



HAL
open science

SPECIATION CHIMIQUE DU FER DANS L'OCEAN : Les complexes fer-porphyrines, méthodes de détection et mécanismes de production

Lilita Vong

► **To cite this version:**

Lilita Vong. SPECIATION CHIMIQUE DU FER DANS L'OCEAN : Les complexes fer-porphyrines, méthodes de détection et mécanismes de production. Océan, Atmosphère. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2008. Français. NNT : . tel-00354951

HAL Id: tel-00354951

<https://theses.hal.science/tel-00354951>

Submitted on 21 Jan 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II

Centre Océanologique de Marseille - Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie

THESE DE DOCTORAT EN OCEANOLOGIE

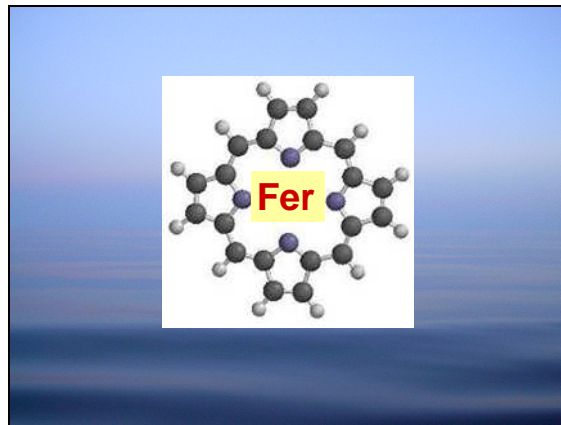
Présentée par **Lilita VONG**

Pour l'obtention du grade de *Docteur en Sciences de l'Environnement Marin*
Spécialité : *Biogéochimie*



SPECIATION CHIMIQUE DU FER DANS L'OCEAN
Les complexes fer-porphyrines, méthode de détection et mécanismes de production.

soutenue le 14 janvier 2008



devant un jury composé de :

Rapporteurs :

Dr. David AMOUROUX (LCABIE, Université de Pau)

Pr. Alain SALIOT (LOCEAN, Université Pierre et Marie Curie)

Examineurs :

Pr. Stéphane BLAIN (LOB-COM, Université de la Méditerranée, *directeur de thèse*)

Pr. Bernard QUEGUINER (LOB-COM, Université de la Méditerranée)

Dr. Géraldine SARTHOU (LEMAR, Université de Bretagne Occidentale)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour le temps qu'ils ont accordé à l'évaluation de mon travail de thèse et pour leurs commentaires encourageants et constructifs.

Je remercie aussi mes collaborateurs : Agathe LAES, Sabine SCHULTES, Géraldine SARTHOU et Mathias GIRAULT qui sont des personnes avec qui il est très agréable de travailler. Et sur un plan matériel, je remercie les microbiologistes du LMGEM (7^{ième} étage) et Patrick RAIMBAULT de m'avoir dépannée à de nombreuses reprises.

Mes remerciements à mon directeur de thèse, Stéphane BLAIN, qui m'a permis de travailler sur cette thématique qui me tenait particulièrement à cœur à la sortie de mon DEA. Stéphane, toi qui n'est pas facile aux premiers abords, je suis contente d'avoir découvert en toi un allié sur les plans scientifique et humain. Merci pour : Keops (!!), ta clarté, la confiance que tu as dans mon travail et de l'avoir toujours défendu. Merci aussi pour ta façon d'encadrer qui laisse une grande liberté aux doctorants.

J'ai aussi rencontré de nombreuses personnes au COM qui, dans des contextes bien différents, ont été à mon égard d'une bienveillance sans faille !

Pour cette qualité qui a fait ou feraient d'eux des compagnons de route ou des amis, je remercie : Maher ABOUDI, Badr AL-ALI, Alexandre ALLOU, Léanne ARMAND, Patrick ASTRUCH, Martine APERIO, Monique ACQUAVIVA, Robert ARFI, Mélina BAKLOUTI, Daniella BANARU, Alicia BAUTISTA-VEGA, Béatriz BEKER, (re) Stéphane BLAIN, Patricia BONIN, Carole BORCHIPELLINI, Delphine BOTHA, Agnès BOURRET, les frères BONHOMME, Gwenaél CADIOU, François CARLOTTI, Julien CHARPIN, Bruno CHARRIERE, Cristèle CHEVALIER, Stéphane CHRISTODOULOU, Philippe CUNY, Anne-Sophie CUSSAT-LEGRAS, Michel DENIS, Andrea DOGLIOLI, Guillaume DIRBERG, Frédéric DIAZ, Marie DUFLOS, Solange DUHAMEL, Dominique ESTIVAL, Lionel EISENHAUER, Delphine FERNANDEZ-BRUYERE, Jean-Luc FUDA, Marc GAREL, (re) Mathias GIRAULT, Fernando GOMEZ, Madeleine GOUTX, Emma GOUZE, Gérald GREGORY, Catherine GUIGUE, Zi Huan HU, Marie-Paule JOUANDET, Karine LEBLANC, Dominique LEFEVRE, Maurice LIBES, Romain MAURIAC, Nicolas MAYOT, Lounis MEBAREK, Mireilla MENDOZA, Bastien MERIGOT, Valérie MICHOTEY, Gilles MIRALLES, Thierry MOUTIN, Mina NASSIRY, Oumarou NIKIEMA, Antoine NOWACZYK, Christos PANAGIOTOPOULOS, Anne PETRENKO, Catherine PERROT, Cristel PINAZO, Zhong Feng QIU, Bernard QUEGUINER, Peggy RIMMELIN, Martine RODIER, Jean-François RONTANI, Gilles ROUGIER, Sandrine RUITTON, Richard SEMPERE, Gerd SLAWYC, Yasmina TALAPITU, Agathe TALARMIN, Christian TAMBURINI, Tsunéo TANAKA, Marc TEDETTI, Mélilotus THYSSEN, Julien TOUBOUL, Nathalie VAN DEN BROECK, France VAN-WAMBEKE et Marc VERLAQUE.

Merci à mes proches confidentes, une belle équipe de choc : Emilie BONNIN, Véronique CORNET-BARTHAUX, Julie GATTI et Judith KLEIN.

Plus personnel, merci à mon père pour son soutien. Merci à SB pour ses encouragements et sa force de caractère qui m'ont toujours aidé à aller au bout de mes envies. Et merci à GB de m'apporter la quiétude nécessaire pour clore un chapitre de ma vie.

SOMMAIRE

CHAPITRE I : Introduction générale

1. CONTEXTE GENERAL : LE FER DANS L'OCEAN	3
1.1. LA SPECIATION DU FER DANS L'OCEAN	5
1.1.a. La spéciation physique	5
1.1.b. La spéciation chimique	6
(i) Spéciation redox	6
(ii) Spéciation organique/inorganique	6
1.2. ROLE DES LIGANDS ORGANIQUES DANS LA BIOGEOCHIMIE DU FER DANS L'OCEAN	8
1.1.a. L'effet des ligands organiques sur la solubilité du fer	8
(i) Spéciation redox	8
(ii) Spéciation organique/inorganique	8
1.1.b. Rôle des ligands dans la biodisponibilité du fer	9
(i) Chez les cellules procaryotes hétérotrophes	9
(ii) Chez les cellules eucaryotes et procaryotes photosynthétiques	9
(iii) Identification des ligands	11
2. LES PORPHYRINES ET LES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS L'EAU DE MER	13
2.1. GENERALITES	13
2.2. BIOSYNTHESE DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES	14
2.3. IMPLICATIONS DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS LES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ORGANISMES MARINS	20
2.3.a. Métabolisme des stéroïdes et détoxication	20
2.3.b. Elimination des radicaux libres	20
2.3.c. Réduction des nitrates en nitrites	21
2.3.d. Stockage et transport d'oxygène	22
2.3.e. Chaînes de transport d'électrons	22
(i) Phosphorylation oxydative	23
(ii) Auto-phosphorylation	24
3. OBJECTIFS DE LA THESE	25

CHAPITRE II : Développement méthodologique
Analyse par injection en flux et détection par chimiluminescence
pour la détermination des complexes fer-porphyrines dans l'eau de mer

1. INTRODUCTION	29
2. MATERIELS ET METHODES	31
2.1. REACTIFS	31
2.2. DESCRIPTION DES MONTAGES	32
2.3. DETERMINATION DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES	34
2.4. ECHANTILLONAGE DES EAUX NATURELLES	34
3. RESULTATS ET DISCUSSION	35
3.1. PRINCIPE ET MECANISMES GENERAUX DE LA REACTION	35
3.2. APPLICATION EN FIA	38
3.3. APPLICATION POUR L'ANALYSE DE L'EAU DE MER	39
3.3.a. Stabilité du signal	39
3.3.b. Automatisation du traitement	40
3.3.c. Compétition avec l'EDTA	42
3.4. AMELIORATION DE LA SENSIBILITE DE LA METHODE	44
3.4.a. Temps de mélange des bobines	44
3.4.b. Température	44
3.10. VERIFICATION DE LA SPECIFICITE DE LA METHODE	44
3.11. INTERFERENCES	46
3.12. STOCKAGE DES ECHANTILLONS	48
3.12. APPLICATIONS	51
3.12.a. Détermination dans les cultures phytoplanctoniques	51
3.12.b. Détermination en milieu naturel	51
4. CONCLUSION	53

CHAPITRE III : Etude d'un mécanisme de relargage des FePy dans l'eau de mer

Le broutage du phytoplancton par le microzooplancton

1. INTRODUCTION	58
2. MATERIELS ET METHODES	59
2.1. CHOIX DES ESPECES	59
2.2. MILIEUX DE CULTURE	60
2.3. DENOMBREMENT CELLULAIRE	60
2.4. DOSAGE DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES	61
2.5. SUIVI DU PH	61
2.6. ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE	61
2.7. CONDITIONS ET PROTOCOLES D'EXPERIMENTATION	62
2.1.a. Expérience 1 : Expérience de broutage	62
2.1.b. Expérience 2 : Expérience de suivi de phytoplancton	63
2.1.c. Expérience 3 : Expérience des communautés bactériennes	65
2.1.d. Expérience 4 : Expérience de broutage	66
3. RESULTATS ET DISCUSSION	67
3.1. LE BROUTAGE DU PHYTOPLANCTON PAR LE MICROZOOPLANCTON PEUT-IL LIBERER LES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS L'EAU DE MER ?	67
3.2. EXISTE-T-IL UNE PRODUCTION DE COMPLEXES FePy DANS UNE CULTURE DE PHYTOPLANCTON ?	69
3.2.a. Résultats expérimentaux	69
3.2.b. Approche théorique	71
(i) Evolution de la croissance cellulaire	71
(ii) Evolution des complexes FePy	72
3.2.c. Application des modèles théoriques	74
(i) Les modèles sont-ils plausibles ?	74
(ii) Détermination des vitesses de production et de disparition	76
3.3. LES COMMUNAUTES BACTERIENNES PRODUISENT-ELLES	

DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES ?	80
3.4. COMMENT ELIMINER DE POSSIBLES INTERFERENCES AVEC LES RADICAUX SUPEROXYDES ?	82
3.4.a. Quelle stratégie choisir ?	82
3.4.b. Quelles sont les conditions d'utilisation des SOD ?	83
3.4.c. Comment tester ces enzymes dans nos conditions d'expérimentation ?	84
3.4.d. Test 1 : Comparaison des activités enzymatiques de la Zn-Cu-SOD et Mn-SOD dans de l'eau de mer artificielle, avec et sans H ₂ O ₂	85
3.4.e. Test 2 : Amélioration de la capacité de la Zn-Cu-SOD à éliminer les superoxydes	88
3.4.f. Test 3 : Augmentation de la production de superoxyde	89
3.4.g. Test 4 : Passage de l'eau de mer artificielle à l'eau de mer de culture	90
3.4.h. Quel est le protocole final adopté ?	92
3.4.i. Avec l'application de ce nouveau protocole, existe-t-il des interférences dans les cultures de phytoplancton ?	93
3.5. LE BROUTAGE PEUT-IL LIBERER DES FePy DANS L'EAU DE MER ?	94
3.5.a. Résultats expérimentaux	94
3.5.b. Approche théorique sur le relargage de FePy	98
3.5.c. Application de l'approche théorique	99
4. CONCLUSION	103

CHAPITRE IV : Conclusions et perspectives

1. CONCLUSION	109
2. PERSPECTIVES	110
2.1. SUR LA METHODOLOGIE	110
2.1.a. Possibilités d'amélioration de la méthode	110
(i) Augmentation de la limite de détection	110
(ii) Développement d'un protocole pour mesurer les porphyrines libres	111
2.1.b. Possibilité de développer et d'introduire d'autres types de méthodes en océanographie	111
(i) FIA-CL spécifique des porphyrine libres	111
(ii) Recherche des FePy par utilisation d'anti-corps	111

2.2. SUR LA BIOGEOCHIMIE DU FER	112
2.1.a. Quels facteurs peuvent contrôler les quotas intracellulaires des FePy ?	112
2.1.b. Quels sont les autres processus qui libèrent les FePy dans le milieu ?	113
(i) La prédation	113
(ii) La lyse virale et la sénescence	113
2.1.c. Quel est le devenir des FePy dans l'eau de mer ?	114
(i) Les facteurs physico-chimiques	114
(ii) Les facteurs biologiques	116

CHAPITRE I :
INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I : Introduction générale

1. CONTEXTE GENERAL : LE FER DANS L'OCEAN	3
1.1. LA SPECIATION DU FER DANS L'OCEAN	5
1.1.a. La spéciation physique	5
1.1.b. La spéciation chimique	6
(i) Spéciation redox	6
(ii) Spéciation organique/inorganique	6
1.2. ROLE DES LIGANDS ORGANIQUES DANS LA BIOGEOCHIMIE DU FER DANS L'OCEAN	8
1.1.a. L'effet des ligands organiques sur la solubilité du fer	8
(i) Spéciation redox	8
(ii) Spéciation organique/inorganique	8
1.1.b. Rôle des ligands dans la biodisponibilité du fer	9
(i) Chez les cellules procaryotes hétérotrophes	9
(ii) Chez les cellules eucaryotes et procaryotes photosynthétiques	9
(iii) Identification des ligands	11
2. LES PORPHYRINES ET LES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS L'EAU DE MER	13
2.1. GENERALITES	13
2.2. BIOSYNTHESE DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES	14
2.3. IMPLICATIONS DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS LES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ORGANISMES MARINS	20
2.3.a. Métabolisme des stéroïdes et détoxication	20
2.3.b. Elimination des radicaux libres	20
2.3.c. Réduction des nitrates en nitrites	21
2.3.d. Stockage et transport d'oxygène	22
2.3.e. Chaînes de transport d'électrons	22
(i) Phosphorylation oxydative	23
(ii) Auto-phosphorylation	24
3. OBJECTIFS DE LA THESE	25

1. CONTEXTE GENERAL : LE FER DANS L'OCEAN

Lors de l'Hadéen (période de l'Histoire de la Terre comprise entre 4,6 – 4,0 Giga années), l'océan primitif qui était présent aux origines de la vie était totalement anoxique. Dans ces conditions redox, le fer essentiellement sous forme réduite (+II) était alors abondant. Cette abondance mais surtout sa capacité à prendre plusieurs états d'oxydation ont fait de lui un élément idéal pour intervenir dans de nombreuses réactions chimiques et biochimiques. Bon candidat dans les échanges d'électrons, il est ainsi devenu un métal essentiel pour le fonctionnement du métabolisme des organismes vivants.

Lors de l'Archéen (période de l'Histoire de la Terre comprise entre 4,0 – 2,5 Giga années), l'apparition des premiers organismes photosynthétiques capables de produire de l'oxygène a progressivement transformé l'océan primitif en un océan moderne, présentant peu à peu les conditions oxydées actuelles. Cette oxydation de l'océan s'est accompagnée par un changement de l'état redox du fer dans l'eau de mer, avec une conversion du fer(+II) en fer(+III) et une précipitation immédiate du fer(+III) en hydroxydes de fer. Les propriétés chimiques de l'océan actuel expliquent aujourd'hui la très faible solubilité du fer dans l'eau de mer. Ses concentrations océaniques, extrêmement faibles, sont de nos jours inférieures à la nanomole (**de Baar and de Jong, 2001; Johnson et al., 1997; Landing and Bruland, 1987; Measures and Vink, 1999**).

Dans certaines parties de l'océan, les concentrations en fer sont telles que celui-ci peut limiter et contrôler la production phytoplanctonique (**Martin and Fitzwater, 1988**). La limitation en fer est remarquable dans de nombreuses et vastes régions océaniques, telles que les régions dites « HNLC » (*High Nutrient Low Chlorophyll*). Ces dernières couvrent 40 % de la surface mondiale (**Moore et al., 2002**) et sont caractérisées par de fortes concentrations en sels nutritifs mais par une faible biomasse phytoplanctonique. Elles rassemblent le Pacifique équatorial (**Coale et al., 1996; Martin et al., 1994**), le Pacifique subarctique (**Boyd et al., 1996; Tsuda et al., 2003**) et l'Océan austral (**Boyd and Law, 2001; Coale et al., 2004**). D'autres régions, autres que les régions HNLC, peuvent également manifester des limitations en fer. C'est le cas de l'Atlantique nord (**Blain et al., 2004; Martin et al., 1993**) et de quelques zones de résurgences côtières (**Hutchins and Bruland, 1998**). Au cours de ces deux dernières décennies, la capacité du fer à réguler la production primaire, de manière temporaire ou permanente, a motivé les études grandissantes sur la biogéochimie du fer dans l'océan.

Un des intérêts scientifiques actuels est de comprendre le rôle de l'océan dans le réchauffement climatique. L'océan est en effet capable de séquestrer le CO₂ atmosphérique par deux mécanismes : la pompe physique et la pompe biologique.

La pompe physique dépend essentiellement de la circulation thermohaline et de la solubilité du CO₂ dans l'eau de mer. Les eaux froides présentant une plus grande solubilité pour le CO₂ vont plonger sous l'effet de leur densité puis entrer dans la circulation profonde de l'océan, séquestrant ainsi le carbone à l'échelle de milliers d'années. La remontée en surface de ces eaux profondes, alors plus chaudes, s'accompagne par un dégazage du CO₂.

La pompe biologique s'effectue par la fixation du carbone inorganique par le phytoplancton. D'une part, le phytoplancton va fixer le CO₂ par activité photosynthétique en carbone organique particulaire. A la mort des organismes, une partie va être reminéralisée dans la couche de surface (recyclant ainsi le CO₂ dans l'atmosphère) tandis qu'une autre partie va être séquestrée dans l'océan profond, par sédimentation des organismes morts. D'autre part, la fixation du carbone inorganique peut se faire par les organismes calcaires (*e.g.* les coccolithophoridés) sous forme de carbonates, forme de carbone inorganique. La sédimentation des organismes morts peut également conduire à une séquestration temporaire du carbone, qui va se poursuivre ensuite par une dissolution des tests calcaires en CO₂. A travers son rôle de contrôle de la production primaire, le fer peut donc contrôler la pompe biologique, et par conséquent, participer au contrôle du climat par les océans.

Cependant, de nos jours, la chimie du fer dans l'eau de mer n'est pas encore résolue. Des limitations techniques telles que les faibles concentrations en fer dans l'eau de mer, les risques de contamination par le fer ambiant lors de l'étape de prélèvement, ou encore, le manque de méthodes analytiques adéquates, sont à l'origine de nos lacunes actuelles pour bien comprendre la biogéochimie du fer. Le point à résoudre reste la spéciation du fer dans l'eau de mer.

1.1. LA SPECIATION DU FER DANS L'OCEAN

La spéciation d'un élément chimique correspond à sa répartition entre les différentes espèces physico-chimiques. Autrement dit, définir la spéciation du fer dans l'océan revient à identifier les différentes formes physico-chimiques présentes dans l'eau de mer et à évaluer leur importance relative.

Aujourd'hui, la spéciation du fer dans l'eau de mer n'est pas parfaitement connue, contrairement aux cas d'autres éléments nutritifs tels que le silicium, l'azote, le phosphore ou le carbone. Pour appréhender la spéciation de ce métal, différentes approches sont utilisées. Une première est basée sur une séparation physique. Une seconde est plutôt basée sur une approche chimique.

1.1.a. LA SPECIATION PHYSIQUE

Cette spéciation repose sur des définitions conventionnelles qui différencient certaines classes de taille correspondant : au fer particulaire (FeP), au fer colloïdal (FeC) et au fer réellement dissous (FeD). Classiquement, la séparation entre le fer dissous (FeD + FeC) et le fer particulaire (FeP) est de 0,2 μm ou de 0,45 μm . Par ailleurs, la limite entre le FeD et le FeC est fixée à 0,02 μm .

Le fer particulaire rassemble des particules biogéniques (cellules vivantes ou détritiques) ainsi que des particules lithogéniques. Ces dernières particules correspondent majoritairement à des silicates, alumino-silicates et hydroxydes de fer. Leurs apports s'effectuent essentiellement par apports fluviaux et apports atmosphériques (**Duce et al., 1991; Duce and Tindale, 1991**). Certains micro-organismes peuvent acquérir le fer particulaire. C'est le cas de flagellés mixotrophes capables de s'approvisionner en fer par ingestion de bactéries (**Maranger et al., 1998**). Cependant, ce mode d'acquisition reste peu répandu.

Le fer colloïdal comprend des oxyhydroxydes de fer. Les colloïdes sont très abondants dans les eaux marines (**Buffle and Leppard, 1995**). Certains organismes sont capables d'acquérir le fer à partir de processus de dissolution et/ou de réduction de colloïdes naturels (**Chen et al., 2003; Kuma and Matsunaga, 1995; Rich and Morel, 1990**). D'autres, tels que certains flagellés photosynthétiques mixotrophes, sont capables d'utiliser le fer par phagocytose à partir d'ingestion de colloïdes inorganiques (**Nodwell and Price, 2001**).

Le fer réellement dissous (ou soluble) correspond au principal compartiment à partir duquel les micro-organismes peuvent acquérir le fer. Cependant, les concentrations restent

extrêmement faibles, avec des concentrations en fer soluble pouvant être atteindre $0,28 \pm 0,01$ nM dans les eaux profondes de l'océan Atlantique (Cullen et al., 2006).

1.1.b. LA SPECIATION CHIMIQUE

La deuxième manière d'aborder la spéciation du fer dans l'océan se base sur des caractères chimiques. Deux approches complémentaires sont possibles : l'approche redox et l'approche organique/inorganique.

(i) Spéciation redox

Cette spéciation prend en compte le degré d'oxydation du fer dans l'océan. Celui-ci peut revêtir deux états d'oxydation : +(II) et +(III). En milieu oxique, le fer(III) est l'état d'oxydation thermodynamiquement le plus stable mais possède une très faible solubilité (Liu and Millero, 2002). Très réactif, il s'adsorbe facilement à la surface des particules et est activement assimilé par le phytoplancton, ce qui signifie qu'il est alors rapidement éliminé de l'eau de mer par sédimentation des particules. Le fer(II) est beaucoup plus soluble mais est très rapidement oxydé dans les environnements oxiques. Le fer(II) a pu être détecté dans les eaux de surface et dans les zones de résurgence, avec des concentrations représentant jusqu'à la moitié du fer total dissous (Gledhill and van den Berg, 1995; O'Sullivan et al., 1991).

Le passage entre les deux formes est possible par divers mécanismes (Sunda, 2001) : (i) le fer (III) peut être réduit en fer (II) par photochimie en surface par les irradiations UV (REDUCTION PHOTOCHEMIE) (ii) ou par bio-réduction à la surface cellulaire des organismes (REDUCTION ENZYMATIQUE) (iii) ou encore par réduction chimique (REDUCTION CHIMIQUE) (iiii) par réduction microbienne dans des environnements réducteurs (*e.g.* sédiments et bassins anoxiques, pelotes fécales). En retour, les formes Fe(II) sont rapidement oxydées par l'oxygène ou par d'autres oxydants présents naturellement dans l'eau de mer, telle que l'eau oxygénée H_2O_2 , les radicaux superoxydes $O_2^{\circ-}$, ou les radicaux hydroxyls $^{\circ}OH$ (King, 1998; King et al., 1995; Millero and Sotolongo, 1989).

(ii) Spéciation organique-inorganique

Le fer possède aussi une spéciation organique-inorganique. On désigne généralement les stocks inorganiques et organiques respectivement par les notations « Fe' » et « FeL ».

Dans la fraction particulaire, l'élément peut être sous forme inorganique, soit inclus dans des réseaux cristallins, tels que les aluminosilicates, les silicates et les hydroxydes de fer, ou soit adsorbé à la surface de particules lithogéniques. Il peut également revêtir des formes

organiques, en étant incorporé au sein de cellules vivantes ou en étant adsorbé à la surface de particules biogéniques détritiques.

Dans la fraction colloïdale, le fer peut se présenter sous forme d'oxyhydroxydes colloïdaux inorganiques, notamment dans les eaux de surface côtières (**Wells and Goldberg, 1992**) ou dans les plumes hydrothermales (**Cowen et al., 1986; Feely et al., 1990**). Cependant, ces colloïdes inorganiques de fer sont physiquement associés à des colloïdes organiques (**Wells et al., 1995**). Les acides humiques sont des exemples de composés organiques colloïdaux, assez répandus en milieu côtier.

Enfin, dans la fraction réellement dissoute, une partie du fer est complexée par des ligands inorganiques et se retrouve sous forme d'espèces hydrolysées (**Liu and Millero, 2002; Waite, 2001**). Pour le fer(III), les espèces prédominantes sont : $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ et Fe^{3+} (respectivement à 91,8 %, 4,5 %, 3,7 % et <1%). Pour le fer(II), les espèces hydrolysées sont : $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, FeCO_3 , FeOH^+ (respectivement à 76 %, 23 % et 1 %). Toutefois, la majorité du fer dissous est complexée par des ligands organiques. Des mesures électrochimiques ont en effet montré que 95 à 99 % de la complexation du fer est de nature organique (**Gledhill and van den Berg, 1994; Rue and Bruland, 1995; van den Berg, 1995; Wu and Luther III, 1995**). Cependant, avec ces méthodes électrochimiques, l'identité chimique exacte de ces molécules organiques n'est pas connue.

Il existe une variété de molécules capables de complexer le fer, notamment ces molécules d'origine terrestre tels que les acides humiques et fulviques (**Buffle et al., 1977**). L'acide domoïque, produit par *Pseudo-nitzschia australis* (diatomée), est également un complexant naturel du fer (**Rue and Bruland, 2001; Wells et al., 2005**). Des protéines capables de lier le fer ont été isolées et identifiées chez *Mytilus edulis* (**Taylor et al., 1994**). Les études électrochimiques, basées sur l'affinité des ligands avec le fer, ont mis en évidence deux types de ligands : les « plus forts » et les « moins forts » (**Gledhill and van den Berg, 1994**). Des comparaisons avec d'autres ligands modèles montrent que les sidérophores et les porphyrines possèdent des constantes de complexation proches des constantes déterminées pour les ligands naturels (**Rue and Bruland, 1995; Witter et al., 2000a**).

Les sidérophores sont des ligands organiques synthétisés et sécrétés par les bactéries (**Wandersman and Delepelaire, 2004**). Leur rôle est de chélater le fer dans l'eau de mer et de le rendre ainsi disponible pour les bactéries qui disposent de récepteurs spécifiques pour récupérer le complexe sidérophore-fer. Ces derniers ligands sont relativement bien étudiés (**Armstrong et al., 2004; Barbeau et al., 2001; Gledhill, 2001; Gledhill et al., 2004; Guan et al., 2001; Martinez et al., 2001; McCormack et al., 2003**). En revanche, les ligands de

type porphyrines n'ont pas été formellement identifiés dans l'eau de mer. Contrairement au cas des sidérophores, il n'existe pas de méthode de dosage capable de les doser spécifiquement dans l'eau de mer.

1.2. ROLE DES LIGANDS ORGANIQUES DANS LA BIOGEOCHIMIE DU FER DANS L'OCEAN

1.2.a. EFFET DES LIGANDS ORGANIQUES SUR LA SOLUBILITE DU FER :

(i) En absence de ligands organiques

En absence de ligands organiques dans le milieu, la solubilité du fer (dans les solutions de chlorure de sodium et dans l'eau de mer) dépend de plusieurs facteurs tels que : la température, le pH, le temps de solubilisation et la force ionique (**Liu and Millero, 1999; Liu and Millero, 2001**). La solubilité du fer(III) inorganique est extrêmement faible : elle est de 0,01 nM dans une solution de chlorure de sodium (**Liu and Millero, 1999**). Au-delà de ce seuil de solubilité, le fer insoluble précipite alors sous forme d'oxyde et d'hydroxyde de fer(III).

(ii) En présence de ligands organiques

La présence de ligands organiques dans le milieu augmente la solubilité du fer(III) à 0,2 ou 0,3 nM (**Liu and Millero, 1999**). Cet effet est illustré par l'addition d'EDTA ou d'acide humique dans une solution de NaCl (**Liu and Millero, 1999**). Par conséquent, la présence de ligands organiques naturels dans l'eau de mer est un facteur de contrôle de la solubilité du fer(III) dans l'océan (**Johnson et al., 1997; Kuma et al., 1996**).

En milieu océanique, la présence de ligands organiques pourrait favoriser la dissolution minérale de poussières atmosphériques qui sont le principal apport en fer pour certaines régions (**Barbeau, 2006; Sulzberger and Laubscher, 1995**).

La complexation organique du fer est sensible à la photochimie. De ce fait, cette dernière peut aussi contrôler la solubilité du fer. En effet, les principales formes chimiques inorganiques du fer à pH = 8 (pH de l'eau de mer) ne présentent pas de photo-réactivité (**King et al., 1993**), alors que les ligands organiques peuvent avoir une chimie sensible aux rayonnements lumineux (**Powell and Wilson-Finelli, 2003**). Ces réactions photochimiques sont à prendre en compte car elles peuvent également participer à la biodisponibilité du fer.

1.2.b. ROLE DES LIGANDS DANS LA BIODISPONIBILITE DU FER :

Les organismes disposent de plusieurs modes d'acquisition du fer qui ne sont pas tous totalement élucidés. Le premier mode d'acquisition du fer repose sur la synthèse et la libération de ligands organiques (synthétisés par l'organisme même) dans le milieu extérieur. Le second repose sur l'acquisition de ligands présents dans l'eau de mer avec plusieurs mécanismes de réduction du fer qui rendent l'élément assimilable.

(i) Chez les cellules procaryotes hétérotrophes

Les bactéries sont capables de produire une variété de molécules de faible poids moléculaire, tels que les sidérophores. Ces molécules organiques sont secrétées dans le milieu extracellulaire et vont se complexer aux ions ferriques pour lesquelles elles présentent une très forte affinité. Le complexe ainsi formé est ensuite reconnu par des récepteurs membranaires spécifiques qui vont permettre l'assimilation du fer, après réduction du complexe (Neilands, 1995).

(ii) Chez les cellules eucaryotes et procaryotes photosynthétiques

Deux mécanismes sont actuellement proposés pour l'acquisition du fer par les cyanobactéries et par les cellules eucaryotes photosynthétiques. Ces deux mécanismes sont tous deux basés sur des processus de réduction des espèces ferriques et une assimilation du fer sous forme ferreuse. De plus, le rôle des ligands organiques dans les mécanismes d'acquisition du fer semble être admis dans les deux mécanismes proposés.

Le premier mécanisme est décrit par Shaked et collaborateurs (Shaked et al., 2005) et est présenté en **figure 1**.

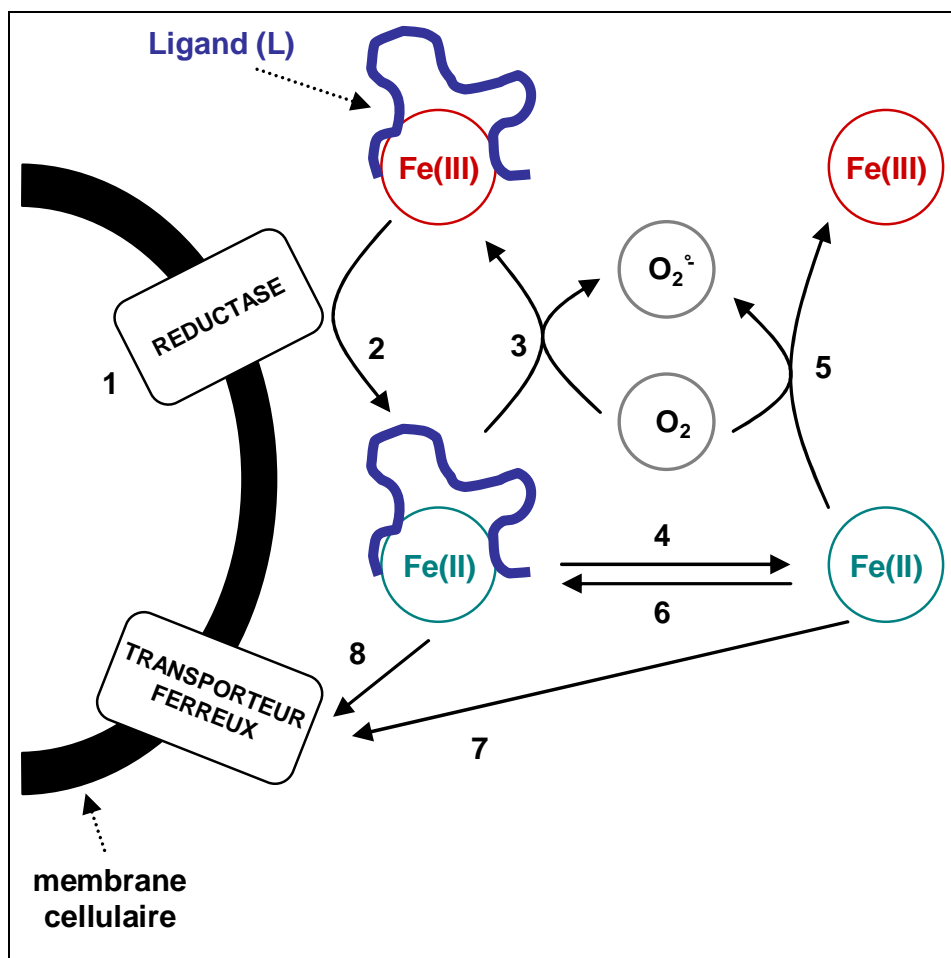


Figure 2 : Présentation du modèle Fer-Ligand, dit « modèle FeL », visant à expliquer les mécanismes d'acquisition du fer chez *Lyngbya majuscula* (cyanobactérie) (Salmon et al., 2006). Ce modèle implique la réduction d'un complexe ferrique Fe(III)-L, soit directement par une réductase (1), soit par des superoxydes qui sont générés par la réductase. La réduction de ce complexe ferrique Fe(III)-L en complexe ferreux Fe(II)-L (2) peut être suivie par l'oxydation immédiate de ce complexe ferreux en complexe ferrique (3). Le complexe ferreux Fe(II)-L peut aussi se dissocier, libérant ainsi le fer ferreux inorganique Fe(II) (4). Ce Fe(II) peut alors être oxydé par l'oxygène en fer ferrique inorganique Fe(III) (5) ou peut être de nouveau complexé par le ligand (6). *Lyngbya majuscula* serait capable d'assimiler le Fe(II) (7) et le Fe(II)-L (8) par un transporteur ferreux.

(iii) Identification des ligands

Quelque soit le modèle admis, la nature chimique et l'origine des ligands intervenant dans les mécanismes d'acquisition du fer par le phytoplancton ne sont pas clairement identifiées. Il est possible que les ligands contrôlant la biodisponibilité du fer soient les mêmes que ceux qui contrôlent la complexation organique dans l'eau de mer. Les ligands qui

pourraient dominer la spéciation du fer dans l'océan seraient : les sidérophores, les porphyrines et les acides carboxyliques des sucres (**Rue and Bruland, 1995; Witter et al., 2000a**).

Dans le cas des bactéries hétérotrophes, les mécanismes d'acquisition du fer reposent sur la synthèse de sidérophores. En milieu terrestre, des bactéries gram négatives (bactéries qui éliminent le cristal violet et apparaissent rose lors de la coloration par la méthode de Gram) sont capables de synthétiser également d'autres types de ligands, des hémophores, capables d'acquérir le fer sous forme d'hème et d'être ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques (**Wandersman and Delepelaire, 2004; Wandersman and Stojiljkovic, 2000**). Toutefois la présence d'hémophore n'a pas été mise en évidence en milieu marin.

Dans le cas des cyanobactéries, certaines études suggèrent la production de sidérophores (**Barbeau et al., 2001; Barbeau et al., 2003; Wilhelm and Trick, 1994**), alors que d'autres, plus récentes, montrent que des cyanobactéries telles que *Synechococcus sp.* ou *Prorochlorococcus sp.* ne disposent pas des gènes nécessaires pour synthétiser ces sidérophores (**Palenik et al., 2003; Rocap et al., 2003**).

Dans le cas du phytoplancton, des études suggèrent une production de sidérophores par le phytoplancton eucaryote (**Armbrust et al., 2004; Boye and van den Berg, 2000**) ainsi que la possibilité d'utilisation de ces complexes par ce dernier (**Maldonado and Price, 2001; Soria-Dengg and Horstmann, 1995**). Cependant, rien ne permet d'affirmer que le phytoplancton eucaryote produise réellement des sidérophores et que leur stratégie d'acquisition du fer repose sur les sidérophores. Une étude montre plutôt la préférence du phytoplancton eucaryote pour l'assimilation de source type fer-porphyrine (**Hutchins et al., 1999**).

2. LES PORPHYRINES ET LES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS L'EAU DE MER

2.1. GENERALITES

D'un point de vu chimique, les porphyrines correspondent à l'ensemble des molécules ayant pour structure commune un noyau tétrapyrrolique cyclique (**Figure 3**).

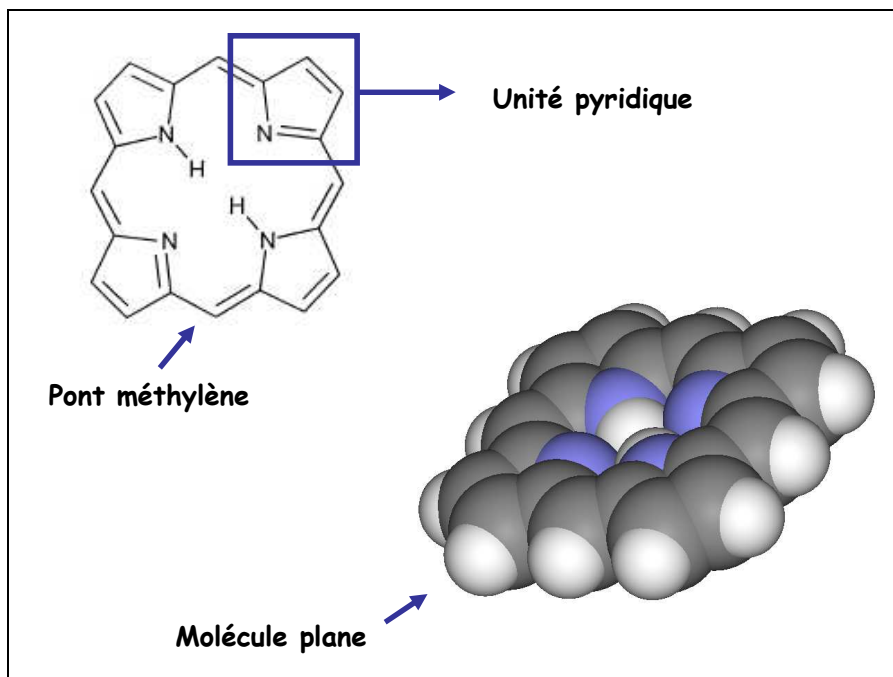


Figure 3 : Structure commune de toutes les porphyrines correspondant à un cycle porphyrinique composés de 4 unités pyrroliques (comportant chacune un atome d'azote) et reliées entre elles par des ponts méthyléniques.

En grec, le terme de « porphyrine » signifie « pourpre ». La coloration que l'on associe aux porphyrines est due au caractère « conjugué » du système. En effet, dans ces macro-cycles, il existe une délocalisation permanente des électrons sur l'ensemble du cycle, ce qui confère par ailleurs une grande stabilité à la molécule.

Les porphyrines sont rapidement oxydées en présence d'oxygène et présentent ainsi une intense fluorescence rouge lorsqu'elles sont exposées à des longueurs d'onde proches de 400 nm (**Straka et al., 1990**). Lorsqu'elles sont réduites dans des environnements particuliers (on parle de porphyrinogène), cette fluorescence disparaît (**Straka et al., 1990**).

Il existe une grande variété de porphyrines, synthétiques (**Kral et al., 2006; Rothmund, 1935; Rothmund, 1936**) ou naturelles, ceci en raison de la diversité des chaînes latérales pouvant se greffer autour du noyau porphyrinique. Leur capacité à chélater le fer et autres métaux de transition, sous plusieurs états d'oxydoréduction, attribue un rôle biologique considérable à ces complexes (**Goldoni, 2002; Lesage et al., 1993**). En effet, au niveau cellulaire, les métallo-porphyrines jouent principalement un rôle de coenzyme dans les réactions d'oxydoréduction avec transfert d'électron(s), à savoir qu'elles apparaissent sous la forme de métabolite non protéique, pouvant être associé ou non à une partie protéique enzymatique (on parle d'apo-enzyme). D'un point de vue biochimique, les métallo-porphyrines peuvent constituer des groupements prosthétiques, c'est-à-dire qu'elles deviennent des parties constituantes de l'enzyme, associées de façon covalente à l'apo-enzyme. Cependant, une partie des métallo-porphyrines peut également rester libre et ne s'associer avec l'apo-enzyme que durant le temps de la catalyse. Ce rôle fonctionnel clé dans les réactions redox, au niveau de chaînes de transfert d'électron(s) ou de réactions enzymatiques, explique que les métallo-enzymes rassemblent près de la moitié de toutes les protéines cellulaires connues (**Butler, 1998**).

Pour remplir leur fonction biologique, les porphyrines sont donc bien souvent associées à divers types de cations métalliques du cuivre, du cobalt, du manganèse mais majoritairement du fer. Ainsi, le fer se retrouve piégé par cette molécule qui forme sur lui une véritable cage. Il peut être intégré au sein de protéines fer-soufre (**Beinet, 2000**) mais également faire partie intégrante de transferrine et ferritines qui correspondent à des molécules de transport et de stockage du fer et que l'on retrouve aussi bien chez animaux, plantes et bactéries (**Ponka, 1999; Theil, 2004**). Néanmoins, la forme majoritaire sous laquelle on retrouve le fer dans l'organisme reste la forme type : fer-porphyrine.

2.2. BIOSYNTHESE DES COMPLEXES FER- PORPHYRINES

La synthèse des tétrapyrroles, linéaires (*e.g.* phycobiline) ou cycliques (*e.g.* porphyrine), prends place chez tous les organismes (**Granick, 1951**). Les porphyrines,

molécules ubiquistes participant au bon fonctionnement du métabolisme, sont biosynthétisées par la quasi-totalité des organismes terrestres mais aussi marins.

Les rares organismes chez qui la biosynthèse de l'hème fait défaut ont tout de même besoin d'hémoprotéines qu'elles acquièrent dans le milieu extérieur (**Rao et al., 2005**).

Les voies de biosynthèse des porphyrines au sein des organismes vivants sont relativement bien connues, même s'il peut toujours exister quelques variantes chez certains d'entre eux. La synthèse de tout complexe type fer-porphyrine repose sur la voie de biosynthèse de la protoporphyrine IX, noyau porphyrinique de base dans lequel une enzyme, la *ferrochélatase*, va insérer un ion ferreux pour former l'hème, précurseur à tout complexe fer-porphyrines.

La voie de biosynthèse de l'hème se déroule dans les compartiments mitochondriaux et cytosolique des cellules (**Straka et al., 1990**) et peut être présentée ici en 6 étapes résumées en **figure 4**.

