

## Validation de la méthode de dosage du pigment chlorophylle *a* dans l'eau douce par extraction et par HPLC-DAD

Jérôme Lazzarotto<sup>1</sup>, Jennifer Maherou

**Résumé :** *La chlorophylle a est un pigment vert présent dans tous les végétaux, dont les algues. L'unité mixte de recherche CARRTEL de l'Inra de Thonon-les-Bains, mesure la concentration de ce pigment dans des lacs alpins afin d'étudier ces écosystèmes. Ce pigment est dosé dans l'eau par HPLC-DAD après une étape de filtration / extraction. Cette méthode qui fait l'objet d'un protocole défini, est utilisée depuis plusieurs années au laboratoire de l'unité. Afin de mieux répondre aux besoins des chercheurs et de se conformer à la démarche qualité de l'Inra, cette méthode a été validée par un profil d'exactitude. Cette validation a été effectuée en deux étapes afin d'évaluer la méthode dans son ensemble : une étape avec un matériau de référence puis à partir de cultures d'algues. Cet article décrit le plan d'expérience et la validation de cette méthode avec un profil d'exactitude dans ce contexte.*

**Mots clés :** limnologie, phytoplancton, chlorophylle *a*, validation, profil d'exactitude

### Introduction

L'unité mixte de recherche CARRTEL de l'Inra de Thonon-les-Bains étudie les écosystèmes lacustres ; son laboratoire de chimie réalise les analyses des eaux et des sédiments lors d'études limnologiques. Depuis plusieurs années, le laboratoire de chimie est engagé dans une démarche qualité selon le Référentiel Inra. Un des objectifs du plateau technique est que toute méthode utilisée en routine soit validée.

Afin d'étudier les écosystèmes lacustres, la biomasse algale des lacs doit être évaluée. Cette biomasse peut être évaluée soit par une détermination taxonomique soit par une estimation en quantifiant les pigments présents.

Nous traiterons ici de la validation de la méthode d'analyse de la chlorophylle *a* par chromatographie liquide avec détections sur barrette de diodes (HPLC-DAD) après extraction liquide-solide avec la méthode du profil d'exactitude (Max Feinberg, 2010b).

### 1. Contexte d'application de la méthode

Depuis le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, la qualité de l'eau des grands lacs s'est fortement dégradée avec le phénomène d'eutrophisation. Un apport excessif en nutriments par les effluents urbains et par les terres agricoles a provoqué une abondante prolifération phytoplanctonique. La décomposition de cette importante biomasse a entraîné une désoxygénation des eaux. Le phosphore est le facteur limitant de ce phénomène d'eutrophisation (Barroin, 2004). Il est aussi l'un des principaux indicateurs de la qualité de l'eau avec la biomasse algale et la transparence (DCE, 2000 ; Seq-EAU, 1999).

La chlorophylle *a* est le pigment le plus répandu dans les différentes classes d'algues. Sa quantification permet une estimation de la biomasse algale en présence.

---

<sup>1</sup> UMR0042 CARRTEL – Centre alpin de recherche sur les réseaux trophiques des écosystèmes mimniques – INRA - F-74200 Thonon-les-bains ☎ 04 50 26 78 21 ✉ [lazzarotto@thonon.inra.fr](mailto:lazzarotto@thonon.inra.fr)

L'analyse de la chlorophylle *a* est réalisée en routine par le laboratoire de chimie de l'unité CARRETEL par extraction liquide-solide puis HPLC-DAD.

Ces analyses sont effectuées lors de programmes de recherche limnologique afin d'évaluer la qualité d'un milieu lacustre (Lazzarotto et Rapin, 2008). Le stade d'eutrophisation d'un milieu est estimé d'après plusieurs paramètres, dont la chlorophylle *a* : oligotrophe : Chl *a* < 35 µg/l ; mésotrophe : 35µg/l < Chl *a* < 100 µg/l ; et eutrophe : Chl *a* > 100 µg/l (Vollenweider and Kerekes, 1982). D'autre part ces études sont effectuées avec plusieurs analyses, au minimum 4 prélèvements différents dans l'année.

