

14 janvier 2008

SPECIATION CHIMIQUE DU FER DANS L'OCEAN :

**Les complexes fer-porphyrines,
méthode de détection et mécanismes de production**

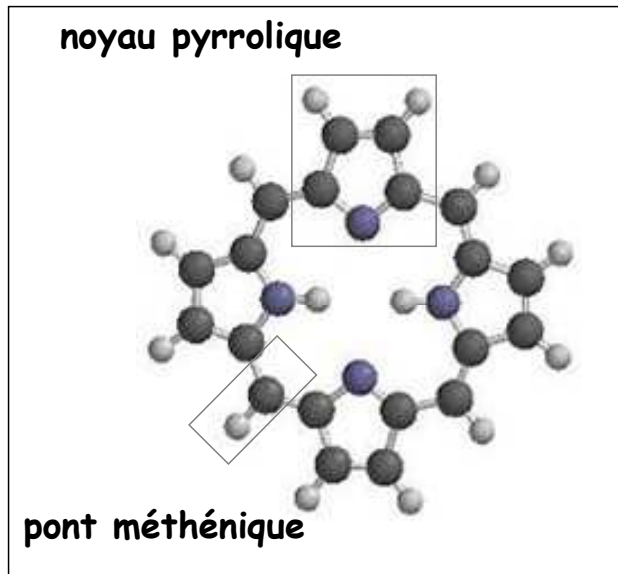
Soutenance de thèse
présentée par **Lilita VONG**



Au : **Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie (UMR CNRS 6535)**
Directeur de thèse : **Stéphane BLAIN (Pr.)**

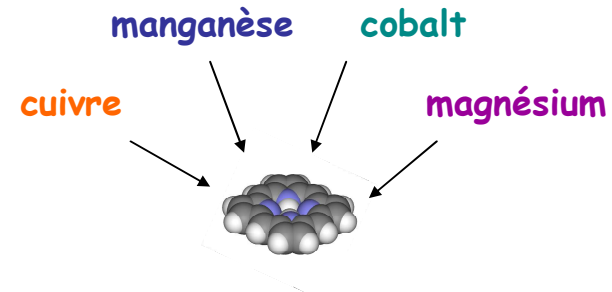
Qu'est-ce qu'un complexe fer-porphyrine ?

STRUCTURE COMMUNE DES PORPHYRINES



+ ou - SOLUBLE
dans les solutions aqueuses
(AGGREGATION, ADSORPTION)

METALLO-PORPHYRINES



FER-PORPHYRINES

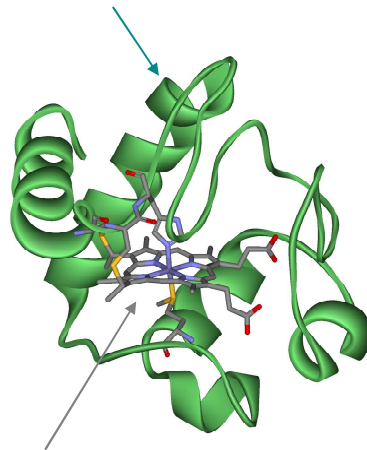


(ECHANGEURS D'ELECTRONS)
Rôle dans les réactions biochimiques

Rôles dans les fonctions physiologiques

ENZYME contenant
une fer-porphyrine :

partie protéique



fer-porphyrine

Exemples de complexes fer-porphyrines

Catalases

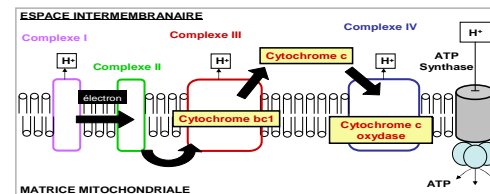
Peroxydases

Cytochromes (a, a₃, b, b₆, c, c₁, d₁, f, P450)

Hémoglobine, myoglobine

Rôles clés dans les fonctions physiologiques

Chaînes de transfert d'électrons
(respiratoires et photosynthétiques)

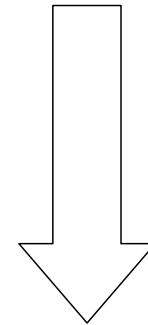


Élimination des radicaux libres
Stockage et transport d'oxygène
... etc.

Les fer-porphyrines : des molécules ubiquistes

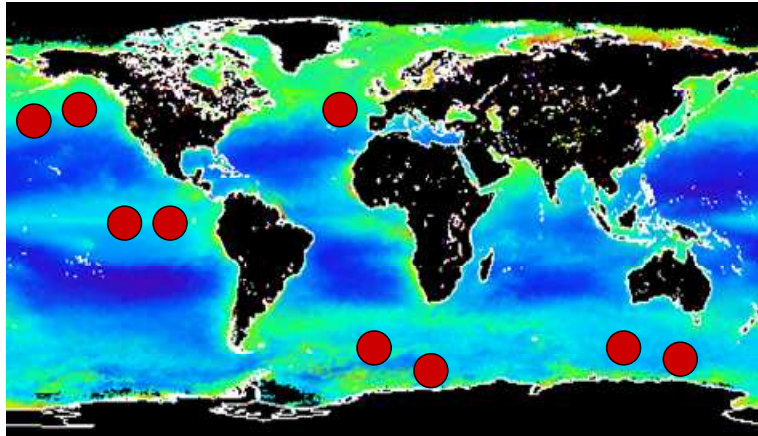


Lorsque ces organismes meurent, le contenu de leur(s) cellule(s) est libéré dans le milieu extérieur...



Libération possible de ces complexes fer-porphyrines intracellulaires dans l'eau de mer,
Dissolution possible des fer-porphyrines dans la phase dissoute ($<0,2 \mu\text{m}$)

Les fer-porphyrines : sources de fer dans l'océan ?