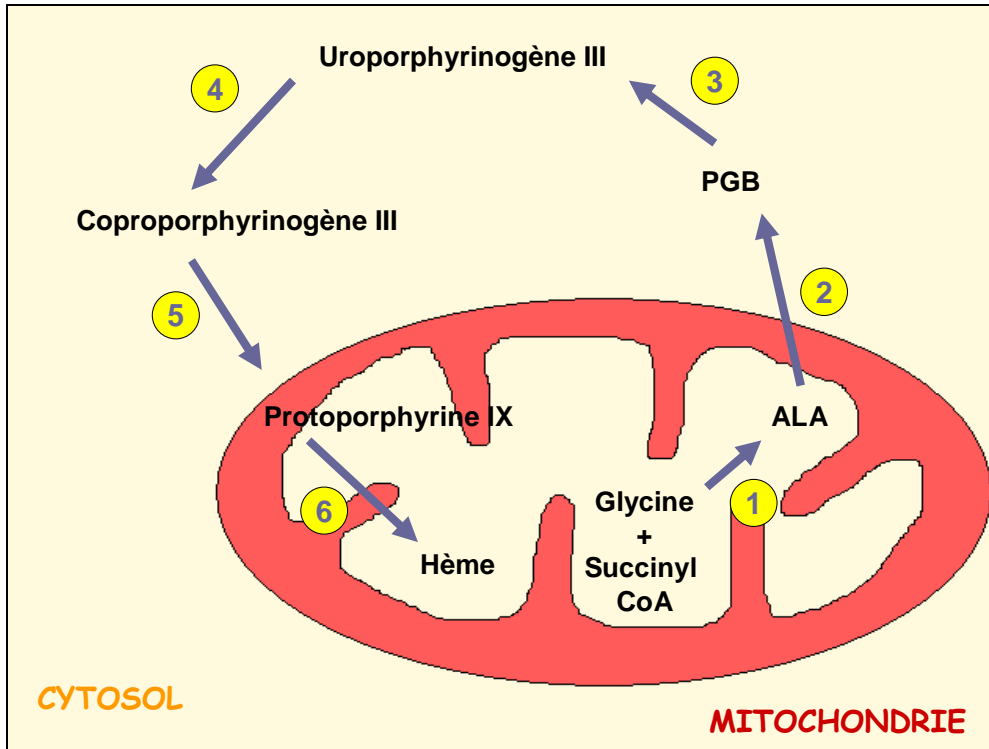


Figure 4 : Schématisation de la voie de biosynthèse de l'hème. *Etape 1:* Formation dans la mitochondrie de l'**acide δ -aminolévulinique (ALA)** à partir de la glycine et du succinyl CoA, chez les animaux. Chez les végétaux, la formation d'ALA se fait à partir du glutamate et glutamyl-tRNA. La réaction est catalysée par l'**ALA synthase** qui nécessite un cofacteur, le pyridoxal phosphate, pour son fonctionnement. *Etape 2:* Formation cytosolique de la **porphobilinogène (PGB)** par condensation de 2 molécules d'ALA, réaction catalysée par l'**ALA déhydrase**. *Etape 3:* Formation cytosolique de l'**uroporphyrinogène III** par condensation de 4 PGB par une **PGB déaminase** suivie d'une réaction de cyclisation par une **cosynthase**. *Etape 4:* Décarboxylation cytosolique de l'uroporphyrinogène III par la **uroporphyrinogène décarboxylase** pour former le coproporphyrinogène III. Ce dernier est ensuite décarboxylé par une **coproporphyrinogène oxydase** pour former le **protoporphyrinogène IX**. *Etape 5:* Formation mitochondriale de la **protoporphyrine IX** par oxydation du protoporphyrinogène IX par la **protoporphyrinogène oxydase**. *Etape 6:* Introduction de l'ion ferreux au sein de la protoporphyrine IX dans la mitochondrie par une **ferrochelatase**, pour former l'hème.

Cette voie de biosynthèse de l'hème est une voie commune à celles d'autres complexes métallo-porphyriques, dont les voies de synthèse bifurquent par des réactions de modification du précurseur commun et par la métallation de ce dernier. Voici les exemples de la vitamine B₁₂, du facteur F₄₃₀, et des pigments chlorophylliens (type chlorophylles ou bactériochlorophylles) (**Figure 5**).

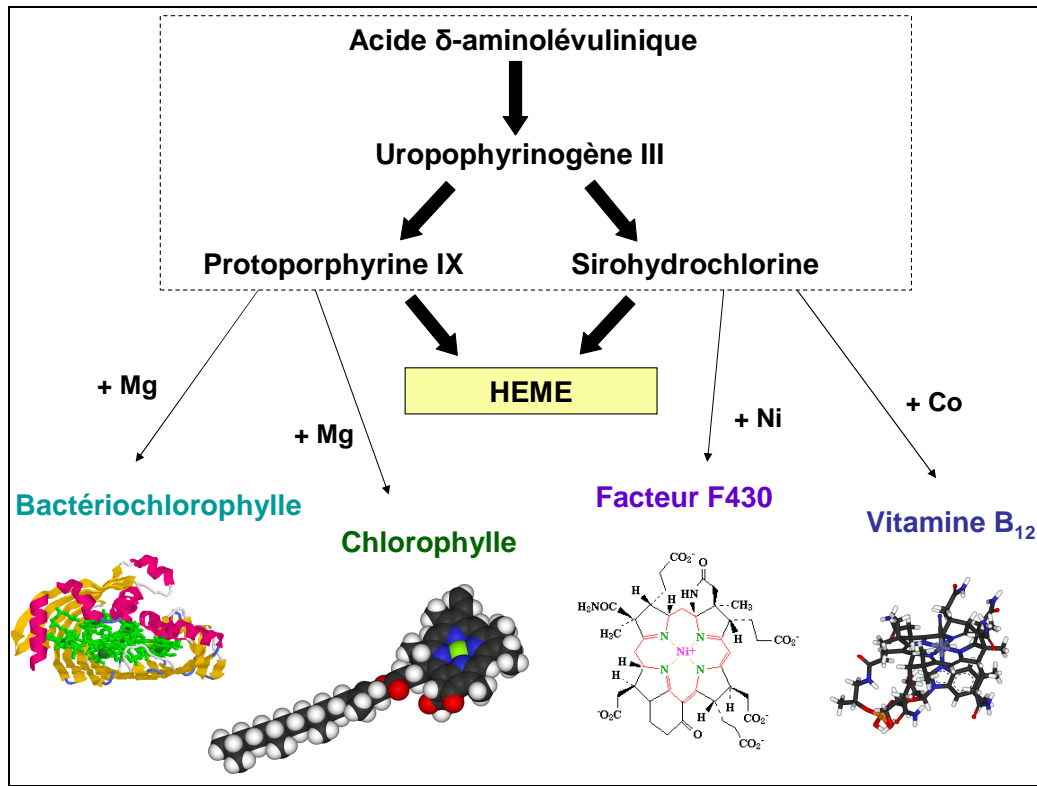


Figure 5 : Métalloporphyrines synthétisées à partir de la voie de synthèse de l'hème. Les biosynthèses de la chlorophylle et de la bactériochlorophylle sont réalisées à partir de la protoporphyrine IX (Willows, 2003) alors que les biosynthèses du coenzyme F₄₃₀ et de la vitamine B₁₂ sont réalisées à partir du sirohydrochlorine (Thauer and Bonacker, 1994).

Un approvisionnement en fer est nécessaire pour alimenter la voie de biosynthèse de la protoporphyrine IX car celui-ci est essentiel à la synthèse de métabolites intermédiaires entrant dans la biosynthèse de la protoporphyrine IX (Prato et al., 1967). Ainsi, lorsque les conditions environnementales sont limitées en fer, la voie de biosynthèse des chlorophylles est affectée, avec une diminution de la teneur en chlorophylle (Spiller et al., 1982).

Lorsque l'ion ferrique (Fe^{3+}) est inséré au sein de la protoporphyrine IX, le complexe ainsi formé porte le nom spécifique d'**hémine**, si le contre ion est le chlorure (Cl^-), ou le nom spécifique d'**hématine**, si le contre ion est l'hydroxyde (OH^-).

Lorsque l'ion ferreux est inséré, on parle spécifiquement d'**hème**. Selon la nature des chaînes latérales reliées au noyau porphyrine, il devient possible de décliner plusieurs types d'hèmes (Figure 6).

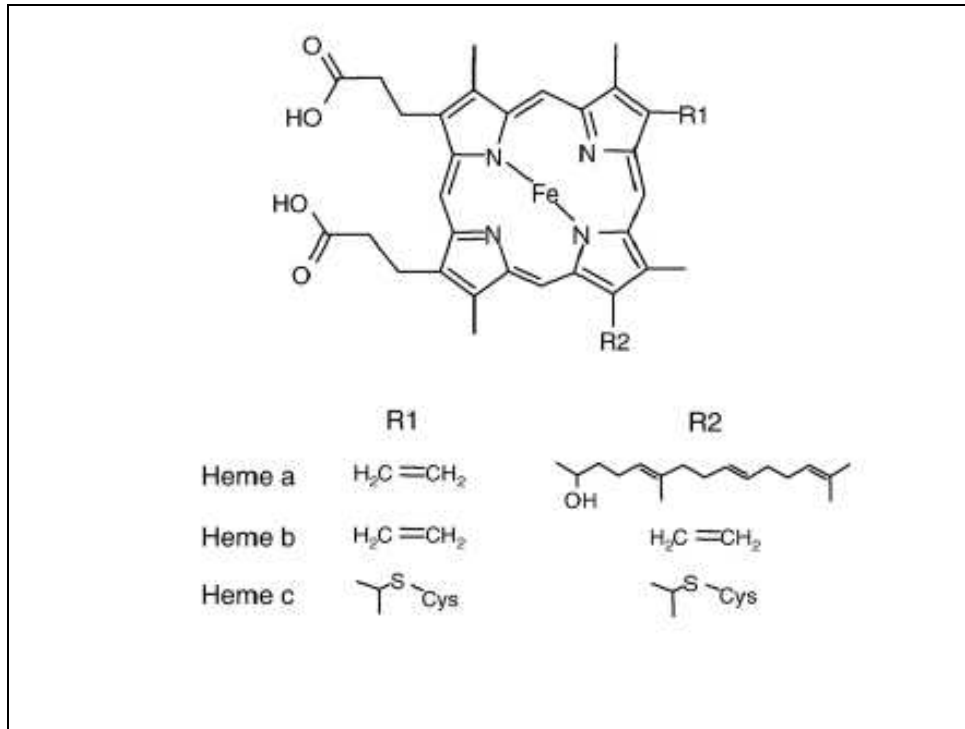


Figure 6 : Représentation chimique de différents types d'hèmes répandus dans les systèmes biologiques : hème a, hème b et hème c (Gledhill, 2007).

Ces différents hèmes sont les précurseurs d'une diversité de complexes protéiniques, de type fer-porphyrine, qui vont pouvoir participer à de nombreuses fonctions physiologiques (Figure 7).

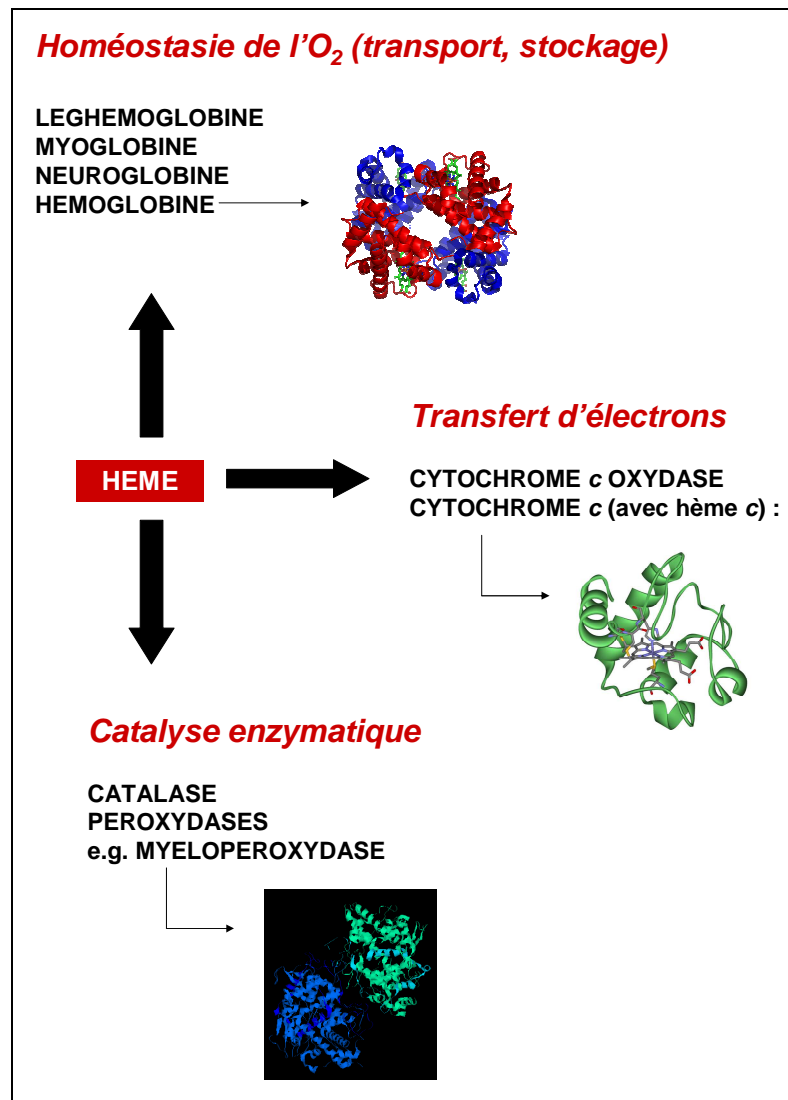


Figure 7 : Exemples de complexes fer-porphyrines biosynthétisés à partir de l'hème et entrant dans les principales fonctions biologiques.

Dans le cas de l'environnement océanique, les complexes fer-porphyrines peuvent occuper une place importante pour le bon fonctionnement physiologique des organismes.

2.3. IMPLICATIONS DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS LES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ORGANISMES MARINS

2.3.a. METABOLISME DES STEROÏDES ET DETOXICATION

Les **cytochromes P450 (hème b)** sont une famille d'enzymes hème-protéiques (hème *b*) impliquées dans le métabolisme oxydatif d'une diversité de molécules, d'origine endogène (*e.g.* stéroïdes) ou exogène (*e.g.* xénobiotiques).

Dans le cas du métabolisme de molécules endogènes, ces enzymes peuvent en effet participer à la biosynthèse et/ou au catabolisme d'hormones stéroïdiennes (chez les mammifères) (**Bernhardt and Waterman, 2007**), d'acides gras (**Pflugmacher and Sandermann, 1998**), ou de vitamine (**Okuda, 1994**). Intégrées au sein de la membrane interne mitochondriale, elles assurent des catalyses spécifiques.

Dans le cas de métabolisation de molécules exogènes, particulièrement de substances xénobiotiques (toxiques mêmes à faibles concentrations) telles que pesticides et autres polluants, les cytochromes P450 sont capables de catalyser un bon nombre de substrats non spécifiques (**Gillam and Hunter, 2007**). Situées dans la membrane interne de réticulum endoplasmique, elles assurent donc un rôle de détoxification. A ce titre, les cytochromes P450 sont devenus de véritables biomarqueurs de pollution (**Siroka and Drastichova, 2004**) et ont pu être mis en évidence chez un bon nombre d'organismes marins.

Les cytochromes P450 sont retrouvés pratiquement dans tous les organismes, procaryotes et eucaryotes (**Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000**). Ils ont pu être détectés qualitativement chez : des microalgues (**Yang et al., 2003**) et macroalgues (**Pflugmacher and Sandermann, 1998**) marines ; des invertébrés marins incluant cnidaires, annélides polychètes, mollusques (**Rewitz et al., 2006**), arthropodes (crustacés) (**James and Boyle, 1998**) et échinodermes (**den Besten, 1998**) ; mammifères tels que les cétacés (**Angell et al., 2004**).

2.3.b. ELIMINATION DES RADICAUX LIBRES

La production de radicaux libres est une conséquence de la vie aérobie pour les organismes fonctionnant sur ce type de métabolisme oxydatif. C'est dans ce cadre, que certaines enzymes de type « fer-porphyrine » interviennent pour éliminer ces radicaux susceptibles d'endommager les membranes cellulaires et les protéines, de part leur grande

réactivité et instabilité chimiques. Les plus connues sont les **catalases** (E.C. 1.11.1.6) et les **peroxydases (hème b)** (E.C. 1.11.1.).

Les catalases sont présentes chez la quasi-totalité des organismes aérobies, et peuvent même être détectées chez les organismes anaérobies (**Brioukhanov et al., 2006**).

Les peroxydases sont pour la plupart des hémoprotéines, que l'on retrouve dans les règnes animaux et végétaux. La plus connue et la plus étudiée est la peroxydase d'une plante, appelée le raifort (**van der Zee et al., 1989**) (« *horseradish peroxydase* », en anglais). Leur faible spécificité vis-à-vis de leur substrat fait que les peroxydases sont impliquées dans une variété de fonctions physiologiques incluant : protection cellulaire contre l'oxydation du peroxyde d'hydrogène (**Shigeoka et al., 1980**), la dégradation de la lignine (**Kirk and Farrell, 1987**), les réponses immunitaires, ou la biosynthèse d'hormones (**Morrison and Schonbaum, 1976**). Elles ont été mise en évidence en milieu marin, chez plusieurs espèces phytoplanctoniques (**Murphy et al., 2000**).

Particulièrement dans le domaine marin, il existe une certaine classe de peroxydases, correspondant aux « **Haloperoxydases** ». Ces dernières sont capables d'utiliser un ou plusieurs ions halogénures pour la biosynthèse de produits naturels halogénés. Elles ont particulièrement pris de l'intérêt lors d'études sur la destruction de la couche d'ozone stratosphérique par des composés organohalogénés volatils, particulièrement produits par les organismes marins (**Wever et al., 1991**).

Les haloperoxydases de type hémoprotéines sont des enzymes qui catalysent l'oxydation des halides (chlorure, bromure, ou iodure) par l'eau oxygénée, et permettent ainsi l'halogénéation concomitantes de composés organiques (**Butler and Walker, 1993**). Les haloperoxydases ont pu être détectées chez une variété d'organismes marins : microorganismes (**Andersen et al., 1974; Wratten et al., 1977**), murex (**Jannun and Coe, 1987**), ver polychète (**Chen et al., 1991**) et particulièrement dans toutes les classes d'algues (**Baden and Corbett, 1980; Hewson and Hager, 1980; Manthey and Hager, 1981; Pedersen, 1976**), microalgues (dont *Dunaliella tertiolecta*) comprises (**Murphy et al., 2000**).

2.3.c. REDUCTION DES NITRITES EN OXYDE NITREUX

La **cytochrome *cdI* nitrite réductase** est une enzyme de type bactérienne, localisée dans le périplasma (**Zajicek et al., 2004**). Elle joue un rôle clé dans les processus de dénitrification, et plus particulièrement dans la réduction des nitrites en oxyde nitreux (N₂O) (**Philippot and Hallin, 2005**). Cette enzyme est présente chez des bactéries dénitrifiantes

marines que l'on trouve dans les sédiments marins et dans l'eau de mer (Michotey et al., 2000).

2.3.d. STOCKAGE ET TRANSPORT D'OXYGENE

Les complexes fer-porphyrines (FePy) interviennent également dans le stockage et transport d'oxygène au sein des organismes, avec deux exemples de complexes protéiques très répandus : l'hémoglobine et la myoglobine.

L'**hémoglobine (hème *b* avec Fe II)**, protéine contenant 4 complexes fer-porphyrines est contenue dans les globules rouges. En milieu oxygène, l'hémoglobine s'oxyde très rapidement, de manière irréversible, en sa forme ferrique, la méthémoglobine (ou dite encore, la ferrihémoglobine). La **myoglobine (hème *b*)** est équivalente à l'hémoglobine mais est spécifique aux tissus musculaires

On retrouve hémoglobine et myoglobine chez la quasi-totalité des vertébrés marins, avec quelques exceptions possibles (O'Brien and Sidell, 1997; Sidell and O'Brien, 2006). L'hémoglobine peut aussi être présente chez les invertébrés marins, telle que l'arénicole, *Arenicola marina*, chez qui elle est bien caractérisée (Green et al., 2001; Jouan et al., 2000).

Le cas de l'hémoglobine en milieu marin est particulièrement bien étudiée dans les environnements hydrothermaux, où les conditions de vie particulières (forte pression, 350°C, milieu anoxique avec de fortes concentrations en H₂S et métaux lourds ...) ont sélectionné au cours du temps des formes particulières (Hourdez and Weber, 2005). De nombreux auteurs se sont intéressés à ces adaptations et de nombreuses études ont donc montré la présence de ce complexe FePy chez de nombreux vertébrés et invertébrés, habitant ces environnements profonds : poissons (Weber et al., 2003), vestimentifères tubiformes (Zal et al., 1996), annélides (Green et al., 2001; Hourdez et al., 2000a), mollusques gastéropodes (Wittenberg and Stein, 1995), mollusques bivalves (Zal et al., 2000), copépodes (Hourdez et al., 2000b) ... L'hémoglobine peut représenter jusqu'à 60% des protéines solubles extraites de *Benthoxymus spiculifer* (copépode des sources profondes) (Hourdez et al., 2000b).

2.3.e. CHAINES DE TRANSPORT D'ELECTRONS

Grâce à la capacité du fer à échanger facilement les électrons, on trouve de nombreuses FePy dans les chaînes de transports d'électrons.

Ces dernières sont présentes chez les procaryotes, généralement intégrées au sein de la membrane plasmique. Chez les eucaryotes, ces chaînes de transports sont situées dans les membranes de divers organelles intracellulaires : dans les membranes mitochondriales mais

aussi dans les membranes chloroplastiques pour les végétaux chlorophylliens et les cyanobactéries.

La fonction commune de ces chaînes de transport est de créer un gradient chimique transmembranaire (généralement sous forme de protons) qui va permettre de générer une production d'adénosine tri-phosphate (ATP), molécule indispensable pour tous les organismes.

On distingue deux catégories de chaînes de transfert d'électron, celles qui assurent la phosphorylation oxydative (la respiration) et celles qui participent à la photophosphorylation (photosynthèse).

(i) Phosphorylation oxydative

Ces chaînes de transfert des électrons sont encastrées au sein des membranes internes mitochondriales, où elles véhiculent les électrons jusqu'à l'accepteur d'électrons, l'oxygène, pour le réduire en H₂O.

Ces chaînes sont constituées de 4 complexes. Les fer-porphyrines, qui sont présentes sous forme de divers cytochromes, ont pu être identifiées dans deux de ces complexes :

- le COMPLEXE III correspondant au **cytochrome *bc1***. Ce cytochrome est en fait composé de plusieurs sous-unités : le **cytochrome *b*** (hème *b*), le **cytochrome *c1*** (hème *c*) et une protéine fer-soufre.
- et le COMPLEXE IV correspondant au **cytochrome *c* oxydase** (hème *a*).

Un **cytochrome *c*** (hème *c*), soluble en milieu aqueux et mobile dans la mitochondrie, va servir d'intermédiaire dans le transport d'électron, entre les deux derniers complexes (**Figure 8**).

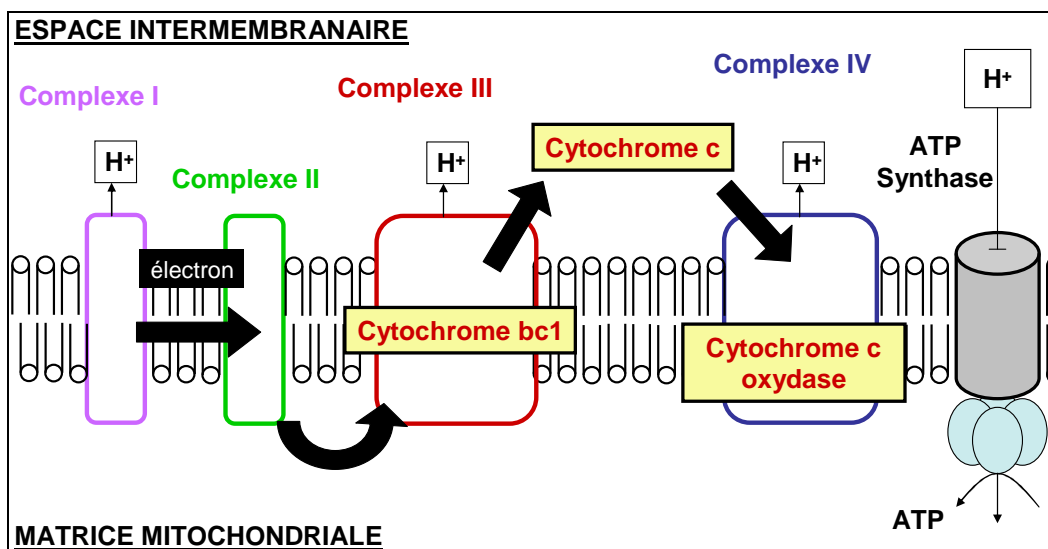


Figure 8 : Participation des fer-porphyrines (sous forme de cytochromes) au sein de la chaîne de transport d'électrons respiratoire. La chaîne de transfert d'électrons est composée de 4 complexes qui vont créer un gradient de protons. Ce gradient est utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP.

(ii) Photo-phosphorylation

Les chaînes de transports photosynthétiques font également intervenir les complexes fer-porphyrines.

Dans le cas de la photosynthèse oxygénique (produisant de l'oxygène), cette chaîne est encadrée dans les membranes thylakoïdiennes des chloroplastes, organites intracellulaires présents chez les eucaryotes photosynthétiques. Le transport d'électrons est alors assuré par 2 complexes transmembranaires : le photosystème II (PSII) et le photosystème I (PSI). Entre ces deux complexes, plusieurs fer-porphyrines vont jouer le rôle d'intermédiaire à travers un complexe appelé « **cytochrome *b6f*** ». Ce dernier est composé d'un **cytochrome *b*** (hème *b*), d'un **cytochrome *f*** (hème *c*) et d'une protéine fer-soufre.

Chez les cyanobactéries, également capables d'effectuer la photosynthèse oxygénique, ce sont d'autres cytochromes qui peuvent participer au transfert d'électrons tels que le **cytochrome *b6f***, le **cytochrome *c6*** ou le **cytochrome *aa3***.

Il existe également une photosynthèse anoxygénique chez des bactéries sulfureuses. Ces dernières ont également besoin de FePy dans leur chaîne de transport d'électrons, avec le **cytochromes *bc1*** (Schwarze et al., 2000).

3. OBJECTIFS DE LA THESE :

Ce travail s'inscrit dans un contexte général qui est de comprendre quel peut être le rôle biogéochimique joué par les complexes fer-porphyrines dans l'océan. Pour cela, les objectifs de cette thèse sont de donner les premiers éléments nécessaires à l'étude de ces complexes dans l'eau de mer.

Objectif 1 :

Sachant qu'aucune étude à ce jour n'a pu déterminer les complexes fer-porphyrines dans l'eau de mer, de façon spécifique, une première partie de ce travail est de mettre au point une méthode de dosage qui permet de déterminer les fer-porphyrines dans l'eau de mer. C'est l'objet du **chapitre 2**.

Objectif 2 :

Après avoir travaillé l'aspect analytique, le second objectif consiste à étudier un processus qui pourrait être une source en fer-porphyrines (FePy) dans l'eau de mer. L'étude du broutage du phytoplancton par le zooplancton a été choisie à titre d'exemple, car c'est un processus de relargage de matières organiques dissoutes communément rencontré en milieu océanique. C'est l'objet du **chapitre 3**.

Le **chapitre 4** est un chapitre récapitulatif et de perspectives de ce travail.

CHAPITRE II :

DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE :

**ANALYSE PAR INJECTION EN FLUX ET
DETECTION PAR CHIMILUMINESCENCE (FIA-CL)
POUR LA DETERMINATION
DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS L'EAU DE MER**

CHAPITRE II : Développement méthodologique
Analyse par injection en flux et détection par chimiluminescence
pour la détermination des complexes fer-porphyrines dans l'eau de mer

1. INTRODUCTION	29
2. MATERIELS ET METHODES	31
2.1. REACTIFS	31
2.2. DESCRIPTION DES MONTAGES	32
2.3. DETERMINATION DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES	34
2.4. ECHANTILLONAGE DES EAUX NATURELLES	34
3. RESULTATS ET DISCUSSION	35
3.1. PRINCIPE ET MECANISMES GENERAUX DE LA REACTION	35
3.2. APPLICATION EN FIA	38
3.3. APPLICATION POUR L'ANALYSE DE L'EAU DE MER	39
3.3.a. Stabilité du signal	39
3.3.b. Automatisation du traitement	40
3.3.c. Compétition avec l'EDTA	42
3.4. AMELIORATION DE LA SENSIBILITE DE LA METHODE	44
3.4.a. Temps de mélange des bobines	44
3.4.b. Température	44
3.10. VERIFICATION DE LA SPECIFICITE DE LA METHODE	44
3.11. INTERFERENCES	46
3.12. STOCKAGE DES ECHANTILLONS	48
3.12. APPLICATIONS	51
3.12.a. Détermination dans les cultures phytoplanctoniques	51
3.12.b. Détermination en milieu naturel	51
4. CONCLUSION	53

1. INTRODUCTION

En océanographie, les méthodes actuellement employées pour étudier le fer dans l'océan repose sur diverses techniques et moyens de détection, qui souvent sont précédées par différentes étapes de pré-concentration.

Parmi les plus récentes et les plus utilisées, il est possible de citer des méthodes spectrométriques : telle que la spectrométrie de masse avec l'ICP-MS pour «Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometers » (**Akatsuka et al., 1992; Wells and Bruland, 1998; Wu and Boyle, 1998**), ou telle que la spectrométrie d'absorption atomique dite GFAAS pour «Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry » (**Landing and Bruland, 1987**). Ces méthodes permettent de mesurer des concentrations en fer dissous, avec des limites de détection de 50 pM pour la GFAAS (**Landing and Bruland, 1987**), voire de 6 pM pour l'ICP-MS (**Wells and Bruland, 1998**). Elles permettent également de déterminer les sidérophores (**Kilz et al., 1999**) (**Gledhill, 2001**), avec un couplage possible à une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (**McCormack et al., 2003**). Cependant, GFAAS et ICP-MS sont des appareillages lourds et assez coûteux, ce qui restreint leur application en océanographie et rend difficile leur utilisation à bord de navires.

Les méthodes électrochimiques, telle que la CSV pour «Cathodic Stripping Voltammetry », viennent compléter les méthodes précédentes pour l'étude de la biogéochimie du fer dans l'océan. Leur utilisation a permis de souligner l'importance de la complexation organique qui représente plus de 98 % du fer dissous (**Gledhill et al., 1998; Rue and Bruland, 1995; Rue and Bruland, 1997; van den Berg, 1995; Witter et al., 2000b; Witter and Luther III, 1998; Wu and Luther III, 1995**). Elles permettent notamment de mettre en évidence deux classes de ligands que l'on différencie en fonction de leur affinité pour le fer. Malheureusement, aucune information sur la nature chimique de ces ligands, dits « faibles » et « forts », n'est fournie par ce type d'approche. Ces méthodes ont l'avantage d'être utilisables en mer.

Cependant, les méthodes qui sont le plus appréciées pour leur plus grande rapidité d'analyse et pour leur côté pratique sont les analyses par injection en flux (FIA), couplées à une détection par spectrophotométrie (**Blain and Treguer, 1995; Measures et al., 1995**) ou par chimiluminescence (FIA-CL) (**Bowie et al., 1998; de Jong et al., 1998; King et al., 1995; Obata et al., 1997; Powell et al., 1995; Seitz and Hercules, 1972**).

Très sensible, la chimiluminescence permet de déterminer des concentrations en fer(III) dissous avec une limite de détection de 10 pM (**de Jong et al., 1998**) et de fer total dissous avec une limite de détection de 40 pM (**de Jong et al., 1998**). Les réactions de chimiluminescence correspondent à des réactions où certaines molécules sont portées à l'état excité, par une énergie d'origine chimique, et où leur retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission de photons. Ces réactions de chimiluminescence peuvent être basées sur l'oxydation de sulfoflavine par exemple, pour la détection de fer(II) et de fer total dissous (**Elrod et al., 1991**). Cependant, l'oxydation du luminol reste la plus fréquemment employée. Cette dernière peut se faire avec le peroxyde d'hydrogène pour oxydant, et peut permettre dans ce cas de déterminer le fer(III) (**de Jong et al., 1998; Obata et al., 1997; Obata et al., 1993**). Autre possibilité, l'oxydation du luminol peut se faire simplement avec l'oxygène moléculaire pour oxydant (on parle d'oxydation non peroxydative du luminol). Selon les conditions, il devient possible de déterminer le fer(II) (**King et al., 1995; O'Sullivan et al., 1995; Seitz and Hercules, 1972**) ou le fer total (**Bowie et al., 1998; Powell et al., 1995**).

Certaines études menées dans le domaine médical montrent que des complexes type FePy sont capables de participer à l'oxydation du luminol, avec H₂O₂ pour oxydant. C'est le cas du cytochrome *c* (**Feissner et al., 2003**), de la myoglobine (**Song et al., 2004**) ou de l'hème en général (**Masuda and Takahashi, 2006**). Une autre étude réalisée dans le cadre de test d'immuno-essai montre que des FePy synthétiques sont capables de produire de la chimiluminescence à pH 13, dans un système d'oxydation du luminol par l'oxygène moléculaire (**Motsenbocker et al., 1993**).

Cette dernière réaction est relativement simple et pourrait être transférée en océanographie pour savoir si, tout comme les sidérophores, les FePy participent à la complexation organique du fer dans l'océan. Aussi, l'objectif de ce travail est de mettre au point une méthode de dosage qui puisse donner les premières concentrations en FePy dans l'eau de mer. Pour cela, notre démarche consiste à adapter la réaction décrite par Motsenbocker et collaborateurs (**Motsenbocker et al., 1993**) avec les modifications qui s'imposent pour l'analyse de l'eau de mer, ceci avec la mise en œuvre d'une analyse d'injection en flux.

2. MATERIELS ET METHIODES

2.1. REACTIFS

Le matériel utilisé pour la préparation des réactifs ci-dessous a été rincé au détergent (MICRO®, International Product Corporation) pour la première utilisation puis, de manière permanente, à la soude NaOH 0,1 M, à l'acide chlorhydrique HCl 10 %, puis à l'eau ultrapure déionisée (Eau milli-Q, Millipore).

Solutions stocks de porphyrines – Toutes les solutions stocks de porphyrines (Sigma-Aldrich) sont conservées à 4° C et à l'obscurité. Les solutions stocks d'hémine à $1,5 \times 10^{-3}$ M (Calbiochem, 3741), de protoporphyrine IX diméthyl ester à 10^{-3} M (Sigma Aldrich, 289965), de coproporphyrine I dihydrochloride à 10^{-3} M (Sigma Aldrich, 258784), de mésoporphyrine IX dihydrochloride à 10^{-3} M (Sigma Aldrich, 258806) et de chlorophylline à 10^{-3} M (Sigma Aldrich, C6003) ont été préparées dans de la soude 0,1 M. Les solutions stocks d'hémoglobine d'origine bovine à $1,5 \times 10^{-2}$ M (Sigma Aldrich, H2625), de myoglobine à $1,5 \times 10^{-2}$ M (Sigma Aldrich, M0630), de vitamine B₁₂ (Sigma Aldrich, V2876) de cytochrome *c* de cœur bovin à $1,5 \times 10^{-2}$ M (Sigma Aldrich, C2037) et de catalase de foie bovin à $1,5 \times 10^{-2}$ M (Sigma Aldrich, C9322 ou C100) ont été préparées dans de l'eau Milli-Q. La solution stock de peroxydase type II de raifort (Sigma Aldrich, P8250 ou 77332) (147 U.mL^{-1}) a été préparée dans du tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane à 0,25 M (Sigma Aldrich, 252859) ajusté à pH 8,6. La solution stock de chlorophylle *a* extraite de l'algue *Anacystis nidulans* à 1 mg.L^{-1} (Sigma Aldrich, 25730) a été préparée dans une solution d'acétone à 90%. Les différentes porphyrines, étant plus ou moins solubles, sont dissoutes dans les solvants pour lesquels elles présentent une plus grande solubilité.

Réactifs de traitement de l'eau de mer et de FIA – La solution tampon $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (pH 9) est obtenue en mélangeant 122 mL d'eau milli-Q, 53 mL d'acide chlorhydrique suprapur à 30 % (Merck) et 75 mL de solution d'ammoniaque pure à 34 % (Merck). Les solutions d'EDTA à 0,25 M (acide éthylènediaminetétraacétique trisodium dihydraté, Sigma Aldrich, 03710), de NaOH à 0,1 M (Sigma aldrich, S8045) et de NaCl à 0,5 M (Sigma Aldrich,

S7653) sont préparées dans de l'eau milli-Q. La solution de luminol à $1,5 \times 10^{-3}$ M est obtenue par dissolution du 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (Sigma Aldrich, A8511) dans 1 litre de soude à 0,1 M (montage 1) ou à 0,5 M (montage 2) contenant au final 3 mL d'acide linoléique à 60 % (Sigma Aldrich, L1626). Le réactif de luminol est ensuite stocké à température ambiante et à l'obscurité dans des bouteilles de polycarbonate opaque. Il faut au moins attendre 24 heures avant de pouvoir l'utiliser. L'eau de mer artificielle utilisée est obtenue en mélangeant 500 mL d'une solution où 24 g de chlorure de sodium (NaCl, VWR) ont été dissous, avec 455 mL d'une deuxième solution où 10,8 g de chlorure de magnésium ($\text{MgCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$, Merck) et 1,5 g de chlorure de sodium ($\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$, Merck) ont été préalablement dissous.

Solutions pour les tests d'interférence – Pour préparer la solution stock de Fe^{3+} à 1 g.L^{-1} (0,0179 M), une ampoule de Fe(III) standard pour spectroscopie atomique (Sigma Aldrich, 02679) est diluée dans 100 mL d'acide chlorhydrique à 37 %. Cette préparation de 100 mL est ensuite diluée dans 1 L d'eau milli-Q. La solution stock de Fe^{2+} est préparée par dissolution d'ammonium sulfate ferreux dans de l'acide sulfurique à 1 M. Les solutions stocks de peroxyde d'hydrogène (VWR International) sont faites au dernier au moment dans de l'eau milli-Q et à l'abri de la lumière. Les solutions stocks d'acide phytique (Sigma Aldrich, P8810), de Cu^{2+} , Co^{2+} et de DFOB (Desferrioxamine B) à 0,4 M sont faites dans de l'eau milli-Q. La solution stock d'acide humique (Sigma Aldrich, H16752) est faite dans une solution de soude et est testée dans le manifold 1 en raison de la plus grande solubilité de l'acide humique à pH élevé. La solution de Fe^{3+} -DFOB est préparée en ajoutant progressivement une solution de Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) à une solution de DFOB, les concentrations finales en Fe^{3+} et en DFOB étant respectivement de $0,2 \mu\text{M}$ et de $1 \mu\text{M}$.

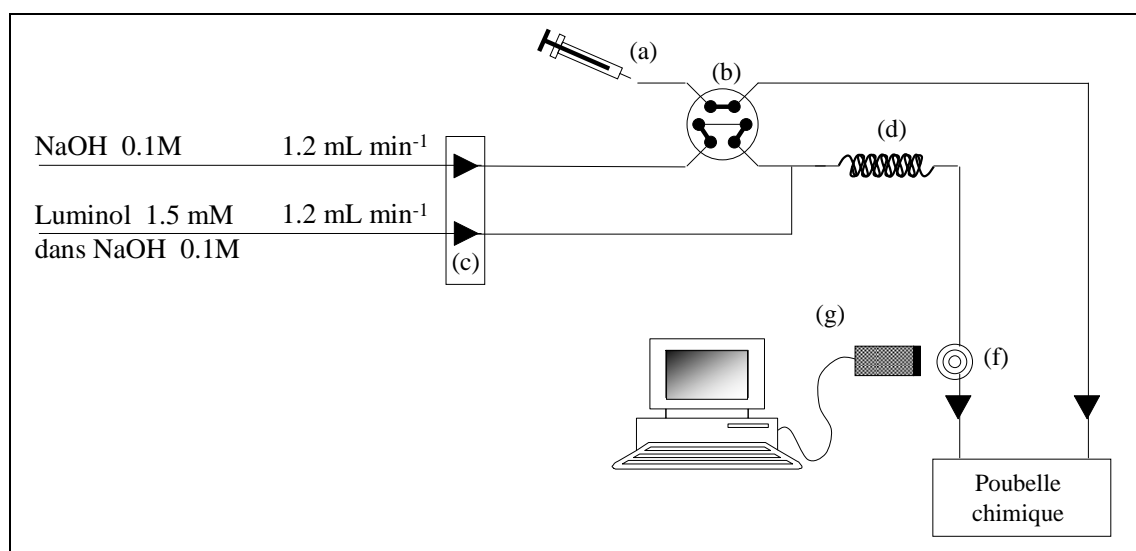
2.2. DESCRIPTION DES MONTAGES

Deux types de montages ont été utilisés (**Figure 9**), le premier étant dédié à l'analyse d'échantillons de soude ou d'eau de mer pré-traitée, et le second montage étant utilisé pour l'analyse directe d'échantillons d'eau de mer.

Dans chacun des montages, le principe reste le même : les réactifs sont poussés par une pompe péristaltique (Gilson Minipuls 3) jusqu'à une vanne d'injection à six port (Cheminert model C22) qui permet d'insérer l'échantillon dans le circuit. Les tubes, les connections en « T » et les bobines de mélange utilisés pour les montages sont faits en Teflon

(Cluzeau Info Labo, diamètre interne de 0,75 mm). La lecture du signal est réalisée au niveau d'une cellule de lecture située juste en face d'un photomultiplicateur (Hamatsu H9319-01) sensible à l'émission de photons qui est provoquée lors de la réaction de chimiluminescence.

Montage 1 :



Montage 2 :

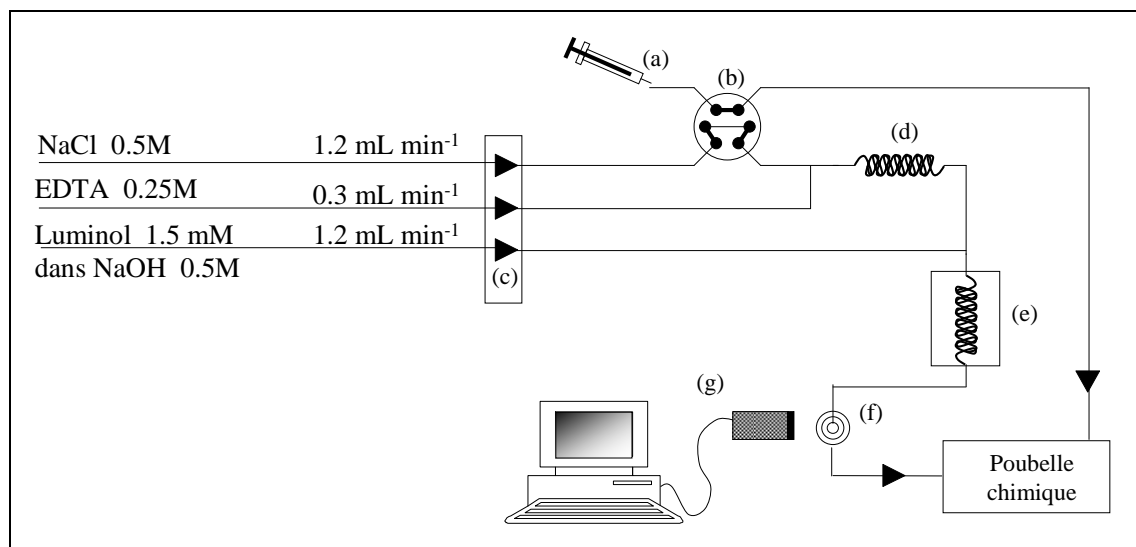


Figure 9 : Schéma des différents montages en FIA-CL : (a) seringue d'injection, (b) vanne d'injection, (c) pompe péristaltique, (d) bobine de mélange (e) bain thermostaté (f) cellule de lecture, (g) photomultiplicateur.