Les exigences des demandeurs d'analyses seront fixées selon ces fréquences d'observation et les distinctions entre les stades d'eutrophisation.

## **2. Matériel et méthode**

L'eau est filtrée pour mesurer sa teneur en chlorophylle *a*. L'analyse de la chlorophylle *a* est réalisée par extraction liquide-solide à partir du filtre puis HPLC-DAD.

Cette méthode est établie et fixée par un mode opératoire, inspiré de la norme NF T90 116. Les pigments sont photosensibles et thermosensibles, les échantillons sont donc conservés au froid et à l'obscurité jusqu'à l'analyse.

### **2.1 Filtration – Extraction**

L'eau brute est filtrée sur un filtre GFC. Le volume filtré est choisi entre 50 ml et 5 l selon la transparence de l'échantillon. Les algues contenant les pigments sont retenues sur ce filtre. Les filtres sont déposés dans un tube à centrifuger avec le solvant d'extraction (méthanol/acétate d'ammonium 0.5 M (98/2 ; v/v)). Ils sont soumis à des ultra-sons afin de briser les cellules algales et de libérer les pigments. Les tubes sont ensuite centrifugés.

Le surnageant est récupéré et filtré à travers un filtre seringue pour le séparer des débris

### **2.2 HPLC-DAD**

L'extrait est ensuite analysé par HPLC-DAD, sur une chaîne Waters avec un passeur d'échantillons. 100 µl sont injectés et élués selon un gradient d'éluion à base de 3 éluants (méthanol / 0,5 M acétate d'ammonium (80/20) ; acétonitrile/eau (90/10) ; éthyle acétate) de 30 mn.

La chlorophylle *a* est identifiée par son temps de rétention ainsi que par son spectre d'absorption spécifique (Jeffrey *et al.*, 1997).

### **2.3. Expression du résultat**

La quantification est permise grâce à un étalonnage externe à partir d'étalons certifiés de chlorophylle *a* dissous dans du méthanol. La quantité mesurée dans le volume injecté est rapportée au volume d'eau filtré. La concentration ainsi mesurée est exprimée en µg Chl *a*/l.

## **3. Démarche de validation avec le profil d'exactitude**

Afin de valider cette méthode, nous avons utilisé la méthode du profil d'exactitude. Cet outil permet de vérifier si une méthode répond aux exigences fixées. En effectuant plusieurs

analyses sur plusieurs jours, il détermine les paramètres pris en compte pour la validation de méthode tels que la justesse, la fidélité intermédiaire et les incertitudes.

Pour cette démarche, nous avons choisi de différencier les deux étapes de la méthode : l'extraction puis la quantification. Dans un premier temps, nous établissons le profil d'exactitude pour la quantification seule *via* HPLC-DAD, avec des matériaux de référence certifiés (MRC) et différents de ceux utilisés pour effectuer l'étalonnage. Nous validons ainsi la justesse de la méthode et nous estimerons la variabilité de cette étape.

Dans un second temps, nous établissons le profil d'exactitude pour la méthode entière, soit l'extraction puis la quantification. Pour ce faire, nous utilisons plusieurs cultures d'algues.

L'étape d'extraction peut apporter un biais qu'il faut considérer. Les pigments présents dans l'échantillon initial peuvent ne pas être extraits en totalité. Nous ne pouvons pas déterminer le recouvrement réel de la méthode. Nous avons estimé en étude préliminaire le rendement maximum de la méthode. Nous avons effectué des mesures en modifiant la méthode et en utilisant une méthode d'extraction considérée comme optimale, avec une étape supplémentaire de broyage du filtre. Le recouvrement observé par rapport à la méthode considérée comme optimale est de 78 % pour des quantités entre 0.1 µg Chl *a* et 6 µg Chl *a* extraites. Ce recouvrement n'est pas un recouvrement absolu mais relatif et correspond au recouvrement maximum possible de la méthode.