Limitation en FER

40 % de la surface
océanique mondiale

La croissance du phytoplancton peut être limitée par le fer

LE PROBLEME :



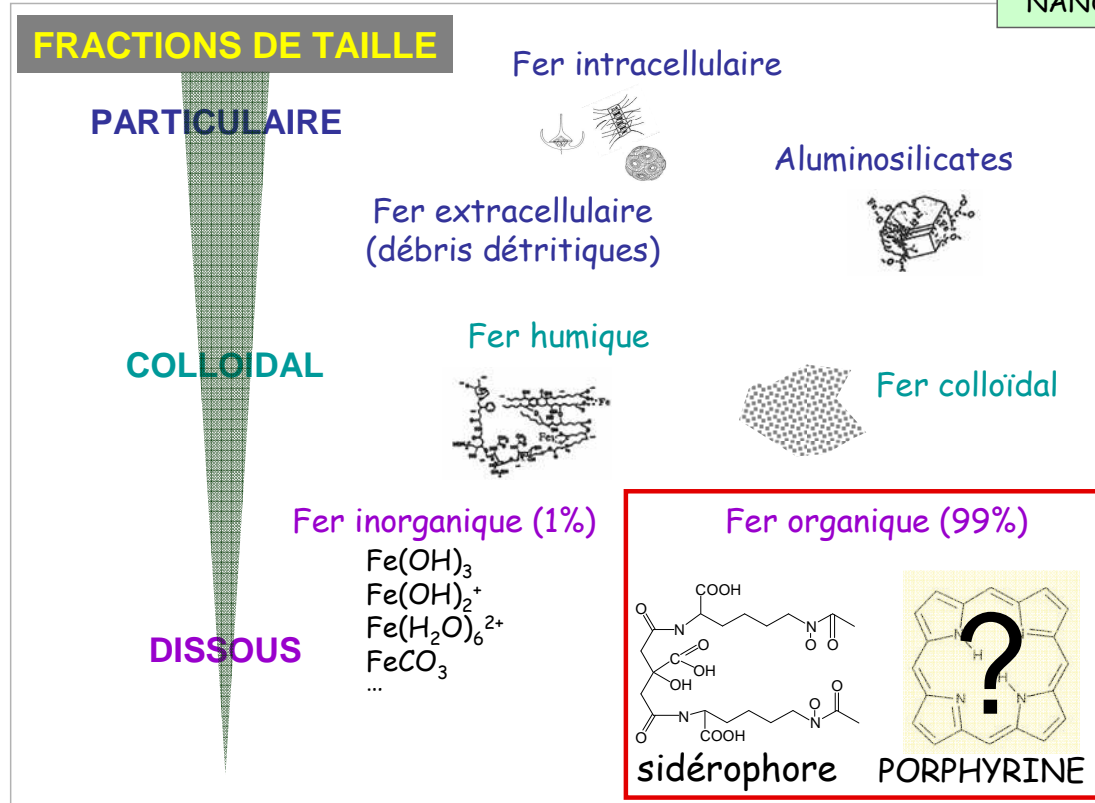
La biodisponibilité en fer
est TRES PEU CONNUE



RESOUDRE LA
SPECIATION CHIMIQUE du fer

La spéciation chimique du fer dans l'océan ...

Ordre du NANOMOLAIRE



Le fer dissous est utilisé par les micro-organismes, et il est majoritairement sous forme organique.

Objectifs :

Pourrait-on retrouver les fer-porphyrines dans l'eau de mer, en phase dissoute ($<0,2 \mu\text{m}$) ?

Objectif 1:

Mettre au point une méthode capable de mesurer les fer-porphyrines dans l'eau de mer.

Objectif 2:

Étudier un mécanisme de production des fer-porphyrines.

PARTIE 1
Comment doser les FePy dans l'eau de mer ?

Le point de départ ...

Le luminol



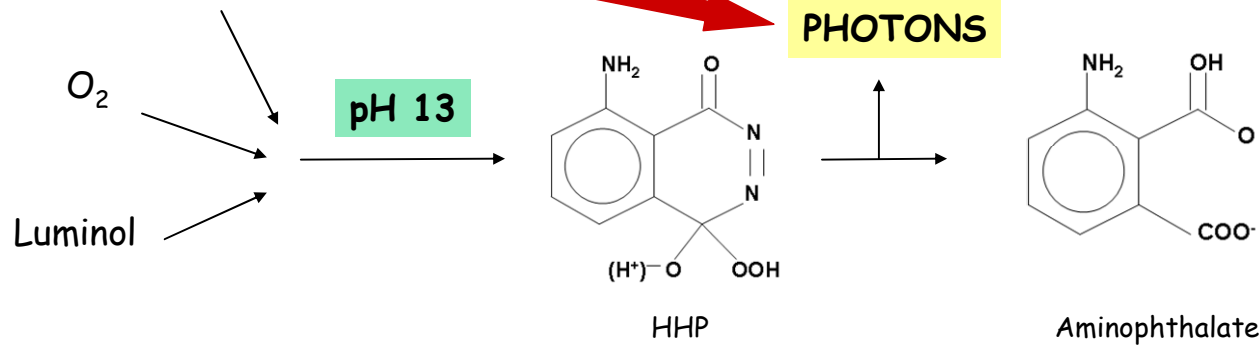
Réaction de chimiluminescence avec l'hémoglobine



Pour des tests d'immuno-essais:

(Motsenbocker et al., 1993)

METALLOPORHYRINES
(fer-porphyrines)



Quelles sont les principales exigences de ce développement analytique ?