2.3. DETERMINATION DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES

Les concentrations en fer-porphyrines sont déterminées par des ajouts dosés d'hémine qui est un complexe fer-porphyrine naturel. Ce dernier est choisi car il est commercialisé (Calbiochem, 3741) et est soluble dans les solutions aqueuses. Les échantillons sont ensuite traités avant d'être injectés selon deux protocoles qui sont spécifiques au montage utilisé.

Pour le montage 1 : Les échantillons de soude à 0,1 M sont directement injectés dans la boucle d'injection. Par contre, les échantillons d'eau de mer (3,5 mL) sont pré-traités avant injection par 420 µl de tampon $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, 980 µl d'EDTA à 0,25 M, puis 210 µl de soude à 8 M.

Pour le montage 2 : Les échantillons d'eau de mer (3,5 mL) sont pré-traités avec 420 µl de tampon $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$.

L'acquisition du signal commence 30 sec après l'injection de l'échantillon et va durer 120 sec pendant lesquelles l'émission de photons de l'échantillon va être enregistrée en fonction du temps sous forme de pic. L'intégrale de ce pic, exprimée en photons émis, va correspondre à la réponse de chimiluminescence de l'échantillon injecté.

2.4. ECHANTILLONNAGE DES EAUX NATURELLES

La méthode a été testée sur plusieurs types d'eaux naturelles et sur des cultures de phytoplancton de *Dunaliella tertiolecta*. Les conditions d'échantillonnage et de culture sont présentées ci-dessous.

Eaux de mer du large :

Les eaux océaniques du large ont été échantillonnées lors de la campagne KEOPS (KErguelen Ocean and Plateau compared Study, 19 janvier au 13 février 2005), à l'aide de bouteilles de prélèvement ®Go-Flo montées sur câble ®Kevlar. Elles ont été filtrées sur 0,2 µm puis analysées à bord mais aussi en laboratoire après un stockage par congélation.

Eaux de mer côtière :

Ces eaux ont été prélevées en surface, à différents endroits : en Guyane française à bord d'un catamaran, et dans les calanques méditerranéennes par nage. Elles ont été filtrées dès prélèvements sur 0,2 µm (filtre polycarbonate). Dans le cas des eaux de Guyane française,

ces dernières ont été stockées à 4 °C jusqu'à leur analyse en laboratoire, quelques jours plus tard (moins d'une semaine).

Eaux intermédiaires et eaux douces:

Ces eaux ont été prélevées dans l'étang de Berre, avec la collaboration d'Emma Gouze (eau intermédiaire), et dans le Rhône, avec la collaboration de Patrick Raimbault (eau douce). Elles ont été immédiatement filtrées et analysées après échantillonnage.

Culture de *Dunaliella tertiolecta* :

La souche de *Dunaliella tertiolecta* (CSIRO, souche CS-175) a été cultivée sur du milieu f/2 modifié (Guillard, 1975; Guillard and Ryther, 1962). De l'eau de mer méditerranéenne (prélèvements réguliers à la station SOMLIT), filtrée sur 0,2 µm, a été enrichie avec du NaNO₃ (75 mg.L⁻¹), du NaH₂PO₄ (4,4 mg.L⁻¹), du CoCl₂·6H₂O (10 g.L⁻¹), du MnCl₂·4H₂O (180 g.L⁻¹), du CuSO₄·5H₂O (9,8 g.L⁻¹), du ZnSO₄·7H₂O (22 g.L⁻¹), du NaMoO₄·2H₂O (6,3 g.L⁻¹), du FeCl₃·6H₂O (315 ng.L⁻¹), du Na₂EDTA (436 ng.L⁻¹), de la thiamine (2 nM), de la cyanocobalamine ou vitamine B₁₂ (0,1 nM) et de la biotine (300 nM). Les milieux de culture ont tous été autoclavés à 120 °C pendant 20 min, et la solution de vitamines, stérilisée par filtration à 0,2 µm n'a été rajoutée qu'après autoclavage. Les cultures sont cultivées à température ambiante sous des conditions lumineuses naturelles. Elles sont homogénéisées tous les jours manuellement.

Pour la détermination du contenu intracellulaire en FePy, les cellules ont été collectées sur un filtre en polycarbonate de 0,2 µm. Ce filtre a ensuite été plongé dans 30 mL de solution de NaOH 0,1 M durant 15 minutes, avec agitation magnétique. La solution est ensuite filtrée à 0,2 µm avant analyse en FIA-CL

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. PRINCIPE ET MECANISMES GENERAUX DE LA REACTION

Il existe différentes voies d'oxydation du luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) qui sont plus ou moins privilégiées selon les conditions expérimentales fixées. Ainsi, le luminol peut être utilisé pour la détermination d'une variété de composés

chimiques et trouve de ce fait son application dans de nombreuses disciplines, pour la détermination de diverses molécules. Tout dépend alors des espèces chimiques que l'on introduit et que l'on favorise dans le milieu réactionnel. En effet, ces espèces vont ensuite orienter les mécanismes responsables de l'oxydation du luminol. Ces derniers ont été décrits dans quelques études bien détaillées (Merényi et al., 1990) (Rose and Waite, 2001) et il semble que, quel que soient les conditions, l'oxydation du luminol se déroule en deux étapes. Premièrement, une première oxydation conduit à la formation de formes radicalaires du luminol. Deuxièmement, une autre oxydation va conduire à la formation d' α -Hydroxy Hydro Peroxyde (α -HHP). Le schéma (Figure 10) établi par Rose et Waite (Rose and Waite, 2001) présente les principales étapes d'oxydation du luminol, avec les différents intermédiaires chimiques.

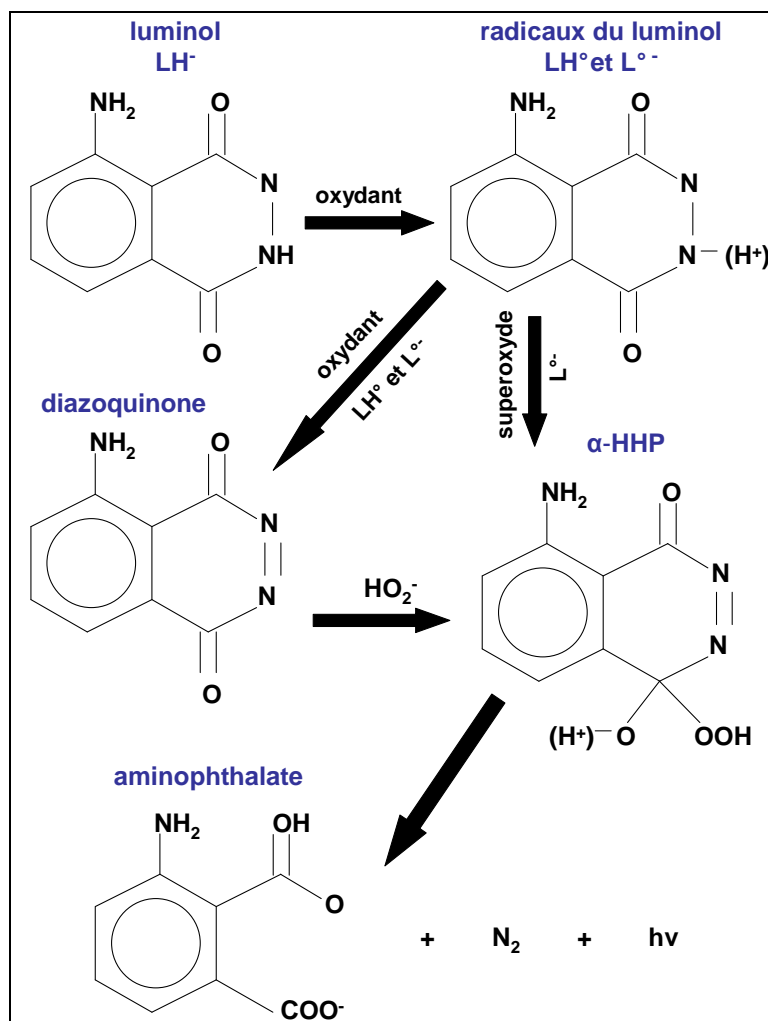


Figure 10 : Mécanisme réactionnel d'oxydation du luminol.

En s'appuyant sur la connaissance de ces mécanismes généraux, il devient plus aisé de comprendre et de préciser la réaction de chimiluminescence décrite par Motsenbocker et collaborateurs (**Motsenbocker et al., 1993**).

Lors de la première oxydation, ce sont les complexes fer-porphyrines qui assurent ici l'oxydation du luminol avec la formation théorique de deux formes radicalaires que sont LH° et L° . Simplement, à pH élevé (pH = 13), la formation du monoanion L° serait privilégiée. Lors de cette étape, de nombreuses espèces chimiques pourraient également intervenir en tant qu'oxydants primaires du luminol. Parmi eux, figurent les métaux traces (fer, manganèse, magnésium, cobalt, chromium, cuivre) ainsi que de nombreuses espèces radicalaires (N_3° , CO_3° , Br_2° , ClO_2°), exception faite des radicaux superoxydes incapables d'intervenir à cette étape. Dans la littérature, un complexe fer-porphyrine qui est la peroxydase de raifort (en anglais, *horseradish peroxydase*) est également bien connu pour intervenir lors de cette première oxydation. Ceci soutient bien l'intervention des complexes fer-porphyrines à cette étape.

Le devenir du luminol dépend ensuite de la concentration en radicaux superoxydes O_2° . En effet, lors de la seconde oxydation, le monoanion L° précédemment formé peut être oxydé directement en α -HHP dans le cas où il y aurait présence préalable de superoxyde dans le milieu. Dans le cas contraire, le monoanion est oxydé avec l'oxygène moléculaire dissous, conduisant ainsi à la formation de diazoquinone et de superoxyde. Dans le système FePy- O_2 -luminol, cette diazoquinone disparaît rapidement par attaque nucléophile par OH^- (OH^- présent à pH = 13). Les radicaux superoxydes générés dans le milieu vont pouvoir intervenir dans l'oxydation du monoanion. Ainsi, même en l'absence de superoxydes initiaux, il existe une production *in situ* à l'origine de l'oxydation du monoanion en α -HHP.

Comme la concentration d'oxygène requise pour oxyder le luminol est extrêmement faible (**Motsenbocker et al., 1993**), celle-ci n'est pas considérée comme limitante pour le développement de la réaction. Le principe consiste donc à travailler en milieu basique avec une concentration en luminol excessive, ceci afin que la quantité de lumière puisse répondre à la quantité de métallo-porphyrines contenues dans l'eau de mer.

3.2. APPLICATION EN FIA

Dans un premier temps, la démarche consiste à rendre compatible l'utilisation de la réaction de chimiluminescence utilisée en immuno-essais avec la FIA. Pour cela, un montage relativement simple où le pH est continuellement maintenu à 13 a été élaboré (**montage 1, figure 9**).

Des standards d'hémine réalisés dans une solution de soude (pH = 13) ont immédiatement été injectés après leurs préparations. Pour des concentrations inférieures à 2 nM, l'émission de photons répond linéairement à la quantité d'hémine ajoutée (**Figure 11**).

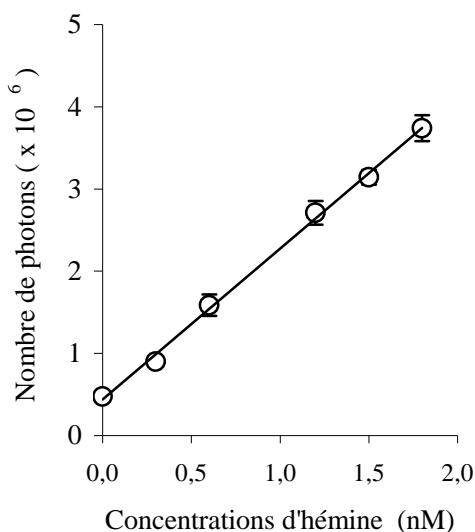


Figure 11 : Réponse de chimiluminescence de l'hémine dans une solution de soude 0,1 M. La réponse est linéaire ($y = 1,83x + 0,44$, $R^2 = 0,99$).

La stabilité du signal avec le temps a également été montrée pour une durée de 4 heures après la préparation d'un standard d'hémine de 4 nM. La limite de détection, correspondant à trois fois l'écart type du blanc (n=10), est de 0,38 nM.

3.3. APPLICATION POUR L'ANALYSE DE L'EAU DE MER

3.3.a. TRAITEMENT DE L'EAU DE MER

L'application pour l'analyse de l'eau de mer est délicate à mettre en œuvre. Elle nécessite un traitement préalable des échantillons d'eau de mer. En effet, pour que la réaction de chimiluminescence puisse avoir lieu, le pH des échantillons d'eau de mer doit être ajusté à $\text{pH} = 13$ avec de la soude 8 M. Or, l'eau de mer comporte de nombreux cations, notamment les ions calcium et magnésium, qui précipitent en milieu basique pour former des hydroxydes de calcium et de magnésium. La présence de ces précipités dans l'eau de mer est incompatible avec la méthode en flux. De plus, ils présentent une surface d'adsorption potentielle qui pourrait capter efficacement de nombreuses espèces minérales et organiques.

Pour éliminer les ions calcium et magnésium, il est possible grâce à un ajout de soude de provoquer la formation d'un précipité qui pourrait ensuite être éliminé par centrifugation. Mais dans le cadre d'une application à bord, cette solution n'est pas la plus idéale. L'option qui a été retenue consiste à complexer les cations avec un ligand qui ne conduit pas à la formation de précipité. C'est le cas de l'EDTA dont l'ajout dans une solution d'eau de mer élimine efficacement les ions calcium et magnésium, sans provoquer de précipité.

Un traitement basé sur la complexation avec l'EDTA demande que le milieu soit auparavant tamponné à $\text{pH} 9,5$ avec du tampon $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Ceci permet de compenser la libération d'ions H^+ qui peut accompagner la complexation des cations par l'EDTA et acidifier le milieu. L'hémine se dégrade en effet en milieu acide et un ajout préalable de tampon permet donc de la préserver. Le protocole est détaillé en page 34.

3.3.b. STABILITE DU SIGNAL

La stabilité du signal décroît de moitié au bout de 5 h, pour un standard d'hémine à 4 nM réalisé dans de l'eau de mer (**Figure 12**).

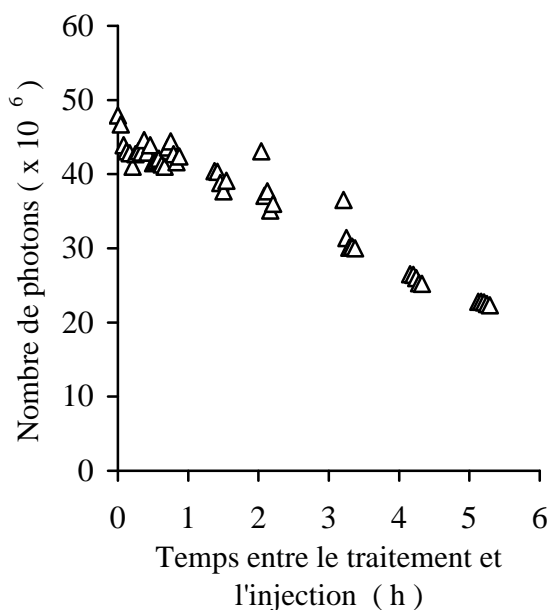


Figure 12 : Evolution dans le temps du signal de chimiluminescence d'un étalon de 3,96 nM réalisé dans de l'eau de mer. Le traitement se fait 3 heures après ajout d'hémine.

Cette décroissance de la chimiluminescence peut être provoquée par une compétition du fer contenu dans l'hémine par l'EDTA, également capable de complexer le fer. D'une autre façon, elle peut aussi être provoquée par un échange du fer contenu dans l'hémine par les ligands naturels présents initialement dans l'eau de mer. Dans ce cas, la vitesse d'échange du fer et donc la vitesse de diminution de la chimiluminescence, pourraient être fonction de la nature et des concentrations de ces ligands naturels selon différents échantillons d'eau de mer. Quoi qu'il en soit, quelle que soit la cause, cette perte de signal réduit la sensibilité de la méthode, c'est pourquoi les échantillons sont immédiatement injectés après traitement. Moins d'une minute sépare le début du traitement de l'échantillon et son injection.

3.3.c. AUTOMATISATION DU TRAITEMENT

L'étape suivante consiste à modifier le montage 1 en montage 2 pour réaliser l'addition d'EDTA en flux contrôlé dans le système d'analyse. Ceci permet d'alléger les manipulations à faire sur l'échantillon et d'obtenir une meilleure reproductibilité sur les temps et conditions de réaction.

L'introduction d'échantillon d'eau de mer dans le montage 1 s'accompagne de la modification du fluide porteur. En gardant une solution de NaOH 0,1 M on permet la formation de précipités d'hydroxyde de magnésium/calcium au sein du montage, lors de l'introduction de l'échantillon dans le circuit par la boucle d'injection. Plusieurs liquides porteurs sont testés : l'eau milli-Q, l'eau de mer artificielle, une solution de NaCl à 0.5M (Figure 13).

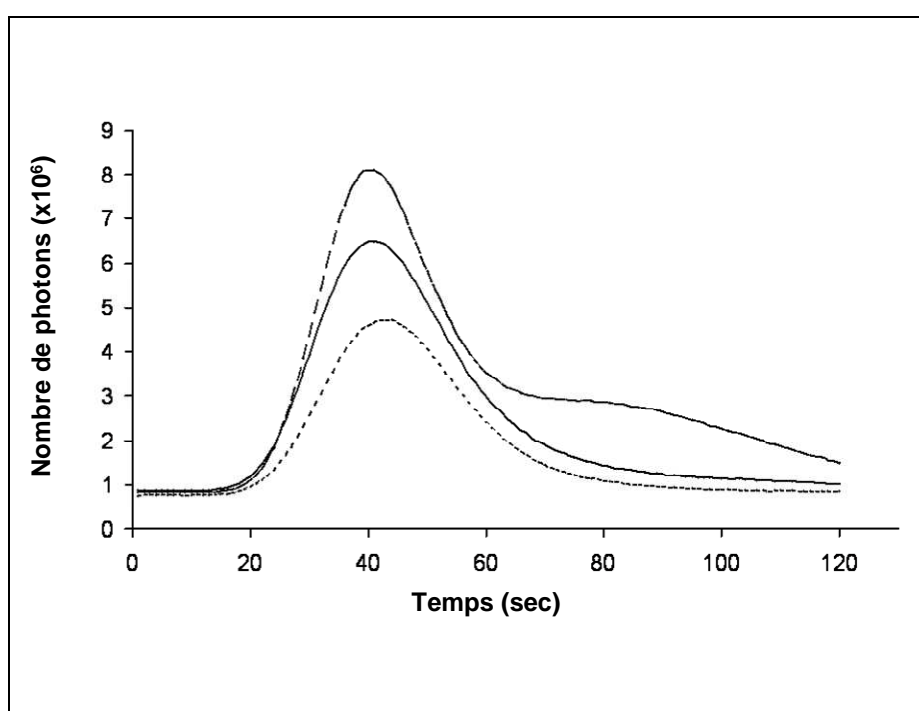


Figure 13 : Modification des signaux obtenus selon la nature du fluide porteur : eau milli-Q (grand pointillé), solution de chlorure de sodium 0,5 M (continu) ou eau de mer artificielle (petit pointillé). Les pics ont été obtenus en injectant un standard d'hémine à 6 nM réalisé dans de l'eau de mer.

Avec de l'eau milli-Q comme fluide porteur, l'injection d'un étalon à 6 nM d'hémine se traduit par la représentation d'un pic de forme dissymétrique, avec un niveau de photoémission qui revient difficilement à son niveau initial. Le calcul de l'aire du pic fait correspondre à l'étalon d'eau de mer, une valeur de chimiluminescence de $25,7 \pm 1,7 \times 10^6$ photons pour une durée d'acquisition de 120 secondes. Pour l'injection du même étalon, l'utilisation d'une solution de chlorure de sodium à 0,5 M conduit à la représentation d'un pic d'allure régulière et plus conforme, avec une aire plus faible de $18,6 \pm 1,2 \times 10^6$ photons. C'est

avec l'eau de mer artificielle que le pic est le plus régulier et le plus faible avec une valeur de $12,4 \pm 0,3 \times 10^6$ photons, pour le même étalon injecté.

Selon la nature du fluide porteur, il est donc possible d'altérer la forme du pic et de jouer sur sa hauteur. Ces dernières modifications ne sont pas sans conséquence sur l'estimation de la chimiluminescence d'un échantillon donné. Ainsi, l'usage d'une solution dépourvue d'ions telle que l'eau milli-Q, conduit à une surestimation de la valeur réelle de l'intégrale du pic. Par ailleurs, c'est aussi avec l'eau milli-Q que la précision est la moins bonne. En revanche, l'utilisation de fluides porteurs possédant une force ionique proche de celle de l'eau de mer, tels que les solutions de chlorure de sodium (0,5 M) et d'eau de mer artificielle, conduit à la formation d'un pic d'allure plus courante en FIA. Bien que la meilleure précision soit obtenue avec l'eau de mer artificielle, pour des raisons pratiques, c'est la solution de chlorure de sodium qui est retenue pour jouer le rôle de fluide porteur.

A remarquer également que dans le montage 2, le luminol est dilué dans une solution de soude à 0,5 M (pH = 13,5) et non plus à 0,1 M (pH = 13) comme dans le montage 1. La raison n'est pas liée à l'introduction d'EDTA mais au changement du fluide porteur, désormais à pH = 7 (NaCl 0,5M), et non plus à pH 13 (NaOH 0,1 M). L'augmentation de pH du réactif du luminol compense la diminution du pH du fluide porteur, de manière que lors de la rencontre de ces deux réactifs, le pH de chimiluminescence soit toujours proche de 13.

3.3.d. COMPETITION DE L'EDTA

Le rôle de l'EDTA est d'éviter la précipitation des cations Mg^{2+} et Ca^{2+} . Or, il est aussi un ligand synthétique capable de complexer le fer. Son introduction peut poser un doute sur une interférence possible avec l'hémine et les complexes fer-porphyriniques naturels. La présence d'EDTA libre dans les échantillons pourrait en effet encourager une compétition, en terme de complexation, pour le fer chélaté par l'hémine et les complexes fer-porpyriniques.

Dans l'hypothèse où l'EDTA serait en compétition avec les porphyrines, l'intensité du signal dû aux fer-porphyrines devrait théoriquement diminuer si la compétition est en faveur de l'EDTA. Autrement dit, elle devrait diminuer pour des concentrations croissantes d'EDTA. Différentes solutions d'EDTA (0,125 M ; 0,25 M ; 0,375 M ; 0,5 M ; 0,675 M) ont donc été testées pour des échantillons d'eau de mer, sans ou avec 6 nM d'hémine (**Figure 14**).

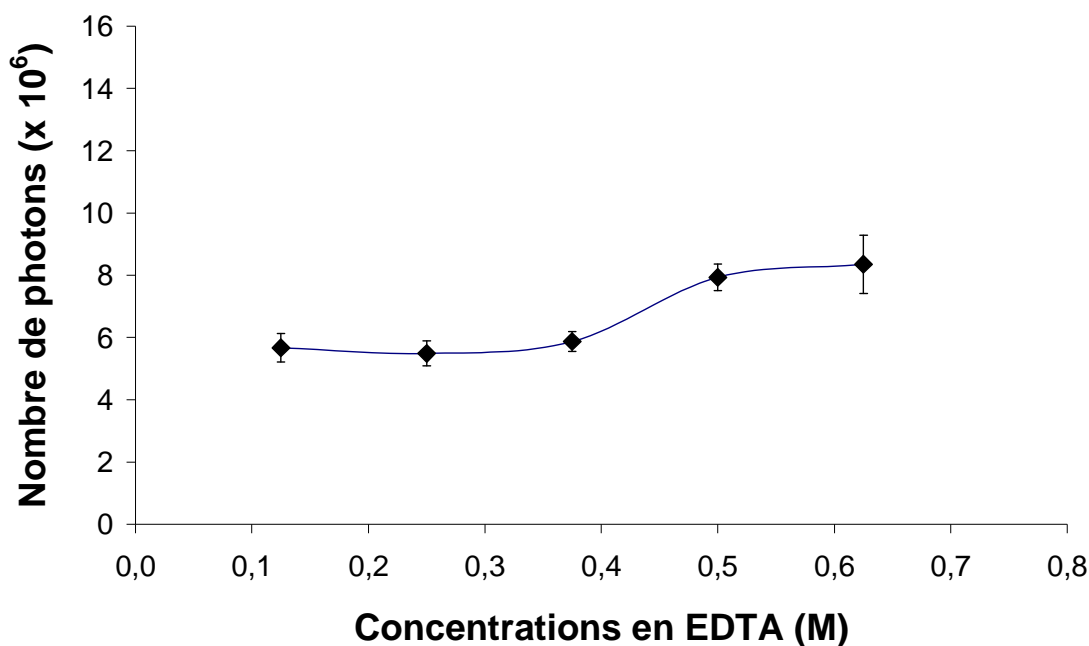


Figure 14 : Signal de chimiluminescence de l'hémine. Ce signal est obtenu par différence du signal d'un échantillon d'hémine à 6 nM par le signal d'un échantillon sans hémine.

Les résultats montrent que pour des concentrations croissantes d'EDTA, le signal ne diminue pas, excluant ainsi tout problème de compétition avec l'hémine et les porphyrines naturelles. Au contraire, la chimiluminescence augmente pour des concentrations d'EDTA supérieure ou égale à 0,5 M. Sachant que la molarité de l'eau de mer en NaCl est de 0,5 M, on pourrait expliquer cette augmentation par une complexation totale des ions calcium et magnésium, pour des concentrations d'EDTA de 0,5 M ou plus. Or, nous avons utilisé jusqu'à présent de l'EDTA à 0,25 M. Ce qui signifie que la complexation des cations est peut être incomplète. L'échantillon n'étant pas complètement débarrassé de ses cations possède alors une petite force ionique au moment de l'analyse. Or, une force ionique croissante favorise la polymérisation des porphyrines et donc favorise leur insolubilité, ce qui pourrait expliquer le plus faible signal. En pratique, lors de l'expérience, on a remarqué que les solutions d'EDTA à 0,5 M et à 0,675 M sont toutes deux saturées. Le choix de ne pas utiliser ces concentrations, en dépit d'un meilleur signal, a été fait pour éviter d'éventuels problèmes d'obstruction des tuyaux de FIA, avec des réactifs saturés en EDTA sous forme solide.

3.4. AMELIORATION DE LA SENSIBILITE DE LA METHODE

3.4.a. TEMPS DE MELANGE DES BOBINES

L'effet du temps de mélange entre le luminol et l'échantillon a été testé en utilisant différentes bobines de mélange (15 s, 20 s, 40 s). Ce test visant à augmenter la sensibilité de la méthode n'a pas montré de différence entre ces différents temps de mélange. Ce résultat est une information sur la réaction de chimiluminescence. Le fait que l'intensité de la réaction ne soit pas affectée par le temps de mélange (de 15 à 40 s), montre que les voies d'oxydation du luminol empruntées dans le système FePy-O₂-luminol ne sont pas les mêmes que celles du système Fe²⁺-O₂-luminol (**Rose and Waite, 2001**).

3.4.b. TEMPERATURE

L'influence de la température a également été testée en plaçant la bobine de mélange dans un bain thermostaté. Les signaux de chimiluminescence obtenus à température ambiante, à 30 °C et à 40 °C ne diffèrent pas. En revanche, à 50°C, les signaux sont 20 % plus élevés. Des températures supérieures à 50°C n'ont pas été testées par souci de sécurité, en vue d'une application en mer. Suite à ces tests, pour améliorer la sensibilité du signal, la bobine de mélange de 20 sec est dès lors plongée dans un bain-marie de 50°C. Dans ces conditions expérimentales, des ajouts dosés d'hémine entre 0 et 7,5 nM induisent une chimiluminescence répondant de manière linéaire ($y = 3,67 (\text{Fe-Py}) + 1,16$ avec $r^2 = 0,99$). La limite de détection de la méthode, correspondant à trois fois l'écart type du blanc (n=10), est de 0,11 nM.

3.5. VERIFICATION DE LA SPECIFICITE DE LA METHODE

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré jusqu'à présent que la chimiluminescence répond quantitativement aux ajouts d'hémine. Cette molécule d'hémine,

correspondant à une protoporphyrine IX complexée à l'ion Fe^{3+} , est utilisée comme un modèle, comme une FePy de référence.

On peut se demander si la méthode est vraiment spécifique de complexes type FePy, et si elle peut présenter une certaine sensibilité à d'autres métallo-porphyrines ou porphyrines libres, naturelles.

De ce fait, plusieurs types de composés porphyriniques, commercialement disponibles, ont donc été testés en FIA. On procède pour cela à des ajouts dosés des composés étudiés, avec des gammes de concentrations variables. Parmi ces composés figurent des porphyrines libres (protoporphyrine, mésoporphyrine, coproporphyrine), une magnésium-porphyrine (chlorophylle *a*), une cuivre-porphyrine (chlorophylline), une cobalt-porphyrine (vitamine B₁₂), et des fer-porphyrines (hémine, catalase, cytochrome *c*, peroxydase de raifort, myoglobine, hémoglobine). Le **tableau I** synthétise la série d'expériences menées pour chacune des molécules.

CENTRE METALLIQUE	NOM DU COMPLEXE	CONCENTRATIONS TESTEES (nM)	SIGNAL RELATIF AU SIGNAL D'HEMINE
-	Protoporphyrine IX	0 – 7,5	0,17 ± 0,04
-	Mésoporphyrine	0 – 7,5	0,05 ± 0,04
-	Coproporphyrine	0 – 7,5	0,05 ± 0,02
Mg	Chlorophylle <i>a</i>	0 – 7,5	0,01 ± 0,01
Cu	Chlorophylline	0 – 7,5	0,05 ± 0,04
Co	Vitamine B ₁₂	0 – 7,5	0,07 ± 0,02
Fe	Hémine	0 – 7,5	1
Fe	Catalase	0 – 7,5	1,54 ± 0,13
Fe	Cytochrome <i>c</i>	0 – 7,5	3,26 ± 0,44
Fe	Peroxydase de raifort	0 – 7,5	3,35 ± 0,44
Fe	Myoglobine	0 – 7,5	12,36 ± 1,61
Fe	Hémoglobine	0 – 7,5	15,07 ± 3,11

Tableau I : Comparaison du signal de chimiluminescence de différents composés porphyriniques à celui de l'hémine.

Les résultats mettent en évidence une faible chimiluminescence de la protoporphyrine IX ainsi que des chimiluminescences négligeables pour les autres porphyrines libres et pour les

Mg-, Cu-, Co-porphyrines. Seuls les composés de type FePy induisent une chimiluminescence supérieure à celle émise par l'hémine. La catalase, enzyme contenant 4 unités FePy, génère une chimiluminescence équivalente à celle de l'hémine. Le signal augmente d'un facteur 3 pour la peroxydase, contenant 1 unité FePy, et pour le cytochrome *c*, contenant 2 unités FePy. Les signaux 12 et 15 fois plus élevés sont obtenus respectivement avec la myoglobine (1 unité FePy) et avec l'hémoglobine (4 unités FePy). Cette intra-variabilité du signal au sein des FePy ne peut pas être expliquée directement, ni avec le nombre d'unités FePy contenues, ni avec le poids moléculaire de ces macro-molécules. Il est possible que cette variabilité découle de cinétique de chimiluminescence différente entre les FePy.

Le nombre de composés porphyriniques testés dans ce travail peut paraître limité. Or, les porphyrines testées ici sont les principales porphyrines susceptibles d'être retrouvées en milieu naturel, car toutes biosynthétisées par les organismes vivants (exception faite de la chlorophylline). Motsenbocker et ses collaborateurs ont également testés divers composés porphyriniques, d'origine synthétique, pour des tests de développement d'immuno-essais (Motsenbocker et al., 1993). Leurs résultats ont montré qu'une Mn-porphyrine synthétique pouvait produire un signal de chimiluminescence. Par conséquent, la méthode peut occasionnellement détecter d'autres complexes porphyriniques, autres que FePy. Cependant, la biosynthèse de Mn-porphyrines (*e.g.* Mn-péroxydase synthétisée par *Lactobacillus plantarum*) est moins répandue que la biosynthèse des FePy. Ainsi, les Mn-porphyrines sont très probablement beaucoup moins communes que les FePy dans les milieux naturels.

Lorsque les échantillons naturels sont analysés, la nature exacte des FePy contenues dans l'échantillon n'est pas connue avec exactitude. Il peut y avoir présence d'un mélange de différentes FePy, donnant une chimiluminescence différente lorsqu'elles sont chacune injectées séparément. De ce fait, la concentration en FePy déterminée par la méthode doit plutôt être interprétée comme une concentration d'espèces donnant un signal correspondant à une concentration similaire d'hémine. Les concentrations en FePy sont donc exprimées en « nM équivalent hémine ».

3.6. INTERFERENCES

Pour approfondir l'étude de la spécificité de la méthode, une série d'espèces inorganiques et organiques (autres que porphyrines ou assimilées) ont été testés. La plupart des espèces chimiques choisies ici sont connues pour réagir en chimiluminescence, mais dans

d'autres conditions expérimentales (Bowie et al., 1998; Klopff and Nieman, 1983). D'autres participent activement à la complexation du fer dans l'océan et/ou sont connues pour réagir avec les complexes FePy, telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec la catalase et la peroxydase (Tableau II).

INTERFERENTS POTENTIELS	CONCENTRATIONS (nM)	GAMME DE CONCENTRATIONS	MANIFOLD	SIGNAL RELATIF D'HEMINE
Co ²⁺	15 nM	0 – 3,5	2	0,9 ± 0,2
Cu ²⁺	20 nM	0 – 3,5	2	1,0 ± 0,2
Fe ³⁺	200 nM	0 – 3,75	2	1,1 ± 0,1
Fe ²⁺	100 nM	0 – 3,5	2	1,3 ± 0,2
H ₂ O ₂	160 nM	0 – 7	2	- 1,3 ± 0,1
	500 nM	0 – 7,5	2	1,2 ± 0,2
DFOB	10 nM	0 – 7,5	2	1,1 ± 0,1
Fe-DFOB	17 nM	0 – 3,5	2	1,1 ± 0,1
Acide humique	5 mg.L ⁻¹	0 – 4	1	- 1,1 ± 0,2
Acide phytique	220 nM	0 – 7,5	2	1,2 ± 0,2
	40 nM	0 – 7,5	2	1,0 ± 0,2

Tableau II : Interférents potentiels dans la détermination des FePy naturelles.

Les concentrations testées sont similaires ou supérieures aux concentrations naturelles dans l'eau de mer, et les résultats montrent l'absence d'interférences majeures. Aucune des espèces chimiques testées n'est donc capable de provoquer de la chimiluminescence supplémentaire à la chimiluminescence des FePy.

L'absence de certaines interférences peut s'expliquer. Dans le cas de H₂O₂, ceci peut s'expliquer par une rapide hydrolyse de l'intermédiaire L par les OH⁻ à pH 13. Le α-HHP ne peut donc pas se former et H₂O₂ présent ne peut participer à la réaction de chimiluminescence (voir **figure 10**). L'absence d'interférence par les ions Fe²⁺, Cu²⁺ et Co²⁺ résulterait de conditions de pH non-optimales, qui nécessiteraient d'être 3 unités en dessous du pH utilisé ici. De plus, la chimiluminescence produite par ces métaux est beaucoup plus rapide que celle induite par les FePy. Elle se produirait quelques secondes juste après le mélange de l'échantillon et du luminol (King et al., 1995; Klopff and Nieman, 1983), et disparaîtrait au moment de passer devant la cellule de lecture. Par ailleurs, la présence de H₂O₂ est nécessaire pour obtenir de la chimiluminescence de Fe³⁺ (Obata et al., 1993). Et les concentrations de

H₂O₂ dans les échantillons naturels sont bien inférieures aux concentrations typiquement utilisées dans les techniques de chimiluminescence pour le dosage des ions Fe³⁺ (0,1 M – 0,7 M) (de Jong et al., 1998; Obata et al., 1993). La présence d'EDTA pourrait également expliquer l'absence d'interférence des cations métalliques, car celui-ci complexe ces derniers les empêchant peut-être ainsi de réagir en chimiluminescence. Le DFOB (libre ou complexé), les acides humique et phytique, qui sont des ligands organiques du fer (Buffle et al., 1977; Witter et al., 2000a), ne sont pas rentrés en compétition (ou très peu) avec l'hémine pour la complexation du fer.

Finalement, pour réaliser une analyse des échantillons naturels, la meilleure démarche consiste à réaliser des ajouts dosés d'hémine pour chacun d'entre eux. La pente de calibration peut en effet varier d'un échantillon à l'autre, selon la différence de composition chimique de ces derniers.

3.7. STOCKAGE DES ECHANTILLONS

Une étude de stabilité des échantillons, conséquente à différentes conditions de stockage, a été réalisée avec de l'eau collectée dans le Rhône. Les deux modes de stockage utilisés sont les suivants : (i) le premier stockage consiste à filtrer immédiatement l'échantillon après prélèvement, puis le conserver congeler ou à température ambiante (ii) le deuxième stockage consiste à empoisonner le milieu avec du chlorure mercurique (HgCl₂) et de le conserver congeler ou à température ambiante.

La **figure 15** présente l'évolution de la concentration des complexes FePy en fonction du temps, lorsque les échantillons filtrés sont placés à température ambiante (**Figure 15 A**) ou congelés (**Figure 15 B**).

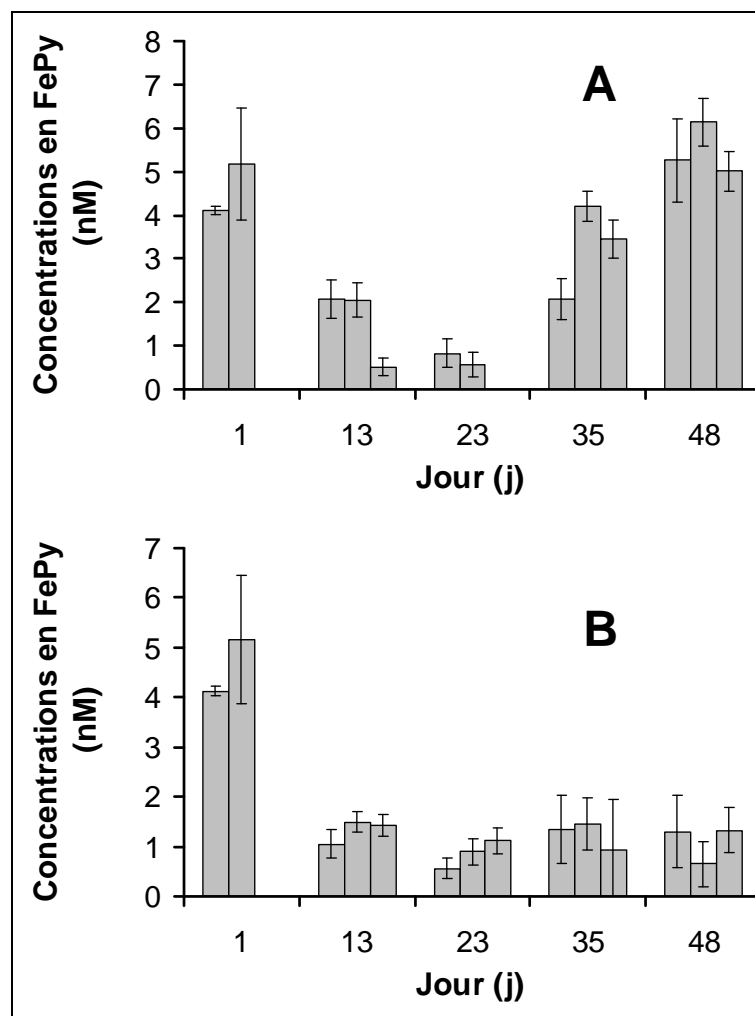


Figure 15 : Stabilité de la chimiluminescence des échantillons naturels (eau du Rhône) en fonction du temps, selon deux modes de stockage : (A) à température ambiante (B) après congélation.

A température ambiante, la concentration en FePy diminue pendant les 23 premiers jours puis augmente jusqu'au 48^{ième} jour. Il en est de même pour la concentration des échantillons congelés qui diminue pendant les 23 premiers jours mais reste constante par la suite. L'activité biologique (bactéries et virus) comme des processus abiotiques d'adsorption/désorption ou d'agrégation/désagrégation peuvent être à l'origine de ces fluctuations de concentrations. Mais en réalité, les raisons du changement de stabilité de l'échantillon restent floues.

L'idée d'améliorer le stockage avec un autre type de stockage repose sur un affranchissement de l'activité biologique et de la modification de la spéciation initiale dans les échantillons. La **figure 16** présente l'évolution de la concentration en FePy lorsque les

échantillons sont empoisonnés et placés : à température ambiante (**Figure 16 A**) ou congelés (**Figure 16 B**).

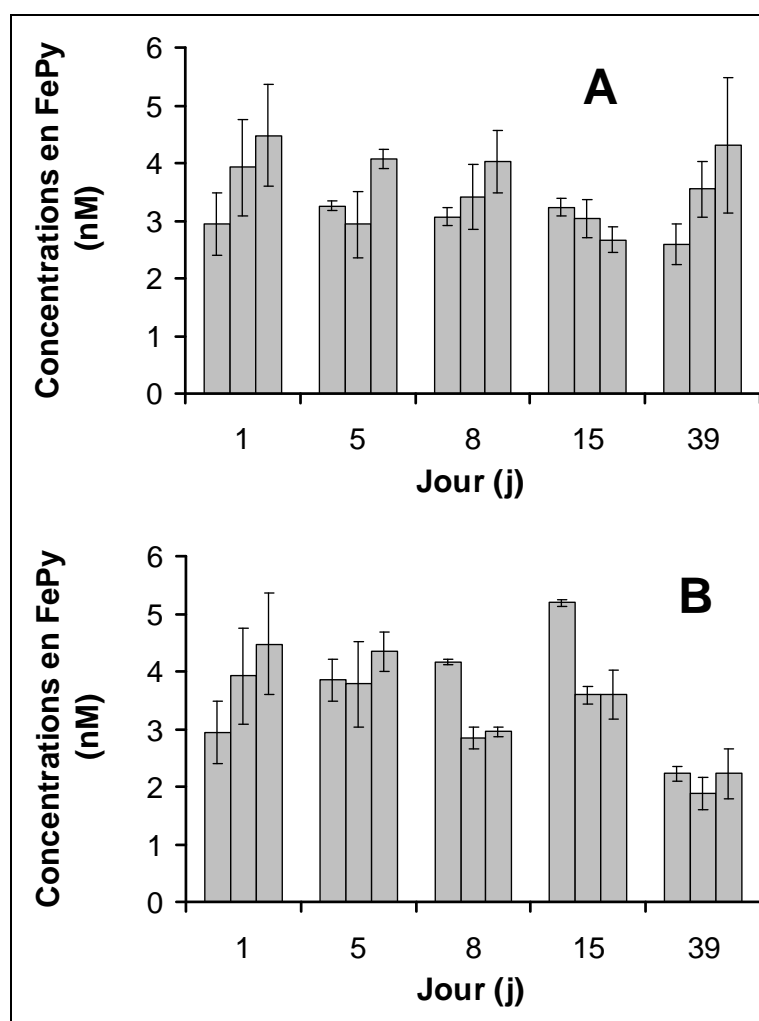


Figure 16 : Stabilité de la chimiluminescence des échantillons naturels (eau du Rhône) en fonction du temps. Les échantillons sont non filtrés et empoisonnés au $HgCl_2$. Deux modes de stockage sont testés: (A) à température ambiante (B) après congélation.

Les résultats montrent qu'en dépit d'une variabilité, la concentration de FePy reste quelque peu constante durant les 15 premiers jours, ceci quelque soit la température de stockage. A température ambiante, une légère diminution apparaît au bout de 39 jours, contrairement au cas où les échantillons sont congelés.