D'après ces connaissances de la méthode que nous utilisons en routine, nous suivons la démarche de validation décrite par Max Feinberg (2010b)

### **3.1 La quantité mesurée**

La quantité mesurée est la concentration en chlorophylle *a* dans le phytoplancton de l'eau. La méthode est une méthode indirecte qui nécessite un étalonnage à partir d'extraits méthanoliques étalons.

Les résultats sont exprimés en µg Chl *a* extrait, cette quantité est ensuite reportée au volume filtré. L'expression finale du résultat est en µg Chl *a*/l.

### **3.2 Les objectifs de la validation**

#### **3.2.1 Le domaine de validation**

Les résultats habituels observés varient entre 0,2 et 100 µg Chl *a*/L, avec des volumes filtrés entre 50 ml et 5 l. La quantité extraite varie donc entre 1 et 5 µg Chl *a*.

Le domaine de validation est exprimé en quantité extraite. Il est choisi plus large qu'entre 1 et 5 µg Chl *a* extraite afin de pouvoir mesurer le pigment si le volume filtré n'est pas optimal et de ne pas avoir à refaire une filtration. Le domaine de validation choisi est de 0,4 à 8,0 µg Chl *a* extrait.

#### **3.2.2 Les limites d'acceptabilité et intervalle de tolérance**

Les exigences des demandeurs d'analyses sont fixées selon les fréquences d'observation et les distinctions entre stades d'eutrophisation explicitées en 1. Il est souhaité que au moins 3 analyses sur 4 donnent un résultat à +/- 25 % de la valeur vraie de l'échantillon, soit que 75 % des résultats obtenus aient un recouvrement de 25 %.

Ainsi les limites d'acceptabilité (□) sont de 25 % et l'intervalle de tolérance (□) est de 75 %.

### 3.3 Les échantillons de validation

Il existe des étalons certifiés d'extrait de chlorophylle *a* méthanolique. Mais il n'existe pas de solution d'algue avec une concentration connue en chlorophylle *a*, du fait des problèmes liés à l'évolution des algues. Il est impossible aussi de doper une matrice puisque le pigment mesuré est à l'intérieur des cellules de plancton.

Pour cette validation, nous avons choisi de différencier les deux étapes de la méthode : l'extraction puis la quantification.

Dans un premier temps, nous établirons un profil d'exactitude pour la quantification seule *via* HPLC-DAD, avec des étalons d'extrait de chlorophylle *a* méthanolique certifiés. Nous validons ainsi la justesse de la méthode et la variabilité liée à cette étape.

Dans un second temps, nous établirons deux profils d'exactitude pour la méthode entière, soit l'extraction puis la quantification. Pour ce faire, nous utilisons deux cultures d'algues, afin de contrôler les espèces d'algues en présence et l'évolution de la biomasse. Nous ne connaissons pas la valeur vraie de la concentration en chlorophylle *a* de ces cultures. Ces profils d'exactitude nous renseigneront sur la variabilité globale de la méthode.

Ces profils sont effectués pour deux algues cultivées spécifiques : diatomées et cyanobactéries. Ces cultures seront filtrées dans les mêmes conditions que les échantillons.

### 3.4 Les essais de validation

#### 3.4.1 Etape HPLC-DAD

Nous avons choisi 4 niveaux de quantité de chlorophylle *a* : 0,4 ; 0,8 ; 2,0 ; 8,0  $\mu\text{g Chl } a$ . Afin d'évaluer la répétabilité et la fidélité intermédiaire de cette étape, nous avons réalisé pour chacune de ces quantités 3 réplicats et cela pendant 3 jours. Soit 9 mesures par niveau, soit 36 mesures au total.

#### 3.4.2 Analyse globale extraction – HPLC-DAD

Nous avons filtré différentes quantités des cultures d'algues afin d'approcher les quantités évaluées lors de la première étape : 1 ml ; 3 ml ; 10 ml ; 90 ml. Afin d'évaluer la répétabilité de cette étape, nous avons réalisé pour chacune de ces filtrations 3 réplicats. Etant donné que la culture d'algues évolue dans le temps, la fidélité intermédiaire ne peut être déterminée en effectuant plusieurs mesures sur différents jours, nous avons donc effectué 3 séries de filtration dans la même journée avec deux opérateurs. Soit 9 mesures par niveau, 36 mesures par culture d'algues et 72 mesures au total.