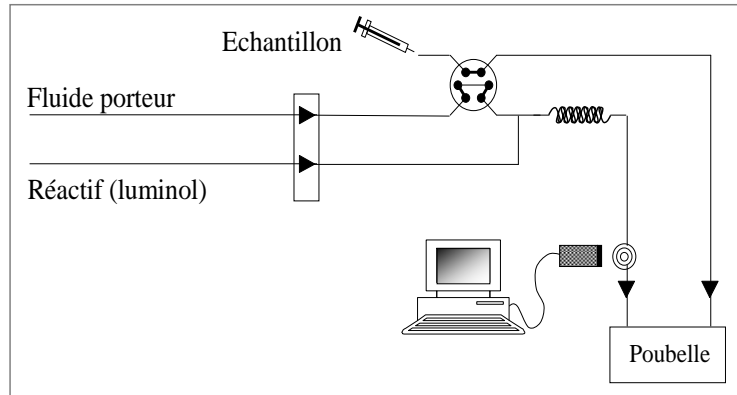
Pour être utilisée en océanographie, la réaction doit être :

- transférable en analyse par injection en flux (FIA)
- adaptée pour l'analyse d'eau de mer
- spécifique aux fer-porphyrines
- assez sensible pour mesurer des concentrations naturelles

Peut-on appliquer la réaction de chimiluminescence en FIA ?

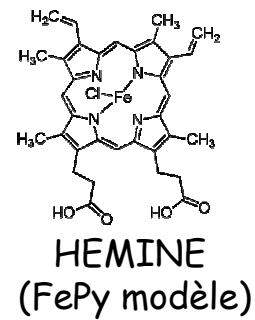
étape 1

FIA = Analyse par injection en flux



Avantages :

- Peu de manipulation sur l'échantillon
- Consomme peu de réactifs
- Applicable à bord de navires
- Peu coûteuse



CALIBRATION avec l'HEMINE

- Commercialisée
- Soluble



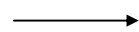
nM d'équivalent hémine

Peut-on appliquer la réaction à des analyses d'eau de mer ?

étape 2

SANS TRAITEMENT ... **NON**

pH 13



Formation de précipités:

Incompatibles avec la FIA

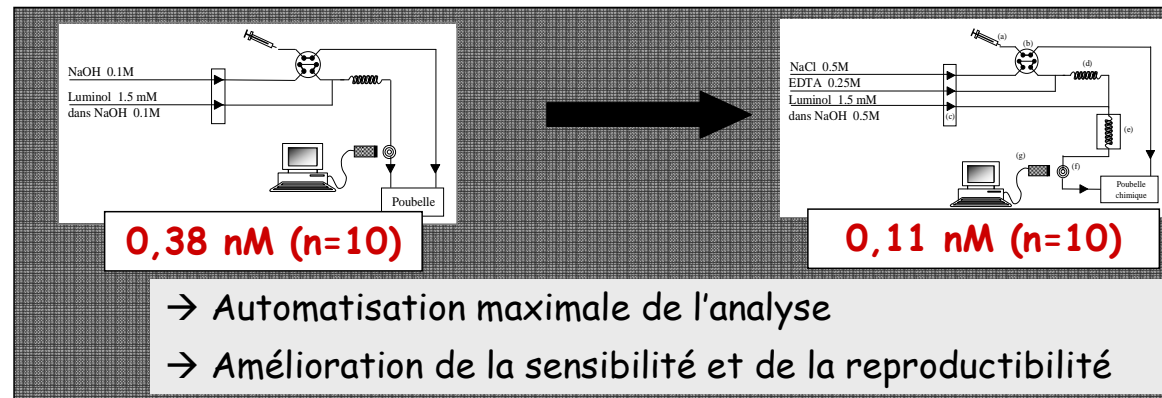
Risque d'adsorption des fer-porphyrines

AVEC TRAITEMENT ... **OUI**

Hors ligne

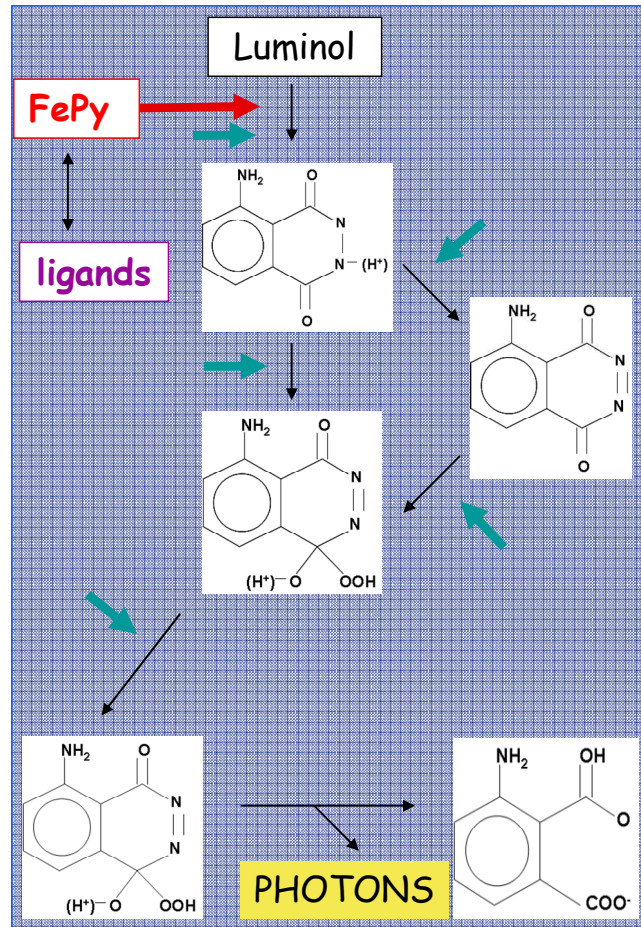
→ Utilisation de l'EDTA qui empêche la précipitation

En ligne



La FIA est-elle spécifique aux fer-porphyrines?