3.8. APPLICATIONS

3.8.a. DETERMINATION DANS DES CULTURES PHYTOPLANCTONIQUES

L'objectif de ces expériences est de démontrer que la présente méthode est capable de détecter des complexes FePy synthétisés par du phytoplancton. Deux expériences distinctes ont permis de déterminer par deux fois le contenu intracellulaire de complexes type FePy. Ces dernières sont de $1,0 \times 10^{-18}$ et de $5,0 \times 10^{-18}$ moles d'équivalent hémine par cellule de *Dunaliella tertiolecta*. La quantité exacte de ce type de complexes n'est pas connue avec exactitude. Simplement, le contenu intracellulaire en fer de cellules phytoplanctoniques se développant dans des conditions non-limitées en fer serait de l'ordre de 10^{-16} moles de fer par cellule (**Hudson and Morel, 1990**). Le tiers de ce contenu ($3,0 \times 10^{-17}$ moles par cellule) serait des protéines contenant du fer (**Raven, 1988**). En considérant que les fer-porphyrines ne sont qu'une fraction de ces fer-protéines, le résultat obtenu avec la présente méthode n'est pas aberrant compte tenu de ces informations. Dans le cas des bactéries, il existe plus précisément des mesures directes d'hémoprotéines (catalase et cytochrome *c*) qui ont été estimées entre 10^{-19} et 10^{-20} moles par cellule (**Ewetz and Thore, 1978; Miller and Vogelhut, 1978**), et les résultats obtenus ici tombent dans cette fourchette de concentrations. Plus récemment, une méthode spectrophotométrique de détermination de l'hème *b*, précédée par une séparation par HPLC, a permis d'estimer une concentration intracellulaire de 2,41 nM d'hème *b* pour une abondance de *Dunaliella tertiolecta* de 18×10^7 cellules par litre (**Gledhill, 2007**). En d'autres termes, le quota intracellulaire en hème *b* serait dans ce cas de $1,34 \times 10^{-17}$ mole hème *b* par cellule. Pour *Dunaliella tertiolecta* également, le quota trouvé ici ($1,0$ à $5,0 \times 10^{-18}$ moles d'équivalent hémine) n'est pas en désaccord avec cette estimation par spectrophotométrie, en considérant les conditions de cultures sans doutes différentes (éclairage, température) ainsi que des protocoles différents d'extraction des FePy. La FIA-CL développée est donc une méthode supplémentaire dans l'étude de la complexation organique du fer en milieu marin.

3.8.b. DETERMINATION EN MILIEU NATUREL

Son application en milieu naturel a été réalisée dans plusieurs types d'environnement, de salinités variables. Le **tableau III** récapitule les différentes analyses effectuées.

SITE D'ECHANTILLONNAGE	SALINITE	CONCENTRATIONS EN FePy (nM EQUIVALENT HEMINE)
Océan austral	33,8	sous la limite de détection
Guyane française	30-34	2,1 ± 0,4
Méditerranée (Calanque)	38	1,1 ± 0,1
Etang de Berre	22	11,5 ± 1,3
Rhône	0	9,2 ± 0,9

Tableau III : Concentrations naturelles en FePy dans différentes eaux naturelles.

Le FePy n'ont pas pu être détectées lors de la campagne océanographique KEOPS, ni dans les eaux de surface ni dans les eaux profondes de l'océan austral. La concentration en fer dissous (incluant toutes les formes dissoutes de fer organique et inorganique) n'excédait pas $0,09 \pm 0,04$ nM en surface et $0,35 \pm 0,16$ nM en profondeur (Blain et al., 2007). A supposer que les FePy aient été présentes dans les échantillons, elles n'auraient représenté qu'une fraction de ces dernières concentrations en fer dissous. Par conséquent, la concentration en FePy était inférieure à la limite de détection. Ce résultat suggère l'utilité de développer une phase de pré-concentration pour l'analyse d'échantillons provenant de l'océan du large. Cependant, pour l'analyse d'eau de mer côtière, les FePy ont pu être détectées avec une concentration de $2,1 \pm 0,4$ nM et de $1,1 \pm 0,1$ nM respectivement pour les eaux de mer de Guyane française et méditerranéenne. Pour des eaux plus saumâtres, la concentration est beaucoup plus élevée ($11,5 \pm 0,1$ nM), l'étang de Berre étant un environnement eutrophe. La méthode peut également être appliquée pour des eaux douces, avec une estimation de la concentration en FePy pouvant atteindre $9,2 \pm 0,9$ nM. Dans tous les cas, à condition que des blancs de même salinité que les échantillons soient réalisés, la détermination des complexes fer-porphyrines peut se faire dans tout type de milieu.

4. CONCLUSIONS

La méthode mise au point permet de donner les premières concentrations en FePy, de l'ordre du nanomolaire, dans les environnements aquatiques naturels. Aucune interférence majeure n'a été détectée. Applicable quasi-immédiatement après échantillonnage, la FIA-CL modifie peu la spéciation chimique du fer.

Son utilisation est relativement simple et l'appareillage utilisé est peu coûteux. Cette méthode complète donc les méthodes actuelles employées pour l'étude de la complexation organique du fer.

CHAPITRE III :

ETUDE D'UN MECANISME DE RELARGUAGE
DES FePy DANS L'EAU DE MER

LE BROUTAGE DU PHYTOPLANCTON
PAR LE ZOOPLANCTON

CHAPITRE III : Etude d'un mécanisme de relargage des FePy dans l'eau de mer

Le broutage du phytoplancton par le microzooplancton

1. INTRODUCTION	58
2. MATERIELS ET METHODES	59
2.1. CHOIX DES ESPECES	59
2.2. MILIEUX DE CULTURE	60
2.3. DENOMBREMENT CELLULAIRE	60
2.4. DOSAGE DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES	61
2.5. SUIVI DU PH	61
2.6. ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE	61
2.7. CONDITIONS ET PROTOCOLES D'EXPERIMENTATION	62
2.1.a. Expérience 1 : Expérience de broutage	62
2.1.b. Expérience 2 : Expérience de suivi de phytoplancton	63
2.1.c. Expérience 3 : Expérience des communautés bactériennes	65
2.1.d. Expérience 4 : Expérience de broutage	66
3. RESULTATS ET DISCUSSION	67
3.1. LE BROUTAGE DU PHYTOPLANCTON PAR LE MICROZOOPLANCTON PEUT-IL LIBERE LES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS L'EAU DE MER ?	67
3.2. EXISTE-T-IL UNE PRODUCTION DE COMPLEXES FePy DANS UNE CULTURE DE PHYTOPLANCTON ?	69
3.2.a. Résultats expérimentaux	69
3.2.b. Approche théorique	71
(i) Evolution de la croissance cellulaire	71
(ii) Evolution des complexes FePy	72

3.2.c. Application des modèles théoriques	74
(i) Les modèles sont-ils plausibles ?	74
(ii) Détermination des vitesses de production et de disparition	76
3.3. LES COMMUNAUTES BACTERIENNES PRODUISENT-ELLES DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES ?	80
3.4. COMMENT ELIMINER DE POSSIBLES INTERFERENCES AVEC LES RADICAUX SUPEROXYDES ?	82
3.4.a. Quelle stratégie choisir ?	82
3.4.b. Quelles sont les conditions d'utilisation des SOD ?	83
3.4.c. Comment tester ces enzymes dans nos conditions d'expérimentation ?	84
3.4.d. Test 1 : Comparaison des activités enzymatiques de la Zn-Cu-SOD et Mn-SOD dans de l'eau de mer artificielle, avec et sans H ₂ O ₂	85
3.4.e. Test 2 : Amélioration de la capacité de la Zn-Cu-SOD à éliminer les superoxydes	88
3.4.f. Test 3 : Augmentation de la production de superoxyde	89
3.4.g. Test 4 : Passage de l'eau de mer artificielle à l'eau de mer de culture	90
3.4.h. Quel est le protocole final adopté ?	92
3.4.i. Avec l'application de ce nouveau protocole, existe-t-il des interférences dans les cultures de phytoplancton ?	93
3.5. LE BROUTAGE PEUT-IL LIBERER DES FePy DANS L'EAU DE MER ?	94
3.5.a. Résultats expérimentaux	94
3.5.b. Approche théorique sur le relarguage de FePy	98
3.5.c. Application de l'approche théorique	99
4. CONCLUSION	103

1. INTRODUCTION

Actuellement, le rôle des porphyrines dans la complexation organique du fer dans l'océan n'est pas clairement démontré.

L'utilisation de méthodes électrochimiques en océanographie a cependant permis de suspecter ces molécules comme pouvant être des ligands naturels du fer dans l'eau de mer. Basée sur la détermination des constantes de complexation, les méthodes électrochimiques ont pu mettre en évidence deux catégories de ligands naturels : les ligands dits « forts » et « faibles ». Une de ces catégories de ligands (les « moins forts ») posséderait une affinité pour le fer similaire à celle de la protoporphyrine IX utilisée comme porphyrine modèle (**Rue and Bruland, 1995**). Plus récemment, une étude électrochimique a mis en évidence une production de ligands organiques du fer ferrique, associée à une consommation du phytoplancton par le zooplancton (**Sato et al., 2007**). Ces ligands possèderaient également la même constante de complexation pour le fer que la protoporphyrine IX (**Sato et al., 2007**).

L'apparition de nouvelles méthodes spécifiques à la détermination de complexes fer-porphyrines pourraient permettre de nous éclairer sur le rôle des porphyrines dans la complexation organique du fer (**Gledhill, 2007; Vong et al., 2007**). Des premiers quotas intracellulaires en fer-porphyrines ont pu être déterminés, d'une part par spectrophotométrie chez des cellules phytoplanctoniques et bactériennes (**Gledhill, 2007**), et d'autre part, par chimiluminescence chez des cellules phytoplanctoniques (**Vong et al., 2007**). La présence de fer-porphyrines directement dans l'eau de mer n'a pas pu être réalisée en raison des limites de détection des méthodes qui sont inférieures aux concentrations en fer dissous (1,5 nM pour la spectrophotométrie et 0,1 nM pour la chimiluminescence). Cependant, la présence de complexes fer-porphyrines dans les milieux riches en matière organique laisse penser que l'on pourrait également retrouver ces fer-porphyrines dans des environnements plus pauvres, ceci suite à divers processus conduisant à la lyse des cellules vivantes.

En milieu océanique, la lyse des cellules par infection virale ainsi que le broutage par le zooplancton pourraient être deux mécanismes de production des complexes fer-porphyrines (**Hutchins et al., 1999; Rue and Bruland, 1995**). La lyse virale peut être une source non négligeable en fer (**Gobler et al., 1997; Poorvin et al., 2004**). De même, le broutage par le zooplancton... Dans certains environnements, le broutage par le microzooplancton est la première source de mortalité du phytoplancton (**Calbet and Landry, 2004; Lessard, 1998**).

L'objectif du travail exposé ci-après est d'étudier sur la base d'un système phytoplancton-zooplancton modèle si le mécanisme de broutage peut conduire à un relargage significatif de FePy dans l'eau de mer.

2. MATERIELS ET METHIODES

2.1. CHOIX DES ESPECES

Les espèces cultivées pour les expériences de broutage sont *Dunaliella salina* (GENRE : *Dunaliella*, FAMILLE : *Polyblepharidaceae*, CLASSE : *Chlorophyceae*, GROUPE : *Ulvophyta*) et *Oxyrrhis marina* (GENRE : *Oxyrrhis*; FAMILLE : *Pronocitilucaceae*, ORDRE : Gymnodiniales; CLASSE : *Dinophyceae*). Ces deux espèces ont été gracieusement fournies par le LEMAR (Brest), avec la collaboration de Sabine Schultes et de Géraldine Sarthou. Des souches axéniques d'*Oxyrrhis marina* n'étant pas disponibles, la nécessité de travailler avec une souche phytoplanctonique axénique s'avère accessoire.

Bien que ces deux espèces ne comptent pas parmi les plus dominantes dans les communautés planctoniques naturelles en milieu océanique, il n'en reste pas moins qu'elles constituent des modèles de choix pour les expériences de broutage. Facilement cultivées, les espèces du genre *Dunaliella* sont relativement bien étudiées et de ce fait, les informations concernant leur biologie et physiologie sont plus nombreuses par rapport à celles concernant d'autres espèces phytoplanctoniques (Oren, 2005). Les *Dunaliella* sp. ont l'avantage de posséder une structure simple et sont dépourvues de frustule (pouvant poser quelques difficultés dans les expériences de lyse de cellules). Les cultures de *Dunaliella* sp. ne sont pas toxiques et les biomasses atteintes peuvent être relativement importantes, ce qui augmente ainsi les chances de détecter des composés aux concentrations traces. *Oxyrrhis marina* a été choisi parce que, de manières récurrentes, il semble que ce soit dans la littérature, le prédateur conjointement associé à *Dunaliella* sp.

2.2. MILIEUX DE CULTURE

Toutes les cultures sont maintenues dans une armoire à culture (SNIJDERS SCIENTIFIC, modèle *economic deluxe*), à 21 °C avec un cycle de luminosité de 12h :12 h et dont l'éclairement est de $160 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (8600 lux).

Dunaliella salina et *Oxyrrhis marina* sont cultivées sur des milieux f/2 modifiés (Guillard, 1975). Ces milieux correspondent à de l'eau de mer méditerranéenne filtrée à 0,2 μm (prélèvements réguliers à la station SOMLIT) et enrichie avec du NaNO_3 (75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), du NaH_2PO_4 (4,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), du $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), du $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (180 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), du $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), du $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), du $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6,3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), du $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (315 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), du Na_2EDTA (436 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), de la thiamine (2 nM), de la cyanocobalamine ou vitamine B₁₂ (0,1 nM) et de la biotine (300 nM). Les milieux de culture ont tous été autoclavés à 120 °C pendant 20 min, et la solution de vitamines, stérilisée par filtration à 0,2 μm n'a été rajoutée qu'après autoclavage.

Dans le cas des cultures des bactéries contenues dans la souche de *Dunaliella salina*, le milieu a également été enrichi en glucose (641 mM), solution également stérilisée par filtration sur 0,2 μm et rajoutée après autoclavage sous hotte à flux laminaire (STERIL-HELIOS).

2.3. DENOMBREMENT CELLULAIRE

Pour la majorité des expériences, les dénombrements ont été réalisés en microscopie. Les dénombrements d'*Oxyrrhis marina* et de *Dunaliella salina* ont été effectués par microscopie optique à lumière transmise, sur cellules de comptage de type « Malassez » ou « Neubauer », après fixation au lugol (5%). Les dénombrements bactériens ont été effectués par microscopie à épifluorescence, après fixation au formol (5%) et coloration au DAPI à $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (4',6-diamino-2-phenylindole, Sigma Aldrich D9542).

Seul le dénombrement bactérien dans l'expérience de suivi de phytoplancton (EXPERIENCE 2, présentée en page 63) a été réalisé par cytométrie en flux, en raison de la fréquence d'échantillonnage trop élevée et du nombre de paramètres à mesurer. Dans ce cas, les échantillons ont été fixés au paraformaldéhyde (PFA) puis stockés dans l'azote liquide, immédiatement après prélèvement.

2.4. DOSAGE DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES

Les échantillons sont centrifugés à 200 RCF (*Relative Centrifugative Force*) pendant 10 minutes après prélèvement, puis filtrés à l'obscurité sur 0,2 μm avant d'être analysés par FIA-CL (Vong et al., 2007). Toutes ces étapes, du prélèvement à l'analyse, se déroulent autant que possible à l'obscurité. Pour chaque échantillon analysé, des ajouts dosés (4 au minimum) sont réalisés, soit au moins 1 heure d'analyse pour un échantillon passé en FIA-CL. Autrement dit, pour 6 cultures avec six gammes d'ajouts dosés, le temps d'analyse en FIA-CL est de plus de 6 h.

Cependant, lorsque le temps d'analyse en FIA-CL excède le temps séparant deux prélèvements successifs pour une expérience de culture donnée, des ajouts dosés ne sont réalisés que pour un échantillon sur les trois réplicats. Ceci a été le cas pour les EXPERIENCES 2 et 3, avec le suivi du phytoplancton et des communautés bactériennes. Par conséquent, pour 9 cultures avec trois gammes d'ajouts dosés, le temps d'analyse est également de plus de 6 h.

2.5. SUIVI DU PH

Le pH a régulièrement été contrôlé au pHmètre (CONSORT C831) dans les expériences de suivi du phytoplancton (EXPERIENCE 2) et des cultures bactériennes (EXPERIENCE 3).

2.6. ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE

Réactifs – Le réactif A correspond, selon le test, à une solution d'eau de mer artificielle ou d'eau de mer de culture. Le réactif B est une solution d'EDTA à 10,7 mM (4,218 g.L⁻¹). Le réactif C est une solution de cytochrome *c* à 1,1 mM (soit du 13,62 mg.mL⁻¹). Il est stocké à 4°C pendant 2 semaines maximum ou à -20°C pendant 6 mois maximum. Le réactif D est une solution de xanthine (Sigma Aldrich, X7375) à 108 μM , préparée à partir d'une solution mère à 0,108 M (1,65 g pour 100 mL) et d'une solution fille à 0,108 mM. Une

solution de mélange réactionnel peut ensuite être préparée avec 23 mL d'eau milli-Q, 25 mL de réactif A, 1 mL de réactif B, 1 mL de réactif C, 50 mL de réactif D. Les solutions enzymatiques de xanthine oxydase (XO) à $0,05 \text{ U.mL}^{-1}$ (Sigma Aldrich, X4376), de Zn-Cu-SOD à 100 U.mL^{-1} (Sigma Aldrich, S2515) et de Mn-SOD à 100 U.mL^{-1} (Sigma Aldrich, S5639) sont préparées et conservées à 4°C et utilisées au moins une semaine après leur préparation. Les solutions stocks de peroxyde d'hydrogène (VWR, 31642) sont préparées avant chaque expérience à l'obscurité.

Procédure – 2,80 mL de mélange réactionnel sont placés dans une cuve en verre de 3 mL, tout en contrôlant une absorbance à 550 nm qui se stabilise à 25°C . 200 μl d'eau milli-Q sont ajoutés au mélange pour réaliser le blanc. Pour le test 1 (test de vérification de production d'ions superoxyde par le système X-XO dans l'eau de mer), 100 μL d'eau milli-Q et 100 μL de xanthine oxydase ($0,05 \text{ U.mL}^{-1}$) sont ajoutés au mélange réactionnel. Pour le test 2 (vérification de l'activité enzymatique de la Zn-SOD et Mn-SOD dans l'eau de mer), 100 μl de xanthine oxydase ($0,05 \text{ U.mL}^{-1}$) et 100 μl de superoxyde dismutase (100 U.mL^{-1}) sont ajoutés au mélange réactionnel. L'absorbance à 550 nm est suivie pendant 5 minutes pour le blanc, et les deux types de tests 1 et 2 (25°C , $\text{pH} = 8,2$).

2.7. CONDITIONS ET PROTOCOLES D'EXPERIMENTATION

2.7.a. EXPERIENCE 1 : EXPERIENCE DE BROUTAGE

La première partie de cette expérience s'est déroulée à Brest, avec la collaboration de Sabine Schultes et de Géraldine Sarthou. Des lots de trois flacons, contenant *Dunaliella salina* (lots témoins) ou contenant *Dunaliella salina* et *Oxhyrris marina* (lots « broutage »), ont été incubés à l'obscurité selon différents pas de temps (0 h ; 6 h ; 24 h). Les échantillons ont ensuite été filtrés sur $0,2 \mu\text{m}$, puis immédiatement congelés (**Figure 17**). Des comptages cellulaires réguliers ont été réalisés par microscopie à Brest. La deuxième partie correspondant aux analyses des complexes Fe-Py s'est effectuée sur Marseille, après un envoi des différents filtrats sous carboglace. Les échantillons ont été décongelés la veille de l'analyse, s'équilibrant ainsi durant une nuit. Pour l'analyse des complexes fer-porphyrines, un lot de trois flacons contenant seulement du milieu de culture (non figurés) a servi de blancs en FIA-CL.

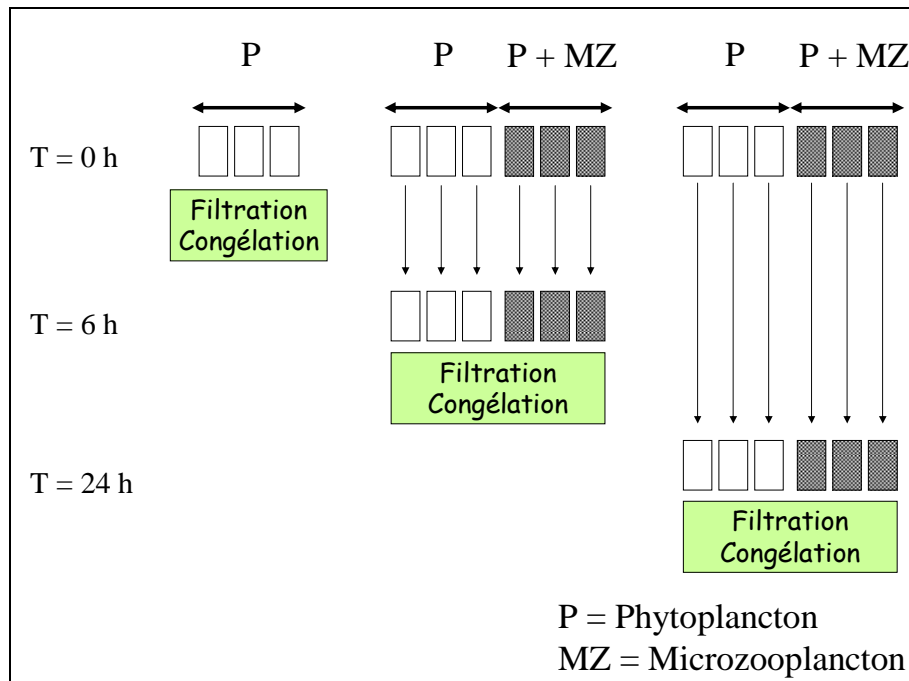


Figure 17 : Schématisation de la répartition des flacons lors de l'expérience de broutage.

2.7.b. EXPERIENCE 2 : EXPERIENCE DE SUIVI DU PHYTOPLANCTON

Dans cette expérience, 9 milieux stériles f/2 ont été répartis en trois lots (**Figure 18**) :

- un premier « lot témoin » de 3 milieux f/2 est suivi pendant 9 jours, avec un cycle d'éclairement 12h :12h,

- un second lot de 6 cultures,ensemencés avec *Dunaliella salina*, est suivi pendant 9 jours. Il est ensuite subdivisé en 2 lots de 3 cultures : le lot « phytoplancton-lumière », toujours éclairé en cycle 12h : 12h, et le lot « phytoplancton-obscurité » emballé dans de l'aluminium.

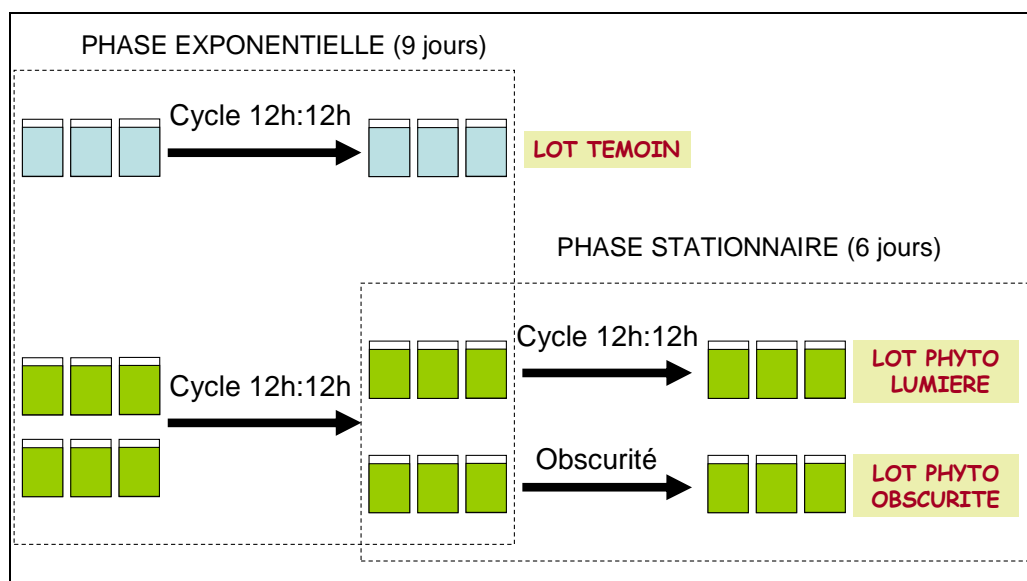


Figure 18 : Schématisation de la répartition des milieux de culture en trois lots.

Durant l'EXPERIENCE 2, toutes les cultures sont placées dans l'incubateur à 21°C, avec un système de bullage préalablement autoclavé avec les milieux de culture et permettant d'introduire continuellement de l'air filtré et stérile, pour une bonne homogénéisation et une amélioration du renouvellement gazeux dans les cultures.

Bien que la souche mère de *Dunaliella salina* ne soit pas axénique, les prélèvements sont toutefois réalisés en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire, avec pipettes de prélèvement stériles à usage unique. La figure 19 résume l'ensemble des paramètres suivis lors de cette expérience.

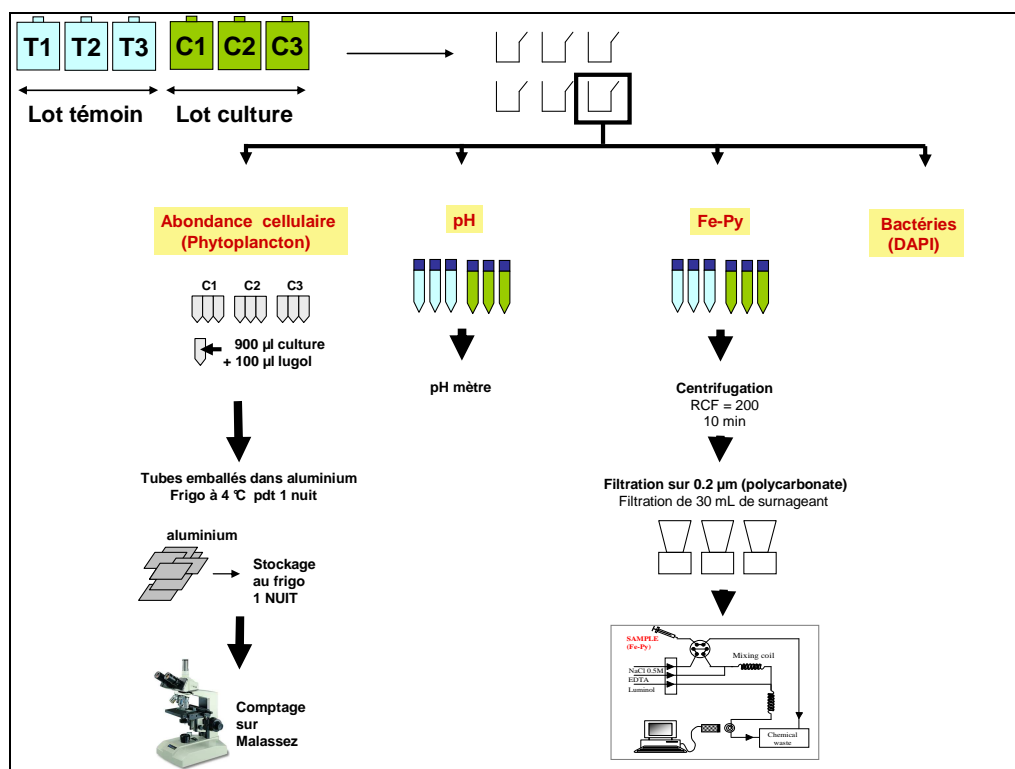


Figure 19 : Paramètres étudiés après prélèvement : dénombrements cellulaires, pH et FePy.

2.7.c. EXPERIENCE 3 : SUIVI DES COMMUNAUTES BACTERIENNES

L'isolement des bactéries s'est fait à partir de la culture de *Dunaliella salina*, par filtration différentielle avec une porosité de filtre de 0,6 µm. Les bactéries ainsi récoltées dans le filtrat ont ensuite été cultivées dans du milieu f/2 stérile enrichi en glucose. Deux pré-cultures successives ont été maintenues à l'obscurité, sous bullage à 21°C, pendant 1 semaine chacune, excluant ainsi la survie d'éventuelles cellules photo-autotrophes.

Pour l'EXPERIENCE 3, 6 milieux stériles sont maintenus dans l'incubateur à 21°C avec un système de bullage continu. Trois d'entre eux sontensemencés en bactéries à partir de la pré-culture, tandis que les trois autres constituent des témoins, dépourvus de bactéries et maintenus en conditions stériles. Les prélèvements ont lieu sous hotte à flux laminaire, avec pipettes stériles à usage unique.

2.7.d. EXPERIENCE 4 : EXPERIENCE DE BROUTAGE

L'EXPERIENCE 4 est subdivisée en deux expériences de broutage 1 et 2, correspondant respectivement à une consommation du phytoplancton par le microzooplancton, en phase exponentielle et en phase stationnaire. Elle se déroule en deux temps (**Figure 20**).

Tout d'abord, trois lots de 3 milieux f/2 sont ensemencés avec *Dunaliella salina* qui se développe sous un cycle lumineux de 12h : 12h. Au 4^{ème} jour, deux des lots sont placés à l'obscurité, le premier avec brouteur et le second sans brouteurs. C'est l'expérience de broutage 1. Le troisième lot reste pendant ce temps éclairé en cycle 12h : 12h.

Puis, au 10^{ème} jour, lorsque *Dunaliella salina* est en phase stationnaire, le troisième lot est subdivisé en deux lots, placés tous deux à l'obscurité, avec ou sans brouteurs. C'est l'expérience de broutage 2.

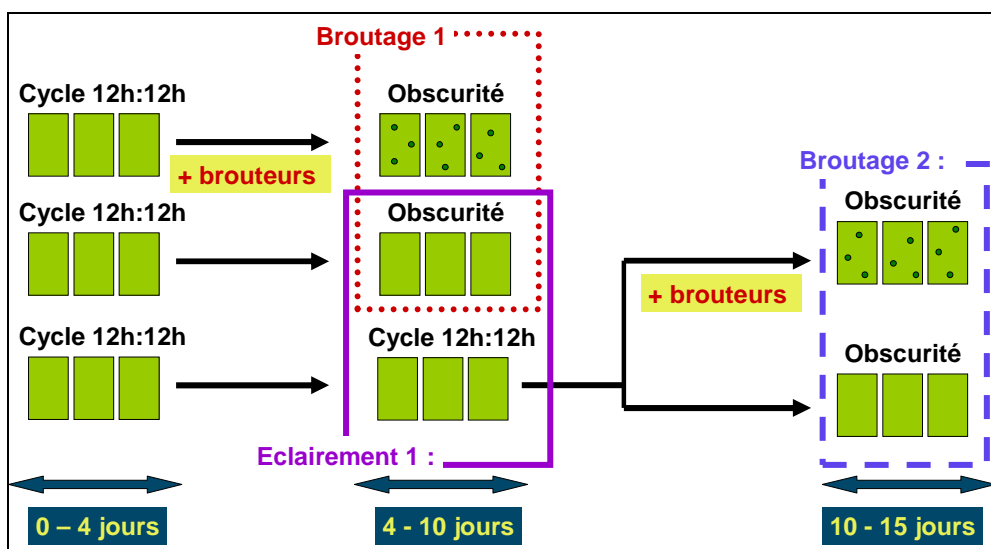


Figure 20 : Schématisation de la répartition des cultures en différents lots, pour l'expérience de broutage.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. LE BROUTAGE DU PHYTOPLANCTON PAR LE MICROZOOPLANCTON PEUT-IL LIBERER DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES DANS L'EAU DE MER ?

EXPERIENCE 1 :

L'objectif est de savoir si un relargage de complexes FePy peut résulter du broutage du phytoplancton par le microzooplancton. Pour cela, des cultures comportant uniquement le phytoplancton et des cultures comportant le phytoplancton avec le brouteur sont suivies pendant 24 h. Le protocole expérimental de cette expérience (EXPERIENCE 1) est présenté en page 62.

Le dénombrement des cellules aux différents pas de temps (**Tableau IV**) permet de vérifier d'une part, que la concentration cellulaire en phytoplancton reste constante dans le lot témoin et d'autre part, qu'il y a bien consommation du phytoplancton par le microzooplancton dans le lot broutage. En 24 h, 25 % du phytoplancton initial a été consommé par le microzooplancton, dans le lot broutage.

	T = 0h	T = 6 h	T = 24 h
<u>LOT TEMOIN :</u>			
<i>Dunaliella salina</i>	350 ± 25	340 ± 20	350 ± 23
<u>LOT BROUTAGE :</u>			
<i>Dunaliella salina</i>	320 ± 14	92 ± 15	1,5 ± 0,4
<i>Oxhyrris marina</i>	2,8 ± 0,4	2,24 ± 0,6	5,0 ± 0,4

Tableau IV : Concentrations cellulaires (10^6 cellules.L⁻¹) de chacune des espèces aux différents pas de temps.

Ces dénombrements cellulaires nous permettent par ailleurs de déterminer un taux de broutage du phytoplancton par le microzooplancton de **0,22 h⁻¹** et un taux de croissance du microzooplancton de **0,03 h⁻¹** (**Figure 21**).

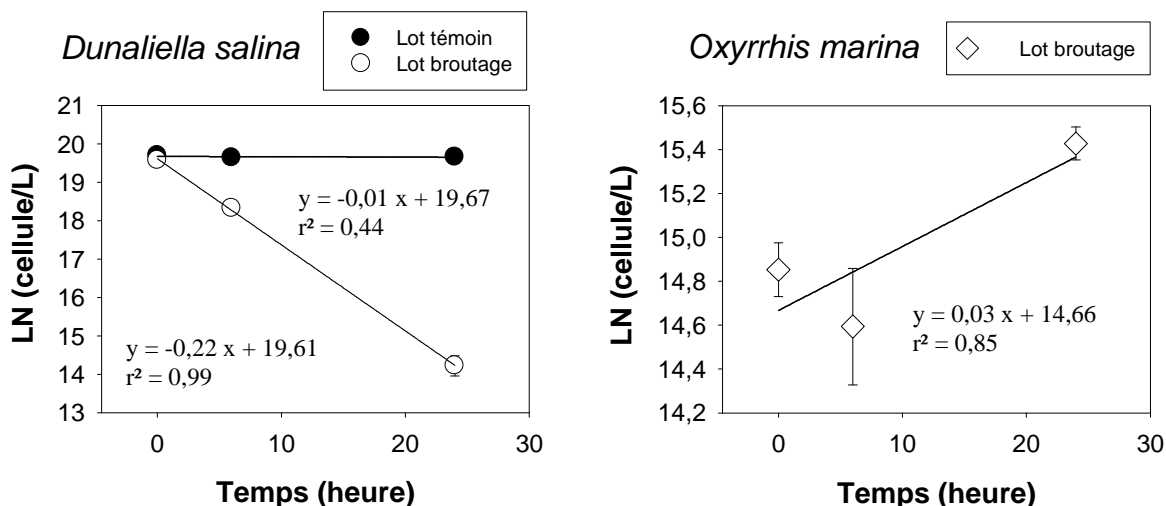


Figure 21: Evolution des concentrations cellulaires de phytoplancton (*Dunaliella salina*) et de microzooplancton (*Oxyrrhis marina*), dans les différents lots.

Parallèlement aux dénombrements cellulaires, nous avons réalisé un suivi des complexes FePy (**Figure 22**). Les résultats montrent que dans les lots témoins, ne contenant que le phytoplancton, il existe une apparition de FePy au bout de 24 h, suggérant une production de ces complexes par la culture de *Dunaliella salina*. L'introduction de brouteurs, dans le lot broutage, n'induit pas de façon significative de libération supplémentaire de FePy dans le milieu de culture. Cette expérience ne permet donc pas de considérer le broutage par le microzooplancton comme un processus source de FePy. En revanche, elle indique que la culture phytoplanctonique à elle seule pourrait être examinée comme une source potentielle de FePy.

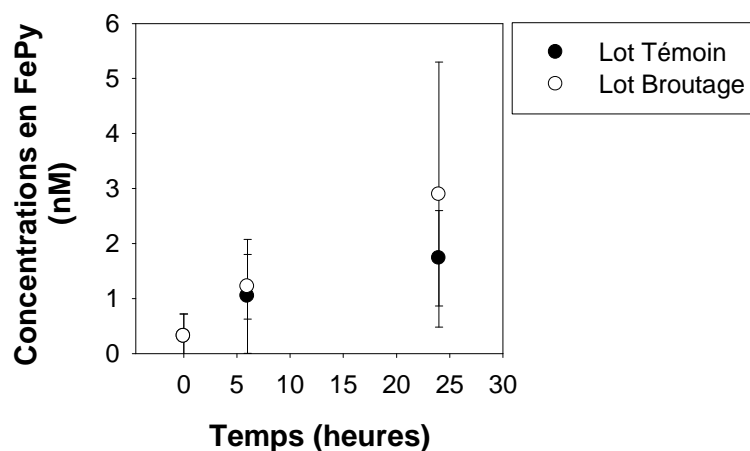


Figure 22 : Evolution des concentrations en fer-porphyrines dans les différents lots.

3.2. EXISTE-T-IL UNE PRODUCTION DE COMPLEXES FePy DANS UNE CULTURE DE PHYTOPLANCTON ?

A partir de l'expérience précédente, la nouvelle question qui se pose est de savoir si le phytoplancton est capable de produire des complexes fer-porphyrines dans le milieu.

3.2.a. RESULTATS EXPERIMENTAUX :

Une première expérience (non présentée) a permis tout d'abord de répondre qualitativement à cette question. Cette dernière consistait à suivre trois cultures non axéniques de phytoplancton pendant la durée de la phase exponentielle et de la phase stationnaire (3 autres cultures témoin, ne contenant que du milieu f/2 ont aussi été suivies). Les résultats (non présentés) ont permis de mettre en évidence une production temporaire de complexes FePy, qui s'est suivie par une disparition complète des complexes dans le milieu. Dans cette démarche préliminaire, ces résultats n'ont pas été exploités d'un point de vue quantitatif, sachant que la fréquence d'échantillonnage réalisée était de l'ordre d'un prélèvement tous les 3 jours. Cette étude a en revanche permis de définir une question supplémentaire au sujet de la disparition de ces complexes. Sachant que les FePy sont en effet sensibles à la lumière, l'idée qui s'ensuit est de savoir si le signal de chimiluminescence obtenu est lui aussi sensible à

l'éclairement lumineux.

L'expérience précédente a été renouvelée, avec une fréquence d'échantillonnage quasi-quotidienne. 9 cultures ont été suivies : 3 cultures témoins ne contenant que du milieu f/2 et 6 autres cultures contenant *Dunaliella salina*. Les 6 cultures de phytoplancton sont maintenues en cycle lumineux de 12h : 12h, puis sont séparées en deux lots après apparition des complexes FePy : le premier lot restant en cycle lumineux 12 h : 12 h, le second lot étant plongé dans une obscurité permanente. Le protocole d'expérimentation (voir EXPERIENCE 2) est présenté plus en détails en page 64.

Différents paramètres ont été suivis : concentrations cellulaires bactériennes (non présentées) et phytoplanctoniques et FePy. Les résultats obtenus, en accords avec ceux de l'expérience préliminaire, montrent que l'on peut discerner deux parties. La première est une phase de production des complexes FePy qui coïncide avec la phase de développement exponentiel des cellules phytoplanctoniques. La seconde est une phase de disparition des complexes qui débute dès lors que les cellules de *Dunaliella salina* rentrent en phase stationnaire (**Figure 23**). L'entrée en phase stationnaire des bactéries plus tardive que celle du phytoplancton coïncide moins bien avec l'arrêt de la production des FePy, suggérant une participation privilégiée du phytoplancton, par rapport aux bactéries, dans les concentrations en FePy mesurées. Le contrôle du pH tout au long de l'expérience n'augmente que d'une unité (passant de 8 à 9) dans le lot contenant *Dunaliella salina*. Cette augmentation de pH due à l'activité photosynthétique ne se produit que durant la phase de croissance.

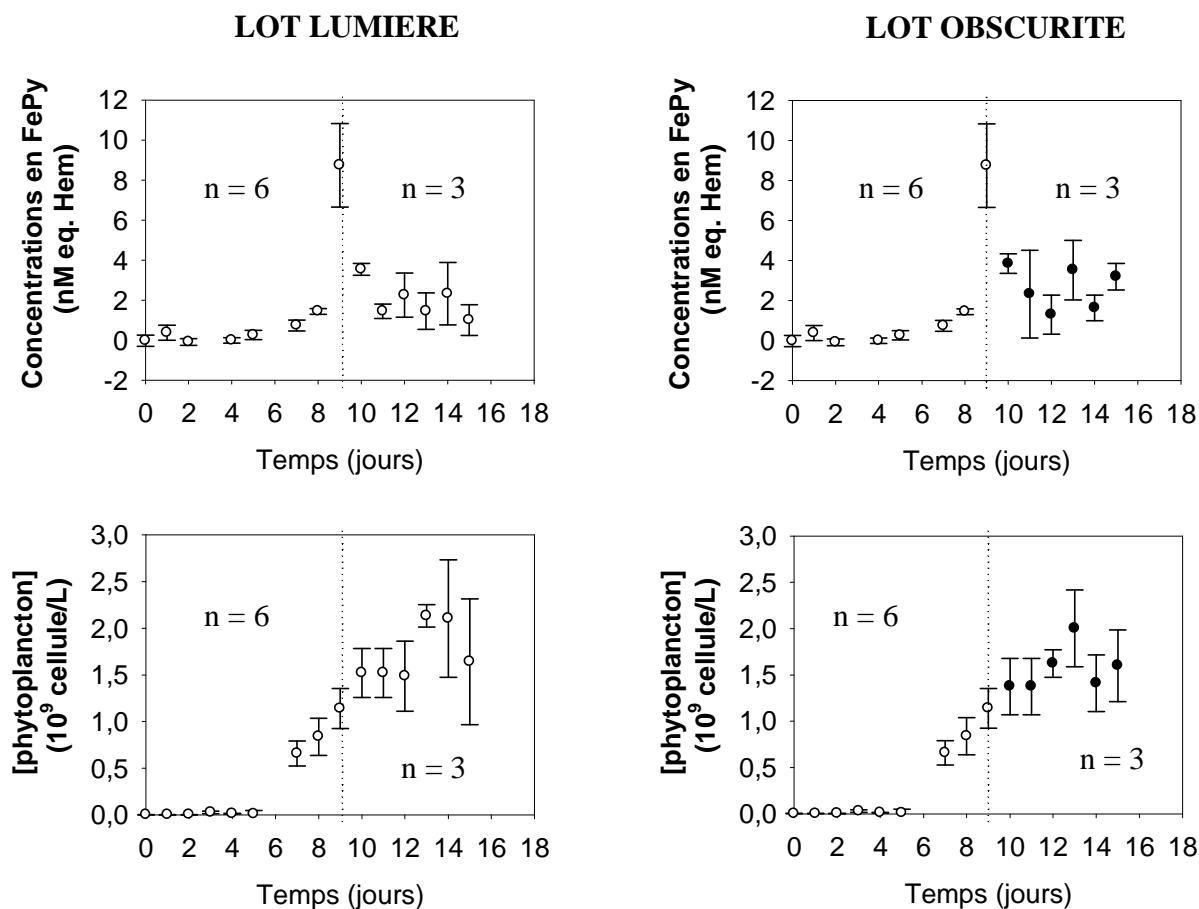


Figure 23 : Relation entre l'évolution des concentrations en FePy et le stade de croissance des cellules phytoplanctoniques. Les points clairs signifient que les cultures sont exposées à un cycle lumineux 12 h : 12 h. Les points noirs signifient que les cultures sont mises à l'obscurité (n = nombre de cultures).

3.2.b. APPROCHE THEORIQUE :

Dans cette approche, on cherche à caractériser l'évolution des différents paramètres expérimentaux mesurés. La croissance cellulaire est bien connue tandis que pour la production et la dégradation des FePy, aucun modèle n'a été établi jusqu'à présent.