### 3.5 L'étalonnage

L'étalonnage est effectué avec des solutions étalons méthanoliques injectées à 3 niveaux : 0,28  $\mu\text{g Chl } a$  ; 4,60  $\mu\text{g Chl } a$  ; 9,20  $\mu\text{g Chl } a$ . L'étalonnage est effectué avec une analyse par niveau.

L'étalonnage devant être effectué à chaque série du plan de validation, il sera effectué lors des 3 séries de mesures pour les étalons certifiés ainsi que pour les algues.

## 4. Résultats

La fonction d'étalonnage est linéaire. Les quantités extraites lors de chaque série sont calculées à partir des fonctions linéaires déterminées à chaque étalonnage.

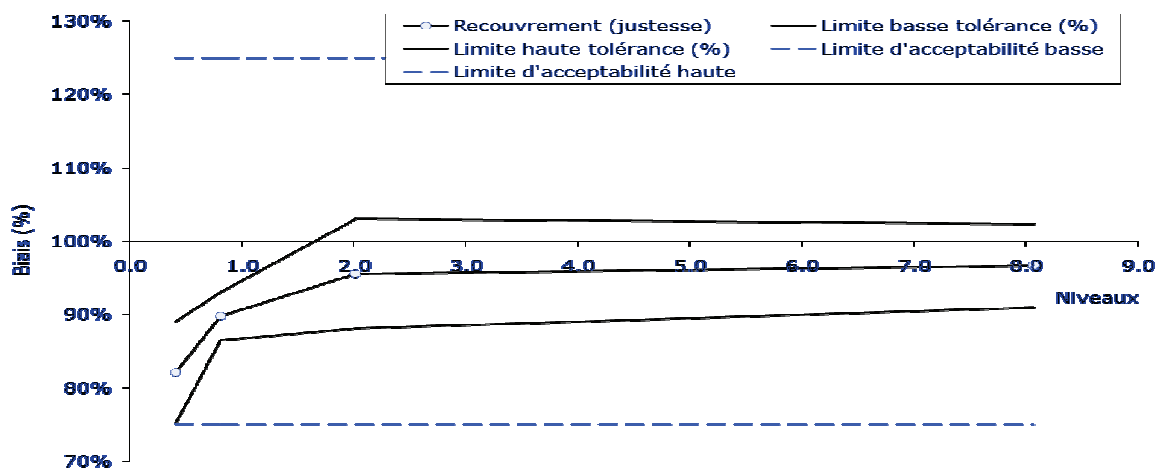
**Tableau 1** : Résultats des étalonnages obtenus lors de chaque série du plan ( $Aire = a x [Chl a] + b$ )

	ESSAIS Etalons certifiés			ESSAIS Culture cyanobactéries			ESSAIS Culture diatomées		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
a	5 851 243	5 920 726	5 955 871	5 603 378	5 738 962	5 465 850	5 451 452	5 515 275	5 645 598
b	-3 636	-6 268	1 621	-922	-5 150	-1 359	3 490	3 650	5 696
r <sup>2</sup>	1.0000	0.9999	0.9999	1.0000	0.9999	1.0000	1.0000	0.9999	0.9997
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Les résultats des essais de validation sont insérés dans le fichier Excel ([https://intranet.inra.fr/mission\\_qualite/acces\\_thematiques/formations\\_et\\_ecoles/ecole\\_des\\_tech\\_niques\\_validation\\_methodes/profil\\_d\\_exactitude](https://intranet.inra.fr/mission_qualite/acces_thematiques/formations_et_ecoles/ecole_des_tech_niques_validation_methodes/profil_d_exactitude)). Le fichier génère automatiquement les tableaux de calcul

### 4.1 Profil d'exactitude de l'étape analytique HPLC-DAD seule

Le profil d'exactitude de cette étape analytique (figure 1) nous indique que la méthode est juste et répétable dans le domaine de 0,4 à 8,0 µg Chl a. Les incertitudes relatives sont de l'ordre de 10 % et les limites de tolérance sont comprises dans les limites d'acceptabilité jusqu'à la valeur basse de 0,4 µg Chl a.



