notre choix s'est porté sur une LED UV HUVL400-320B, 3mm de diamètre. La lumière UV émise est centrée sur 400nm +/- 10nm.

Pour la détection de la fluorescence, nous avons choisi une photodiode assez sélective (pour éviter d'ajouter un filtre). Nous avons choisi la EPD-660-5-0.9.

Dans le schéma ci-dessous, nous avons superposé son spectre de réception avec celui de la fluorescence de la chlorophylle.

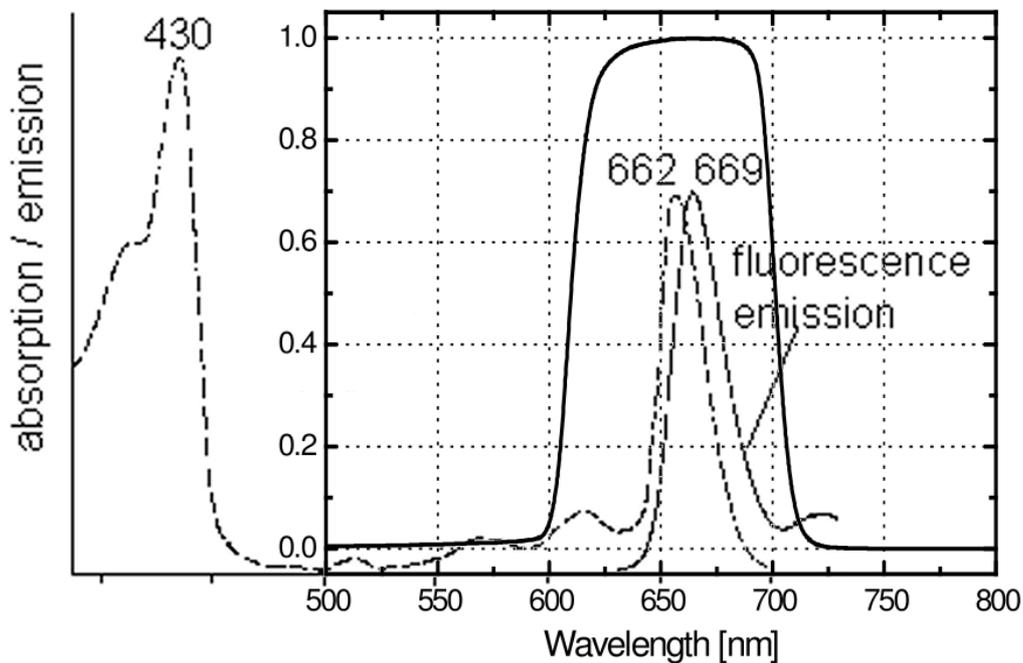


Fig.1 Spectre de détection superposer au spectre de fluorescence

Pour amplifier le courant produit par la photodiode, nous allons utiliser des amplificateur opérationnels qui nécessitent très peu de composants additionnels.

Détection de la chlorophylle

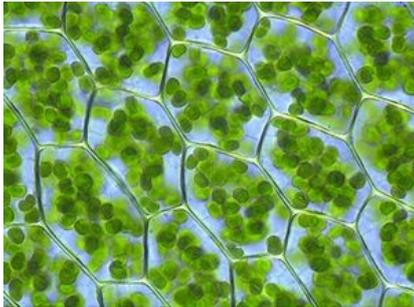
MANGO et bouées dérivantes



Réalisation de solutions de chlorophylle

Nous cherchons ici à réaliser des solutions dont la teneur en chlorophylle nous est connue.

Pour cela, nous allons utiliser de l'alcool à 90° comme solvant de la chlorophylle. L'alcool dissout les membranes des cellules et des chloroplastes qui libèrent leur chlorophylle.



Cellules de Plagiomnium
On voit très bien les chloroplastes.



Nous avons utilisé des feuilles d'épinard.

Le dosage consiste à ajouter des gouttes de solution saturée en chlorophylle à une dose d'alcool pur.

La solution de chlorophylle alcoolisée ayant une densité proche de celle de l'eau, une goutte a un volume d'environ 0,05ml.