(i) Evolution de la croissance cellulaire :

- Pendant la phase de production des FePy :

Parce que les cellules se multiplient par scissiparité, la croissance des organismes phytoplanctonique et bactérien obéit à une loi exponentielle du type :

$$N_t = N_o \exp (\mu t) \quad (1)$$

où :

- t = Temps (jour)
- Nt = Nombre de cellules au moment t
- No = Nombre initial de cellules
- μ = Taux de croissance des cellules (jour⁻¹)

Cette relation permet donc de déterminer des taux de croissance phytoplanctonique (μ_{PHYTO}) et bactérien (μ_{BACT}).

○ **Pendant la phase de disparition des FePy**

Pendant cette phase, les cellules phytoplanctoniques et bactériennes sont en phase stationnaire.

(ii) Evolution des complexes FePy

○ **Pendant la phase de production**

Dans le cas des FePy, on ignore à quel type de loi obéit la production des complexes. On ignore également si la production que l'on mesure correspond à une production réelle ou bien si elle correspond au résultat de processus de production et de disparition des complexes qui ont lieu simultanément. On fait alors l'hypothèse que, durant cette phase de production, tous les processus qui font disparaître les FePy du milieu, soient négligeables face aux processus qui les génèrent.

Pour caractériser la production des FePy, on peut considérer que l'augmentation de leurs concentrations dépend :

- du temps,
- de la quantité de cellules phytoplanctoniques présentes,
- et d'autres facteurs que l'on regroupe sous le terme d'une constante k_p.

La mise en équation de ces hypothèses est présentée ci-dessous :

$$d(FePy) = k_p \times N \times dt \quad (2)$$

$$d(FePy) = k_p \times No \times \exp(\mu t) \times dt \quad (1) + (2)$$

$$\int_{(FePy)_o}^{(FePy)_t} dFePy = \int_{t_o}^t k_p \times No \times \exp(\mu t) \times dt$$

$$(FePy)_t - (FePy)_{t_o} = k_p \times No \times \frac{\exp(\mu \times t)}{\mu} - k_p \times No \times \frac{\exp(\mu \times t_o)}{\mu}$$

Avec $(FePy)_{t_o} = 0$ et $t_o = 0$:

$$(FePy)_t = k_p \times No \times \frac{\exp(\mu \times t)}{\mu}$$

$$\ln(FePy)_t = \ln\left(\frac{k_p \times No}{\mu}\right) + \ln(\exp(\mu \times t))$$

$$\boxed{\ln(FePy)_t = \mu \times t + \ln \frac{k_p \times No}{\mu}} \quad (3)$$

Autrement dit, si la production de FePy est réellement caractérisée par l'équation (3), alors la représentation graphique de « ln FePy » en fonction du temps se présente sous forme d'une droite dont la pente est μ et dont l'ordonnée à l'origine est $\ln(k_p * No / \mu)$.

Ce dernier paramètre k_p est exprimé en nmoles FePy.L⁻¹.cellule⁻¹.jour⁻¹ et pourrait donc correspondre ici à une vitesse de relargage de FePy, que l'on suppose constante durant la phase de production.

○ Pendant la phase de disparition

De la même manière que pour la phase de production, le processus de disparition des FePy peut être mis en équation. Lors de cette phase, cette vitesse de disparition des complexes pourrait dépendre :

- du temps,
- de la quantité de FePy
- d'un certain nombre de paramètres regroupés sous le terme « k_D », où interviennent notamment les conditions lumineuses.

$$d(FePy) = -k_D (FePy) dt$$

$$\int_{(FePy)_o}^{(FePy)_t} \frac{dFePy}{FePy} = \int_{t_o}^t -k_D dt$$

$$\ln(FePy)_t - \ln(FePy)_{t_o} = -k_D t + k_D t_o$$

$$\boxed{\ln(FePy)_t = -k_D t + \ln(FePy)_{t_o}} \quad (4)$$

Si l'expression est vérifiée, cela signifie que la représentation graphique du « $\ln FePy$ » en fonction du temps est sous forme de droite dont la pente est $-k_D$, exprimée en jour^{-1} .

On définit « $T_{1/2}$ » le temps pour lequel la moitié des FePy a disparu :

$$(FePy)_{t_{1/2}} = \frac{(FePy)_{t_o}}{2} \quad (5)$$

$$\ln(FePy)_{t_{1/2}} = -k_D t_{1/2} + \ln(FePy)_{t_o} \quad (4) + (5)$$

$$\frac{\ln(FePy)_{t_o}}{2} = -k_D t_{1/2} + \ln(FePy)_{t_o}$$

$$\boxed{t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_D}} \quad (6)$$

3.2.c. APPLICATION DES MODELES THEORIQUES :

(i) Les modèles sont-ils plausibles ?

Les représentations des logarithmes des concentrations cellulaires et de la chlorophylle *a* en fonction du temps (non présentés) permettent de déterminer les taux de croissance des organismes cultivés. La représentation du logarithme de la concentration en FePy en fonction du temps est présentée en **figure 24**.

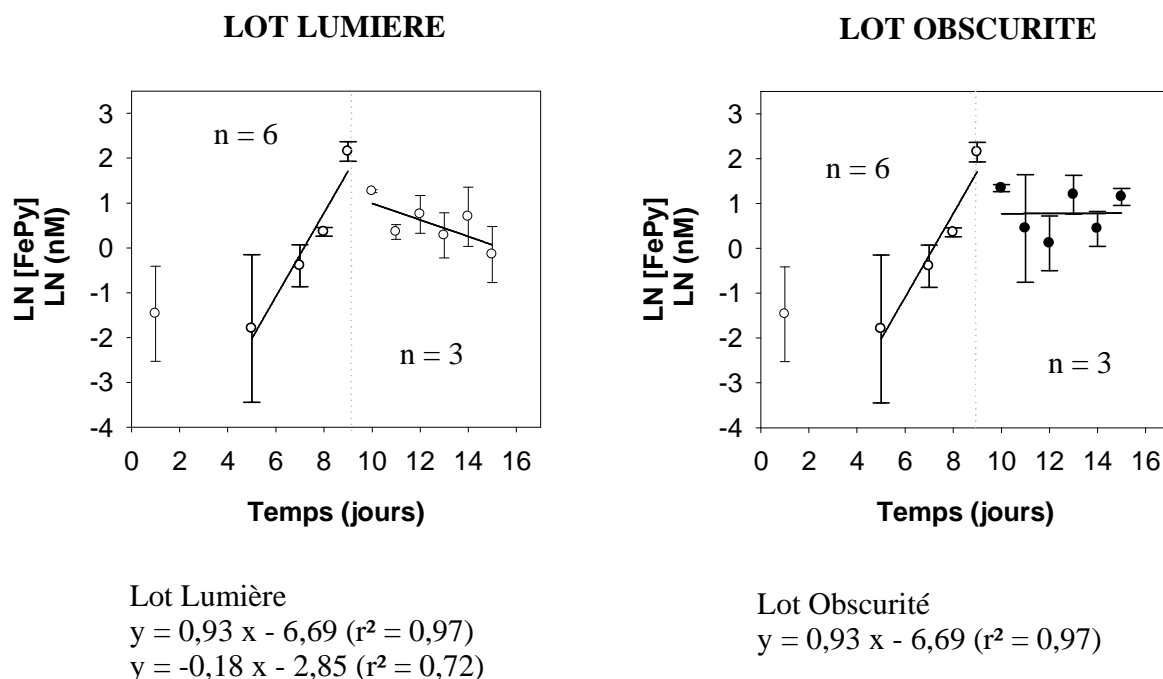


Figure 24 : Evolution des concentrations en FePy (échelle logarithmique) dans les différents lots. Les points clairs signifient que les cultures sont exposées à un cycle lumineux 12h/12h. Les points noirs signifient que les cultures sont mises à l'obscurité. (*n* = nombre de cultures).

Les FePy ne sont détectées véritablement qu'à partir du 5^{ème} jour (exception faite au 1^{er} jour). Les résultats montrent que la phase de production débutant du 5^{ème} jusqu'au 9^{ème} jour, semble répondre à une loi exponentielle ($r^2 = 0,97$). En revanche, la disparition des complexes FePy est plus difficile à caractériser : elle s'apparente relativement bien à une décroissance de type exponentielle lorsque les cultures restent en cycle lumineux 12h : 12h ($r^2 = 0,72$), mais elle devient difficilement interprétable lorsque les cultures sont constamment maintenues à l'obscurité (La variabilité est relativement importante et la pente de la droite passant entre les données obtenues pour l'obscurité n'est pas significativement différente de 0).

Il existe en effet une grande variabilité des mesures durant cette deuxième phase.

Lorsque l'on s'intéresse à la représentation de « Ln FePy » en fonction du temps (voir **figure 24**), la pente de la droite de régression linéaire « P_e FePy » est de $0,9 \pm 0,2 \text{ j}^{-1}$. Cette pente correspond bien au taux de croissance du phytoplancton « μ_{PHYTO} » de $0,9 \pm 0,1 \text{ j}^{-1}$. Par conséquent, l'équation (3) est vérifiée.

(ii) Détermination des vitesses de production et de disparition

Le **tableau V** présente l'ensemble des paramètres expérimentaux à partir desquels il est possible de déduire les vitesses de production (k_p) et de disparition des FePy (k_D), selon les conditions lumineuses.

(Lumière)		
PHASE DE PRODUCTION (n=6)		
<u>Concentrations cellulaires :</u>		
No	$1,53 \pm 0,53 \times 10^6$	
μ_{PHYTO}	$0,9 \pm 0,1 \text{ (} r^2=0,97 \text{)}$	
μ_{BACT}	$0,8 \pm 0,2 \text{ (} r^2=0,95 \text{)}$	
<u>Complexes FePy :</u>		
P_e FePy	$0,9 \pm 0,2 \text{ (} r^2=0,97 \text{)}$	
$\text{Ln}(k_p \text{No} / \mu_{\text{PHYTO}})$	$-6,7 \pm 1,3 \text{ (} r^2=0,97 \text{)}$	
D'où : k_p	$1,8 \times 10^{-18}$	
(Lumière) (Obscurité)		
PHASE DE DISPARITION (n=3)		
<u>Complexes FePy :</u>		
P_e FePy (= k_D)	$-0,2 \pm 0,1 \text{ (} r^2=0,72 \text{)}$	$-0,0 \pm 0,2 \text{ (} r^2=0,01 \text{)}$
n	= Nombre de cultures	
No	= Concentrations initiales en phytoplancton (cellules/L)	
μ_{PHYTO}	= Taux de croissance du phytoplancton (jour^{-1})	
μ_{BACT}	= Taux de croissance bactérien (jour^{-1})	
P_e FePy	= Pente de la droite de régression linéaire lorsque l'on représente le logarithme des concentrations en FePy en fonction du temps (jour^{-1})	
k_p	= Vitesse de production (moles FePy /L /cellule / jour)	
k_D	= Vitesse de disparition (moles FePy /L /cellule / jour)	

Tableau V : Récapitulatif des différents paramètres extraits du suivi des FePy et des concentrations cellulaires pendant les phases de production et de disparition des complexes en FePy.

○ **Pendant la phase de production des FePy**

Les porphyrines sont souvent envisagées comme des ligands provenant de la dégradation cellulaire des organismes (phytoplancton et bactéries) (**Hutchins and Bruland, 1994**). En partant de cette hypothèse, l'apparition des fer-porphyrines lors de la phase active de croissance du phytoplancton pose certaines questions.

D'un point de vue qualitatif, quel(s) rôle(s) peuvent donc avoir ces complexes, dont la biosynthèse est relativement coûteuse, pour être ainsi secrétés dans l'eau de mer par le phytoplancton ?

D'un point de vue quantitatif, est-ce que cette production de FePy peut être considérée comme réaliste, en considérant le contenu intracellulaire en FePy d'une cellule phytoplanctonique ?

→ Aspect qualitatif de la production de FePy :

D'après quelques études menées hors du domaine marin, il semble que quelques organismes soient capables de sécréter dans le milieu extérieur des complexes type FePy. En effet, en milieu terrestre, moins dispersif que le milieu marin, des basidiomycètes sont capables de sécréter des peroxydases extracellulaires pour dégrader des composés organiques tel que la lignine (**Gold and Alic, 1993**). Des procaryotes, plus exactement des bactéries *gram* négatives vivant dans des environnements gastriques, ont la capacité de sécréter des enzymes extracellulaires de type catalase (**Mori et al., 1997**). Par conséquent, d'un point de vue qualitatif, la production extracellulaire de FePy dans le milieu extérieur paraît tout à fait plausible car il semble que les FePy puissent assurer certaines activités enzymatiques extracellulaires.

→ Aspect quantitatif de la production de FePy :

Quelle quantité de FePy les cellules peuvent-elles produire pendant leur durée de vie ?

Le temps de vie d'une cellule de *Dunaliella salina* est de 18,5 heures ($= \ln 2 / \mu_{\text{PHYTO}}$). Pendant cette durée de vie, une cellule possède une vitesse de production k_p de $1,8 \times 10^{-18}$ moles FePy.L⁻¹.cellule⁻¹.jour⁻¹. Pendant sa durée de vie (18,5 h), une cellule pourrait produire **$1,39 \times 10^{-18}$ mole FePy.L⁻¹.cellule⁻¹**.

A la fin de la phase de production de FePy, la concentration phytoplanctonique est de $1,14 \times 10^9$ cellules.L⁻¹. Par conséquent, la production de FePy extracellulaires par l'ensemble de ces cellules (pendant 18,5 h) est de : $1,58 \times 10^9$ mole FePy.L⁻¹ ($=1,14 \times 10^9 \times 1,39 \times 10^{-18}$).

Cette production extracellulaire en FePy est-elle plausible ?

Le contenu intracellulaire d'une cellule de *Dunaliella tertiolecta* est compris entre 1×10^{-18} et 5×10^{-18} moles de FePy.cellule⁻¹. On fait l'hypothèse que le contenu intracellulaire de *Dunaliella salina* est le même que celui de *Dunaliella tertiolecta*.

Pour une même concentration de cellules ($1,14 \times 10^9$ cellules.L⁻¹), la quantité de FePy intracellulaire obtenue à la fin de la phase de production est donc comprise entre : $1,14 \times 10^9$ et $5,69 \times 10^9$ moles de FePy.L⁻¹. Cela signifie que la part de FePy extracellulaire produite par rapport aux FePy intracellulaire pourrait être comprise entre **30 %** ($1,58 \times 10^9/5,69 \times 10^9$) et **140 %** ($1,58 \times 10^9/1,14 \times 10^9$). Autrement dit, 30 à 140 % des FePy intracellulaires pourraient être produites et libérées dans l'eau de mer.

Ce résultat est peu plausible. Il semble peu probable qu'une cellule phytoplanctonique secrète le tiers (au moins) de son contenu intracellulaire pour assurer des activités enzymatiques extracellulaires. Et une production extracellulaire en FePy excédant le contenu intracellulaire d'une cellule est irréaliste.

Ces conclusions posent donc un doute sur la nature exacte du signal de chimiluminescence mesuré au cours de la croissance de *Dunaliella salina*.

En effet, elles peuvent d'une part suggérer que le signal que nous avons mesuré lors de la phase de croissance du phytoplancton ne corresponde pas totalement à des complexes FePy. Il est possible que d'autres espèces puissent être mesurées, « à la place » ou « en plus » des FePy. Si tel est le cas, alors ces dernières seraient produites uniquement lors de la phase exponentielle de croissance du phytoplancton.

Des études ont montré que le phytoplancton était capable de produire des radicaux superoxyde, ceci lors de sa phase exponentielle de croissance (Marshall et al., 2005a; Marshall et al., 2005b). Ces radicaux superoxyde sont en particulier produits durant la période de forte activité photosynthétique (Bowler et al., 1992), et ils seraient donc peu liés à la croissance des bactéries présentes dans les cultures. Ces radicaux superoxyde sont connus pour réagir dans l'oxydation du luminol et générer ainsi de la chimiluminescence (Merényi et al., 1990; Rose and Waite, 2001). Il faudrait donc s'assurer que l'on ne mesure pas ici ces

superoxydes, lors des expériences de suivi de croissance du phytoplancton, mais également dans les expériences de broutage. Cette incertitude est donc testée par la suite. Un protocole d'élimination des anions superoxyde sera établi par la suite.

Hormis un possible problème méthodologique, la production excessive de FePy suggère, d'autre part, l'existence possible d'une source supplémentaire en FePy. Il est possible que les bactéries produisent un signal de chimiluminescence, en produisant des FePy et/ou en produisant une espèce interférente. Cette piste va être testée par la suite, avec le suivi des communautés bactériennes.

○ Pendant la phase de disparition des FePy

D'après le **tableau V**, en conditions lumineuses de 12 h : 12 h, $T_{1/2}$ est de 3,5 jours. Autrement dit, les FePy produites dans le milieu pourraient avoir un temps de résidence suffisamment long pour pouvoir être consommées par des organismes, dans le cas où elles pourraient être une source en fer pour ces derniers.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la décroissance du signal de chimiluminescence :

(1) un arrêt ou une diminution de la production devenant alors minoritaire face à des processus de dégradation physico-chimique des molécules de FePy tels que : (a) une photosensibilité (b) une faible solubilité des FePy qui peut se traduire par une agrégation des complexes et/ou par leur adsorption sur de la matière organique détritique et/ou vivante, dissoute et/ou particulaire...

(2) une consommation des FePy en tant que source de fer par les organismes, bactériens et/ou phytoplanctoniques, entrant tous deux en phase stationnaire et faisant intervenir un métabolisme secondaire. Certains travaux ont démontré que certaines bactéries, les *gram* négatives surtout, sont tout à fait capables d'assimiler le fer à partir de l'hème (**Wandersman and Delepelaire, 2004; Wandersman and Stojiljkovic, 2000**).

Avec l'expérience menée, l'effet de l'éclairement lumineux n'est pas clair ici, en raison de la grande variabilité du signal. Il est difficile de dire si l'obscurité améliore vraiment la stabilité des FePy. Autrement dit, nous ne savons pas si le facteur « lumière » peut contrôler la dégradation des complexes.

BILAN DE L'EXPERIENCE 2 :

Cette expérience de suivi de phytoplancton a donc permis de mettre en évidence une production apparente et temporaire en FePy. Cette production est apparemment associée au développement exponentiel des cellules phytoplanctoniques mais semble excessive compte tenu de la quantité de FePy contenue dans les cellules de phytoplancton.

Deux études complémentaires sont donc menées :

- une production par les communautés bactériennes,
- des interférences possibles avec les ions superoxydes.

Pour savoir si la lumière peut intervenir dans la dégradation des FePy, un autre test de sensibilité des FePy à différentes conditions lumineuses sera mené par la suite.

3.3. LES COMMUNAUTES BACTERIENNES PRODUISENT-ELLES DES COMPLEXES FER-PORPHYRINES ?

L'expérience précédente a permis de mettre en évidence une production temporaire de FePy dans une culture de phytoplancton non axénique. Pour vérifier si cette production est bien issue de *Dunaliella salina*, on isole les bactéries contaminantes de la culture afin de vérifier si ces dernières peuvent produire ou non des FePy. Pour cela, on réalise un suivi de 6 cultures : 3 contenant des bactéries contaminantes et 3 autres témoins ne contenant que du milieu f/2 stérile (voir le protocole de l'EXPERIENCE 3 présentée en page 65).

Le taux de croissance bactérien est de $3,4 \times 10^{-2} \text{ jour}^{-1}$ (soit $0,14 \text{ h}^{-1}$). A partir du 6^{ième} jour les comptages bactériens deviennent difficilement réalisables et donc peu fiables. En effet, à compter d'une certaine densité, les bactéries forment des agrégats qu'il est difficile de déstructurer, même par vortex, conduisant ainsi à une sous-estimation de la concentration réelle en bactéries. Ce taux de croissance est environ 20 fois inférieur à celui obtenu pour des bactéries en présentes dans une culture de phytoplancton ($0,8 \text{ jour}^{-1}$, page 76). Ceci peut s'expliquer par le fait que les bactéries présentes dans la culture de phytoplancton se développent mieux en présence de composés organiques excrétés par le phytoplancton qui

constituent sans doute une meilleure source que le glucose ajouté dans le milieu de culture.

Avec les observations au microscope à épi-fluorescence, les assemblages bactériens initiaux semblent similaires, puis diffèrent progressivement conduisant ainsi à des assemblages bactériens finaux différents d'une culture à l'autre. Sur simple observation par critère de taille et de forme, il semble qu'il y ait au moins 3 ou 4 «espèces».

L'analyse des complexes fer-porphyrines montre qu'il ne semble pas y avoir de production spécifique de fer-porphyrines par les bactéries, que ce soit en phase exponentielle ou stationnaire (**Figure 25**). Au delà de ces 6 jours d'analyse, rien n'exclut cependant une apparition de fer-porphyrines, suite à une mortalité naturelle des cellules (lyse virale, sénescence...).

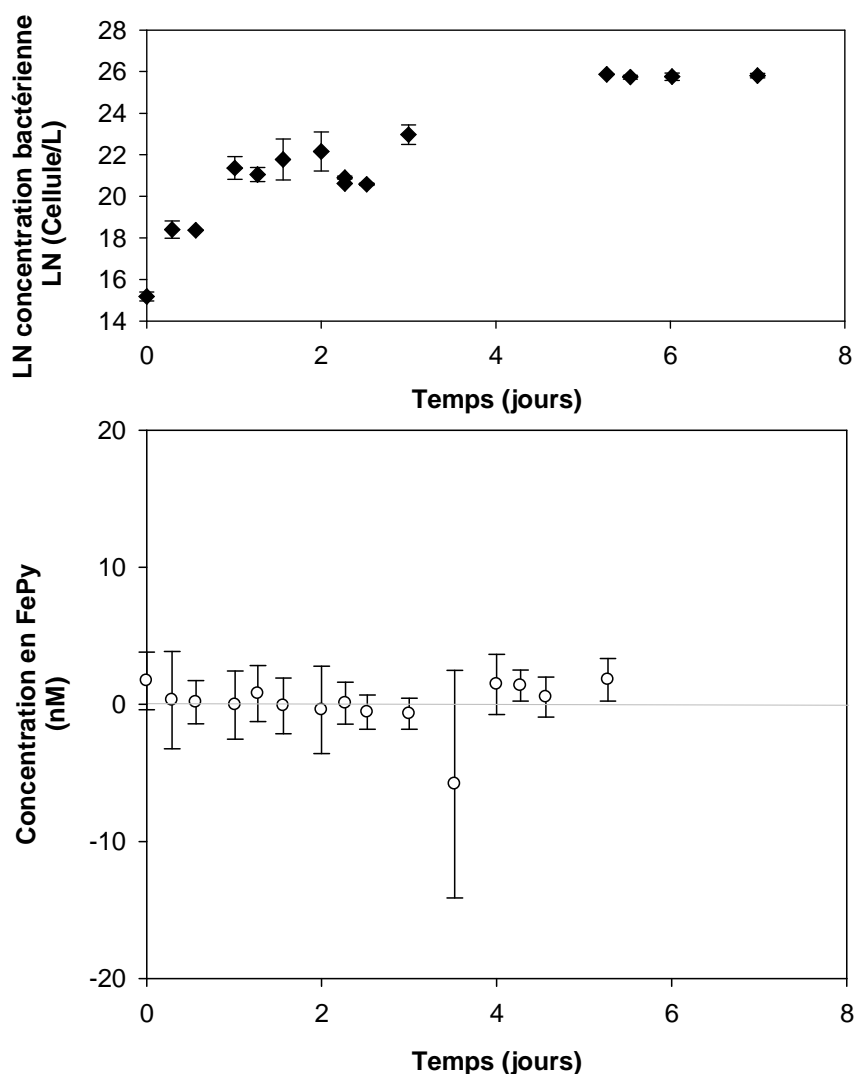


Figure 25 : Evolution des FePy en fonction du développement bactérien.

Cette analyse dissipe donc le doute de l'EXPERIENCE 2. Elle permet en effet d'affirmer que la production temporaire de FePy observée était bien due aux cellules de *Dunaliella salina*. Et s'il existe une production bactérienne, même faible, elle reste inférieure à 4 nM et n'explique pas les concentrations obtenues en FePy, lors de l'expérience précédente.

L'hypothèse d'une production bactérienne étant maintenant écartée, il reste à tester l'hypothèse d'une éventuelle interférence, notamment par les radicaux superoxyde.

3.4. COMMENT ELIMINER DE POSSIBLES INTERFERENCES AVEC LES RADICAUX SUPEROXYDES ?

La production de radicaux superoxyde a été mise en évidence chez plusieurs espèces phytoplanctoniques, mais a été considérée comme non remarquable dans le cas de culture de *Dunaliella tertiolecta* (Marshall et al., 2005a). Bien que *Dunaliella salina* soit très proche de *Dunaliella tertiolecta*, la production de superoxydes considérée comme « non significative » avec la méthode utilisée par (Marshall et al., 2005a) pourrait l'être dans les conditions de la FIA-CL. Ainsi, pour lever le doute, un protocole d'élimination des superoxydes est établi afin d'être sûr de ne mesurer que les complexes FePy.

3.4.a. QUELLE STRATEGIE CHOISIR ?

Pour éliminer les radicaux superoxyde, il existe une variété de molécules, recensées dans la littérature, étant plus ou moins efficaces selon les cas. Parmi elles, figurent les acides fulvique et ascorbique (Nandi and Chatterjee, 1987), cependant inadaptés dans notre étude car tous deux capables de chélater le fer et de perturber ainsi sa spéciation chimique. Parmi elles, figurent également la glutathione (Hussain et al., 1996), l' α -tocopherol (vitamines C et E) (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999) et l'hémoglobine (Asoke et al., 1991). La meilleure stratégie pour éliminer les ions superoxydes repose en fait sur l'utilisation d'enzyme spécifique. La superoxyde dismutase (SOD, E.C.1.15.1) est la plus classiquement employée (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999). Selon le cofacteur métallique associé, il existe trois types de SOD : la Zn-Cu-SOD, la Fe-SOD et la Mn-SOD (Bowler et al., 1992). Dans le cadre

d'une étude de la chimie du fer, l'utilisation Fe-SOD est rejetée. Notre choix porte donc sur la Mn-SOD et la Zn-Cu-SOD qui pourraient donc être potentiellement utilisées.

3.4.b. QUELLES SONT LES CONDITIONS D'UTILISATION DES SUPEROXIDE DISMUTASES ?

La question que l'on peut se poser est de savoir si l'utilisation de ces enzymes est compatible avec nos conditions expérimentales.

Ce que l'on relève dans la littérature c'est, d'une part, que l'utilisation de la Mn-SOD s'accompagne d'interférences négatives : son emploi est en effet incompatible avec l'usage de fixateurs tels que le chlorure mercurique HgCl_2 (Shimojo et al., 2002), le formaldéhyde et le glutaraldehyde. Seul le lugol pourrait ne pas avoir d'effet sur l'enzyme, mais reste fortement proscrit en FIA. Par conséquent, aucune méthode de fixation ne doit être envisagée pour un bon fonctionnement de la Mn-SOD, ce qui peut poser problème dans le cas d'études de processus rapides, tels que le broutage du phytoplancton par le microzooplancton.

D'autre part, la Zn-Cu-SOD, contrairement à la Mn-SOD, pourrait être sensible à la présence de H_2O_2 dans le milieu (Symonyan and Nalbandyan, 1972). Certaines études (Hodgson and Fridovich, 1975; Symonyan and Nalbandyan, 1972) ont en effet décrit un éclaircissement d'une solution de Zn-Cu-SOD lors d'ajout de solution de H_2O_2 . Cet éclaircissement, qui est attribué à la réduction du cuivre contenu dans l'enzyme par l'eau oxygénée, peut atteindre 50 % pour un ajout de 1 mole de H_2O_2 à 1 mole de Zn-Cu-SOD (Symonyan and Nalbandyan, 1972). Cette inhibition est lente mais irréversible. Elle est également dose dépendante et semble commencer pour des concentrations de H_2O_2 supérieures à 700 μM de H_2O_2 . Dans le cadre de nos expériences, cette sensibilité de la Zn-Cu-SOD à H_2O_2 peut poser un réel problème car le phytoplancton est une source de H_2O_2 , particulièrement en phase active de croissance (Palenik et al., 1987). Pour un taux maximal de production de 2×10^{-14} mol cell⁻¹ h⁻¹ (Palenik et al., 1987), la production peut atteindre 200 nM pour 10^7 cellules en 1 heure, et être du même ordre que les concentrations naturelles trouvées dans l'eau de mer : 0-130 nM pour les eaux océaniques et 0-160 nM pour les eaux côtières (Milne et al., 2006). Des concentrations de 580 nM peuvent être atteintes dans le cadre de culture de phytoplancton infectée par des virus (Evans et al., 2006).

La Zn-Cu-SOD a déjà été utilisée dans le cadre de travaux sur cultures phytoplantoniques (Kustka et al., 2005), mais avec l'utilisation conjointe d'une enzyme supplémentaire pour protéger l'activité de la Zn-Cu-SOD. Cependant, cette stratégie de couplage « Zn-Cu-SOD » et « enzyme protectrice » ne peut pas être appliquée dans notre étude de suivi de complexes fer-porphyrines. La raison est que les deux seuls types d'enzymes capables d'éliminer H₂O₂, et de protéger ainsi la Zn-Cu-SOD, sont une catalase et une peroxydase, autrement dit 2 complexes fer-porphyrines. Si ces deux fer-porphyrines sont ajoutées dans les échantillons, leurs signaux respectifs obtenus en chimiluminescence, déjà très variables, risqueraient de masquer un signal peut-être moindre en fer-porphyrines naturelles. Catalase et peroxydase ont des chimiluminescences élevées et dont la variabilité risque d'être aussi grande que le signal de FePy naturelles mesuré. De plus, il n'existe pas de catalase et de peroxydase fonctionnant avec un centre catalytique autre que le fer et donc susceptibles de ne pas réagir en FIA (exception faite pour une Mn-peroxydase, non commercialisée).

3.4.c. COMMENT TESTER CES ENZYMES DANS NOS CONDITIONS D'EXPERIMENTATION ?

Pour savoir si les Zn-Cu-SOD et Mn-SOD vont être fonctionnelles dans nos conditions expérimentales de culture. Des tests préliminaires sont effectués et consistent à : (i) générer une production artificielle de radicaux superoxyde dans de l'eau de mer artificielle, (ii) vérifier les activités des différentes SOD dans un milieu réactionnel salin, au pH de l'eau de mer, (iii) et de tester la sensibilité des SOD à H₂O₂.

Pour cela, on utilise le système xanthine-xanthine oxydase (X-XO) qui va générer des ions superoxydes capables d'assurer la réduction de cytochrome *c* présent dans le milieu, réduction que l'on peut suivre par spectrophotométrie. Le principe est simple. Il est résumé en **figure 26**. Si la SOD est active, elle va catalyser l'élimination des ions superoxyde, empêchant la réduction du cytochrome *c*. Si la SOD est absente ou inactive, les ions superoxydes vont pouvoir réduire le cytochrome *c*.

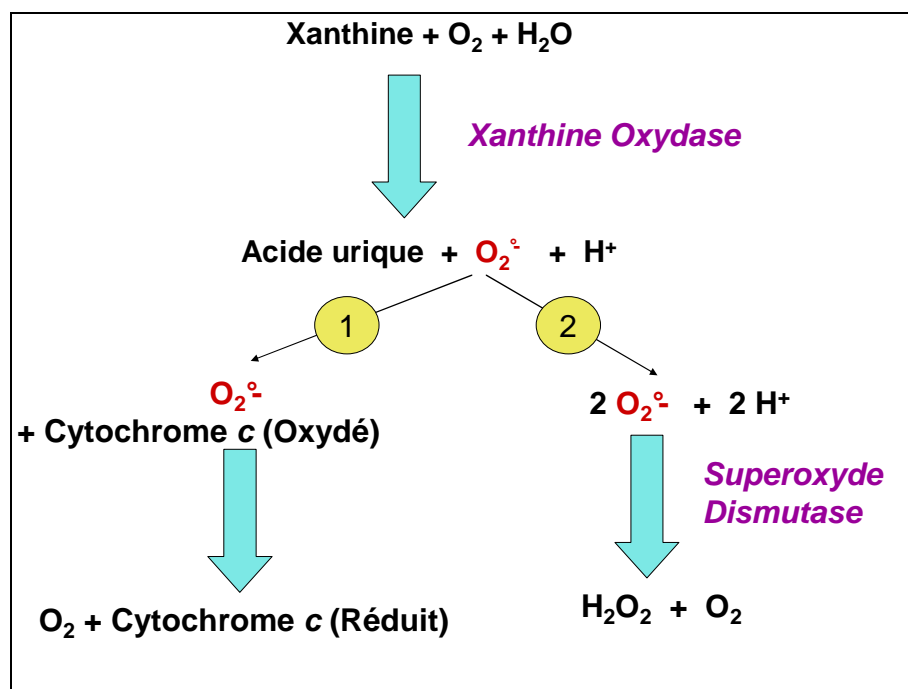


Figure 26 : Principe des tests d'activité de la SOD. La voie 2 est privilégiée à la voie 1, lorsque la superoxyde dismutase est active dans le milieu réactionnel.

3.4.d. TEST 1 : COMPARAISON DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DE LA ZN-CU-SOD ET DE LA MN-SOD DANS DE L'EAU DE MER ARTIFICIELLE, AVEC ET SANS H₂O₂

Le premier test consiste à comparer l'efficacité de la Zn-Cu-SOD et de la Mn-SOD dans l'élimination de radicaux superoxyde, avec ou sans H₂O₂. Les résultats sont présentés en **figure 27**.

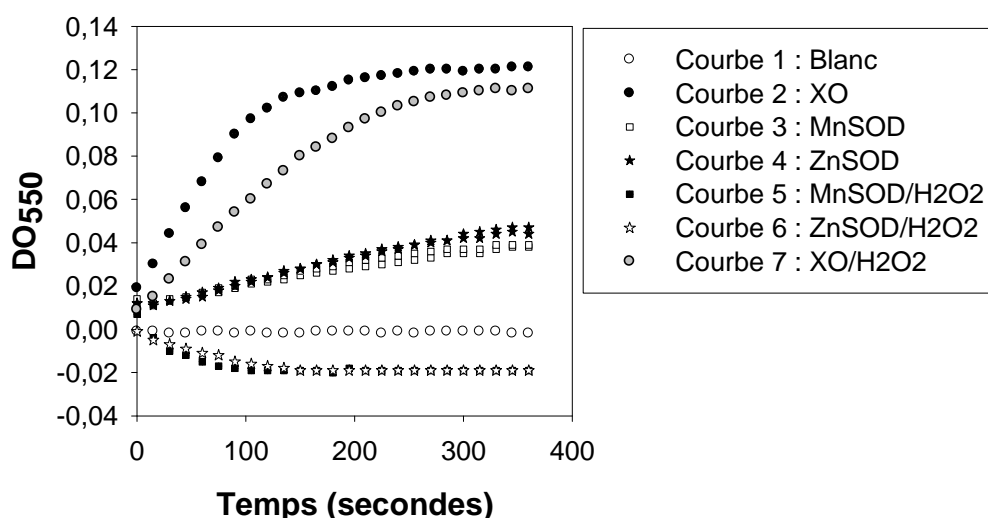


Figure 27 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome *c* par la XO (2,49 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO à 2,49 U.mL⁻¹ (Courbe 3) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 5) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ avec H₂O₂ à 1 mM, 30 min., 25°C, pH 7) (Courbe 6) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ avec H₂O₂ à 1mM, 30 min., 25°C, pH 7) (Courbe 7) XO à 2,49 U.mL⁻¹ en présence de H₂O₂ à 1mM.

On vérifie qu'en introduisant la xanthine oxydase (XO) dans le milieu réactionnel, des ions superoxydes sont bien générés, permettant ainsi la réduction du cytochrome *c* et l'augmentation de l'absorbance (550 nm) au cours du temps (courbe 2). L'introduction supplémentaire de la Mn-SOD (courbe 3) ou de la Zn-Cu-SOD (courbe 4) provoque une diminution de la réduction du cytochrome *c*. Autrement dit, pour des concentrations finales de 3,33 U.mL⁻¹ de Zn-Cu-SOD ou de Mn-SOD, l'efficacité des deux enzymes est équivalente dans l'élimination des radicaux superoxydes. Lorsque ces enzymes sont pré-incubées avec H₂O₂ (1mM) pendant 30 min (courbes 5 et 6), des DO négatives, inférieures à celles obtenues avec l'ajouts d'enzymes non pré-traitées et inférieures à celles du blanc, sont observées. Ce résultat est surprenant car si H₂O₂ avait affecté l'activité des enzymes, les DO auraient été plus élevées que celles obtenues pour les courbes 3 et 4. La cinétique de réduction du cytochrome *c* aurait été en effet plus proche de la cinétique obtenue avec XO seule. Comment expliquer ces DO négatives ? Lorsqu'on s'intéresse aux DO obtenues lorsque la XO est en présence de H₂O₂ seulement (pas d'ajout de SOD), on remarque qu'elles sont inférieures à celles obtenues avec

la XO seule (Courbe 7). Ceci démontre un effet d'inhibition partiel de la XO par H₂O₂ et/ou une interférence négative due à H₂O₂ avec l'un des intermédiaires chimiques assurant la réduction du cytochrome *c* (xanthine, acide urique ou superoxyde généré). Une interférence négative avec le cytochrome *c* n'est pas non plus exclue et pourrait peut être expliquer ainsi les DO négatives.

Quoiqu'il en soit, l'effet de H₂O₂ sur les activités enzymatiques n'est pas clair avec cette expérience. Aussi, cette dernière est renouvelée. Simplement, les enzymes sont pré-traitées dans des conditions moins contraignantes/excessives, avec une concentration en H₂O₂ inférieure (54 µM) et pendant 5 min. Les résultats présentés en **figure 28** montrent qu'en absence de SOD, les ions superoxyde générés par XO (2,49 U.mL⁻¹) vont réduire le cytochrome *c* à une vitesse de 2 x 10⁻⁴ sec⁻¹. L'addition de Zn-SOD ou de Mn-SOD réduit cette vitesse de réduction de manière équivalente à 4 x 10⁻⁵ sec⁻¹, soit une réduction de 79 %. Lorsque les Zn-Cu-SOD et Mn-SOD sont pré-traitées avec du H₂O₂, la vitesse de réduction du cytochrome *c* est également diminuée de 79 %. Les points vérifiés par cette expérience sont donc d'une part, des activités de « scavenging » équivalentes pour les deux SOD et d'autre part, l'absence d'interférence négative avec H₂O₂ (54 µM, traitement de 5 min.).

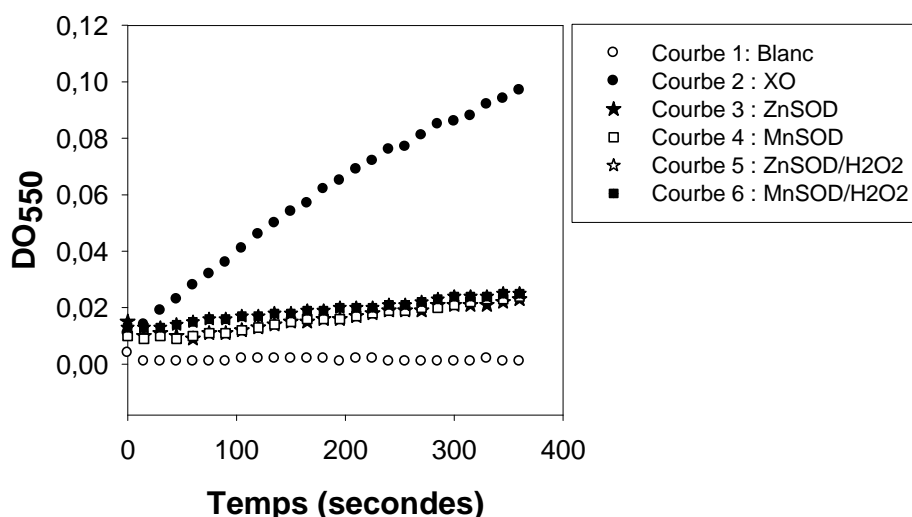


Figure 28 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome *c* par la XO (2,49 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 4) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 5) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ avec H₂O₂ à 54 µM, 5 min., 25°C, pH 7 (Courbe 6) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Mn-SOD à XXM avec H₂O₂ à 54 µM, 5 min., 25°C, pH 7).

3.4.e. TEST 2 : AMELIORATION DE LA CAPACITE DE LA ZN-CU-SOD A ELIMINER LES SUPEROXYDES

La concentration finale de la Zn-Cu-SOD utilisée précédemment ($3,33 \text{ U.mL}^{-1}$) est normalement suffisante pour garantir une bonne suppression des ions superoxyde. Elle est égale à la concentration utilisée par Kutska et ses collaborateurs (Kustka et al., 2005), qui obtiennent 95 % d'inhibition de la réduction du cytochrome *c* pour $10 \text{ U}/3\text{mL}$ de Zn-Cu-SOD. Cependant, nos conditions expérimentales ne sont pas tout à fait les mêmes que celles de Kutska et collaborateurs car nous ne couplons pas l'utilisation de la Zn-Cu-SOD avec une catalase. La concentration finale en Zn-Cu-SOD est alors augmentée dans cette expérience à 80 U.mL^{-1} pour voir si nous pouvons avoir une meilleure élimination des superoxydes (Figure 29).

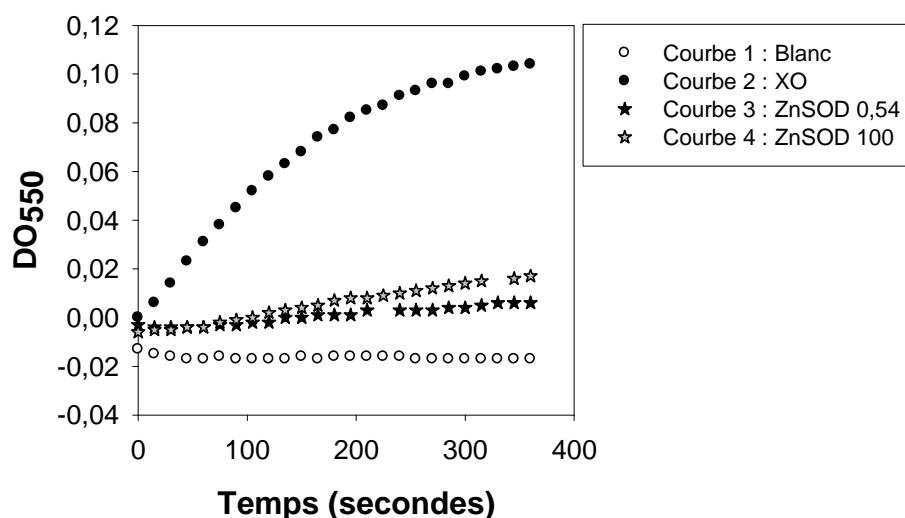


Figure 29 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome *c* par la XO ($4,98 \text{ U.mL}^{-1}$), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à $0,54 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL^{-1} .

Les résultats montrent que l'activité de « scavenging » n'est pas améliorée pour autant, malgré une concentration supérieure (80 U.mL^{-1}) en SOD. Avec une concentration de $3,33 \text{ U.mL}^{-1}$, l'élimination des superoxydes par la Zn-Cu-SOD reste donc optimale dans ces conditions.

3.4.f. TEST 3 : AUGMENTATION DE LA PRODUCTION EN SUPEROXYDE

Par définition, 1 unité de XO permet la production de $1 \mu\text{mole}$ de superoxyde par minute, à pH 7,5 et à 25°C . Par conséquent, avec une concentration en XO de $2,49 \text{ U.mL}^{-1}$, $2,49 \mu\text{mole.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de O_2° sont générées. Cette production artificielle de superoxyde utilisé dans les tests d'essai, reste supérieure à la production que l'on peut obtenir dans une culture : $2,48 \pm 0,34 \text{ nmole.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ pour 10^4 cellules (Oda et al., 1992). Par conséquent, la concentration en XO ($2,49 \text{ U.mL}^{-1}$) est suffisante pour simuler une production par le phytoplancton. Cependant, rien ne dit qu'il n'existe pas de production supplémentaire de superoxyde, lors des expériences de broutage.