**Figure 1** : profil d'exactitude de la méthode d'analyse HPLC-DAD de la chlorophylle a avec des matériaux de référence

#### 4.2 Profils d'exactitude de la méthode globale extraction - analyse HPLC-DAD à partir de cultures d'algues

Les profils d'exactitude à partir des cultures d'algues ne renseignent pas sur la justesse de la méthode. La valeur cible correspond à la moyenne des mesures. Ces profils indiquent la variabilité de la méthode dans son ensemble : l'extraction et l'analyse HPLC-DAD.

Les figures 2 et 3 représentent ces profils.

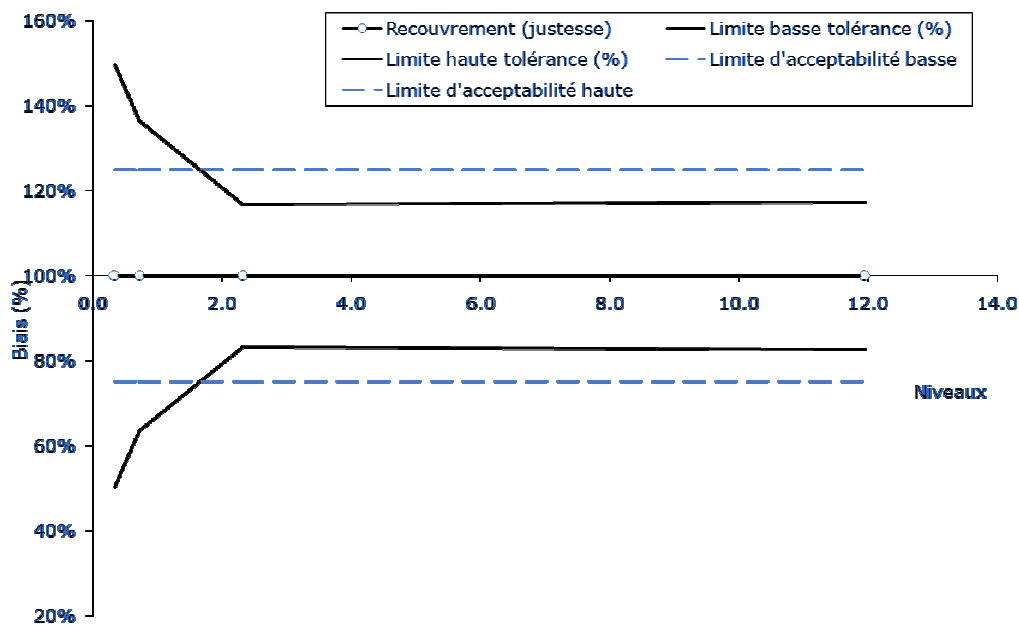


Figure 2 : profil d'exactitude de la méthode d'analyse HPLC-DAD de la chlorophylle a avec une culture de cyanobactéries