Nous allons doser différents tubes d'alcool avec un nombre de gouttes différents

Exemple de dosage :

1 goutte	0,05 ml
Volume initial	3326,16 mm ³
	3,33 cm ³
	3,33 ml

Nb Gouttes	Volume ml	Concentration
0	3,330	0,000
1	3,380	0,015
2	3,430	0,029
3	3,480	0,043
4	3,530	0,057
5	3,580	0,070
6	3,630	0,083
7	3,680	0,095
8	3,730	0,107
9	3,780	0,119
10	3,830	0,131
11	3,880	0,142
12	3,930	0,153
13	3,980	0,163

Détection de la chlorophylle

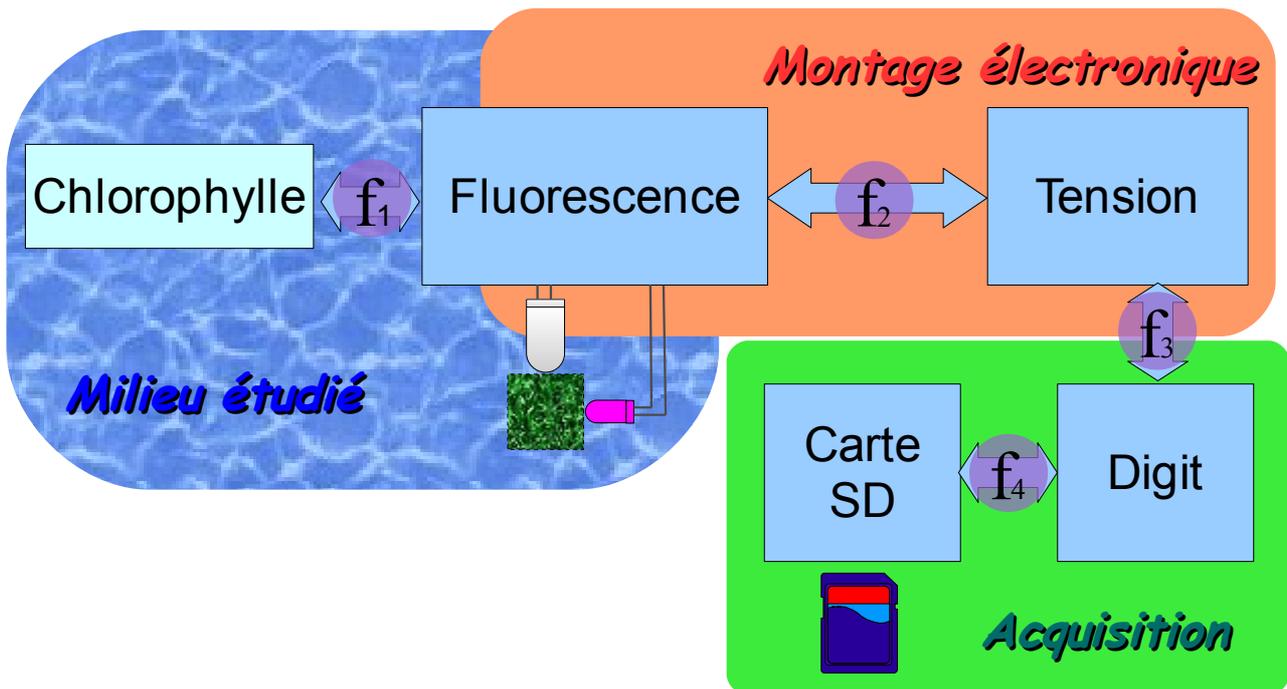
MANGO et bouées dérivantes



Méthode d'étalonnage

La méthode consiste à :

- Identifier chaque élément de la chaîne de mesure.
- Établir les fonctions mathématiques qui permettent de passer d'un élément à l'autre.
- Évaluer les perturbations possibles pour chaque élément.



f₁ : Notons que pour une certaine concentration de chlorophylle éclairée par une lumière UV constante, une certaine quantité de lumière rouge est émise.
Pour plus de détails sur le phénomène de fluorescence, lisez le chapitre 5

f₂ : La luminosité rouge recueillie est transformée en courant par la photodiode puis en tension par le montage électronique associé.

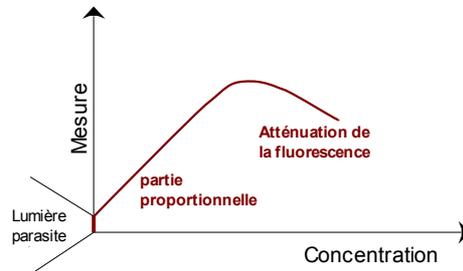
Pour éviter des perturbations électroniques, il est souhaitable d'utiliser des composants présentant un faible bruit électromagnétique.

Le principal élément perturbateur sera la lumière extérieure. Il conviendra d'intégrer le capteur de façon à éviter d'avoir la lumière solaire dans l'axe de la photodiode.

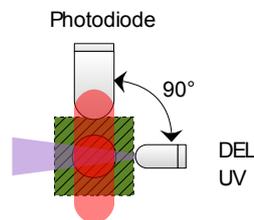
Détection de la chlorophylle MANGO et bouées dérivantes



Pour des concentrations faibles, la luminosité due au phénomène de fluorescence est proportionnelle à la concentration de chlorophylle. Les fortes concentrations de chlorophylle vont atténuer la fluorescence. On devrait avoir une courbe comme celle-ci.