La capacité de la Zn-Cu-SOD et Mn-SOD à réagir avec une production plus conséquente d'ions superoxydes doit donc être testée. L'expérience précédente est renouvelée avec une concentration supérieure de $4,98 \text{ U.mL}^{-1}$ en XO. Les résultats obtenus sont similaires (Figure 30), avec des taux d'inhibition de la réduction du cytochrome *c* de 72 % et de 78 % respectivement pour la Mn-SOD et la Zn-Cu-SOD. Par conséquent, une concentration enzymatique de $3,33 \text{ U.mL}^{-1}$ est suffisante pour absorber une production plus conséquente en superoxyde.

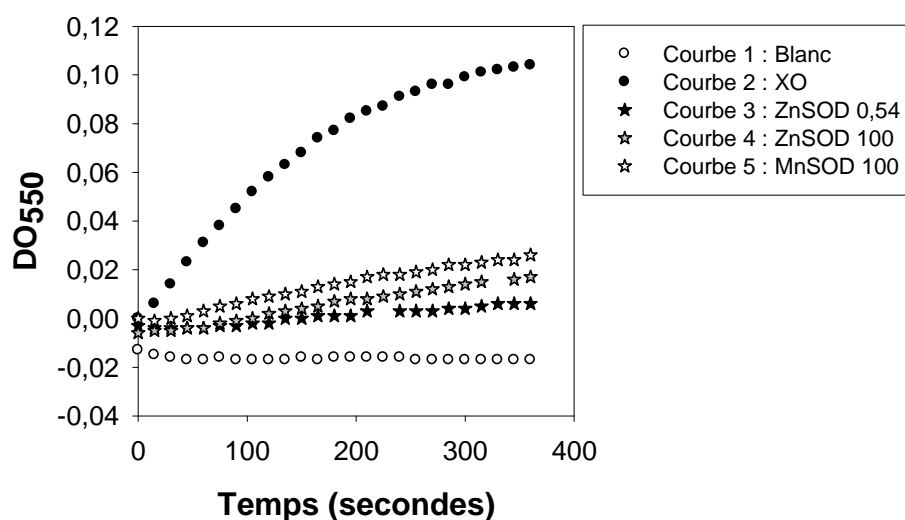


Figure 30 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome c par la XO (4,98 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à 0,54 mg.mL⁻¹ (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ (Courbe 5) Mn-SOD à 100 U.mL⁻¹.

3.4.g. TEST 4 : PASSAGE DE L'EAU DE MER ARTIFICIELLE AU MILIEU DE CULTURE

Le test final consiste à reproduire la manipulation précédente, d'une part en remplaçant l'eau de mer artificielle par le filtrat (0,2 µm) d'une culture phytoplanctonique arrivée en phase stationnaire et d'autre part, en augmentant la concentration de H₂O₂. Les résultats sont présentés en **figure 31**.

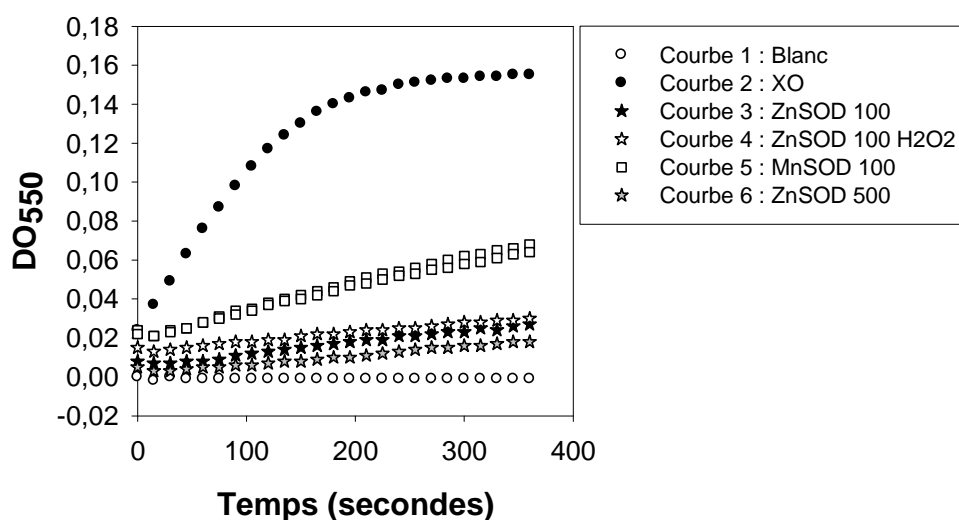


Figure 31 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome *c* par la XO (4,98 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ avec H₂O₂ à 9,8 mM, 5 min., 25°C, pH 7 (Courbe 5) Mn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ (Courbe 6) Zn-Cu-SOD à 500 U.mL⁻¹.

Cette expérience met en évidence que la présence H₂O₂ (9,8 mM, 5min) ne provoque pas d'inactivation de Zn-Cu-SOD et de Mn-SOD. Ce résultat est en accord avec des études qui estiment que l'inhibition de la Zn-Cu-SOD est effective pour 700 mM de H₂O₂. Ce qui est également intéressant, c'est qu'il existe une différence d'inhibition de la réduction du cytochrome *c* entre la Mn-SOD (88 %) et la Zn-Cu-SOD (94 %). La Mn-SOD semble donc partiellement inhibée. Bien qu'elle soit théoriquement insensible aux concentrations de H₂O₂, il semble que son activité enzymatique soit alors altérée par des espèces chimiques, organiques et/ou inorganiques, préalablement présentes dans le filtrat. La culture a été prise en phase stationnaire, et de ce fait, il existe donc une variété d'espèces chimiques dans le milieu correspondant à des métabolites de dégradation cellulaire. Finalement, seule l'utilisation Zn-Cu-SOD dans ces conditions serait envisageable. Par ailleurs, il semble qu'une concentration de 100 U.mL⁻¹ ou 500 U.mL⁻¹ n'améliore pas l'élimination des superoxydes.

3.4.h. QUEL EST LE PROTOCOLE FINAL ADOPTE ?

Finalement, il existe donc un moyen d'éliminer de possibles interférences provoquées par des radicaux superoxyde en chimiluminescence, ceci sans utiliser d'enzymes protectrices. Un ajout de Zn-Cu-SOD dans les échantillons, de préférence juste avant analyse, peut remédier au problème. En effet, l'ajout de l'enzyme n'est pas réalisé dans la culture phytoplanctonique même, ceci pour ne pas stresser la croissance du phytoplancton. Il semble que l'ajout de SOD puisse inhiber la croissance de certaines algues, ce qui a été le cas pour *Chattonella marina* (*Raphidophyceae*) (Oda et al., 1995), révélant ainsi le rôle stimulateur des superoxydes dans la croissance de cette algue. De manière générale, les superoxydes peuvent donc avoir un rôle positif dans la croissance du phytoplancton de par leur possible rôle de facteur de croissance autocrinien (Oda et al., 1995) et/ou de par leur capacité à augmenter la biodisponibilité du fer par réduction des complexes ferriques en fer(II) (Garg, 2007; Rose and Waite, 2005).

Le protocole finalement employé est d'ajouter de la Zn-Cu-SOD (concentration finale à $3,33 \text{ U.mL}^{-1}$) dans les échantillons préalablement filtrés, pendant 5 min. Puis, après ajout d'hémine et de tampon, les échantillons sont immédiatement injectés en FIA-CL.

Une question se pose alors. Elle porte sur les conséquences de l'usage de SOD au niveau de la FIA-CL. Dans le système FePy-O₂-luminol, les ions superoxyde sont nécessaires à l'oxydation du luminol (voir chapitre 2). L'introduction préalable de Zn-Cu-SOD dans les échantillons en vue d'éliminer les radicaux superoxydes initiaux va-t-elle atténuer la chimiluminescence ? Certaines études suggèrent une inhibition de la chimiluminescence par la présence de SOD (Fridovich, 1997; Hodgson and Fridovich, 1973; Miller and Fridovich, 1986). Dans notre cas, cette inhibition est en principe peu probable. En effet, lorsque l'échantillon (contenant la SOD) devrait se mélanger au réactif de luminol, son pH augmenterait à 13. Or, à ce pH, l'enzyme devient inactive et ne peut donc éliminer les radicaux superoxyde (O'Neill et al., 1988). Par conséquent, il y a peu de chance que la sensibilité de la méthode soit altérée.

Une autre question peut se poser sur la possibilité d'une interférence négative avec l'hémine. La présence de SOD va-t-elle affecter la réactivité de l'hémine en chimiluminescence ? Un test de vérification a donc été effectué. Deux gammes d'hémine ont été réalisées, sans et avec Zn-Cu-SOD. Les résultats (non présentés) montrent une diminution de 14 % lorsque $3,33 \text{ U.mL}^{-1}$ (soit $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) de Zn-Cu-SOD sont ajoutés, avant l'hémine. Une possible interférence existe donc mais reste toutefois minime. En effet, il est préférable

d'accepter et de négliger cette perte de signal de 14 % plutôt que de garder un doute dans les expériences de culture quand à la nature exacte du signal de chimiluminescence (de ne pas pouvoir l'attribuer aux FePy et/ou aux superoxydes initiaux).

3.4.i. AVEC L'APPLICATION DE CE NOUVEAU PROTOCOLE, EXISTE-T-IL DES INTERFERENCES DANS LES CULTURES DE PHYTOPLANCTON ?

Les expériences précédentes de suivi de cultures phytoplanctoniques ont montré l'apparition d'un signal de chimiluminescence pendant les 9 premiers jours correspondant à la durée de la phase de croissance du phytoplancton. Ce signal, théoriquement attribué aux FePy, pouvait également s'expliquer par une production naturelle de superoxyde par le phytoplancton.

L'expérience consiste donc à suivre une culture de *Dunaliella salina*, avec l'application de ce nouveau protocole. La **figure 32** représente le suivi des complexes FePy, avec une échelle logarithmique. Elle montre l'absence de production de chimiluminescence et met ainsi en évidence l'absence de production de FePy. La croissance du signal précédemment obtenu, lors de l'EXPERIENCE 2 de suivi du phytoplancton, était donc une interférence provoquée exclusivement par les radicaux superoxyde. Un taux d'apparition des complexes FePy non significativement différent de zéro ... $0,1 \pm 0,1 \text{ jour}^{-1}$ est ainsi estimé.

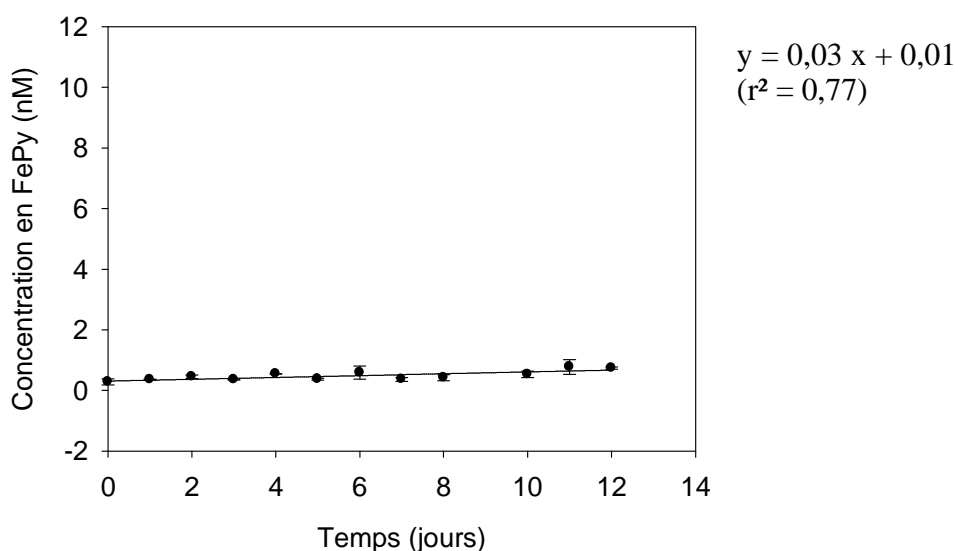


Figure 32 : Evolution des concentrations en FePy dans une culture de *Dunaliella salina*, avec l'utilisation d'un protocole d'élimination des radicaux superoxyde.

3.5. LE BROUTAGE PEUT – IL LIBERER DES FePy DANS L'EAU DE MER ?

Les tests menés précédemment ont pu répondre aux différentes interrogations qui se sont dégagées lors du suivi de la culture de phytoplancton. L'augmentation du signal de chimiluminescence lors de la phase de croissance était un artéfact de la méthode. Il est alors possible de revenir à la question initiale avec la certitude cette fois-ci de ne mesurer que les FePy s'il y a un signal de chimiluminescence. Le but de cette étude est de savoir s'il existe des complexes fer-porphyrines dans l'eau de mer, et si tel est le cas, est-ce qu'il est possible de les mettre en évidence suite à des processus naturels tels que la consommation du phytoplancton par le microzooplancton ?

Dans cette partie, l'expérience de broutage est menée différemment, à savoir que l'analyse de FIA-CL a lieu immédiatement après prélèvement, sans passer par une étape de conservation. Le protocole d'expérimentation est présenté en page 64 (EXPERIENCE 4).

Le principe consiste à suivre la croissance du phytoplancton et d'introduire des brouteurs aux différents stades de développement du phytoplancton. Les phases exponentielle de croissance et stationnaire sont deux phases qui font appel à deux métabolismes bien distincts. Le contenu intracellulaire en FePy, susceptible d'être dépendant des conditions expérimentales (lumière, disponibilité en fer...), peut ou non, varier selon la phase considérée. L'idée est donc de prospecter l'effet du broutage sur le relargage des FePy, pendant les deux phases de croissance de phytoplancton.

3.5.a. RESULTATS EXPERIMENTAUX

L'expérience générale consiste à suivre trois lots de cultures de phytoplancton, à partir desquels 2 expériences de broutage vont être menées. La première expérience de broutage se déroule lors de la phase exponentielle du phytoplancton tandis que la seconde se déroule durant la phase stationnaire. Le protocole d'expérimentation est davantage détaillé en page 66 (EXPERIENCE 4). La **figure 33** permet de visualiser de façon générale l'ensemble de l'expérience : elle présente les concentrations cellulaires en phytoplancton dans les lots témoins (phytoplancton seul) et dans les lots broutage (phytoplancton et microzooplancton).

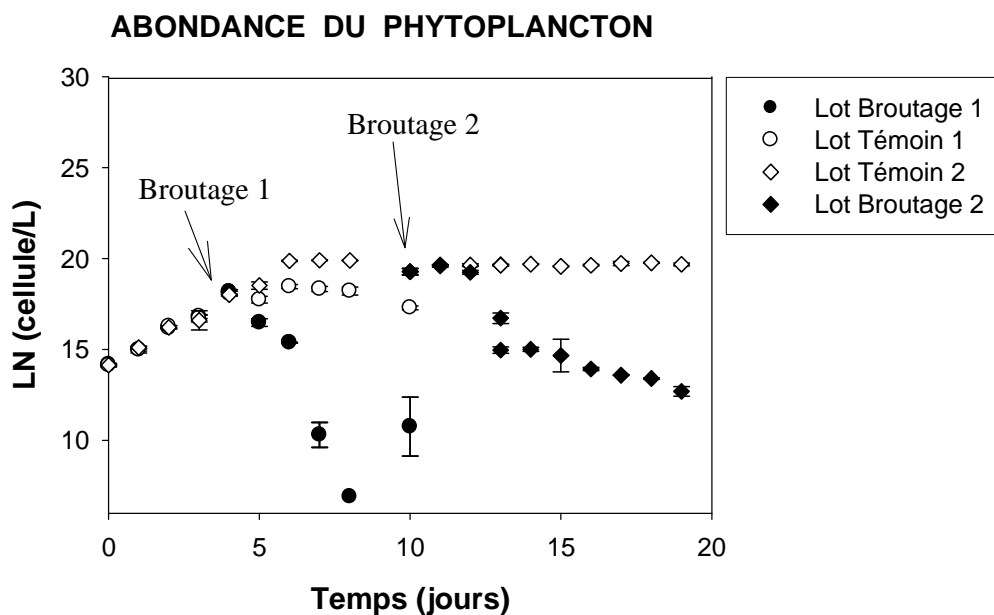
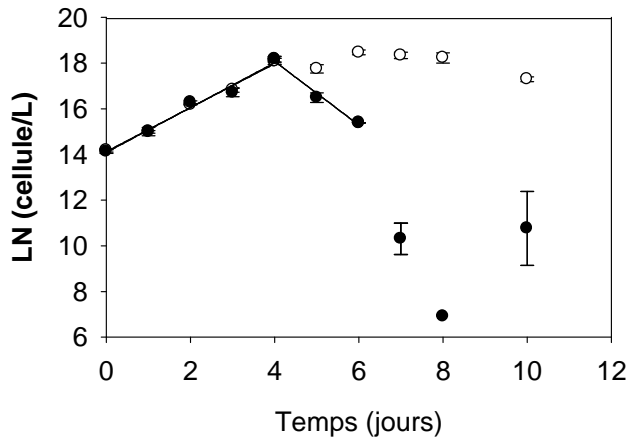
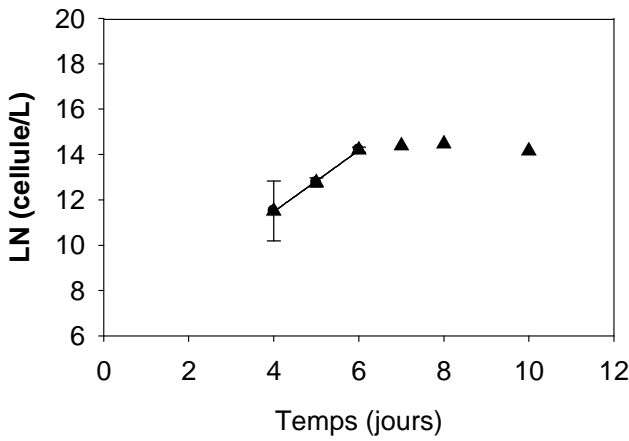


Figure 33 : Abondance cellulaire du phytoplancton lors de l'expérience générale, qui se subdivise en une première expérience de broutage (Broutage 1) lors de la phase exponentielle, et d'une seconde expérience de broutage (Broutage 2) en phase stationnaire.

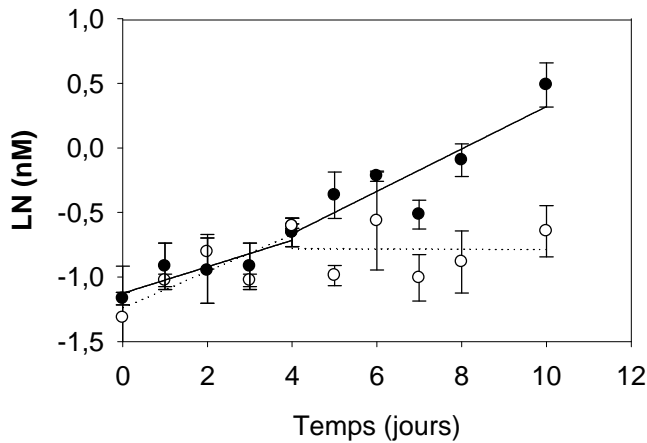
Dans chaque expérience de broutage (1 et 2), abondances cellulaires phytoplanctoniques et microzooplanctoniques ainsi que concentrations en chlorophylle *a* et en FePy ont été suivis au cours du temps (**Figure 34**, pour l'expérience de Broutage 1 et **Figure 35** pour l'expérience de Broutage 2).



ABONDANCE DU PHYTOPLANCTON

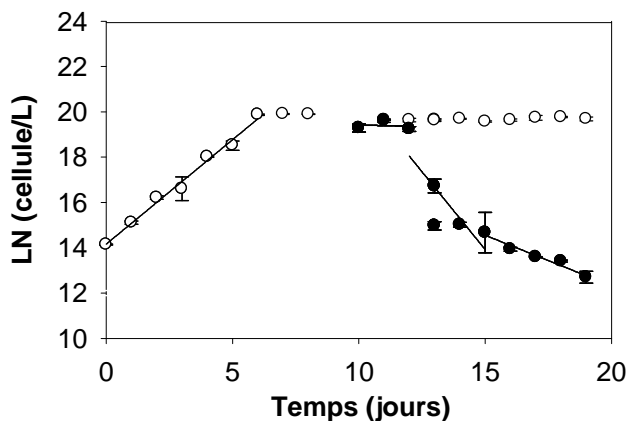


ABONDANCE DU MICROZOOPLANCTON

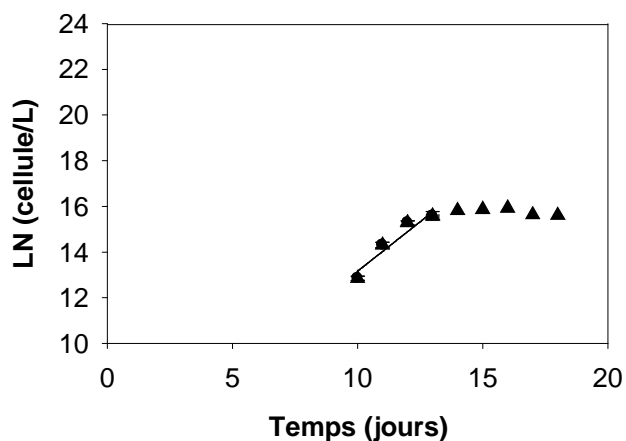


FER-PORPHYRINES (FePy)

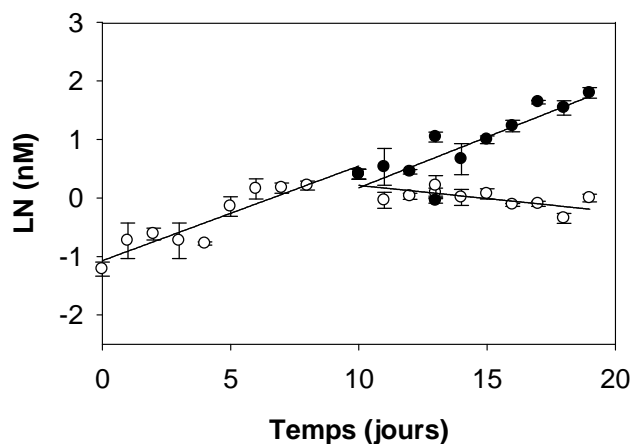
Figure 34 : Suivis des abondances cellulaires et des concentrations en FePy lors de l'expérience de Broutage 1 dans deux lots de trois cultures : Un premier lot « témoin » (symboles blancs) ne contenant que du phytoplancton et un second lot « broutage » (symboles noirs) contenant du phytoplancton avec introduction du microzooplancton dès le jour 4.



ABONDANCE DU PHYTOPLANCTON



ABONDANCE DU MICROZOOPLANCTON



FER-PORPHYRINES (FePy)

Figure 35 : Suivis des abondances cellulaires et des concentrations en FePy lors de l'expérience de Broutage 2 dans deux lots de trois cultures : Un premier lot « témoin » (symboles blancs) ne contenant que du phytoplancton et un second lot « broutage » (symboles noirs) contenant du phytoplancton avec introduction du microzooplancton dès le jour 10.

Dans chacune des expériences de broutage 1 et 2, les résultats montrent une consommation du phytoplancton par le microzooplancton qui s'accompagne d'un relargage de FePy dans l'eau de mer, dès l'introduction des brouteurs.

3.5.b. APPROCHE THEORIQUE SUR LE RELARGUAGE DE FePy :

Si le broutage du phytoplancton par le microzooplancton s'accompagne d'une production de FePy dans l'eau de mer, il est alors possible de définir une vitesse de relargage des FePy. Pour cela, on considère que la dégradation des FePy libérées dans l'eau de mer est négligeable. On fait l'hypothèse que la production de FePy dans le milieu est proportionnelle à la quantité de cellules broutées pour un laps de temps donné.

$$\frac{d(FePy)}{dt} = -k \frac{d(N_{BROUT})}{dt}$$

$$d(FePy) = -k d(N_{BROUT})$$

$$\int_{(FePy)_o}^{(FePy)_t} dFePy = -k \int_{t_0}^t N_{BROUT}$$

$$FePy_t - FePy_{t_0} = -k [(N_{BROUT})_t - N_{(BROUT)_{t_0}}]$$

Avec $N_{(BROUT)_{t_0}} = 0$:

$$FePy_t = -k (N_{BROUT})_t + FePy_{t_0} \quad (7)$$

où : $k =$ quantité de FePy relarguée par cellule de phytoplancton broutée
(en nmole.cellule broutée⁻¹)

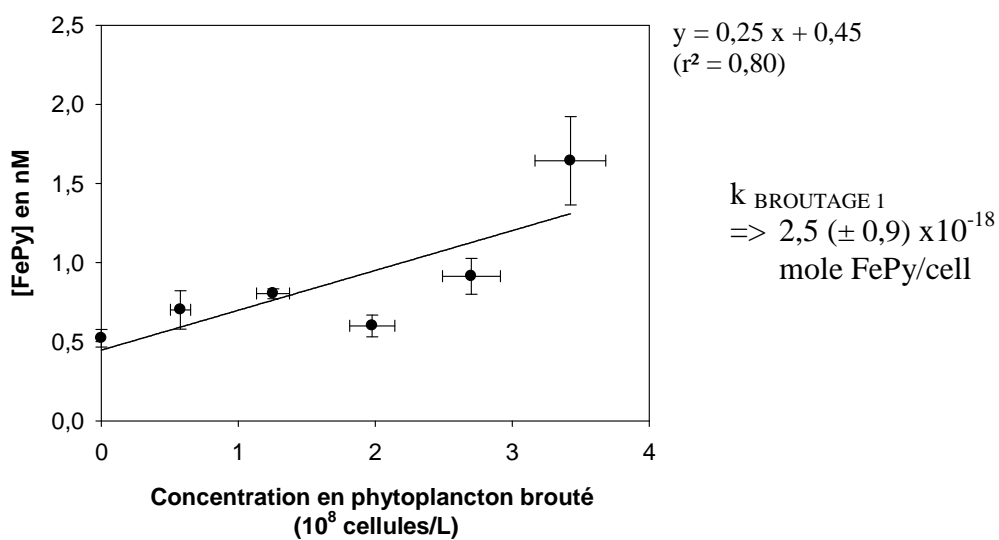
Si les hypothèses posées sont vérifiées, alors la représentation graphique des concentrations en FePy en fonction des concentrations de cellules broutées doit se présenter sous forme de droite, dont la pente est k .

3.5.c. APPLICATION DE L'APPROCHE THEORIQUE

Détermination de k :

D'après nos données expérimentales, il existe une relation linéaire entre le broutage par le microzooplancton et l'apparition de complexes FePy dans le milieu (**Figure 36**). L'équation (7) décrite ci-dessus est donc probable. Par conséquent, la quantité de FePy relarguée par cellule (k) peut être déterminée pour chacune des expériences. Elle est respectivement de $1,9 (\pm 0,3) \times 10^{-18}$ mole FePy.cellule⁻¹ et de $2,5 (\pm 0,9) \times 10^{-18}$ mole FePy.cellule⁻¹, pour les expériences de broutage 1 et de broutage 2.

BROUTAGE 1



BROUTAGE 2

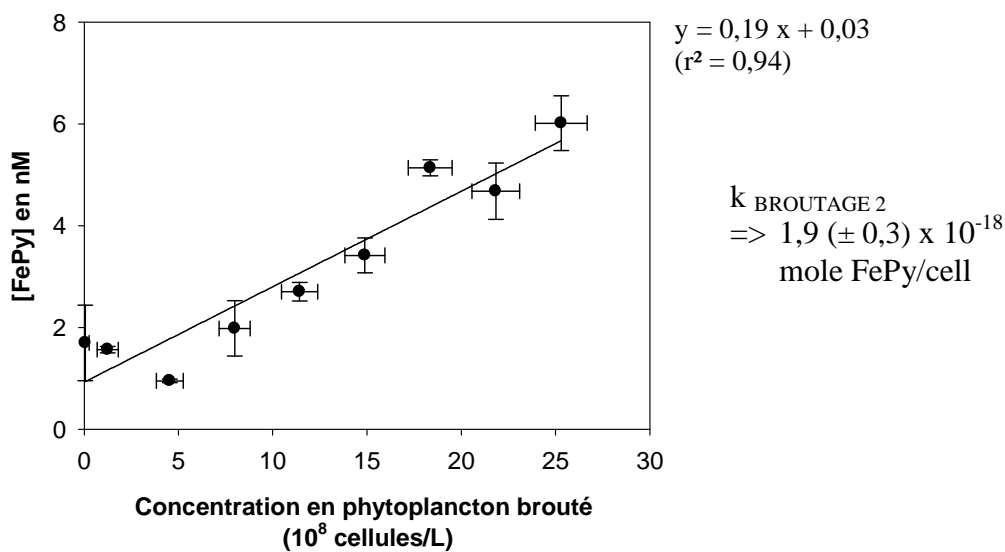


Figure 36 : Relation entre la concentration en FePy dans l'eau de mer et la quantité de cellules phytoplanktoniques broûtées. « k » représente la quantité de FePy libérée par cellule broûtée (en mole FePy.cellule broûtée⁻¹).

Les valeurs de k sont équivalentes dans les expériences de broutage 1 et de broutage 2, ce qui suggère que la phase de croissance du phytoplancton n'influe pas sur la quantité de FePy libérées par cellule broutée. La capacité moyenne de relargage de FePy par cellule broutée peut être moyennée:

$$k_{MOY} = 2,2 (\pm 0,5) \times 10^{-18} \text{ mole FePy.cellule broutée}^{-1} \quad (n=2)$$

La valeur de k est elle réaliste à l'échelle d'une cellule ?

Pour répondre à cette question, la quantité de FePy libérée par cellule broutée (k) est comparée au contenu intracellulaire en FePy. On fait l'hypothèse que la valeur de ce contenu intracellulaire ne varie pas si la cellule de phytoplancton est en phase exponentielle ou en phase stationnaire.

Le rapport « FePy par cellule broutée » / « FePy intracellulaire » est exprimé sous forme de pourcentage. Dans la littérature, deux valeurs de contenu intracellulaire en FePy ont été définies par spectrophotométrie et par chimiluminescence, et conduisent donc à deux estimations différentes (**Tableau VI**).

			Unités
$Q_{FePy \text{ BROUT}}$	2,2 (\pm 0,5)		10^{-18} mole FePy/cellule
$Q_{FePy \text{ INTRA}}$	3 (\pm 2) ⁽¹⁾ ↓	13,4 (\pm 0,1) ⁽²⁾ ↓	10^{-18} mole FePy/cellule
$\frac{Q_{FePy \text{ BROUT}}}{Q_{FePy \text{ INTRA}}}$	73 \pm 70	16 \pm 23	%

$Q_{FePy \text{ BROUT}}$: Quantité de FePy libérée par cellule broutée

$Q_{FePy \text{ INTRA}}$: Quantité de FePy contenu dans une cellule

¹ : d'après le **Chapitre 2**, page 51.

² : d'après (**Gledhill, 2007**)

Tableau VI: Détermination du pourcentage de FePy relarguée, pour une cellule de phytoplancton broutée.

Dans les deux cas, les quotas intracellulaires déterminés par spectrophotométrie ou par chimiluminescence ont été déterminés pour *Dunaliella tertiolecta*. Bien que la valeur de quota intracellulaire soit sensible aux conditions environnementales et à l'espèce considérée, on fait l'hypothèse que ces valeurs sont toutefois indicatives du quota intracellulaire en FePy chez *Dunaliella salina*.

Le quota intracellulaire déterminé par chimiluminescence est 10 fois moins important que celui déterminé par Gledhill (Gledhill, 2007). Ceci s'explique par les méthodes d'extraction employée avant l'analyse. La détermination de l'hème *b* par spectrophotométrie a en effet été précédée d'une extraction en présence de détergents et d'une sonication (Gledhill, 2007), tandis que la détermination des FePy par chimiluminescence a été précédée d'une extraction à la soude NaOH 0,1 M (Chapitre 2, page 35). Les FePy sont connus pour être peu solubles, et il se pourrait que la méthode d'extraction à la soude n'ait pas solubilisé une partie des FePy, notamment celles qui sont enchevêtrées au sein des membranes plasmiques (membrane cellulaire, chloroplastique, mitochondriale...) et qui interviennent dans les chaînes de transport d'électrons.

Malgré cette différence, les pourcentages obtenus sont encourageants. Les ordres de grandeurs obtenus montrent que la part de FePy pouvant être relarguées dans le milieu suite au broutage peut être du même ordre que la part de FePy intracellulaire. L'estimation du relarguage des FePy dans le milieu par le broutage du phytoplancton semble donc réaliste.

La valeur de k est elle réaliste à l'échelle océanique ?

La détermination de la quantité de FePy libérée par cellule broutée peut être rapportée à l'échelle d'une floraison phytoplanctonique qui serait broutée par du microzooplancton. A cette plus grande échelle, la quantité théorique de FePy relarguée dans l'eau de mer devrait être cohérente avec les concentrations naturelles en fer dissous, si l'estimation de *k* est correcte.

Dunaliella salina fait partie du nanophytoplancton (2 à 20 μm) dont les concentrations en milieu naturel sont de l'ordre de 10^5 à 10^6 cellules.mL⁻¹ (Vanucci and Mangoni, 1999). Pour réaliser nos calculs, on pose l'hypothèse que toutes les espèces des communautés phytoplanctoniques naturelles présentent la même capacité de relarguage (*k*) que *Dunaliella salina*.

Avec une capacité de relargage (k) de $2,2 (\pm 0,5) \times 10^{-18}$ moles de FePy.cellule broutée⁻¹, si tout le nanophytoplancton était brouté par le microzooplancton, la concentration en FePy attendue dans l'eau de mer serait comprise entre des ordres de grandeurs de **0,2 à 2,2 nM de FePy**. Ces résultats montrent que la vitesse de relargage des FePy est plausible car les concentrations théoriques en FePy relarguée sont réalistes et de l'ordre de grandeur des concentrations en fer dissous dans l'océan.

Ce résultat est une limite supérieure car : (i) le broutage du nanophytoplancton n'est pas total (ii) les FePy intracellulaires ne sont peut être pas libérées en totalité dans la phase dissoute.

Lorsque une cellule phytoplanctonique est phagocytée par le microzooplancton, son contenu intracellulaire (FePy incluses) va se libérer au sein du système digestif du microzooplancton. Plusieurs devenir des complexes FePy sont alors envisageables. Ces complexes peuvent être métabolisés par le microzooplancton, assurant ainsi un transfert de matière et d'énergie à l'échelon trophique supérieur. Ils peuvent également ne pas intégrer la biomasse microzooplanctonique, et dans ce dernier cas :

- soit ils sont dégradés en produits ne correspondant plus à des molécules de type FePy et ne réagissant plus en FIA-CL,
- soit ils ne sont pas ou peu dégradés et sont secrétés dans l'eau de mer en gardant leur structure de base de type FePy intacte. La FIA-CL mesure cette partie des FePy qui se retrouve dans la phase dissoute de l'eau de mer. Il est possible qu'une partie des FePy relarguées puissent s'agréger ou s'adsorber sur des particules abiotiques (particules lithogéniques) ou biotiques (cellules vivantes, détritiques organiques). Dans ce dernier cas où les FePy intégreraient la phase particulaire, elles ne sont pas prises en compte en FIA-CL.

Facteurs à considérer dans l'estimation de la capacité de relargage des FePy:

Certains éléments n'ont pas été pris en compte dans l'estimation du pourcentage de relargage de FePy. Ils sont soulevés ici car ils jouent dans la précision de l'estimation du pourcentage de relargage des FePy.

Tout d'abord, rappelons que les signaux de chimiluminescence mesurés sont traduits en équivalent hémine. Les FePy naturelles peuvent posséder un signal de chimiluminescence inférieur ou supérieur à celui de l'hémine, conduisant à une sous-estimation ou sur-estimation

des concentrations en FePy naturelles. Ceci est le cas pour les FePy type peroxydase ou cytochrome *c* (Chapitre 2).

D'autres facteurs peuvent plus particulièrement conduire à une sous-estimation de l'efficacité de broutage, tels que :

- **Temps de digestion** : Le temps de digestion, soit le temps entre l'ingestion de la proie et le début de l'excrétion, peut être de l'ordre de quelques jours. Ceci peut avoir des conséquences dans l'estimation du ratio FePy/cellule broutée. La raison est que, pour un temps donné, la quantité de FePy libérées dans le milieu sous l'effet du broutage ne provient pas de la quantité de cellule broutée à ce même moment, mais correspond en fait à une quantité moindre de cellules auparavant ingérées. Le dernier ratio tend donc à être surestimé.

- **Les conditions de détermination de quotas intracellulaires**. En effet, les quotas intracellulaires ont été établis pour des cellules phytoplanctoniques éclairées avec un cycle lumineux de 12h :12h, tandis que la quantité de FePy libérée par cellule broutée (*k*) est déterminée pour des cellules plongées à l'obscurité. L'effet de la lumière sur le contenu en FePy n'est pas encore connu.

D'autres facteurs peuvent, en revanche, conduire à une sur-estimation de l'efficacité de broutage, tel que :

- **le cannibalisme**. En effet, *Oxyrrhis marina* est capable de cannibalisme, en particulier lorsque les proies deviennent insuffisantes (Flynn et al., 1996; Martel, 2006). Cette stratégie de survie pourrait influencer sur la quantité de FePy libérée. En effet, le contenu intracellulaire en FePy chez *Oxyrrhis marina* n'est pas connu. Même si la fonction de photosynthèse n'existe pas chez *Oxyrrhis* (donc pas de synthèse de FePy associées à la photosynthèse), on ignore toutefois si le quota intracellulaire en FePy chez *Oxyrrhis marina* est supérieur ou non à celui de *Dunaliella salina*. Cependant, de part sa plus grande taille par rapport à *Dunaliella salina* (5-8 µm pour *Dunaliella* et 25 µm pour *Oxyrrhis*), il semble probable que la digestion d'une cellule de microzooplancton puisse libérer davantage de FePy qu'une cellule de *Dunaliella*. Dans ce cas, le pourcentage pourrait être surestimé.

4. CONCLUSIONS

D'un point de vue méthodologique, le travail exposé dans ce chapitre a permis de mettre en évidence l'existence d'une interférence non négligeable provoquée par les radicaux superoxydes dans le cadre de travaux sur cultures, où les biomasses atteintes excèdent les biomasses en milieu naturel. Ces derniers sont produits dans l'eau de mer, lors de la phase de croissance du phytoplancton. La mise au point d'un protocole rapide et efficace a permis de s'affranchir de cette gêne analytique.

D'un point de vue biochimique, ce travail permet de considérer l'existence de complexes FePy dans l'eau de mer comme plausible. Il montre que le broutage du phytoplancton par le microzooplancton peut être une source significative de FePy dans la zone pélagique et que ces dernières molécules représentent bien des produits de dégradation cellulaires (car aucune production n'a été détectée lors de la phase active de croissance du phytoplancton et des bactéries).

CHAPITRE IV :

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE IV : Conclusions et perspectives

1. CONCLUSION	109
2. PERSPECTIVES	110
2.1. SUR LA METHODOLOGIE	110
2.1.a. Possibilités d'amélioration de la méthode	110
(i) Augmentation de la limite de détection	110
(ii) Développement d'un protocole pour mesurer les porphyrines libres	111
2.1.b. Possibilité de développer et d'introduire d'autres types de méthodes en océanographie	111
(i) FIA-CL spécifique des porphyrine libres	111
(ii) Recherche des FePy par utilisation d'anti-corps	111
2.2. SUR LA BIOGEOCHIMIE DU FER	112
2.1.a. Quels facteurs peuvent contrôler les quotas intracellulaires des FePy ?	112
2.1.b. Quels sont les autres processus qui libèrent les FePy dans le milieu ?	113
(i) La prédation	113
(ii) LA Lyse virale et la sénescence	113
2.1.c. Quel est le devenir des FePy dans l'eau de mer ?	114
(i) Les facteurs physico-chimiques	114
(ii) Les facteurs biologiques	116

1. CONCLUSION

Ce travail a permis de mettre en évidence la **présence de complexes FePy** dans l'eau de mer. Ce résultat possède des répercussions sur la complexation organique du fer dans l'océan, et prend son ampleur en considérant le rôle du fer dans le contrôle de la pompe biologique avec le manque de connaissances sur sa spéciation organique dans l'eau de mer. En plus des sidérophores, qui ne seraient synthétisés que par les bactéries, les complexes FePy, molécules ubiquistes, apparaissent comme la **deuxième catégorie** de ligands organiques d'origine biologique et dont l'existence dans la phase dissoute (phase principalement disponible pour le développement des micro-organismes planctoniques) est tout à fait plausible (Chapitre 3).

La mise en évidence de cette forme de fer, jusqu'à lors connue au sein des organismes mais non connue dans l'eau de mer, est passée par **deux étapes** :

La première a été le développement d'une méthode d'injection en flux qui a servi à appliquer une réaction de chimiluminescence détectant des FePy. Un travail d'adaptation sur l'application de la réaction dans l'eau de mer a été réalisé en utilisant une complexation avec de l'EDTA. De nombreux efforts ont été fournis pour diminuer la limite de détection et les premières analyses d'eaux naturelles, riches en matière organique, ont permis d'évaluer les premières concentrations en FePy dans divers types d'environnement (eau de mer, eau douce, eau de salinité intermédiaire). Seules des eaux extrêmement pauvres, telles que des eaux océaniques du large, éloignées des influences côtières, ont posé des difficultés analytiques. Leur concentration en fer dissous est en effet inférieure à la limite de détection de la méthode. Leur analyse a posé la question de savoir si dans ces environnements extrêmement pauvres où le fer est à l'état de trace, il était également possible de vérifier la présence ou non des complexes FePy dans l'eau de mer.

La seconde étape de cette étude s'est focalisée sur cette question. Pour y répondre, l'objectif était de simuler un processus naturel de relargage de ces complexes (broutage) et de vérifier ou non leur présence dans l'eau de mer. Les travaux en culture, permettant d'atteindre de plus fortes biomasses, ont permis de nous affranchir du problème rencontré (à savoir une limite de détection inférieure aux concentrations naturelles). Ils ont ainsi mis le doigt sur des

problèmes d'interférences avec les radicaux superoxyde, particulièrement importants dans le cas de milieux riches en cellules phytoplanctoniques en phase exponentielle. Le relarguage de FePy a ainsi pu être démontré à la faveur de ce processus de broutage du phytoplancton par le microzooplancton, ceci en écartant tous doutes sur la fiabilité de l'approche méthodologique employée.

De manière générale, ce travail permet d'amorcer des premières études sur la biogéochimie des complexes FePy dans l'eau de mer et constitue donc une porte ouverte à de nombreux travaux méthodologiques et biogéochimiques.

2. PERSPECTIVES

2.1. SUR LA METHODOLOGIE

2.1.a. POSSIBILITES D'AMELIORATION DE LA METHODE :

(i) **Augmentation de la limite de détection :**

Le travail de développement de la FIA-CL pour évaluer les concentrations naturelles en FePy peut encore être poursuivi. Quelques tests, non présentés dans ce manuscrit, encouragent en effet à prospecter certaines pistes pour améliorer la limite de détection de la méthode.

La pré-concentration :

La première piste est la mise en place d'une étape préliminaire de pré-concentration. Les complexes FePy peuvent présenter certaines propriétés d'hydrophobicité qui peuvent être exploitées si l'on passe par exemple un grand volume d'eau de mer sur des colonnes hydrophobes (*e.g.* Sepak C₁₈). Ces colonnes sont alors capables de retenir les porphyrines qui peuvent être récupérées avec un éluant, compatible avec la FIA-CL. Certaines méthodes d'extraction de porphyrines avec des solvants particuliers (**Horvath and Huie, 1992; Horvath and Huie, 1993; Tong et al., 1998**) permettraient également de pré-concentrer les complexes et pourraient donc être testées.

La solubilité des FePy :

La seconde piste pour améliorer la sensibilité de la méthode serait de mieux solubiliser les FePy naturelles dans l'eau de mer, juste avant l'analyse en FIA-CL. Quelques tests, non présentés dans le manuscrit, encouragent à employer l'éthanol pour limiter l'agrégation des FePy dans l'échantillon.