étape 3



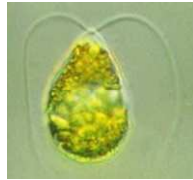
Tests de spécificité :

- ➔ Autres métallo-porphyrines et porphyrines libres (12 molécules)
- ➔ Interférents (dans d'autres conditions de pH...) : Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , H_2O_2
- ➔ Ligands (en compétition avec FePy) : DFOB, Fe-DFOB, acides humiques et phytiques

➔ PAS D'INTERFERENCES !

Application de la FIA ?

étape 4



Dunaliella tertiolecta
PHYTOPLANCTON

QUOTA INTRACELLULAIRE (FePy)
1 à 5
($\times 10^{-18}$ moles d'équivalent hémine.cellule⁻¹)



Calcul théorique (Ewetz et Thore, 1978)
(Miller et Vogelhut, 1978)



Spectrophotométrie (Gledhill, 2007)

!! PREMIERES CONCENTRATIONS EN MILIEU NATUREL !!

~ 9 nM (Rhône)

~ 11 nM (Etang de Berre)

~ 1 à 2 nM (Baie de Marseille, Guyane)

(Océan austral)
< LD

(En phase dissoute)

Conclusions :

... a-t-on répondu à nos objectifs ?

Pour être utilisée en océanographie, la réaction doit être :

- transférable en FIA
- adaptée pour l'analyse d'eau de mer
→ Avec un traitement spécifique
- spécifique aux fer-porphyrines
- assez sensible pour mesurer des concentrations naturelles
→ 0,11 nM équivalent hémine

La suite de ce travail

BILAN POSITIF :

CETTE FIA EST LA PREMIERE METHODE DE DOSAGE DES FePy
DANS L'EAU DE MER :

Limite de détection : 0,11 nM équivalent hémine

1^{ère} possibilité:

POURSUIVRE LE DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE
(Diminution de LD) (phase de pré-concentration)

2^{ème} possibilité:

ETUDE DES MECANISMES DE PRODUCTION de FePy
(cultures)

PARTIE 2
Étude de mécanismes
de production des fer-porphyrines

Quel mécanisme choisit-on d'étudier ?

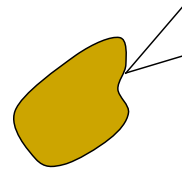
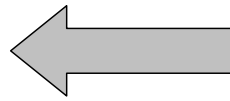
LA PREDATION (=LE BROUTAGE)