Pour une meilleure efficacité de mesure, il conviendra de « regarder » la fluorescence avec un angle de 90° avec le faisceau de lumière UV incidente.



f₃ : La tension est numérisée par le système d'acquisition.

La carte d'acquisition MANGO mesure des tensions comprises entre 0 à 5V. La numérisation est faite sur 10 bits. La résolution du système est de 0,005V.

f₄ : Le nombre numérique codé sur 10 bits est converti en tension au format ASCII, c'est à dire en texte qui sera écrit dans un fichier, sur la carte SD. Le fichier pourra être importé facilement dans un logiciel tableur.

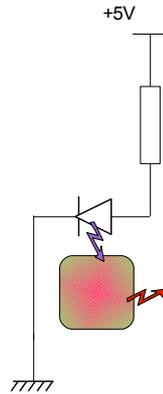
Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes

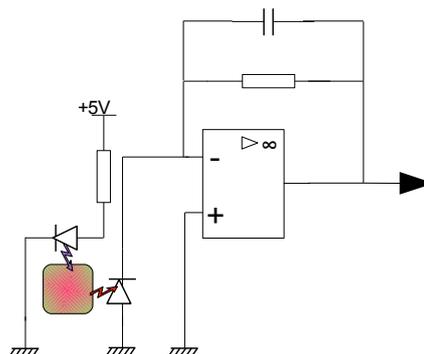


4. Réalisation de l'instrument de mesure

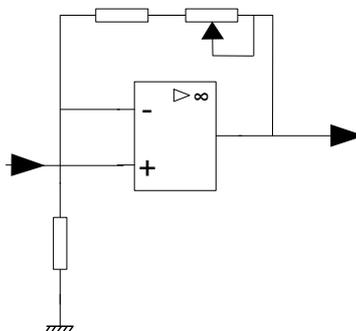
Étude électronique



Montage de la DEL ultraviolette, avec une résistance en série. La valeur de la résistance détermine le courant passant dans la DEL et donc l'intensité du rayonnement UV.



Un premier amplificateur transforme le très faible courant généré par la photodiode (quelques nano ampères) en tension. Vu le faible niveau de courant produit par la photodiode, nous devons utiliser des amplificateurs à faible niveau de bruit.



Un second amplificateur permet d'ajuster la tension au système d'acquisition. Le gain est ajustable pour permettre un étalonnage en fonction du milieu étudié.

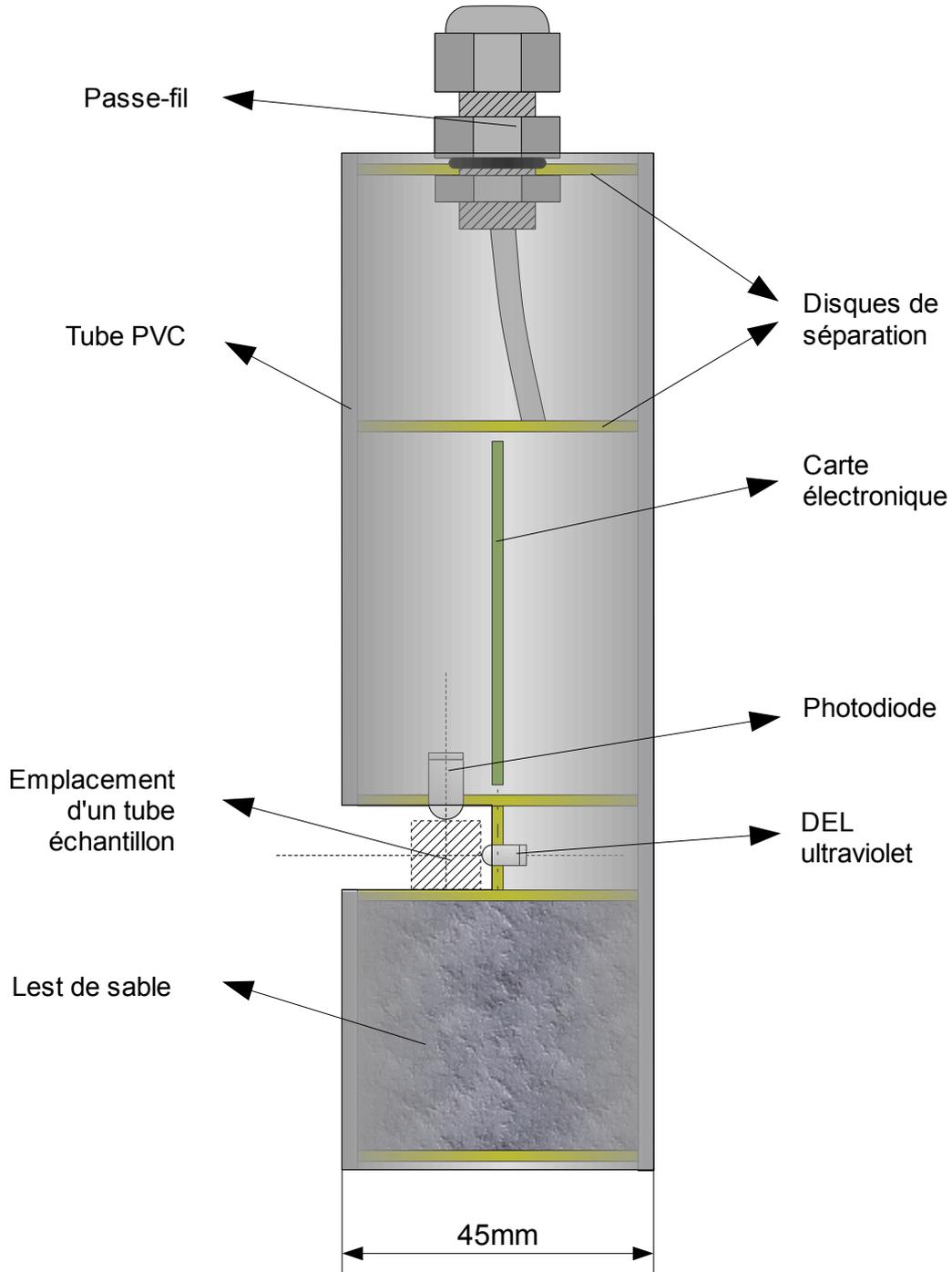
Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivanres



Étude mécanique

Nous allons intégrer l'ensemble DEL/Photodiode dans un tube de PVC standard.



Une ouverture en forme de demi lune, est pratiquée sur le coté du tube pour permettre le passage de l'eau chargée de chlorophylle entre la DEL et la photodiode et cela à l'abri de la lumière du jour. Les parois intérieures en contact avec l'eau sont peintes en noir mat. Les dimensions choisies permettent également le placement d'un tube carré standard utilisé pour les spectromètres de laboratoire.

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



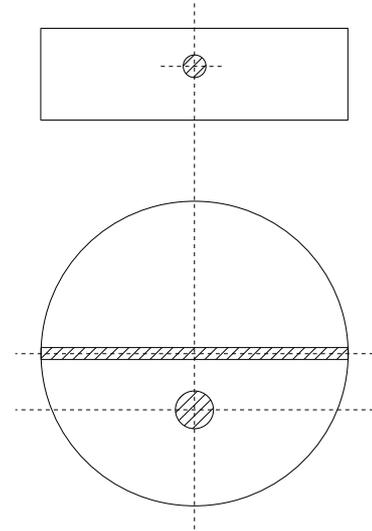
Voici le schéma des pièces pour la fixation de la DEL (rectangle) et de la photodiode (disque).

Ces pièces sont réalisées en plastique ou en époxy.

Les collages se font à la colle époxy bi-composants.

La carte électronique est placée verticalement et calée entre deux disques de séparation.

Une fois les étalonnages réalisés, le montage final doit être définitif, pour des raisons d'étanchéité.



Réalisation électronique

Les composants

Amplificateurs

C'est le LT1051 (Linear Technology) qui a été retenu. Il est très faible bruit, présente un *offset* très faible (à condition de l'alimenter avec une tension symétrique).

Il consomme très peu et est bon marché ! Le composant se présente sous la forme d'une puce à 8 pattes et intègre deux amplificateurs opérationnels identiques.

Résistances

Nous avons utilisé des résistances classiques (avec une précision de 5%) pour le prototype à titre exploratoire. Les modèles futurs auxquels nous demanderons plus de précision utiliseront dans doute des résistances couche métal à 1% de précision.