(ii) Développement d'un protocole pour mesurer les porphyrines libres :

La FIA-CL ne détecte pas les porphyrines libres, puisque seules les porphyrines contenant du fer produisent de la chimiluminescence. Cependant, la FIA-CL pourrait être employée de façon indirecte pour les mesurer dans l'eau de mer. Pour cela, il faudrait arriver à insérer du fer dans les porphyrines libres, naturellement présentes dans l'échantillon. Cette opération peut se faire sous l'action enzymatique d'une ferrochélatase. Les Fe-Py artificiellement formées produiraient ainsi une chimiluminescence correspondant aux porphyrines libres.

2.1.b. POSSIBILITE DE DEVELOPPER ET D'INTRODUIRE D'AUTRES TYPES DE METHODES EN OCEANOGRAPHIE :

(i) FIA-CL spécifique des porphyrines libres :

Il existe une autre méthode de FIA-CL spécifique des porphyrines libres, employée dans le domaine médical pour des analyses dans l'urine et basée sur la chimiluminescence du peryoxalate (**Lin and Huie, 1997**). Cette méthode pourrait peut être trouver une application en océanographie.

(ii) Recherche des FePy par utilisation d'anti-corps :

D'autres types de méthodes peuvent être développées pour le dosage des FePy en milieu marin. Les anti-corps sont souvent employés dans le domaine médical et leur utilisation en océanographie est encore timide. Les anti-corps sont des glycoprotéines qui ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière très spécifique à des fragments protéiques, lipidiques ou polysaccharides... Puisqu'il existe des anti-corps pouvant être spécifiques de porphyrines

libres (Horita et al., 2001), ou plus précisément de fer-porphyrines (Kawamura-Konishi et al., 1998), il est peut être possible d'envisager leur utilisation dans l'eau de mer pour détecter ces complexes. L'introduction d'anti-corps dans des échantillons d'eau de mer (filtrée ou non), pourrait par exemple permettre de mettre en évidence la localisation des FePy (en phase dissoute, ou colloïdale, ou particulaire s'il y a de l'absorption). Couplée à une méthode de détection, telle que la chimiluminescence (comme c'est le cas des tests immunologiques), l'introduction d'anticorps pourrait aussi permettre de les quantifier. De plus, il existe des moyens de pré-concentration de ces derniers : Une d'entre elles consiste à récupérer par magnétisme les anti-corps grâce, à une particule magnétique apposée à ce dernier (Torok and Penke, 1991).

De manière générale, l'introduction de nouvelles méthodes, toujours plus performantes en océanographie permet de faciliter la compréhension des systèmes océaniques et sont une possibilité d'introduire de nouveaux concepts.

2.2. SUR LA BIOGEOCHIMIE DU FER

Dans le cadre de la complexation organique du fer dans l'océan, la possibilité de doser les FePy dans l'eau de mer permet désormais d'ouvrir un champ d'investigation sur cette catégorie de ligands. La mise en évidence des complexes fer-porphyrines montre que ces molécules sont peut-être à prendre en compte pour comprendre le rôle du fer dans le contrôle de la pompe biologique. Pour cela, certaines questions doivent être résolues, questions portant sur leur synthèse intracellulaire jusqu'à leur devenir à long terme dans l'eau de mer.

2.2.a. QUELS FACTEURS PEUVENT CONTROLER LES QUOTAS INTRACELLULAIRES DES FePy ?

Puisque le fer est nécessaire à la synthèse de l'hème, il est possible que la biodisponibilité de ce métal, variable selon les différents types d'environnements océaniques considérés (HNLC, oligotrophe, eutrophe), puisse contrôler le quota intracellulaire en FePy dans une cellule vivante. L'influence d'autres facteurs tels que la lumière ou la disponibilité en autres sels nutritifs n'est pas non plus exclue. Evaluer les facteurs de contrôle du quota

intracellulaire en FePy permet de donner une information partielle sur la quantité de FePy qui peut être libérée dans l'eau de mer, et par conséquent, d'apprécier l'influence des FePy dans la spéciation chimique du fer.

2.2.b. QUELS SONT LES AUTRES PROCESSUS QUI LIBERENT LES FePy DANS LE MILIEU ?

Les processus introduisant les FePy dans l'eau de mer sont ordinairement les processus conduisant à la lyse des cellules. La prédation, la lyse virale et la sénescence sont les processus dominants.

(i) La prédation :

Le rôle du broutage du phytoplancton par le microzooplancton a été mis en évidence dans l'apparition des FePy dans l'eau de mer, avec un mode d'ingestion de *Dunaliella salina* par *Oxhyrris marina* correspondant à de la phagocytose. Cependant, d'autres études sur un autre type de prédation peuvent être envisagées : c'est le cas de la prédation propre aux métazoaires (*e.g.* copépodes), prédation à laquelle on associe des phénomènes de « sloppy feeding », c'est-à-dire à une perte de matériel de la proie qui n'est pas ingérée par le prédateur et qui est ainsi perdue dans l'eau de mer.

De plus, l'étude de *Dunaliella salina* et *Oxhyrris marina* en tant que modèles doit être complétée par l'utilisation d'autres espèces. Des expériences menées sur la prédation des diatomées pourraient conduire à des estimations plus représentatives du milieu océanique.

(ii) La lyse virale et la sénescence :

La lyse virale est également un processus qui conduit à la rupture des membranes cellulaires et à la libération du contenu intracellulaire. Bien que l'on puisse comprendre de manière intuitive leur rôle source dans l'apparition des FePy dans l'eau de mer, leur participation reste à démontrer.

Par ailleurs, il serait intéressant de pouvoir évaluer l'importance relative entre ces deux processus, « broutage » et « lyse virale », dans le relargage des FePy dans l'eau de mer. Même si la lyse virale peut être moins importante que le processus de broutage, rien ne dit que

la lyse ne libère davantage de FePy à l'échelle d'une cellule. En effet, suite à une lyse virale, on peut s'attendre à ce que la totalité du contenu intracellulaire soit libéré dans le milieu. Suite à une prédation du phytoplancton par le (micro)zooplancton, les FePy transitent dans le système digestif du prédateur où elles peuvent être acidifiées. De ce fait, à faible pH, les complexes FePy peuvent être dissociés en Fer libre et en porphyrine libre, qui séparément ne réagissent pas en chimiluminescence. Par conséquent, seule une partie des FePy se retrouve libérée dans l'eau de mer suite à un broutage par exemple du phytoplancton par du microzooplancton.

2.2.c. QUEL EST LE DEVENIR DES FePy DANS L'EAU DE MER ?

Une fois libérées dans l'environnement extracellulaire, le temps de vie des FePy dans l'eau de mer peut être réduit par deux types de facteurs : les facteurs physico-chimiques et les facteurs biologiques. Les facteurs qui prédominent sont alors variables selon la région océanique (pauvre ou non), la profondeur (couche euphotique ou aphotique), les communautés planctoniques naturelles ... etc.

(i) Les facteurs physico-chimiques :

L'éclairement :

L'effet de la lumière est un aspect intéressant à développer. Au cours de cette étude, différentes expériences (non présentées) ont été menées sur l'effet de différents types de rayonnement sur la stabilité des FePy. Ces études montrent des réponses différentes (dégradation du signal sous rayonnement type UV et stabilité du signal sous rayonnement visible pendant 4 heures).

Par conséquent, des expériences complémentaires sur les effets des rayonnements ultraviolets (UV-A, UV-B et UV-C) et visible (PAR pour « Photosynthetically Active Radiation ») sur la stabilité des FePy dans l'eau de mer doivent être poursuivies. Des comparaisons de cinétiques de FePy naturelles avec des FePy commercialisées sont envisageables et permettront peut-être de répondre à quelques questions : Quel(s) type(s) de rayonnements affecte(nt) le plus la stabilité des FePy ? Quelles sont les vitesses de dégradation ? Est-ce que toutes les FePy présentent la même photo-sensibilité ?

L'agrégation des complexes dans l'eau de mer :

L'étude de porphyrines synthétiques montre que ces dernières s'agrègent dans les solutions aqueuses, notamment lorsque la concentration en sel augmente (**Scolaro et al., 2002**). Ainsi, les FePy naturelles peuvent également être sujettes à ce type de processus, résultant de leur mauvaise solubilité dans l'eau de mer. Il est possible que ces dernières s'agrègent entre elles, comme le reportent certaines études où il y existe de fortes interactions entre porphyrines et protéines hémiques (**Chakraborti, 2003**). Cette auto-agrégation peut être vérifiée simplement en comparant la chimiluminescence de deux FePy. Si la somme des chimiluminescences des deux FePy mesurées séparément l'une de l'autre est supérieure à la chimiluminescence obtenue lorsque les deux FePy sont toutes deux présentes dans l'eau de mer, alors il y a un phénomène d'agrégation.

En plus de l'auto-agrégation, il pourrait également exister une interaction avec d'autres composés, autres que des composés porphyriniques. L'agrégation des FePy pourrait être encouragée par exemple par la présence de matière organique particulaire (MOP), support d'adsorption à de nombreux composés. Et si tel est le cas, la quantité, la nature et la taille des particules mais également la qualité de la matière (fraîche ou non, réactive ou non)...pourraient conditionner l'agrégation des complexes sur la MOP. Des études de cinétiques d'adsorption sont donc envisageables. Les acides nucléiques semblent des candidats particuliers pour interagir avec les FePy. Pouvant être libérés sous les mêmes processus que les FePy dans l'environnement extracellulaire, rien ne permet d'écarter que les FePy puissent s'adsorber sur des fragments d'acides nucléiques. Cette interaction est semble bien établie (**Neault and Tajmir-Riahi, 1999; Scolaro et al., 2002**). Il en est de même pour d'autres métallo-porphyrines (**Pasternack et al., 2001**). L'ADN étant commercialisé, de simples tests réalisés dans l'eau de mer, en présence de porphyrines ou non, pourraient suffire à valider ou non l'hypothèse de l'agrégation des FePy avec ces molécules.

(ii) Les facteurs biologiques :

En plus de facteurs physicochimiques tels que l'éclairement ou les processus liés au manque de solubilité des FePy, rien ne peut écarter que l'activité biologique puisse aussi intervenir dans le devenir des FePy.

Etant une forme de fer dans les océans, ces complexes pourraient apparaître comme une source potentielle dans l'acquisition de fer par les micro-organismes. Dans des environnements particuliers, certaines bactéries pourraient acquérir du fer à partir de l'hème (**Wandersman and Delepelaire, 2004; Wandersman and Stojiljkovic, 2000**). En milieu marin, il semble possible que le phytoplancton puisse acquérir le fer à partir de complexes fer-porphyrines artificiellement introduits dans le milieu (**Hutchins et al., 1999**).

Dans le cas où ces complexes sont effectivement capables d'être utilisés comme source de fer, on peut s'interroger sur le devenir possible de la porphyrine libre dans l'eau de mer. Est-ce que les porphyrines libres peuvent de nouveau chélater de nouveaux atomes de fer ou d'autres atomes métalliques ? Cette question revient à savoir si la métallation d'une porphyrine (c'est-à-dire l'introduction d'un métal dans le noyau tétrapyrrolique) peut avoir lieu dans l'eau de mer. La métallation d'une porphyrine nécessite la déformation du cycle pour que l'atome de fer puisse être inséré. Comme le résumait bien Shi et Chengguang (**Shi and Chengguang, 1997**), cette déformation, difficile à réaliser, peut se faire notamment par chauffage ou par l'introduction d'agent réducteur (*e.g.* acide ascorbique). Dans le cas du fer, l'enzyme capable d'assurer son insertion est une férrochelatase, que l'on retrouve aussi dans le contenu intracellulaire de l'organisme. Mais est-ce que la férrochelatase, libérée dans le milieu extérieur, peut-elle encore avoir une activité enzymatique résiduelle dans l'eau de mer ?

Toutes ces questions restent pour l'instant en suspens. Le rôle des FePy en tant que source possible de fer dans les environnements océaniques peut être une question clé dans la capacité des organismes à se développer dans des environnements pauvres en fer.

BIBLIOGRAPHIE :

- Akatsuka, K., McLaren, J.W., Lam, J.W. and Berman, S.S., 1992. Determination of iron and ten other trace elements in the Open Ocean Seawater reference material NASS-3 by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7: 889 - 894.
- Andersen, R.J., Wolfe, M.S. and Faulkner, D.J., 1974. Autotoxic antibiotic production by a marine *Chromobacterium*. *Marine Biology*, 27: 281-285.
- Angell, C.M., Wilson, J.Y., Moore, M.J. and Stegeman, J.J., 2004. Cytochrome P450 1a1 Expression in cetacean integument: implications for detecting contaminant exposure and effects. *Marine Mammal Science*, 20(3): 554-566.
- Armbrust, E.V. et al., 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science*, 306(5693): 79-86.
- Armstrong, E., Granger, J., Mann, E.L. and Price, N.M., 2004. Outer-membrane siderophore receptors of heterotrophic oceanic bacteria. *Limnology and Oceanography*, 49(2): 579-587.
- Asoke, M., Anuradha, N. and Chatterjee, B., 1991. Haemoglobin : A scavenger of superoxide radical. *Journal of Biosciences*, 1-2: 43-53.
- Baden, D.G. and Corbett, M.D., 1980. Bromoperoxidases from *Penicillus capitatus*, *Penicillus lamourouxii* and *Rhipocephalus phoenix*. *Biochem. J.*, 187(1): 205-211.
- Barbeau, K., 2006. Photochemistry of organic iron(III) complexing ligands in oceanic systems. *Photochemistry and Photobiology*, 82(6): 1505-1516.
- Barbeau, K., Rue, E.L., Bruland, K.W. and Butler, A., 2001. Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron(III)-binding ligands. *Nature*, 413: 409-413.
- Barbeau, K., Rue, E.L., Trick, C.G., Bruland, K.W. and Butler, A., 2003. Photochemical reactivity of siderophores produced by marine heterotrophic bacteria and cyanobacteria based on characteristic Fe(III) binding groups *Limnology and Oceanography*, 48(3): 1069-1078.
- Beinet, H., 2000. Iron-sulfur proteins : ancient structures, still full of surprises. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(1): 2-15.
- Bernhardt, R. and Waterman, M.R., 2007. Cytochrome P450 and steroid hormone biosynthesis. *The ubiquitous roles of cytochrome P450 proteins*, 3: Chapitre 12.
- Blain, S. et al., 2004. Availability of iron and major nutrients for phytoplankton in the northeast Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 49(6): 2095-2104.
- Blain, S. et al., 2007. Effect of natural iron fertilization on carbon sequestration in the Southern Ocean. *Nature Letters*, 446: 1070-1074.
- Blain, S. and Treguer, P., 1995. Iron(II) and iron(III) determination in sea water at the nanomolar level with selective on-line preconcentration and spectrophotometric determination. *Analytica Chimica Acta*, 308(1-3): 425-432.
- Bowie, A.R., Achterberg, E.P., Fauzi, R., Mantoura, C. and Worsfold, P.J., 1998. Determination of sub-nanomolar levels of iron in seawater using flow injection with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 361(3): 189-200.
- Bowler, C., Montagu, M.V. and Inzé, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Reviews*, 43: 83-116.
- Boyd, P.W. and Law, C.S., 2001. The Southern Ocean Iron RElease Experiment (SOIREE) - introduction and summary. *Deep-Sea Research II*, 48: 2425-2438.

- Boyd, P.W. et al., 1996. *In vitro* iron enrichment experiments in the NE subarctic Pacific. Marine Ecology Progress Series, 136: 179-193.
- Boye, M. and van den Berg, C.M.G., 2000. Iron availability and the release of iron-complexing ligands by *Emiliana huxleyi*. Marine Chemistry, 70: 277-287.
- Brioukhanov, A.L., Nesatyy, V.J. and Netrusov, A.I., 2006. Purification and characterization of Fe-containing superoxide dismutase from *Methanobrevibacter arboriphilus* strain AZ. Biochemistry, 71(4): 441-447.
- Buffle, J., Greter, F.L. and Haerdi, W., 1977. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion selective electrodes. Analytical Chemistry, 49(2): 216-222.
- Buffle, J. and Leppard, G.G., 1995. Characterization of Aquatic Colloids and Macromolecules. 1. Structure and Behavior of Colloidal Material. Environ. Sci. Technol., 29(9): 2169-2175.
- Butler, A., 1998. Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. Science, 281: 207-210.
- Butler, A. and Walker, J.V., 1993. Marine haloperoxidases. Chem. Rev., 93(5): 1937-1944.
- Calbet, A. and Landry, M.R., 2004. Phytoplankton growth, microzooplankton grazing, and carbon cycling in marine systems. Limnology and Oceanography, 49(1): 51-57.
- Chakraborti, A.S., 2003. Interaction of porphyrins with heme proteins - a brief review. Molecular and Cellular Biochemistry, 253: 49-54.
- Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. Food and Chemical Toxicology, 37(9-10): 949-962.
- Chen, J., Gu, B., Royer, R.A. and Burgos, W.D., 2003. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron. The Science of The Total Environment, 307(1-3): 167-178.
- Chen, Y.P., Lincoln, D.E., Woodin, S.A. and Lovell, C.R., 1991. Purification and properties of a unique flavin-containing chloroperoxidase from the capitellid polychaete *Notomastus lobatus*. J. Biol. Chem., 266(35): 23909-23915.
- Coale, K.H. et al., 1996. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. Nature, 383: 495-501.
- Coale, K.H. et al., 2004. Southern Ocean iron enrichment experiment: Carbon cycling in High- and Low-Si waters. Science, 304: 408-414.
- Cowen, J.P., Massoth, G.J. and Baker, E.T., 1986. Bacterial scavenging of Mn and Fe in a mid- to far-field hydrothermal particle plume. Nature, 322(6075): 169-171.
- Cullen, J.T., Bergquist, B.A. and Moffett, J.W., 2006. Thermodynamic characterization of the partitioning of iron between soluble and colloidal species in the Atlantic Ocean. Marine Chemistry, 98(2-4): 295-303.
- de Baar, H.J.W. and de Jong, J.T.M., 2001. Distributions, sources and sinks of iron in seawater. The biogeochemistry of iron in seawater, chapitre 5 (ed. Turner, D.R., Hunter K.A.): 123-253.
- de Jong, J.T.M. et al., 1998. Dissolved iron at subnanomolar levels in the Southern Ocean as determined by ship-board analysis. Analytica Chimica Acta, 377: 113-124.
- den Besten, P.J., 1998. Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 121(1): 139-146.

- Duce, R.A. et al., 1991. The atmospheric input of trace species to world ocean Global Biogeochemical Cycles, 5: 193-259.
- Duce, R.A. and Tindale, N.W., 1991. Atmospheric transport of iron and its deposition in the ocean. Limnology and Oceanography, 36: 1715-1726.
- Elrod, V.A., Johnson, J.M. and Coale, K.H., 1991. Determination of subnanomolar levels of iron(II) and total dissolved iron in seawater by flow injection analysis with chemiluminescence detection. Analytical Chemistry, 63: 893-898.
- Evans, C., Malin, G. and Mills, G.P., 2006. Viral infection of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) leads to elevated production of reactive oxygen species. Journal of Phycology, 42: 1040-1047.
- Ewetz, L. and Thore, A., 1978. Correlation between hemin content and the chemiluminescent luminol reaction with bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 36(6): 790-793.
- Feely, R.A. et al., 1990. The effect of hydrothermal processes on midwater phosphorus distributions in the northeast Pacific. Earth and Planetary Science Letters, 96(3-4): 305-318.
- Feissner, R., WXiang, Y. and Kranz, R.G., 2003. Chemiluminescent-based methods to detect subpicomole levels of c-type cytochromes. Analytical Biochemistry, 315: 90-94.
- Flynn, K.J., Davidson, K. and Cunningham, A., 1996. Prey selection and rejection by a microflagellate; implications for the study and operation of microbial food webs. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 196(1-2): 357-372.
- Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. The Journal of Biological Chemistry, 272(30): 18515-18517.
- Garg, S., 2007. Photochemical and biological production of superoxide : Effect on redox cycling and bioavailability of iron. Thesis.
- Gillam, M.J. and Hunter, D.J.B., 2007. Chemical defense and exploitation - Biotransformation of xenobiotics by cytochrome P450 enzymes. The ubiquitous roles of cytochrome P450 proteins, 3: Chapitre 15.
- Gledhill, M., 2001. Electrospray ionisation-mass spectrometry of hydroxamate siderophores. The Analyst, 126: 1359-1362.
- Gledhill, M., 2007. The determination of heme b in marine phyto- and bacterioplankton. Marine Chemistry, 103(3-4): 393.
- Gledhill, M. et al., 2004. Production of siderophore type chelates by mixed bacterioplankton populations in nutrient enriched seawater incubations. Marine Chemistry, 88(75-83).
- Gledhill, M. and van den Berg, C.M.G., 1994. The determination of complexation of iron (III) with natural organic complexing ligands in sea water using cathodic stripping voltammetry. Marine Chemistry, 47: 41-54.
- Gledhill, M. and van den Berg, C.M.G., 1995. Measurement of the redox speciation of iron in seawater by catalytic cathodic stripping voltammetry. Marine Chemistry, 50(1-4): 51-61.
- Gledhill, M., van den Berg, C.M.G., Nolting, R.F. and Timmermans, K.R., 1998. Variability in the speciation of iron in the northern North Sea. Marine Chemistry, 59: 283-300.
- Gobler, C.J., Hutchins, D.A., Fisher, A.C. and Cosper, E.M., 1997. Release and bioavailability of C, N, P, Se, and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. Limnology and Oceanography, 42: 1492-1504.

- Gold, M.H. and Alic, M., 1993. Molecular biology of the lignin-degradating basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*, 57(3): 605-622.
- Goldoni, A., 2002. Porphyrins: fascinating molecules with biological significance. *Elettra Highlights*, Vol 2001-2002: 64-65.
- Granick, S., 1951. Biosynthesis of chlorophyll and related pigments. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 2: 115-144.
- Green, B.N. et al., 2001. Observation of large, non-covalent globin subassemblies in the ~3600 kDa hexagonal bilayer hemoglobins by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, 309: 553-560.
- Guan, L.L., Kanoh, K. and Kamino, K., 2001. Effect of exogenous siderophores on iron uptake activity of marine bacteria under iron-limited conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1710-1717.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press, New York, 26-60 pp.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229-239.
- Hewson, W.D. and Hager, L.P., 1980. Bromoperoxydases and halogenated lipids in marine algae. *Journal of Phycology*, 16(3): 340-345.
- Hodgson, E.K. and Fridovich, I., 1973. The role of O_2^- in the chemiluminescence of luminol. *Photochemistry and Photobiology*, 18(6): 451-455.
- Hodgson, E.K. and Fridovich, I., 1975. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, 14(24): 5294-5298.
- Horita, E., Yamaguchi, H. and Harada, A., 2001. Preparation and Properties of anti-cationic Porphyrin Antibodies. *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu*, 79(2): 878.
- Horvath, W.J. and Huie, C.W., 1992. Salting-out surfactant extraction of porphyrins and metalloporphyrin from aqueous non-ionic surfactant solutions. *Talanta*, 39(5): 487-492.
- Horvath, W.J. and Huie, C.W., 1993. Screening of urinary coproporphyrin using cloud point extraction and chemiluminescence detection. *Talanta*, 40(9): 1385-1390.
- Hourdez, S. et al., 2000a. Gas transfer system in *Alvinella pompejana* (Annelida Polychaeta, Terebellida): Functional properties of intracellular and extracellular hemoglobins. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73(3): 365-373.
- Hourdez, S., Lamontagne, J., Peterson, P., Weber, R.E. and Fisher, C.R., 2000b. Hemoglobin from a deep-sea hydrothermal-vent copepod. *The Biological Bulletin*, 199: 95-99.
- Hourdez, S. and Weber, R.E., 2005. Molecular and functional adaptations in deep-sea hemoglobins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(1): 130-141.
- Hudson, R.J.M. and Morel, F.M.M., 1990. Iron transport in marine phytoplankton: Kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnology and Oceanography*, 35(5): 1002-1020.
- Hussain, S., Slikker, W. and Ali, S.F., 1996. Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. *Neurochemistry International*, 29(2): 145-152.
- Hutchins, D.A. and Bruland, K.W., 1994. Grazer-mediated regeneration and assimilation of Fe, Zn and Mn from planktonic prey. *Marine Ecology Progress Series*, 110: 259-269.

- Hutchins, D.A. and Bruland, K.W., 1998. Iron-limited diatom growth and Si:N uptake ratios in a coastal upwelling regime. *Letters to Nature*, 393: 561-564.
- Hutchins, D.A., Witter, A., Butler, A. and Luther III, G.W., 1999. Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature*, 400: 858-861.
- James, M.O. and Boyle, S.M., 1998. Cytochromes P450 in crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121((1-3)): 157-172.
- Jannun, R. and Coe, E.L., 1987. Bromoperoxidase from the marine snail, *Murex trunculus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 88(3): 917-922.
- Johnson, K.S., Gordon, R.M. and Coale, K.H., 1997. What controls dissolved iron concentrations in the world ocean? *Marine Chemistry Discussion Paper. Marine Chemistry*, 57: 137-161.
- Jouan, L., Taveau, J.C., Marco, S., Lallier, F.H. and Lamy, J.N., 2000. Occurrence of two architectural types of hexagonal bilayer hemoglobin in Annelids: Comparison of 3D reconstruction volumes of *Arenicola marina* and *Lumbriscus terrestris* hemoglobins. *Journal of Molecular Biology*, 305: 757-771.
- Kawamura-Konishi, Y., Asano, A., Yamazaki, M., Tashiro, H. and Suzuki, H., 1998. Peroxidase activity of an antibody-ferric porphyrin complex. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4: 181-190.
- Kilz, S., Lenz, C. and Budzikiewicz, H., 1999. A fast screening method for the identification of siderophores from fluorescent *Pseudomonas spp.* by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 34: 281-290.
- King, D.W., 1998. Role of carbonate speciation on the oxidation rate of Fe(II) in aquatic systems. *Environmental Science and Technology*, 32: 2997-3003.
- King, D.W., Aldrich, R.A. and Charnecki, S.E., 1993. Photochemical redox cycling of iron in NaCl solutions. *Marine Chemistry*, 44(2-4): 105-120.
- King, D.W., Lounsbury, H.A. and Millero, F.J., 1995. Rates and mechanisms of Fe(II) oxidation at nanomolar total iron concentrations. *Environmental Science and Technology*, 29: 818-824.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L., 1987. Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41(1): 465-501.
- Klopf, L.L. and Nieman, T.A., 1983. Effect of iron(II), cobalt(II), copper(II) and manganese(II) on the chemiluminescence of luminol in the absence of hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry*, 55: 1080-1083.
- Kral, V., Kralova, J., Kaplanek, R., Briza, T. and Martasek, P., 2006. Quo vadis porphyrins chemistry? *Physiological Research*, 55(2): S3-S26.
- Kuma, K. and Matsunaga, K., 1995. Availability of colloidal ferric oxides to coastal marine phytoplankton. *Marine Biology*, 122(1): 1-11.
- Kuma, K., Nishioka, J. and Matsunaga, K., 1996. Controls on iron(III) hydroxide solubility in seawater: The influence of pH and natural organic chelators. *Limnology and Oceanography*, 41(3): 396-407.
- Kustka, A.B., Shaked, Y., Milligan, A.J., King, D.W. and Morel, F.M.M., 2005. Extracellular production of superoxide by marine diatoms: contrasting effects on iron redox chemistry and bioavailability. *Limnology and Oceanography*, 50(4): 1172-1180.

- Landing, W.M. and Bruland, K.W., 1987. The contrasting biogeochemistry of iron and manganese in the Pacific Ocean. *Geochemica Cosmochemica Acta*, 51: 29-43.
- Lesage, S., Xu, H. and Durham, L., 1993. The occurrence and roles of porphyrins in the environment: possible implications for bioremediation. *Hydrological Sciences Journal*, 38(4): 343-354.
- Lessard, E.J., 1998. Microzooplankton herbivory and phytoplankton growth in the northwestern Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 16: 173-188.
- Lin, M. and Huie, C.W., 1997. Chemiluminescence detection of porphyrins with the peroxyolate by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 339: 131-138.
- Liu, X. and Millero, F.J., 1999. The solubility of iron hydroxide in sodium chloride solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 3487-3497.
- Liu, X. and Millero, F.J., 2001. The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry*, 77: 43-54.
- Liu, X. and Millero, F.J., 2002. The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry*, 77: 43-54.
- Maldonado, M.T. and Price, N.M., 2001. Reduction and transport of organically bound iron by *Thalassiosira oceanica* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 37: 298-309.
- Manthey, J.A. and Hager, L.P., 1981. Purification and properties of bromoperoxidase from *Penicillus capitatus*. *J. Biol. Chem.*, 256(21): 11232-11238.
- Maranger, R., Bird, D.F. and Price, N.M., 1998. Iron acquisition by photosynthetic marine phytoplankton from ingested bacteria. *Nature*, 396: 248-251.
- Marshall, J.A., de Salas, M., Oda, T. and Hallegraeff, G., 2005a. Superoxide production by marine microalgae: I. Survey of 37 species from 6 classes. *Marine Biology*(147): 541-549.
- Marshall, J.A., Ross, T., Pyecroft, S. and Hallegraeff, G., 2005b. Superoxide production by marine microalgae: II. Towards understanding ecological consequences and possible functions. *Marine Biology*, 147: 541-549.
- Martel, C.M., 2006. Prey location, recognition and ingestion by the phagotrophic marine dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335(2): 210-220.
- Martin, J.H. et al., 1994. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, 371: 123-129.
- Martin, J.H. and Fitzwater, S.E., 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature*, 331: 341-343.
- Martin, J.H., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Hunter, C.N. and Tanner, S.J., 1993. Iron, primary production and carbon-nitrogen flux studies during the JGOFS North Atlantic bloom experiment. *Deep-Sea Research II*, 40(1/2): 115-134.
- Martinez, J.S., Haygood, M.G. and Butler, A., 2001. Identification of a natural desferrioxamine siderophore produced by a marine bacterium. *Limnology and Oceanography*, 46(2): 420-424.
- Masuda, T. and Takahashi, S., 2006. Chemiluminescent-based method for heme determination by reconstitution with horseradish peroxidase apo-enzyme. *Analytical Biochemistry*, 355: 307-309.
- McCormack, P., Worsfold, P.J. and Gledhill, M., 2003. Separation and detection of siderophores produced by marine bacterioplankton using HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*(75): 2647-2652.

- Measures, C.I. and Vink, S., 1999. Seasonal variations in the distribution of Fe and Al in the surface waters of the Arabian Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 46(8-9): 1597-1622.
- Measures, C.I., Yuan, J. and Resing, J.A., 1995. Determination of iron in seawater by flow injection analysis using in-line preconcentration and spectrophotometric detection. *Marine Chemistry*, 50(1-4): 3-12.
- Merényi, G., Lind, J. and Eriksen, T.E., 1990. Luminol chemiluminescence: Chemistry, excitation, emitter. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 5: 53-56.
- Michotey, V., Mejean, V. and Bonin, P., 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4): 1564-1571.
- Miller, C.A. and Vogelhut, P., 1978. Chemiluminescent detection of bacteria: experimental and theoretical limits. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(4): 813-816.
- Miller, E.K. and Fridovich, I., 1986. A demonstration that O_2^- is a crucial intermediate in the high quantum yield luminescence of luminol. *Journal of free radicals in biology and medicine*, 2(2): 107-110.
- Millero, F.J. and Sotolongo, S., 1989. The oxidation of Fe(II) with H_2O_2 in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53(8): 1867-1873.
- Milne, A. et al., 2006. High resolution real time determination of hydrogen peroxide production by diatoms: Implications for iron speciation. *Eos Trans. AGU, Ocean Sciences Meeting Supplement*, 87: 36.
- Moore, J.K., Doney, S.C., Glover, D.M. and Fung, I.Y., 2002. Iron cycling and nutrient-limitation patterns in surface waters of the World Ocean. *Deep-Sea Research II*, 49: 463-507.
- Mori, M. et al., 1997. Catalase and Superoxide Dismutase Secreted from *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2(2): 100-105.
- Morrison, M. and Schonbaum, G.R., 1976. Peroxidase-catalyzed halogenation. *Annual Review of Biochemistry*, 45(1): 861-888.
- Motsenbocker, M., Ichimori, Y. and Kondo, K., 1993. Metal porphyrin chemiluminescence reaction and application to immunoassay. *Analytical Chemistry*, 65: 397-402.
- Murphy, C.D., Moore, R.M. and White, R.L., 2000. Peroxidases from marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 12: 507-513.
- Nandi, A. and Chatterjee, I.B., 1987. Scavenging of superoxide radical by ascorbic acid. *Journal of Biosciences*, 11(1-4): 435-441.
- Neault, J.F. and Tajmir-Riahi, H.A., 1999. Structural analysis of DNA-chlorophyll complexes by Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biophysical Journal*, 76: 2177-2182.
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.*, 270(45): 26723-26726.
- Nodwell, L.M. and Price, N.M., 2001. Direct use of inorganic colloidal iron by marine mixotrophic phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 46(4): 765-777.
- O'Brien, K.M. and Sidell, B.D., 1997. The loss of hemoglobin and/or myoglobin affects cardiac ultrastructure in antarctic fishes. *Antarctic Journal of the United States, Marine Biology*.
- O'Neill, P. et al., 1988. The effects of pH and various salts upon the activity of a series of superoxide dismutases. *Biochemical Journal*, 251: 41-46.

- O'Sullivan, D.W., Hanson, A.K. and Kester, D.R., 1995. Stopped flow luminol chemiluminescence determination of Fe(II) and reducible iron in seawater at subnanomolar levels. *Marine Chemistry*, 49: 65-77.
- O'Sullivan, D.W., Hanson, A.K., Miller, W.L. and Kester, D.R., 1991. Measurement of Fe(II) in surface water of the equatorial Pacific. *Limnology and Oceanography*, 36(8): 1727-1741.
- Obata, H., Karatani, H., Matsui, M. and Nakayama, E., 1997. Fundamental studies for chemical speciation of iron in seawater with an improved analytical method. *Marine Chemistry*, 56(1-2): 97-106.
- Obata, H., Karatani, H. and Nakayama, E., 1993. Automated determination of iron in seawater by chelating resin concentration and chemiluminescence detection. *Analytical Chemistry*, 65: 1524-1528.
- Oda, K. et al., 1995. Catalase- and superoxide dismutase-induced morphological changes and growth inhibition in the red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(11): 2044-2048.
- Oda, T. et al., 1992. Hydroxyl radical generation by Red Tide Algae. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(1): 38-43.
- Okuda, K.I., 1994. Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J. Lipid Res.*, 35(3): 361-372.
- Oren, A., 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *BioMed Central*, I(2): 1-14.
- Palenik, B. et al., 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*, 424(6952): 1037-1042.
- Palenik, B., Zafiriou, O.C. and Morel, F.M.M., 1987. Hydrogen peroxide production by a marine phytoplankter. *Limnology and Oceanography*, 32(6): 1365-1369.
- Pasternack, R.F. et al., 2001. Interactions of copper(II) porphyrins with DNA. *Inorganica Chimica Acta*, 317: 51-71.
- Pedersen, M., 1976. A brominating and hydroxylating peroxidase from the red alga *Cystoclonium purpureum*. *Physiologia Plantarum*, 37(1): 6-11.
- Pflugmacher, S. and Sandermann, H., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiology*, 1998(117): 123-128.
- Philippot, L. and Hallin, S., 2005. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology*, 8(3): 234-239.
- Ponka, P., 1999. Cellular iron metabolism. *Kidney Int*, 55(S69): S2-S11.
- Poorvin, L., Rinta-Kanto, J.M., Hutchins, D.A. and Wilhelm, S.W., 2004. Viral release of iron and its bioavailability to marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 49(5): 1734-1741.
- Powell, R.T., King, D.W. and Landing, W.M., 1995. Iron distributions in surface waters of the south Atlantic. *Marine Chemistry*, 50(1-4): 13-20.
- Powell, R.T. and Wilson-Finelli, A., 2003. Photochemical degradation of organic iron complexing ligands in seawater. *Aquatic Sciences*, 65: 367-374.
- Prato, V., Mazza, U., Massaro, A.L., Bianco, G. and Battistini, V., 1967. Porphyrin synthesis and metabolism in iron deficiency anaemia. I. In-vivo-studies. *Annals of Hematology*, 16(6): 333-341.

- Rao, A., Carta, L.K., Lesuisse, E. and Hamza, I., 2005. Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12): 4270-4275.
- Raven, J.A., 1988. The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon and nitrogen sources. *New Phytologist*, 109: 279-287.
- Rewitz, K.F., Styrisshave, B., Lobner-Olesen, A. and Andersen, O., 2006. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(4): 363-381.
- Rich, H.W. and Morel, F.M.M., 1990. Availability of well-defined iron colloids to the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography*, 35(3): 652-662.
- Rocap, G. et al., 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424(6952): 1042-1047.
- Rose, A.L. and Waite, A., 2005. Reduction of organically complexed ferric iron by superoxide in a simulated natural water. *Environmental Science and Technology*, 39: 2645-2650.
- Rose, A.L. and Waite, T.D., 2001. Chemiluminescence of luminol in the presence of iron(II) and oxygen: oxidation mechanism and implications for its analytical use. *Analytical Chemistry*, 73: 5909-5920.
- Rothmund, P., 1935. Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.*, 57(10): 2010-2011.
- Rothmund, P., 1936. A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin. *J. Am. Chem. Soc.*, 58(4): 625-627.
- Rue, E.L. and Bruland, K.W., 1995. Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Marine Chemistry*, 50(1-4): 117-138.
- Rue, E.L. and Bruland, K.W., 1997. The role of organic complexation on ambient iron chemistry in the equatorial Pacific Ocean and the response of a mesoscale iron addition experiment. *Limnology and Oceanography*, 42(5): 901-910.
- Rue, E.L. and Bruland, K.W., 2001. Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzshia*. *Marine Chemistry*, 76: 127-134.
- Salmon, T.P., Rose, A.L., Neilan, B.A. and Waite, A., 2006. The FeL model of iron acquisition: nondissociative reduction of ferric complexes in the marine environment. *Limnology and Oceanography*, 51(4): 1744-1754.
- Sato, M., Takeda, S. and Furuya, K., 2007. Iron regeneration and organic iron(III)-binding ligand production during in situ zooplankton grazing experiment. *Marine Chemistry*, 106(3-4): 471-488.
- Schwarze, C., Carluccio, A.V., Venturoli, G. and Labahn, A., 2000. Photo-induced cyclic electron transfer involving cytochrome *bc1* complex and reaction center in the obligate aerobic phototroph *Roseobacter denitrificans*. *European Journal of Biochemistry*, 267: 422-433.
- Scolaro, L.M. et al., 2002. Nucleation effects in the aggregation of water-soluble porphyrin aqueous solutions. *Physica A*, 304: 158-169.

- Seitz, W.R. and Hercules, D.M., 1972. Determination of trace amounts of iron(II) using chemiluminescence analysis. *Analytical Chemistry*, 44(13): 2143-2149.
- Shaked, Y., Kustka, A. and Morel, F.M.M., 2005. A general kinetic model for iron acquisition by eucaryotic phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 50(3): 872-882.
- Shi, Z. and Chengguang, F., 1997. Porphyrins as ligands for trace metal analysis by high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 44: 593-604.
- Shigeoka, S., Nakano, Y. and Kitaoka, S., 1980. Purification and some properties of -ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* z. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(1): 121-127.
- Shimojo, N., Kumagai, Y. and Nagafune, J., 2002. Difference between kidney and liver in decreased manganese superoxide dismutase activity caused by exposure of mice to mercuric chloride. *Archives of Toxicology*, 76: 383-387.
- Sidell, B.D. and O'Brien, K.M., 2006. When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes. *J Exp Biol*, 209(10): 1791-1802.
- Siroka, Z. and Drastichova, J., 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination - Cytochromes P450 in fish - A review. *Acta Veterinaria Brno*, 73: 123-132.
- Song, Z., Wang, L. and Hou, S., 2004. A study of the chemiluminescence behavior of myoglobin with luminol and its analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 529-535.
- Soria-Dengg, S. and Horstmann, U., 1995. Ferrioxamines B and E as iron sources for the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Ecology Progress Series*, 127: 269-277.
- Spiller, S.C., Castelfranco, M. and Castelfranco, P.A., 1982. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis - I. *In vivo* observations on iron and oxygen-deficient plants. *Plant Physiology*, 69: 107-111.
- Straka, J.G., Rank, J.M. and Bloomer, J.R., 1990. Porphyria and porphyrin metabolism. *Annual Reviews of Medicine*, 41: 457-469.
- Sulzberger, B. and Laubscher, H., 1995. Reactivity of various types of iron(III) (hydr)oxides towards light-induced dissolution. *Marine Chemistry*, 50(1-4): 103-115.
- Sunda, W.G., 2001. Bioavailability and bioaccumulation of iron in the sea. in *Biogeochemistry of Iron in Seawater*, 3(chapitre 3 (ed. Turner, D.R., Hunter K.A.)): 41-84.
- Symonjan, M.A. and Nalbandyan, R.M., 1972. Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes. *FEBS Letters*, 28(1): 22-24.
- Taylor, C., Luther III, G.W. and Waite, J.H., 1994. Polarographic and spectrophotometric investigation of iron(III) complexation to 3,4-dihydroxyphenylalanine-containing peptides and proteins from *Mytilus edulis*. *Inorganic Chemistry*, 33: 5819-5824.
- Thauer, R.K. and Bonacker, L.G., 1994. Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphinoid involved in methanogenesis. *Ciba Found Symposium*, 180: 210-222.
- Theil, E.C., 2004. Iron, ferritin, and nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 24(1): 327-343.
- Tong, A. et al., 1998. Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins. *Analytica Chimica Acta*, 369: 11-16.

- Torok, A. and Penke, B., 1991. Atrial natriuretic peptide assayed after immunoextraction with magnetic iron particles. *Clin Chem*, 37(10): 1769-1773.
- Tsuda, A. et al., 2003. A mesoscale iron enrichment in the Western Subarctic Pacific induces a large centric diatom bloom. *Science*, 300: 958-961.
- van den Berg, C.M.G., 1995. Evidence for organic complexation of iron in seawater. *Marine Chemistry*, 50: 139-157.
- van der Zee, J., Duling, D.R., Mason, R.P. and Eling, T.E., 1989. The oxidation of N-substituted aromatic amines by horseradish peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(33): 19828-19836.
- Vanucci, S. and Mangoni, O., 1999. Pico- and nanoplankton assemblages in a subantarctic ecosystem: the strait of Magellan. *Botanica Marina* 42: 563-572.
- Vong, L., Laes, A. and Blain, S., 2007. Determination of iron-porphyrin-like complexes at nanomolar levels in seawater. *Analytica Chimica Acta*, 588(2): 237-244.
- Waite, A., 2001. Thermodynamics of the iron system in seawater. The biogeochemistry of iron in seawater, 7(chapitre 7 (ed. Turner, D.R., Hunter K.A.)): 291-342.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P., 2004. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58: 611-647.
- Wandersman, C. and Stojiljkovic, I., 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current opinion in Microbiology*, 3: 215-220.
- Weber, R.E., Hourdez, S., Knowles, F. and Lallier, F., 2003. Hemoglobin function in deep-sea and hydrothermal-vent endemic fish: *Symenichelis parasitica* (Anguillidae) and *Thermarces cerberus* (Zoarcidae). *The Journal of Experimental Biology*, 206: 2693-2702.
- Wells, M.L. and Bruland, K.W., 1998. An improved method for rapid preconcentration and determination of bioactive trace metals in seawater using solid phase extraction and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Marine Chemistry*, 63: 145-153.
- Wells, M.L. and Goldberg, E.D., 1992. Marine submicron particles. *Marine Chemistry*, 48: 157-182.
- Wells, M.L., Price, N.M. and Bruland, K.W., 1995. Iron chemistry in seawater and its relationship to phytoplankton: a workshop report. *Marine Chemistry*, 48: 157-182.
- Wells, M.L., Trick, C.G., Cochlan, W.P., Hughes, M.P. and Trainer, V.L., 2005. Domoic acid: The synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. *Limnology and Oceanography*, 50(6): 1908-1917.
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6): 3003.1-3003.9.
- Wever, R., Tromp, M.G.M., Krenn, B.E., Marjani, A. and Van Tol, M., 1991. Brominating activity of the seaweed *Ascophyllum nodosum*: impact on the biosphere. *Environ. Sci. Technol.*, 25(3): 446-449.
- Wilhelm, S.W. and Trick, C.G., 1994. Iron-limited growth of cyanobacteria: Multiple siderophore production is a common response. *Limnology and Oceanography*, 39(8): 1979-1984.
- Willows, R.D., 2003. Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Natural Product Report*, 20: 327-341.
- Wittenberg, J.B. and Stein, J.L., 1995. Hemoglobin in the symbiont-harboring gill of the marine gastropod *Alviniconcha hessleri*. *The Biological Bulletin*, 188: 5-7.