MODELE SIMPLE : Phytoplancton - Microzooplancton



Phytoplancton

Phagotrophie



Microzooplancton

Cause de mortalité
souvent dominante
dans le domaine
pélagique

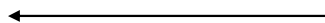
CULTURES NON AXENIQUES

Phytoplancton



Dunaliella salina
CHLOROPHYCEE

Prédateur associé

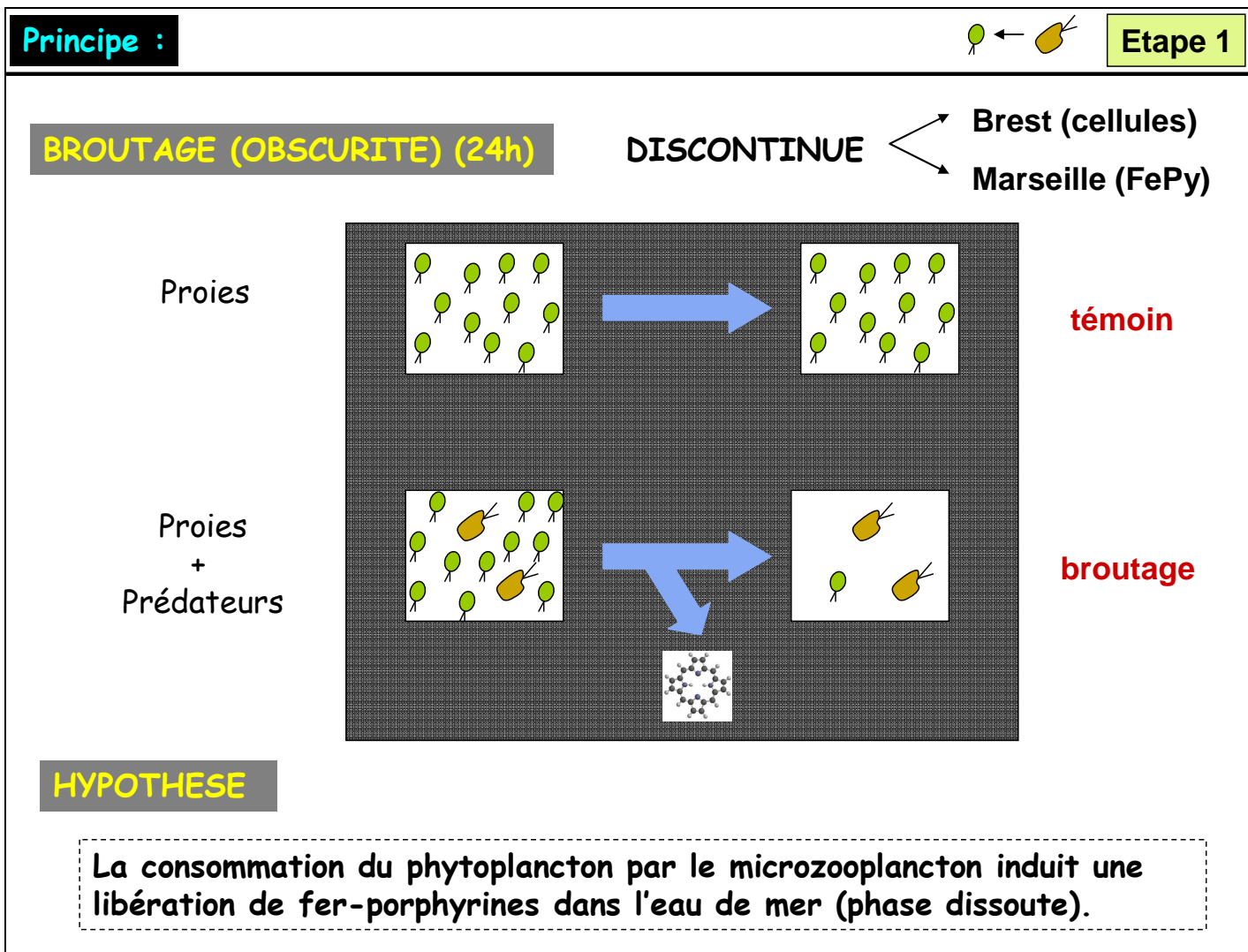


(5 fois plus gros)

Microzooplancton



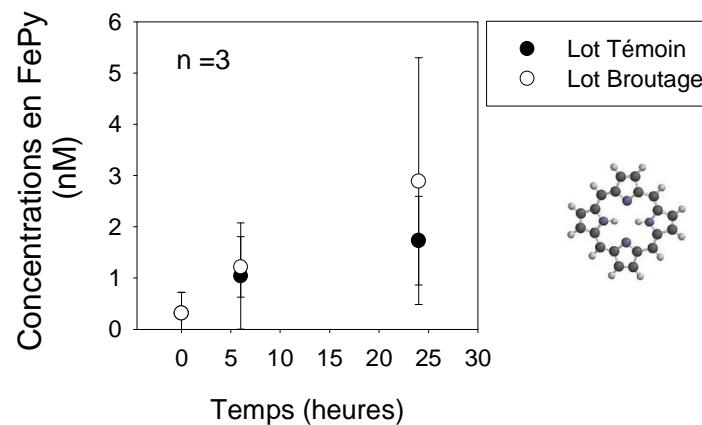
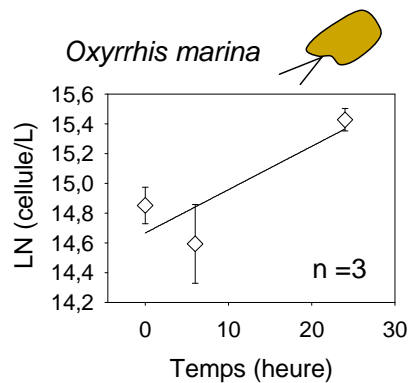
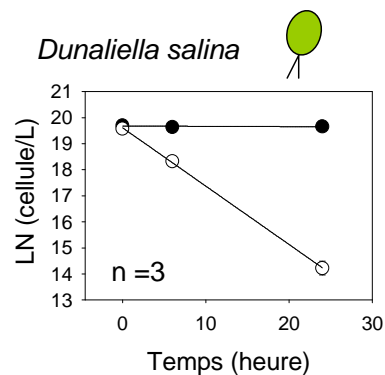
Oxyrrhis marina
DINOPHYCEE



Résultats et discussion :



Etape 1



Le broutage n'apparaît pas comme un mécanisme de production de FePy

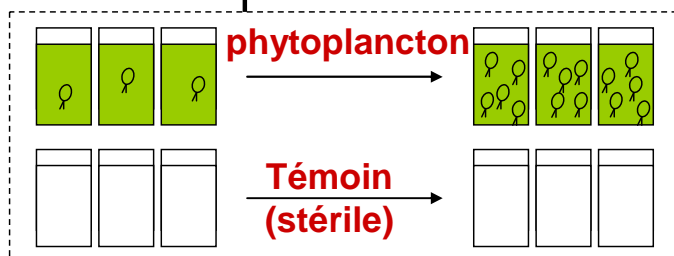
Libération de fer-porphyrines dans les cultures de phytoplancton

CONSOMMATION du phytoplancton par le microzooplancton

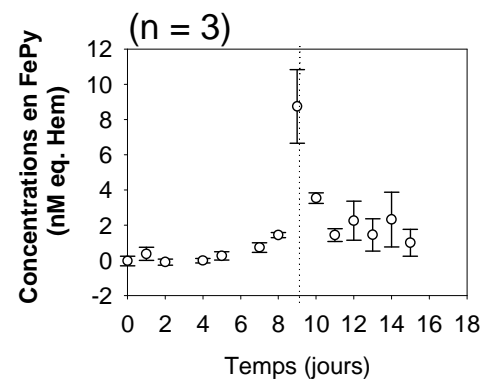
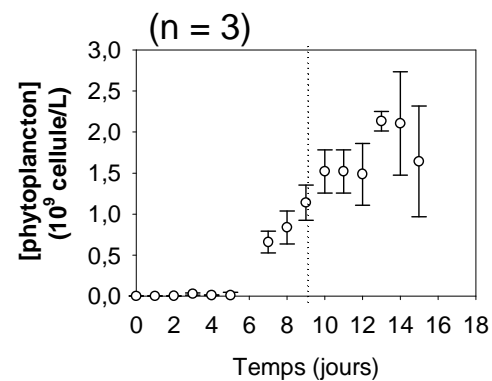
Principe et résultats:

Etape 2

**SUIVI DE CULTURES DE PHYTOPLANCTON
(2 semaines)**

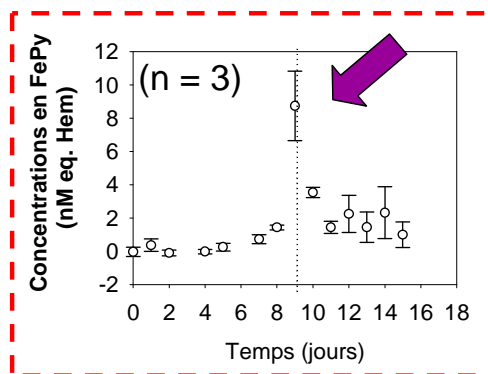


Production de fer-porphyrines
lors de la phase exponentielle



Discussion :

Etape 2



CAPACITE de PRODUCTION
 $K_p = 1,8 \times 10^{-18}$
 moles FePy/L/cellule/jour

QUOTA INTRACELLULAIRE
 $1 \text{ à } 5 \times 10^{-18}$
 moles FePy/cellule

$$\text{RAPPORT} = \frac{\text{FePy extracellulaire}}{\text{FePy intracellulaire}}$$

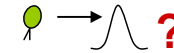
0,3 à 1,4

PEU REALISTE qu'une cellule soit capable de produire l'équivalent de son contenu intracellulaire en fer-porphyrines pour le libérer dans l'eau de mer

→ HYPOTHESE 1 : Une production de fer-porphyrines par les bactéries ?

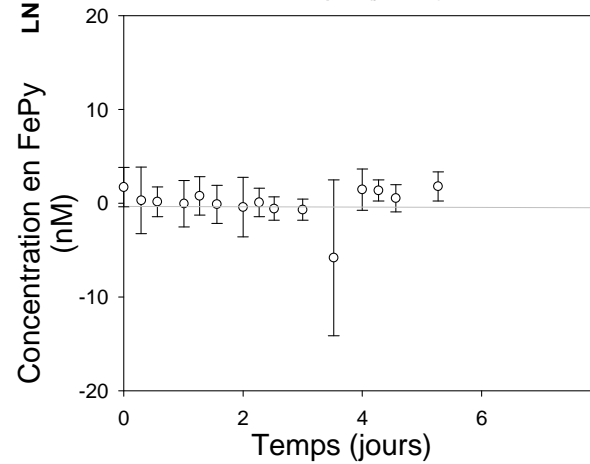
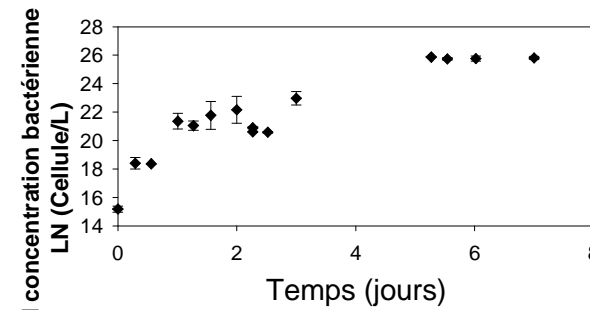
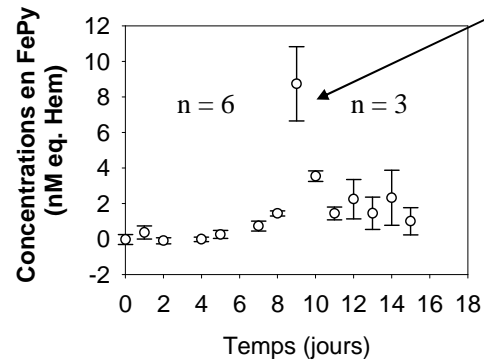
→ HYPOTHESE 2 : Une interférence chimique (chimiluminescence)?

Hypothèse 1 : production par les bactéries ?



Etape 3

HYPOTHESE 1:
Une production par les bactéries ?

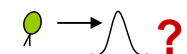


Bactéries

NON



Hypothèse 2 : existence d'un interférent ?

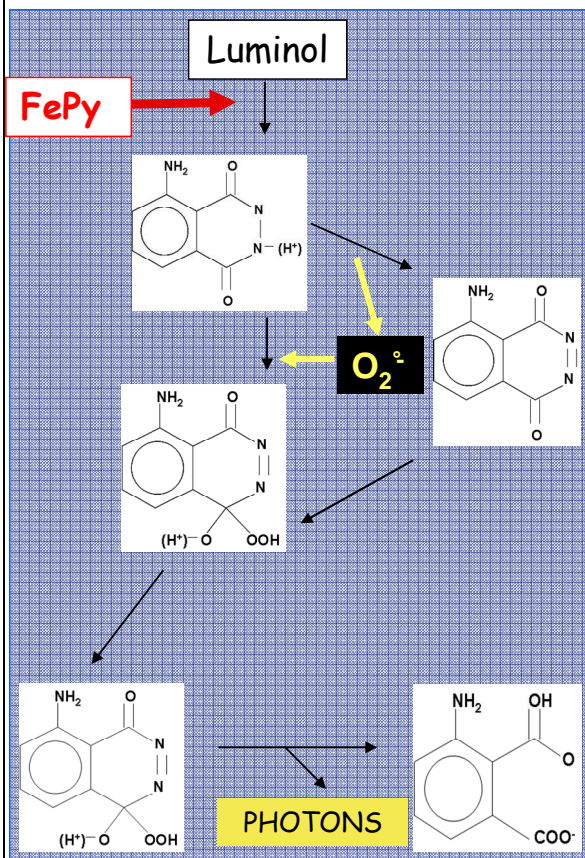


Etape 3

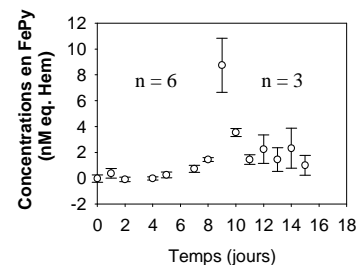
1^{er} INDICE:

intervient dans l'oxydation du luminol...