Alimentation symétrique

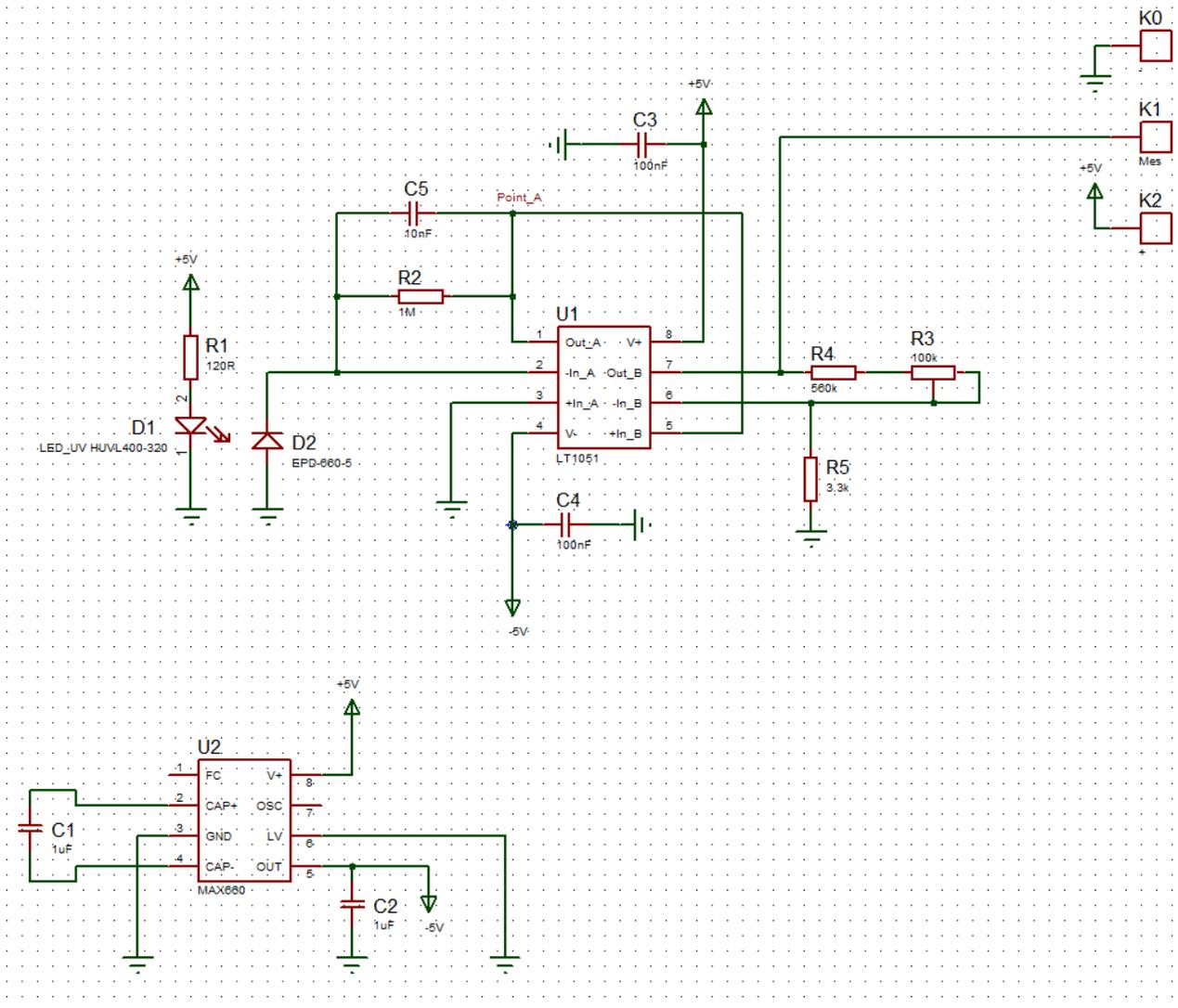
Nous utilisons un composant qui permet de faire du -5V avec du +5V : le MAX660 (Maxim). Il n'a besoin que d'un condensateur comme composant extérieur. Le courant utilisé sur cette tension négative par les deux amplificateurs opérationnels est très inférieur à ce que peut fournir le MAX660 (120mA). Donc pas de soucis.

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



Le schéma



Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



Étalonnage

La démarche d'étalonnage est dans un premier temps exploratoire : Sommes-nous capable de détecter la présence de chlorophylle avec notre montage ?

Une première opération consiste à utiliser les dosages réalisés précédemment et de les placer entre la DEL UV et la photodiode et de noter la tension donnée par notre montage.

Une première mesure avec un tube rempli d'alcool pure permet d'estimer l'influence du tube, de l'alcool ainsi que celle de la lumière ambiante qu'on veillera à ne pas faire varier tout au long des mesures.



Le montage réalisé pour ce tutoriel.

La DEL UV est à gauche, on observe la lumière rouge par le dessus du tube.

Voici les résultats obtenus :