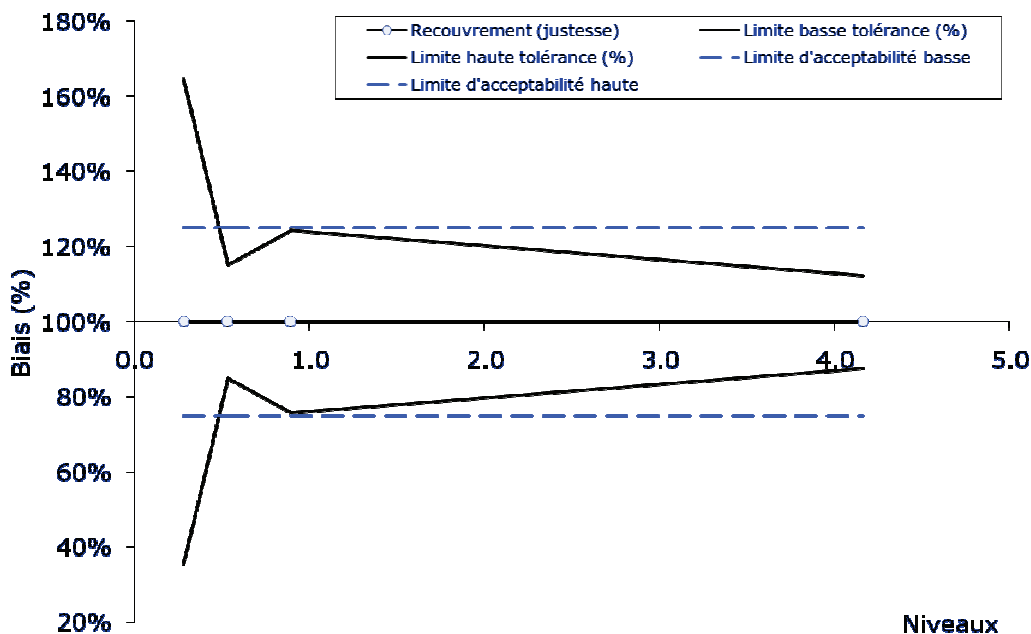


Figure 3 : profil d'exactitude de la méthode d'analyse HPLC-DAD de la chlorophylle a avec une culture de diatomées

Ces profils sont différents selon la culture d'algues. L'homogénéité des pigments dans les algues et les solutions ne sont donc pas les mêmes selon les cultures d'algues. La variabilité est acceptable de 1,8 µg Chl *a* à 12 µg Chl *a* pour la culture de diatomées et de 0,5 µg Chl *a* à 4,1 µg Chl *a* pour la culture de cyanobactéries.

## Conclusion

L'étape d'analyse HPLC-DAD est validée selon les exigences spécifiées : la justesse de la méthode est validée dans le domaine de 0,4 à 8,0 µgChl *a*.

Les résultats des essais de la méthode globale extraction – HPLC-DAD indique une variabilité différente selon les algues en présence.

En prenant en considération ces résultats, la méthode est validée selon les exigences spécifiées dans le domaine de 4,1 µg Chl *a* à 8 µg Chl *a*, soit avec des volumes filtrés de 50 ml à 5 l de 0,8 à 160 µg Chl *a*/l. Le domaine validé correspond aux besoins usuels. 75 % des résultats indiqueront des valeurs autour de 25 % de la valeur vraie.

Étant donné l'importance de la variabilité due au prélèvement et aux classes d'algues en présence, il est conseillé d'apporter un soin particulier à l'échantillonnage sur le terrain, en effectuant par exemple plusieurs échantillons à pooler.

Une carte de contrôle à partir de solutions de chlorophylle *a* certifiées, est effectuée afin de garantir la stabilité de la méthode validée.

L'outil profil d'exactitude a facilité cette validation et a permis de confronter les exigences des demandeurs d'analyses avec les possibilités du laboratoire.

## Bibliographie

Barroin G. (2004) Phosphore, azote, carbone... Du facteur limitant au facteur de maîtrise. *Courrier Env. INRA*, 52, 23-30.

DCE, Directive Cadre Eau (2000) Directive 2000/60/CE JO CE L 327/1 du 22.12.2000, p. 72

Feinberg Max (2010<sup>b</sup>) Mise en œuvre du profil d'exactitude *in* Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, numéro spécial : 27-44

Lazzarotto J., Rapin F. (2008) Évolution physico-chimique des eaux du Léman. Rapports sur les études et recherches entreprises dans le bassin lémanique. Programme quinquennal 2006-2010. Campagne 2007, p. 31-55

SEQ-Eau (1999) Système d'évaluation de la qualité des cours d'eau, rapport de présentation SEQ-Eau. Agences de l'eau, les études des agences de l'eau n° 64 - 59p.

Vollenweider, R.A., and Kerekes, J. (1982) Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. OECD Cooperative programme on monitoring of inland waters (Eutrophication control), Environment Directorate, OECD, Paris. P. 154