... si oui, quel est-il ?



2^{ème} INDICE:



produit pendant la phase exponentielle...

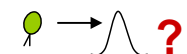
3^{ème} INDICE:

Le radical superoxyde

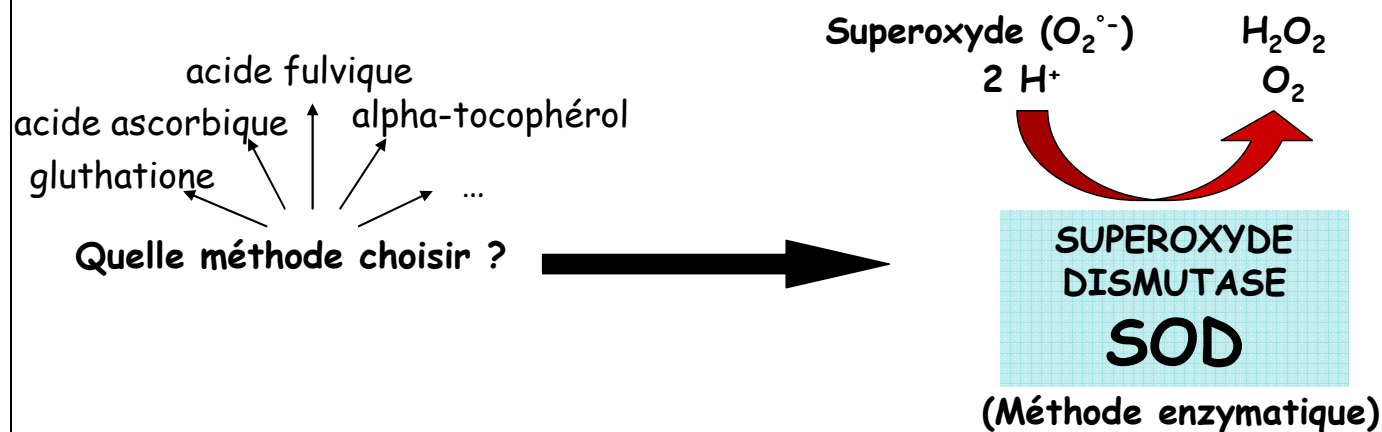
Production par le phytoplancton de superoxyde (phase exponentielle)

(Marshall et al., 2005)

Comment éliminer les radicaux superoxydes ?



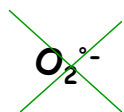
Etape 3



MISE AU POINT: PROTOCOLE D'ELIMINATION DES SUPEROXYDES

pH eau de mer

SOD active

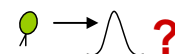


pH 13

SOD inactive

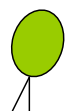
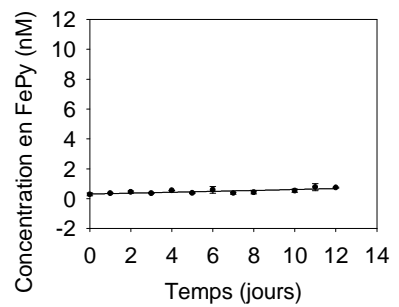
La SOD n'empêchera pas la chimiluminescence
provoquée par les fer-porphyrines

Vérification :

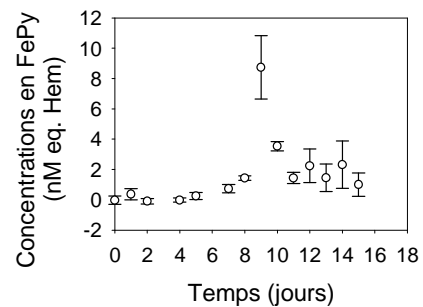


Etape 3

AVEC SOD



**SANS SOD
(résultat précédent)**



DONC :

INTERFERENCE AVEC LES SUPEROXYDES (ARTEFACT)

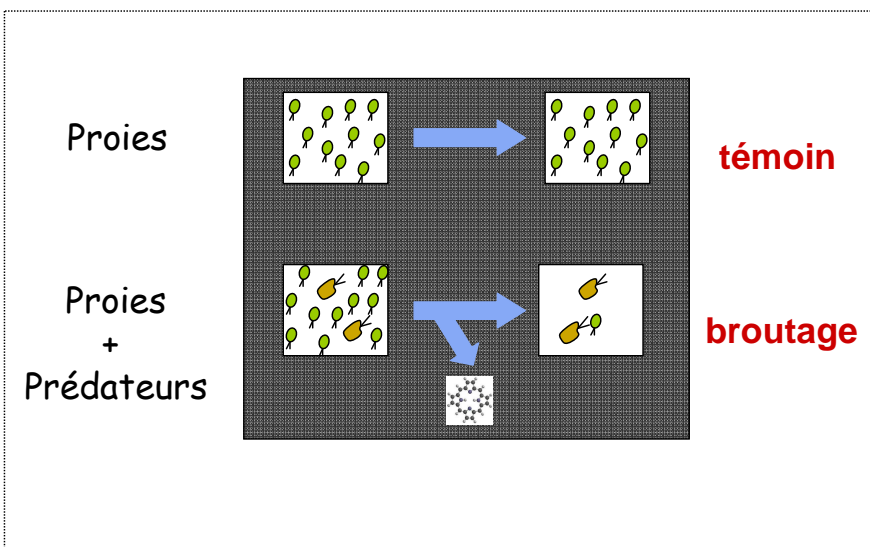
Principe :



Etape 4

EXPERIENCE DE BROUTAGE

CONTINUE: Marseille (cellules + FePy)



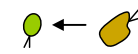
+ SOD

Ajout de prédateurs :
-en phase exponentielle
-en phase stationnaire
... du phytoplancton

HYPOTHESE

La consommation du phytoplancton par le microzooplancton induit une libération de fer-porphyrines dans l'eau de mer (phase dissoute).