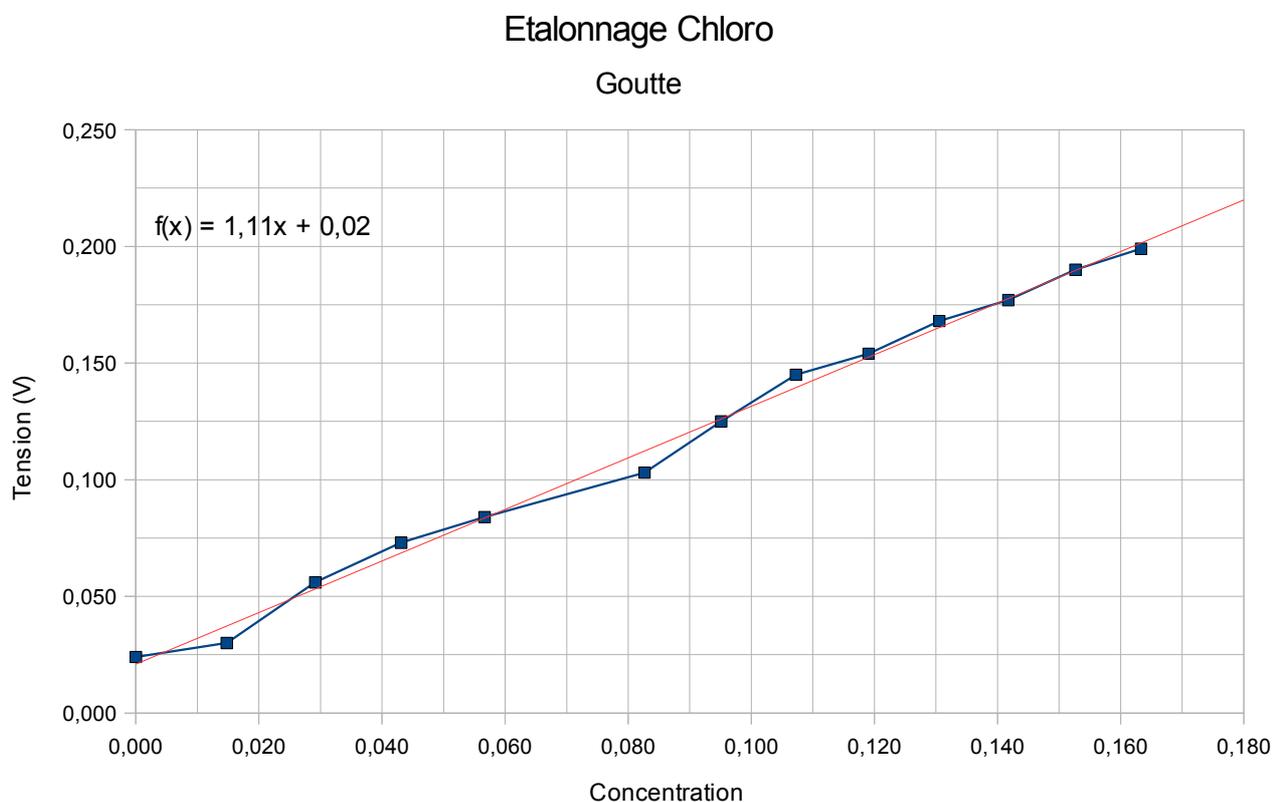
Nb Gouttes	Volume ml	Concentration	Tension
0	3,330	0,000	0,024
1	3,380	0,015	0,030
2	3,430	0,029	0,056
3	3,480	0,043	0,073
4	3,530	0,057	0,084
5	3,580	0,070	
6	3,630	0,083	0,103
7	3,680	0,095	0,125
8	3,730	0,107	0,145
9	3,780	0,119	0,154
10	3,830	0,131	0,168
11	3,880	0,142	0,177
12	3,930	0,153	0,190
13	3,980	0,163	0,199

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



et la courbe :



Note : le niveau de tension est ajustable en fonction des lumières parasites grâce à la résistance variable R_3 qui permet un réglage de l'offset.

Les premiers essais ont permis d'établir la relation proportionnelle entre la mesure et la concentration de chlorophylle. Reste à les valider dans le milieu aquatique (lac, cours d'eau ou océan).

5. Les fluorescences des plantes

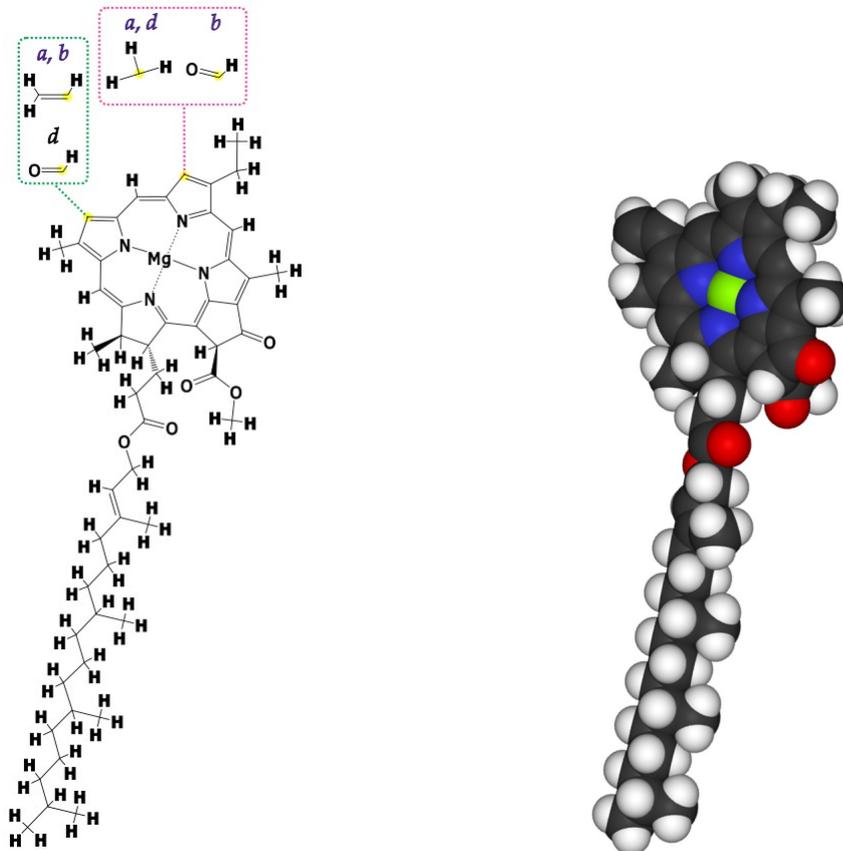
Les chlorophylles

Les chlorophylles les plus communes sont les chlorophylles *a* et *b*, présentes dans les chloroplastes des cellules de tous les végétaux de couleur verte : plantes à fleurs, fougères, mousses, algues vertes,...

Comme la nature est bien faite, elle a optimisé l'absorption de lumière (662 nm la chlorophylle *a* et 430 nm pour la chlorophylle *b*).

Il existe d'autres variantes *c1*, *c2*, *d* qui ne diffèrent entre elles que par de petits détails de structure. Seule la chlorophylle *a* est constante pour tous les végétaux.

La molécule de chlorophylle : $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$



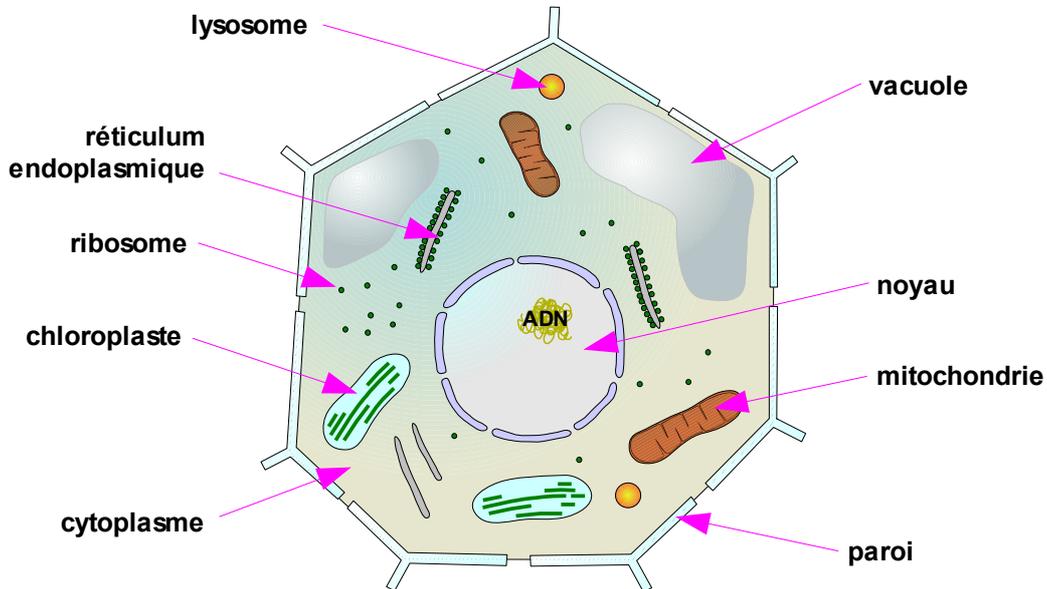
Elle s'articule autour d'un atome de magnésium (**Mg**) de quatre atomes d'Azote (**N**) le tout entouré d'une grappe de groupements carbone (**C** non représentés sur la structure de gauche) et hydrogène (**H**). Des atomes d'oxygène (**O**) permettent le rattachement de la chaîne carbonée à la grappe principale. En haut, on distingue les groupements différents correspondant aux différents types de chlorophylles.