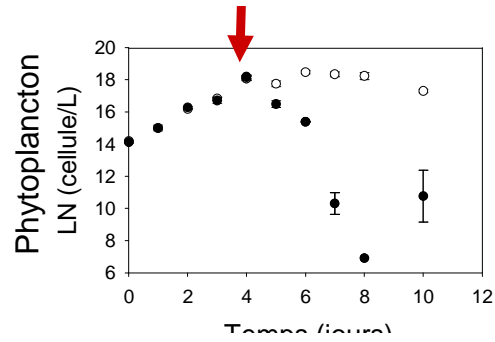
Résultats :



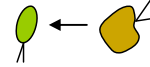
Etape 4

En phase exponentielle

ajout du prédateur

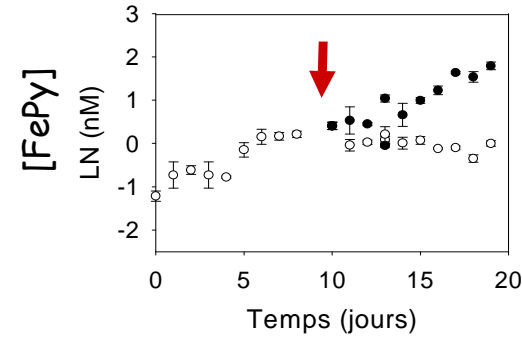
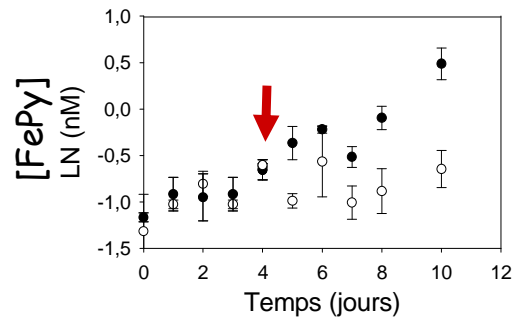
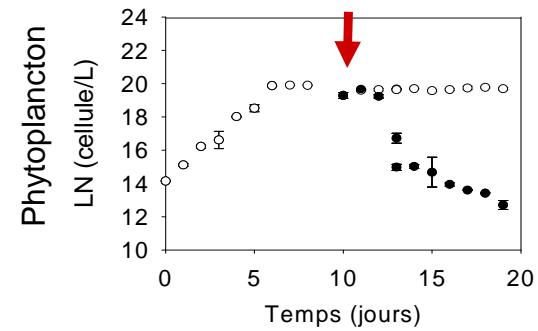


- Broutage
- Témoin



En phase stationnaire

ajout du prédateur



Discussion :



Etape 4

CAPACITE DE RELARGUAGE :

$k \rightarrow 2,2 (\pm 0,5) \times 10^{-18}$ moles de fer-porphyrines par cellule broutée

QUOTA INTRACELLULAIRE
 $1 \text{ à } 5 \times 10^{-18}$
moles FePy/cellule/

$$\text{RAPPORT} = \frac{\text{FePy extracellulaire}}{\text{FePy intracellulaire}} \leftarrow \boxed{0,03 \text{ à } 1,43} \leftarrow$$

Il est PLAUSIBLE :

que la quantité de FePy libérée par une cellule broutée
soit du même ordre de grandeur que son contenu intracellulaire.

Le broutage est un mécanisme de production
des fer-porphyrines

**CONCLUSIONS GENERALES
et
PERSPECTIVES**

Conclusions:

Pourrait-on retrouver les fer-porphyrines dans l'eau de mer, en phase dissoute ($<0,2 \mu\text{m}$) ?

Partie 1 :

DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE:

Mise au point d'une méthode de détection des complexes fer-porphyrines
Et **détermination** de **concentrations naturelles**

Partie 2 :

ETUDE DE MECANISME DE PRODUCTION :

Le **broutage** peut générer une **libération** de complexes fer-porphyrines dans le milieu (Cultures).



On peut retrouver les fer-porphyrines dans l'eau de mer
(rôle possible dans la complexation organique et la biodisponibilité du fer dans l'océan)

Perspectives :

Sur la méthodologie :

Efforts sur la diminution de la limite de détection

Méthode de pré-concentration

Possibilité de travailler sur la phase particulaire

Méthode de dissolution/désorption

Développer un protocole pour mesurer les porphyrines libres

Indirectement avec une ferrochélatase



Perspectives :

Sur la biogéochimie des complexes fer-porphyrines :

Processus de production de fer-porphyrines

Broutage (autre mode)

Lyse virale



Processus de « dégradation » de fer-porphyrines

Éclairement ... (les fer-porphyrines sont photosensibles)

Faible solubilité qui entraîne :

ADSORPTION

AUTO-AGGREGATION

Rôle des fer-porphyrines dans la biodisponibilité du fer dans l'océan

Les fer-porphyrines sont-elles biodisponibles ?

Les porphyrines libres sont-elles capables de chélater le fer dissous ?

Merci de votre attention ...

...et...