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes

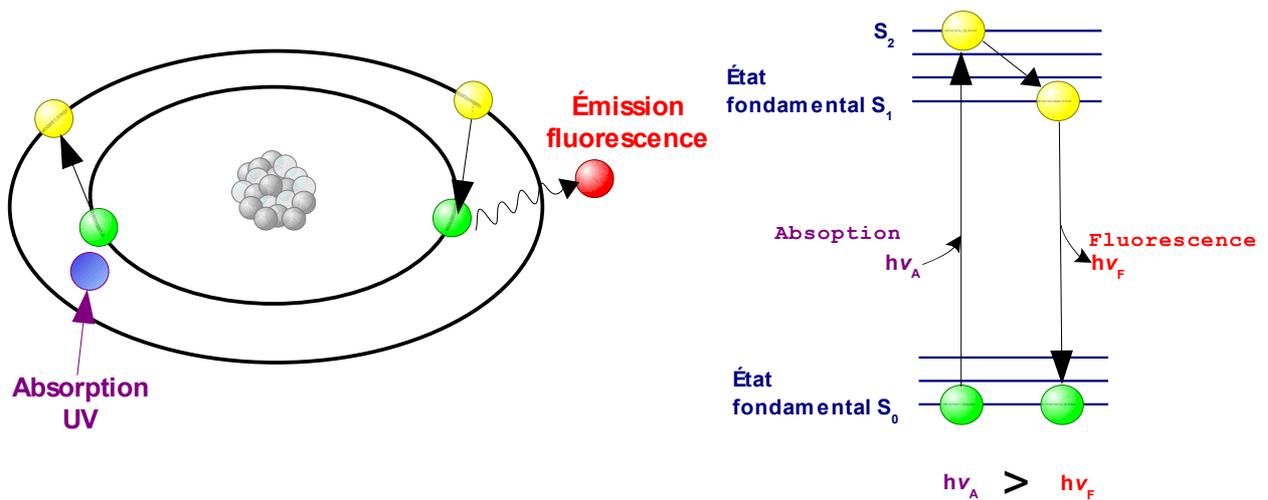


Les molécules de chlorophylle se trouvent dans les chloroplastes qui sont le siège de la photosynthèse des plantes. Les chloroplastes se trouvent dans le cytoplasme de la cellule végétale.



La fluorescence de la chlorophylle

Lorsque la chlorophylle absorbe la lumière, certains électrons des atomes qui la composent absorbent l'énergie lumineuse. Ceci a pour effet de les amener à un état "excité", plus éloigné du noyau atomique. Cet état, très instable, ne dure que 10 ns (nanoseconde) et les électrons reviennent spontanément à leur état initial en restituant l'énergie absorbée sous forme de lumière rouge (fluorescence).

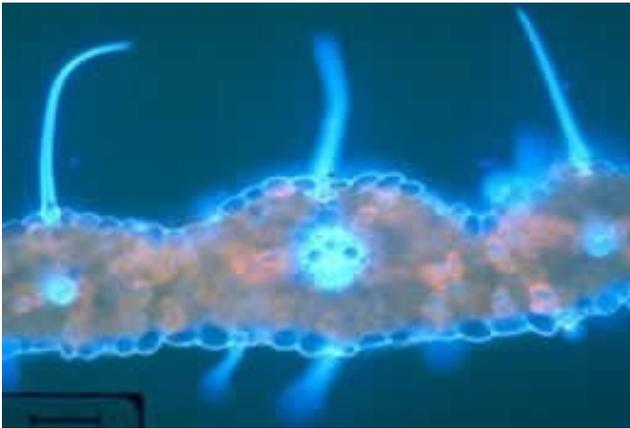


Dans les chloroplastes, les électrons de la chlorophylle participent aux réactions chimiques de la photosynthèse et sont remplacés par les électrons arrachés à l'eau. La chlorophylle ne présente alors pas de fluorescence.

Détection de la chlorophylle MANGO et bouées dérivantes



Il existe fondamentalement deux types de fluorescence : la **fluorescence bleu-vert** et la **fluorescence rouge**. L'imagerie de fluorescence, qui permet de visualiser la fluorescence de la feuille, a démontré que la fluorescence bleu-vert provient principalement de l'épiderme, des trichomes, des faisceaux vasculaires et des parois cellulaires, tandis que la fluorescence rouge provient essentiellement des chloroplastes des cellules mésophylliennes.



Émission de fluorescence sous excitation UV d'une coupe transversale (à gauche) et de la surface (à droite) de feuille de blé (photo Sylvie Meyer)

L'analyse spectrale de la fluorescence foliaire indique que la fluorescence bleu-vert est émise dans la plage de 400 à 630 nm tandis que la fluorescence rouge est émise dans les régions rouge et rouge lointain (630 à 800 nm) du spectre.



Celle-là, c'est de la Science-Fiction
(J.Cameron 2009)

Détection de la chlorophylle

MANGO et bouées dérivantes



6. Références

[1] Bruno TASSIN 1999 - Mesure de la Chlorophylle par fluorimétrie - CEREVE 1999

[2] Tounsia AÏT-SLIMANE http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Master/ue/MV426/fluo89.pdf

[3] Emmanuel JASPARD

<http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/Zsuite/2Photosynthese/4Pigments/4Pigments.pdf>

[4] Wikibis <http://www.enzyme.wikibis.com/chlorophylle.php>

[5] GNIS Centre de ressources sur les semences et les espèces végétales

<http://www.gnis-pedagogie.org/pages/classbio/chap2/7.htm>