- Witter, A., Hutchins, D.A., Butler, A. and Luther III, G.W., 2000a. Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater. *Marine Chemistry*, 69: 1-17.
- Witter, A., Lewis, B.L. and Luther III, G.W., 2000b. Iron speciation in the Arabian Sea. *Deep-Sea Research II*, 47: 1517-1539.
- Witter, A.E. and Luther III, G.W., 1998. Variation in Fe-organic complexation with depth in the Northwestern Atlantic Ocean as determined using a kinetic approach. *Marine Chemistry*, 62: 241-258.
- Wratten, S.J., Wolfe, M.S., Andersen, R.J. and Faulkner, D.J., 1977. Antibiotic metabolites from a marine Pseudomonad. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(3): 411-414.
- Wu, J. and Boyle, E.A., 1998. Determination of iron in seawater by high-resolution isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry after Mg(OH)₂ coprecipitation. *Analytica Chimica Acta*, 367(1-3): 183-191.
- Wu, J. and Luther III, G.W., 1995. Complexation of Fe(III) by natural organic ligands in the Northwest Atlantic Ocean by a competitive ligand equilibration method and a kinetic approach. *Marine Chemistry*, 50(1-4): 159-177.
- Yang, S., Wu, R.S.S., Mok, H.O.L., Zhang, Z.P. and Kong, R.Y.C., 2003. Identification of a novel cytochrome P450 cDNA, CYP97E1, from the marine diatom *Skeletonema costatum* Bacillariophyceae. *Journal of Phycology*, 39(3): 555-560.
- Zajicek, R.S., Allen, J.W.A., Cartron, M.L., Richardson, D.J. and Ferguson, S.J., 2004. *Paracoccus pantotrophus* NapC can reductively activate cytochrome cd1 nitrite reductase. *FEBS Letters*, 565(1-3): 48-52.
- Zal, F., Lallier, F., Green, B.N., Vinogradov, S.N. and Toulmond, A., 1996. The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachytila*. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 8875-8881.
- Zal, F. et al., 2000. Haemoglobin structure and biochemical characteristics of the sulphide-binding component from the deep-sea clam *Calypptogena magnifica*. *Les Cahiers de Biologie Marine*, 41: 413-424.



ANNEXES :



ANNEXE 1 : LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Présentation du modèle Fe(II)s présenté par Sahked et collaborateurs (Shaked et al., 2005). Le fer ferrique Fe(III), sous forme complexé Fe(Y) ou sous forme non complexé Fe(III)', est réduit par des réductases membranaires (1) (2) en fer ferreux Fe(II)s. Ce fer réduit peut ensuite être transporté au sein de la cellule via un transporteur ferreux (3) ou se complexer à un ligand Z dans le milieu (4).

Figure 2 : Présentation du modèle Fer-Ligand, dit « modèle FeL », visant à expliquer les mécanismes d'acquisition du fer chez *Lyngbya majuscula* (cyanobactérie) (Salmon et al., 2006). Ce modèle implique la réduction d'un complexe ferrique Fe(III)-L, soit directement par une réductase (1), soit par des superoxydes qui sont générés par la réductase. La réduction de ce complexe ferrique Fe(III)-L en complexe ferreux Fe(II)-L (2) peut être suivie par l'oxydation immédiate de ce complexe ferreux en complexe ferrique (3). Le complexe ferreux Fe(II)-L peut aussi se dissocier, libérant ainsi le fer ferreux inorganique Fe(II) (4). Ce Fe(II) peut alors être oxydé par l'oxygène en fer ferrique inorganique Fe(III) (5) ou peut être de nouveau complexé par le ligand (6). *Lyngbya majuscula* serait capable d'assimiler le Fe(II) (7) et le Fe(II)-L (8) par un transporteur ferreux.

Figure 3 : Structure commune de toutes les porphyrines correspondant à un cycle porphyrinique composés de 4 unités pyridiques (comportant chacune un atome d'azote) et reliées entre elles par des ponts méthyléniques.

Figure 4 : Schématisation de la voie de biosynthèse de l'hème. Etape 1: Formation dans la mitochondrie de l'acide δ -aminolévulinique (ALA) à partir de la glycine et du succinyl CoA, chez les animaux. Chez les végétaux, la formation d'ALA se fait à partir du glutamate et glutamyl-tRNA. La réaction est catalysée par l'ALA synthase qui nécessite un cofacteur, le pyridoxal phosphate, pour son fonctionnement. Etape 2: Formation cytosolique de la porphobilinogène (PGB) par condensation de 2 molécules d'ALA, réaction catalysée par l'ALA déshydrase. Etape 3: Formation cytosolique de l'uroporphyrinogène III par condensation de 4 PGB par une PGB déaminase suivie d'une réaction de cyclisation par une cosynthase. Etape 4: Décarboxylation cytosolique de l'uroporphyrinogène III par la uroporphyrinogène

décarboxylase pour former le coproporphyrinogène III. Ce dernier est ensuite décarboxylé par une coproporphyrinogène oxydase pour former le protoporphyrinogène IX. Etape 5: Formation mitochondriale de la protoporphyrine IX par oxydation du protoporphyrinogène IX par la protoporphyrinogène oxydase. Etape 6: Introduction de l'ion ferreux au sein de la protoporphyrine IX dans la mitochondrie par une ferrochelatase, pour former l'hème.

Figure 5 : Métalloporphyrines synthétisées à partir de la voie de synthèse de l'hème. Les biosynthèses de la chlorophylle et de la bactériochlorophylle sont réalisées à partir de la protoporphyrine IX (Willows, 2003) alors que les biosynthèses du coenzyme F₄₃₀ et de la vitamine B₁₂ sont réalisées à partir du sirohydrochlorine (Thauer and Bonacker, 1994).

Figure 6 : Représentation chimique de différents types d'hèmes répandus dans les systèmes biologiques : hème a, hème b et hème c (Gledhill, 2007).

Figure 7 : Exemples de complexes fer-porphyrines biosynthétisés à partir de l'hème et entrant dans les principales fonctions biologiques.

Figure 8 : Participation des fer-porphyrines (sous forme de cytochromes) au sein de la chaîne de transport d'électrons respiratoire. La chaîne de transfert d'électrons est composée de 4 complexes qui vont créer un gradient de protons. Ce gradient est utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP.

Figure 9 : Schéma des différents montages en FIA-CL : (a) seringue d'injection, (b) vanne d'injection, (c) pompe péristaltique, (d) bobine de mélange (e) bain thermostaté (f) cellule de lecture, (g) photomultiplicateur.

Figure 10 : Mécanisme réactionnel d'oxydation du luminol.

Figure 11 : Réponse de chimiluminescence de l'hémine dans une solution de soude 0,1 M. La réponse est linéaire ($y = 1,83 x + 0,44$, $R^2 = 0,99$).

Figure 12 : Evolution dans le temps du signal de chimiluminescence d'un étalon de 3,96 nM réalisé dans de l'eau de mer. Le traitement se fait 3 heures après ajout d'hémine.

Figure 13 : Modification des signaux obtenus selon la nature du fluide porteur : eau milli-Q (grand pointillé), solution de chlorure de sodium 0,5 M (continu) ou eau de mer artificielle (petit pointillé). Les pics ont été obtenus en injectant un standard d'hémine à 6 nM réalisé dans de l'eau de mer.

Figure 14 : Signal de chimiluminescence de l'hémine. Ce signal est obtenu par différence du signal d'un échantillon d'hémine à 6 nM par le signal d'un échantillon sans hémine.

Figure 15 : Stabilité de la chimiluminescence des échantillons naturels (eau du Rhône) en fonction du temps, selon deux modes de stockage : (A) à température ambiante (B) après congélation.

Figure 16 : Stabilité de la chimiluminescence des échantillons naturels (eau du Rhône) en fonction du temps. Les échantillons sont non filtrés et empoisonnés au HgCl₂. Deux modes de stockage sont testés: (A) à température ambiante (B) après congélation.

Figure 17 : Schématisation de la répartition des flacons lors de l'expérience de broutage.

Figure 18 : Schématisation de la répartition des milieux de culture en trois lots.

Figure 19 : Paramètres étudiés après prélèvement : dénombrements cellulaires, pH et FePy.

Figure 20 : Schématisation de la répartition des cultures en différents lots, pour l'expérience de broutage.

Figure 21: Evolution des concentrations cellulaires de phytoplancton (*Dunaliella salina*) et de microzooplancton (*Oxhyrris marina*), dans les différents lots.

Figure 22 : Evolution des concentrations en fer-porphyrines dans les différents lots.

Figure 23 : Relation entre l'évolution des concentrations en FePy et le stade de

croissance des cellules phytoplanctoniques. Les points clairs signifient que les cultures sont exposées à un cycle lumineux 12 h : 12 h. Les points noirs signifient que les cultures sont mises à l'obscurité (n = nombre de cultures).

Figure 24 : Evolution des concentrations en FePy (échelle logarithmique) dans les différents lots. Les points clairs signifient que les cultures sont exposées à un cycle lumineux 12h/12h. Les points noirs signifient que les cultures sont mises à l'obscurité. (n = nombre de cultures).

Figure 25 : Evolution des FePy en fonction du développement bactérien.

Figure 26 : Principe des tests d'activité de la SOD. La voie 2 est privilégiée à la voie 1, lorsque la superoxyde dismutase est active dans le milieu réactionnel.

Figure 27 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome c par la XO (2,49 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO à 2,49 U.mL⁻¹ (Courbe 3) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 5) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Mn-SOD à XXM avec H₂O₂ à 1 mM, 30 min., 25°C, pH 7) (Courbe 6) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ avec H₂O₂ à 1mM, 30 min., 25°C, pH 7) (Courbe 7) XO à 2,49 U.mL⁻¹ en présence de H₂O₂ à 1mM.

Figure 28 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome c par la XO (2,49 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 4) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (Courbe 5) Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Zn-Cu-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ avec H₂O₂ à 54 µM, 5 min., 25°C, pH 7) (Courbe 6) Mn-SOD à 3,33 U.mL⁻¹ (incubation préalable de Mn-SOD à XXM avec H₂O₂ à 54 µM, 5 min., 25°C, pH 7).

Figure 29 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome c par la XO (4,98 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à **0,54 mg.mL⁻¹** (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹.

Figure 30 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome c par la XO (4,98 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à 0,54 mg.mL⁻¹ (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ (Courbe 5) Mn-SOD à 100 U.mL⁻¹.

Figure 31 : Cinétiques enzymatiques de réduction du cytochrome c par la XO (4,98 U.mL⁻¹), selon différentes conditions expérimentales : (Courbe 1) Blanc où absence de SOD et de XO (Courbe 2) XO (Courbe 3) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ (Courbe 4) Zn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ avec H₂O₂ à 9,8 mM, 5 min., 25°C, pH 7 (Courbe 5) Mn-Cu-SOD à 100 U.mL⁻¹ (Courbe 6) Zn-Cu-SOD à 500 U.mL⁻¹.

Figure 32 : Evolution des concentrations en FePy dans une culture de *Dunaliella salina*, avec l'utilisation d'un protocole d'élimination des radicaux superoxyde.

Figure 33 : Abondance cellulaire du phytoplancton lors de l'expérience générale, qui se subdivise en une première expérience de broutage (Broutage 1) lors de la phase exponentielle, et d'une seconde expérience de broutage (Broutage 2) en phase stationnaire.

Figure 34 : Suivis des abondances cellulaires et des concentrations en FePy lors de l'expérience de Broutage 1 dans deux lots de trois cultures : Un premier lot « témoin » (symboles blancs) ne contenant que du phytoplancton et un second lot « broutage » (symboles noirs) contenant du phytoplancton avec introduction du microzooplancton dès le jour 4.

Figure 35 : Suivis des abondances cellulaires et des concentrations en FePy lors de l'expérience de Broutage 2 dans deux lots de trois cultures : Un premier lot « témoin » (symboles blancs) ne contenant que du phytoplancton et un second lot « broutage » (symboles noirs) contenant du phytoplancton avec introduction du microzooplancton dès le jour 10.

Figure 36 : Relation entre la concentration en FePy dans l'eau de mer et la quantité de cellules phytoplanctoniques broutées. « k » représente la quantité de FePy libérée par cellule broutée (en mole FePy.cellule broutée⁻¹).

ANNEXE 2 : LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Comparaison du signal de chimiluminescence de différents composés porphyriniques à celui de l'hémine.

Tableau II : Interférents potentiels dans la détermination des FePy naturelles.

Tableau III : Concentrations naturelles en FePy dans différentes eaux naturelles.

Tableau IV : Concentrations cellulaires (10^6 cellules.L⁻¹) de chacune des espèces aux différents pas de temps.

Tableau V : Récapitulatif des différents paramètres extraits du suivi des FePy et des concentrations cellulaires pendant les phases de production et de disparition des complexes en FePy.

Tableau VI : Détermination du pourcentage de FePy relarguée, pour une cellule de phytoplancton broutée.

ANNEXE 3 : ARTICLE

Determination of iron–porphyrin-like complexes at nanomolar levels in seawater

Lilita Vong^a, Agathe Laës^b, Stéphane Blain^{a,*}

^a *Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie, Université de la Méditerranée, Centre d'Océanologie de Marseille (OSU), Unité Mixte de Recherche CNRS 6535, Campus de Luminy, Case 901, 163, Avenue de Luminy, F-13288 MARSEILLE Cedex 09, France*

^b *Ifremer, Département TSI, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France*

Received 20 December 2006; received in revised form 2 February 2007; accepted 2 February 2007

Available online 12 February 2007

Abstract

A new method for the non-specific determination of iron–porphyrin-like complexes in natural waters has been developed. It is based on the chemiluminescent oxidation of the luminol in the presence of dioxygen (O₂) at pH 13. The method has been implemented in a FIA manifold that allowed the direct injection of seawater. The limit of detection is 0.11 nM of equivalent hemin (Fe–protoporphyrin IX). Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂, siderophore (deferrioxamine B), humic acid and phytic acid did not interfere when they were present at the concentrations expected in seawater. Metal free porphyrin and Mg, Cu, Co porphyrin complexes did not induce a significant chemiluminescent signal. Poisoned unfiltered samples could be stored for several weeks before analyses. The new method was successfully applied to the determination of the Fe–porphyrin complexes contained in cultured phytoplankton and in natural samples.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Iron; Porphyrin; Seawater; Flow injection; Complexation; Chemiluminescence

1. Introduction

During recent years, considerable attention has been paid to the biogeochemistry of iron in seawater because this metal limits phytoplanktonic growth in large oceanic regions [1–3]. The solubility and bioavailability of iron is largely controlled by its chemical speciation that is still poorly understood. Almost all dissolved iron (DFe), supposed to be the major source of iron for microorganisms, is bound by organic ligands that are still largely unidentified [4]. Complementary analytical approaches are used to elucidate the chemical speciation of iron in seawater. Using cathodic stripping voltammetry (CSV) [5–11] two distinct classes of binding ligands were discovered according to their conditional affinity constant for iron. The stronger ligands are suspected to be siderophores. These molecules are excreted by bacteria to acquire iron [12,13]. The identification of siderophore produced by marine organisms has been done using mass spectrometry (MS) [14,15] that can be cou-

pled with high performance liquid chromatography (HPLC) [16]. Although this method allows the complete determination of the chemical structure of the molecules it requires large volumes of seawater and time consuming separation protocols. The other class of ligands with lower conditional affinity constant might include porphyrins [5]. Porphyrins are molecules biosynthesized in almost all living organisms. They are characterized by a tetrapyrrolic ring that allows the complexation of different metal cations. This is the case for iron, leading to Fe–porphyrin (Fe–Py) complexes that are found in various metalloproteins involved in essential biochemical functions, such as photosynthesis, respiration, and nitrogen fixation [17]. Catalase, peroxidase, cytochrome, hemoglobin, myoglobin are some examples of proteins containing Fe–Py complexes playing a key role in enzymatic reactions involved in the electron transfer or the oxygen transport. Although these molecules might be released in aquatic environments following cell degradation or passive excretion, they have not yet been identified as dissolved species in natural waters.

Our work aimed to develop a new method for the measurement of Fe–Py-like complexes in seawater. The method used flow injection analysis (FIA) and chemiluminescence

* Corresponding author. Tel.: +33 4 91 82 93 69; fax: +33 4 91 82 19 91.
E-mail address: stephane.blain@univmed.fr (S. Blain).

detection. The oxidation of luminol has already been applied to the determination different chemical species in natural waters [18]. In most of the methods, the oxidant is hydrogen peroxide [19–21]. However, the oxidation of luminol by O_2 dissolved in the reagents has been applied to the determination of Fe(II) [22–24] or Fe (II) + Fe(III) [25,26]. Recently, Ussher et al. reported that organic compounds interfere in current luminol–chemiluminescence methods used for iron determination [27]. These authors attributed these to interactions with iron species rather than chemiluminescence induced by organic ligands themselves. Fe–Py complexes are also known to promote the luminol oxidation by O_2 at pH 13 in immunoassays [28,29]. The objective of the present study was to implement this chemical reaction in a flow injection system and to apply the FIA method to the determination of Fe–Py in natural waters.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All plasticware was cleaned with a detergent (MICRO[®]; International Products Corporation), NaOH 0.1 M, HCl 10% and ultrapure deionized water (Milli-Q, Millipore Co.). The solutions of NaOH (0.1 and 0.5 M) were prepared by dissolving 4 g or 20 g of NaOH pellets in 1 L of MQ water. The solution of luminol (1.5×10^{-3} M) was prepared by dissolving 177.2 mg of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione in 1 L of NaOH (0.1 M or 0.5 M) containing 3 mL of linoleic acid 60%. These reagents were stored in opaque bottles for at least 24 h prior to use. The solution of EDTA (0.25 M) was obtained by dissolving trisodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate in MQ water. The artificial seawater was composed of NaCl (24 g L^{-1}), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (10.8 g L^{-1}), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.5 g L^{-1}). The buffer solution (pH 9) was prepared with 75 mL of suprapur ammonia solution 25% (Merck) and 53 mL of suprapur hydrochloric acid 30% (Merck).

All porphyrins were commercial products (Sigma). Stock solutions of hemin (1.5×10^{-3} M), protoporphyrin IX dimethylester (10^{-3} M), coproporphyrin I dihydrochloride (10^{-3} M), mesoporphyrin IX dihydrochloride (10^{-3} M) and chlorophyllin sodium copper (10^{-3} M) were prepared in NaOH 0.1 M solution. Stock solutions of hemoglobin (1.5×10^{-2} M), myoglobin (1.5×10^{-2} M), vitamin B₁₂ (0.2 M), bovine-heart cytochrome *c* (1.5×10^{-2} M) and catalase (1.5×10^{-2} M) were prepared in MQ water. Stock solution of horseradish peroxidase (147 U mL^{-1}) was prepared in Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer 0.25 M adjusted at pH 8.6. Stock solution (1 mg L^{-1}) of chlorophyll *a* from *Anacystis nidulans* algae ($\geq 96\%$ HPLC) was prepared in acetone solution 90%.

Stock solution of Fe^{3+} (1.79×10^{-2} M) was prepared by diluting a standard for atomic spectroscopy (1 g $FeCl_3$) (Sigma) in 100 mL of HCl 37% solution and completed to 1 L with MQ water. Stock solution of Fe^{2+} (15 μM) was prepared by dissolving ferrous ammonium sulfate in sulfuric acid 1 M. Stock solution of humic acid (1 g L^{-1}) was prepared in NaOH 0.1 M. Stock solutions of phytic acid (9.12 μM), desferrioxamine B (DFOB) (0.4 M) and H_2O_2 (1 μM) were prepared in MQ water. Stock solution of H_2O_2 was stored in the dark at 4 °C.

2.2. Manifolds

The FIA manifolds (Fig. 1) included a peristaltic pump (Gilson Minipuls 3), a six-port rotary injection valve (Cheminert, Model C22) and a photomultiplier (Hamamatsu, H9319-01) placed in front of a spiral cell (diameter 3.7 cm). The carrier, the solutions of luminol and EDTA were pumped at flow rates of 1.2, 1.2 and 0.3 mL min^{-1} , respectively. T-connectors, mixing coils (0.75 mm i.d., length 96 cm) and all tubings (0.75 mm i.d.) were made of Teflon FEP (Cluzeau Info Labo). The lengths of the tubing were: in the manifold #1, 10 cm between the T connector and the input of the mixing coil and 27 cm between the output of the T connector and the flow cell. In the manifold #2, 10 cm between the first T connector and the input of the first mixing coil, 11 cm between the output of the first mixing coil and the second T connector, 27 cm between the second T connector and the input of the second mixing coil and 60 cm between the output of the second mixing coil and the flow cell. The injection loop was loaded using a 2 mL plastic syringe.

2.3. Procedure for determination of Fe–Py

All the solutions containing porphyrin were manipulated at low ambient light level and using opaque polyethylene bottles to avoid photo-degradation of the complexes. The concentrations of Fe–Py-like complexes were determined by standard additions of hemin in the samples. Thus, the unit of the concentrations of Fe–Py-like complexes was nanomolar of equivalent hemin.

The manifold #1 was used to analyse Fe–Py complexes in NaOH, in artificial and natural seawater, the pH of the sample (3.5 mL) was buffered to pH 9 with 980 μL of buffer solution, followed by the addition of 420 μL of EDTA. Finally, the pH of the sample was increased up to 13 by addition of 210 μL of NaOH 8 M.

The manifold #2 was used for direct injection of samples of artificial seawater, natural waters (sea, river and pond waters) and culture media.

2.4. Study of interferences

Possible interferences of inorganic (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} and H_2O_2) and organic (DFOB, Fe–DFOB, humic and phytic acids) species were investigated. The samples were analysed by standard additions of hemin, immediately after the addition of the interferent. The effect of humic acids was studied in NaOH, because humic acid is more soluble at high pH. All other interferences were tested in seawater. In the case of phytic acid and H_2O_2 , two other experiments were performed where the interferent was first equilibrated with the sample for 12 h and 30 min, respectively, following by standard addition analysis.

2.5. Sampling of natural surface waters

Oceanic water was collected using GoFlo bottles during the KEOPS cruise in the Southern Ocean. Samples were also collected in the Rhône river (France) in the mouth of the Kourou river (Guyana, France) in the pond of Berre (France).

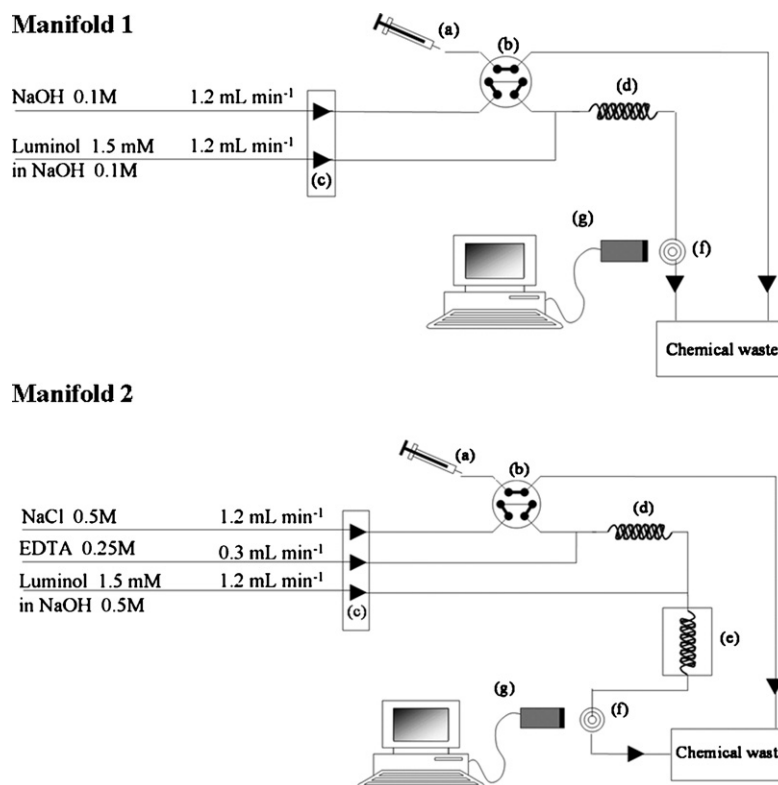


Fig. 1. Flow injection manifolds: (a) syringe, (b) six-port rotary valve, (c) peristaltic pump, (d) mixing coil, (e) thermo-insulated bath (f) flow cell and (g) photomultiplier.

All samples were immediately filtered after sampling through polycarbonate filters (0.2 μm). The oceanic samples were analysed on board, immediately after sampling or after few days of storage at 4 °C. The river samples were stored at 4 °C, and analysed few days later in the laboratory.

2.6. Culture experiments

Green marine alga *Dunaliella tertiolecta* was supplied by CSIRO (strain CS-175 of *D. tertiolecta*). The culture media was a f/2 medium [30,31] modified as follow: filtered Mediterranean seawater (0.2 μm) was enriched with NaNO_3 (75 mg L^{-1}), NaH_2PO_4 (4.4 mg L^{-1}), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 $\mu\text{g L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (180 $\mu\text{g L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9.8 $\mu\text{g L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22 $\mu\text{g L}^{-1}$), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6.3 $\mu\text{g L}^{-1}$), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (315 ng L^{-1}), Na_2EDTA (436 ng L^{-1}), thiamine, cyanocobalamine (vitamin B_{12}) and biotine. The sterilization of the medium was performed by autoclaving at 120 °C for 20 min, except for the vitamin solution, which was added after sterilization by filtration (0.2 μm). Cultures were grown at ambient temperature under natural light conditions. The bottles were shaken once daily by hand. A flow cytometer (Cytoron Absolute, Ortho Diagnostic Systems, France) was used for cell counting.

For the determination of the intracellular content of Fe–Py more than 1000 cells μL^{-1} were collected on polycarbonate filters (0.2 μm). The cells were then broken by placing the filters in 30 mL of NaOH (0.1 M) during 15 min with magnetic stirring.

The mixture was then filtered (0.2 μm) to eliminate the broken cells.

3. Results and discussion

3.1. Mechanims of the reaction

The mechanism of the non-peroxidative chemiluminescence of luminol has been studied in detail [32,33]. This mechanism includes two different steps of oxidation (Fig. 2). The primary (one electron) oxidation can be achieved by many strong oxidants and leads to the luminol radical which exist as undissociated form (LH^\bullet) or as monoanion $\text{L}^{\bullet-}$ depending on the pH. Two different pathways are possible for the secondary oxidation leading to the α -hydroxy-hydroperoxide (α -HPP) which produces luminescence by decomposition to aminophthalate. The direct oxidation by superoxide (reaction 1, Fig. 2) can only occurs with the monoanion $\text{L}^{\bullet-}$. The second pathway involves the oxidation of the luminol radical to diazoquinone L (reaction 2a, Fig. 2) and the subsequent oxidation by the monodissociated hydrogen peroxide (reaction 2b, Fig. 2). The importance of the different pathways has been discussed in detail by Rose and Waite [33] in the case of the determination of Fe(II) by chemiluminescence. They show that OH^\bullet and $\text{O}_2^{\bullet-}$ are the oxidants involved in the primary oxidation of the luminol and that the secondary oxidation proceeds *via* the direct oxidation of the luminol radical by $\text{O}_2^{\bullet-}$. All the reactions occur within the cell in roughly 1 s.

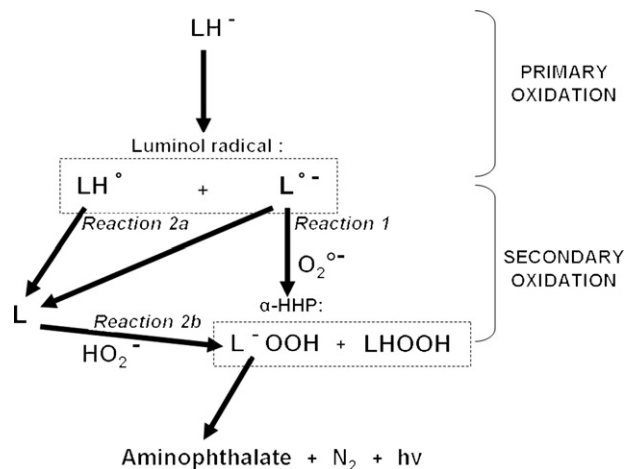


Fig. 2. Mechanisms of luminol oxidation for Fe(II) chemistry, adapted from Merényi et al. [32] and Rose and Waite [33]. LH^- = luminol; LH^\bullet = undissociated form of luminol radical; $L^{\bullet-}$ = monoanion form of luminol radical; L = diazoquinone; α -HHP = α -hydroxy-hydroperoxide; $L^{\bullet-}OOH$ = monoanion form of α -HHP; $LHOOH$ = undissociated form of α -HHP; $O_2^{\bullet-}$ = superoxide.

The mechanism for the non-peroxidative chemiluminescence of luminol in presence of Fe–Py is not established. However, based on the reactions describe above and considering the conditions used in the FePy– O_2 –luminol system a possible mechanism can be suggested. The pH of 13 used in the reaction implies that the luminol is present as a dianion. The one electron oxidation results in the luminol radical present as monoanion ($K_a = 2 \times 10^{-8}$ [34]). If we consider that $O_2^{\bullet-}$ is not initially present in the solution of Fe–Py, the secondary oxidation step will require an *in situ* production of $O_2^{\bullet-}$. It has been reported that $L^{\bullet-}$ can react with O_2 to produce $O_2^{\bullet-}$ and L . Because L is rapidly hydrolysed [35] all $L^{\bullet-}$ that react with O_2 should produce $O_2^{\bullet-}$. This reaction is slow compared to other reactions involved in the mechanism [35]. Some characteristics of the method presented in the section below are discussed in the light of this possible mechanism.

3.2. Implementation in a flow injection manifold

The chemiluminescent reaction described by Motsenbocker et al. [28] was implemented into the FIA manifold #1 (Fig. 1A). The carrier stream of NaOH (0.1 M) was mixed with luminol (1.5 mM, pH 13) within a knitted mixing coil before passing through the detector. The internal diameter of the mixing coil was of 0.75 mm and the length was of 90 mm resulting in the residence time of 20 s. The manifold was tested using solutions of hemin in NaOH 0.1 M.

Additions of hemin were realised in NaOH and the standards were immediately injected. The calibration curve based on the integrated signal was linear ($y = a(Fe-Py) + b$ with $a = 1.83 \pm 0.05$; $b = 0.44 \pm 0.05$; $r^2 = 0.99$). The signal of a solution containing 4 nM of hemin was stable during 4 h after its preparation. The limit of detection (three times the standard deviation of the blank, $n = 10$) was 0.38 nM.

3.3. The case of seawater

Direct injection of seawater in manifold #1 was not possible due to the precipitation of magnesium and calcium hydroxide that would rapidly clog up the tubing. The precipitation was masked by complexing Ca^{2+} and Mg^{2+} with EDTA before mixing the seawater with NaOH. This procedure was first tested off line.

The stability of the treated seawater sample over the time was investigated. The signal of natural seawater spiked with 4 nM of hemin decreased significantly (50%) after 5 h. This could be due to the slow exchange of Fe contained in hemin with free EDTA (see below). This decrease may also be caused by a slow exchange with natural ligands present in seawater. In this case, the decrease would depend on the type and on the concentrations of ligands and therefore would be different for different samples. Whatever the cause, the decrease of the signal with time reduced the sensitivity of the method. Therefore, the sample must be injected immediately after being treated. The typical time lag between the beginning of the treatment and the injection was roughly 1 min.

To improve the reproducibility, EDTA was then added on-line. The manifold #1 was modified as shown in Fig. 1b. The pH of luminol was increased to keep an optimum pH of 13 before the mixing coil. The carrier (NaOH 0.1 M) used with the manifold #1 was not appropriate to the manifold #2 because the injection of seawater would have precipitated hydroxide. Different carriers (MQ water; NaCl (0.5 M) and artificial seawater) were tested. The signals resulting from the injection of seawater in these different carriers are shown in Fig. 3. Injection in MQ water produced an asymmetric peak, probably due to the strong difference in ionic strength between the sample and the carrier. NaCl and the artificial seawater produced better peaks. NaCl was chosen because it gave a better sensitivity and was easier to prepare than artificial seawater.

3.4. Competition with EDTA

EDTA is a good ligand for iron, thus adding EDTA as masking agent of the precipitation of Ca^{2+} and Mg^{2+} , could also reduce the concentration of iron complexes initially present in the

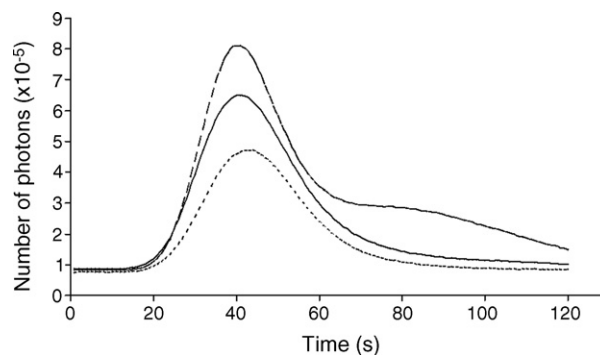


Fig. 3. Chemiluminescence peaks obtained by injection of seawater + 6 nM of hemin in different carriers: MQ water (dotted line), NaCl (0.5 M) (dark gray line) and artificial seawater (light gray line).

sample. Different concentrations of EDTA (0.125, 0.25, 0.375, 0.5 and 0.675 M) were tested with seawater spiked with 6 nM of hemin and seawater without hemin addition. The precipitation of hydroxide was observed at the outlet of the mixing coil when the lowest concentration of EDTA was used. Concentrations of 0.5 M and higher resulted in saturation of the EDTA solution. For the other concentrations of EDTA no significant change in the signal was observed. Therefore, we conclude that EDTA, at the concentration required to mask the precipitation of Ca^{2+} and Mg^{2+} , does not interfere with the Fe–Py determination.

3.5. Optimization of the method

The effect of the time of mixing between the sample and the luminol was investigated by varying the length of the mixing coil in manifold #2. Different times of mixing (15, 20 and 40 s) gave the same sensitivity.

The FePy– O_2 –luminol chemiluminescence is observed after 15 s and the signal does not change significantly when the mixing time was increased to 20 and 40 s. This is consistent with a steady state concentration $\text{O}_2^{\bullet-}$ resulting from the production by reaction 1 and consumption by reaction 2. In the Fe(II)– O_2 –luminol chemiluminescence, Rose and Waite [33] have demonstrated that different levels of impurities in the luminol reagent result in steady state concentration of $\text{L}^{\bullet-}$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$ in the range of 40 s–3 months.

Merényi suggested that the role of the superoxide can be ascertained by the addition of superoxide dismutase (SOD), which catalyses the dismutation of $\text{O}_2^{\bullet-}$ with the production of hydrogen peroxide [32]. The addition of 1.2 mg L^{-1} of SOD in hemin standard solution decreases the chemiluminescence by 45%. The only partial reduction of the signal might be due to the decrease in the activity of the SOD at high pH [36].

The influence of temperature was also tested by placing the reaction coil (e) in a thermo-insulated water bath. The signal obtained at 30 and 40 °C did not differ significantly from the signal measured at ambient temperature. The signal increased by 20% when the temperature was set to 50 °C.

Therefore, the optimised conditions were a mixing time of 20 s at 50 °C. The calibration curve of hemin in seawater was linear ($y = 3.67(\text{FePy}) + 1.16$ ave $r^2 = 0.9861$) in the range of concentrations 0–7.5 nM. The limit of detection of the method was 0.11 nM (three times the standard deviation of the blank, $n = 10$).

3.6. Selectivity of the method

The feasibility of the determination of Fe–Py-like complexes in seawater is demonstrated using hemin as a model. However, in natural waters other Fe–Py-like complexes as well as free porphyrin or porphyrin complexed with metal other than iron may be present. We have tested our method with commercially available porphyrins. The results are summarised in Table 1. The injection of metal free porphyrins (proto-, meso- and copro-porphyrins), magnesium–porphyrin (chlorophyll *a*), copper–porphyrin (chlorophyllin) and cobalt–porphyrin (vitamin B₁₂) did not give a significant signal compared to injection

Table 1

Comparison of the chemiluminescent signal produced by different porphyrin and metal–porphyrin complexes

Central metal atom	Compounds	Range of concentrations (nM)	Relative signal to hemin
–	Protoporphyrin IX	0–7.5	0.17
–	Mesoporphyrin	0–7.5	0.05
–	Coproporphyrin	0–7.5	0.05
Mg	Chlorophyll <i>a</i>	0–280	0.01
Cu	Chlorophyllin	0–4	0.05
Co	Vitamin B ₁₂	0–140	0.07
Fe	Hemin	0–7.5	1
Fe	Catalase	0–7.5	1.54
Fe	Cytochrome <i>c</i>	0–7.5	3.26
Fe	Horseshoe peroxidase	0–7.5	3.35
Fe	Myoglobin	0–7.5	12.36
Fe	Hemoglobin	0–7.5	15.07

of hemin at the same concentration. The catalase, an enzyme containing 4 Fe–Py units, had a similar response to hemin. A signal enhanced by a factor of 3 compared to hemin was obtained with the peroxidase, an enzyme containing 1 Fe–Py unit and with the cytochrome *c*, a macromolecule containing 2 Fe–Py units. The highest responses ($\times 12$ and $\times 15$) relative to hemin were obtained with myoglobin (1 Fe–Py unit) and hemoglobin (4 Fe–Py units), respectively.

The number of porphyrins tested in this work is limited, but the results show that the method is quite selective for the detection of Fe–Py-like complexes. However, the sensitivity of the signal is dependent of the nature of the Fe–Py complexes. Previous work determining porphyrins for immunoassay development and using the same chemical reaction have shown that a synthetic Mn–porphyrin complex also produced a chemiluminescent signal [28] and therefore our method could occasionally detect non-Fe–porphyrin. However, the number of Mn–Py complexes biosynthesized in organisms (*i.e.* Mn–peroxidase) is well below the number of Fe–Py. They are probably not abundant in natural waters compared to Fe–Py.

When natural samples are analysed, the exact nature of the Fe–Py complexes contained in the sample is not known. The sample contains very likely a mixture of different Fe–Py complexes, which give different chemiluminescent signals when separately injected in our manifold. The concentration of Fe–Py-like complexes determined by our method must be interpreted as a concentration of species in the sample that gives a signal corresponding to the same concentration of hemin. So, the correct unit to be used is nanomolar equivalent hemin.

3.7. Interferences

The results of the study of the interferences are reported in Table 2. These chemical species were selected because they are known to produce a chemiluminescent signal in the O_2 –luminol reaction [26,37] or because they can react with Fe–Py (for example H_2O_2 with catalase and peroxidase). In the case of H_2O_2 we suggest that the rapid hydrolyse at pH 13 of L by OH^- does not allow the formation of the α -HPP by reaction 2b

Table 2
Interferences in the Fe–Py determination

Possible interferents	Concentrations (nM)	Range of hemin concentrations (nM)	Manifold	Relative signal
Co ²⁺	15 nM	0–3.5	2	0.9
Cu ²⁺	20 nM	0–3.5	2	1.0
Fe ³⁺	200 nM	0–3.75	2	1.1
Fe ²⁺	100 nM	0–3.5	2	1.3
H ₂ O ₂	160 nM	0–7	2	–1.3
	500 nM ^a	0–7.5	2	1.2
DFOB	10 nM	0–7.5	2	1.1
DFOB–Fe	17 nM	0–3.5	2	1.1
Humic acid	5 mg L ^{–1b}	0–4	1	–1.1
Phytic acid	220 nM	0–7.5	2	1.2
	40 nM ^a	0–7.5	2	1.0

^a Previously equilibrated with the sample before injection. See section 2.4.

^b Corresponding to 617 μmoles carbon L^{–1}.

(Fig. 2) and therefore the presence of H₂O₂ does not interfere with the determination of Fe–Py. The absence of interference with Fe²⁺, Cu²⁺ and Co²⁺ results likely from non-optimum pH conditions. In fact the non-peroxidative chemiluminescence with these metals required the pH to be 3 units lower than in our method. In addition, the chemiluminescence resulting from these metals is produced within the seconds following the mixing between the metal and the luminol [23,37]. Therefore, most of this signal has disappeared before entering in the flow cell of our manifold. For Fe³⁺, H₂O₂ is required to produce the chemiluminescence [19]. The levels of H₂O₂ in natural samples are too low compared to the typical concentrations of H₂O₂ (0.1–0.7 M used in Fe³⁺ chemiluminescent method [19,21]).

DFOB (free and complexed), humic and phytic acids were tested because they are models of possible natural organic ligands for iron [38,39]. The exchange of iron between hemin and natural ligands might change the sensitivity of the method. This was not observed for the ligands tested in this study. The important role of O₂^{•–} in the mechanism of the detection reaction (Fig. 2) implies that this specie is a possible interferent in the determination of Fe–Py. Superoxide is inherently unstable, but the continuous production of O₂^{•–} can lead to steady state concentration. For example extracellular release of superoxide by phytoplankton with detectable superoxide concentrations in the culture media has been reported [40,41]. Photochemical reactions of dissolved organic matter can also produce superoxide [42]. Because SOD does not fully inhibit the non-peroxidative luminol reaction at pH 13 (see above), the addition of SOD in the sample at its natural pH (around 8 for seawater) can be used to eliminate the interference. Kustka et al. have reported that the addition of 10 U per 3 ml was enough to decrease the superoxide concentration by 95% [41]. This concentration of SOD reduces only by 14% the signal produced by a standard containing 3.5 nM of hemin.

None of the tested chemical species, with concentration similar to those expected in seawater gave strong interference. However, because the slope of the calibration curve is dependent

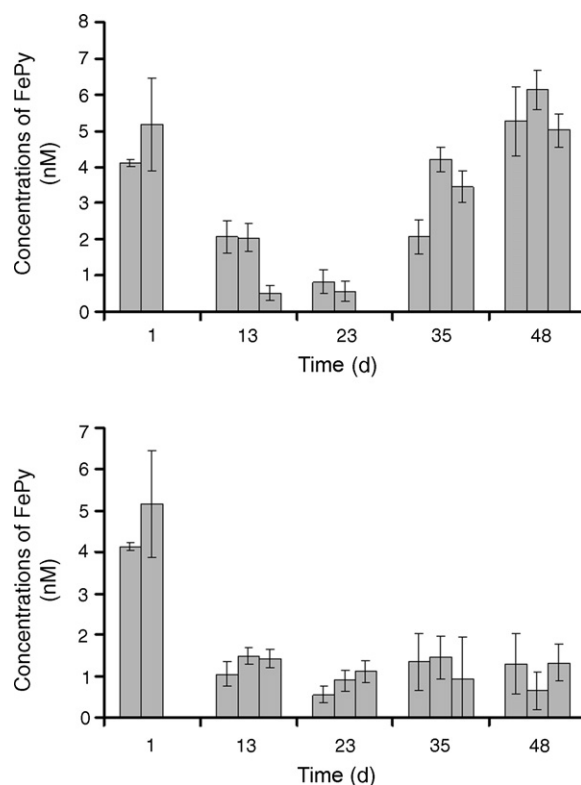


Fig. 4. Stability of the sample (filtered river water) during storage: (a) at ambient temperature and (b) frozen (–20 °C).

on the nature of the sample, standard additions are definitively required.

3.8. Storage of samples

The stability of the samples during storage was studied using water collected in the Rhône river. Different conditions of storage were tested: (i) the storage protocol used for iron binding ligand studies [10], where the sample is immediately filtered after sampling and stored at ambient temperature or frozen and (ii) the sample is poisoned with HgCl₂ stored at ambient temperature or frozen. The filtration is carried out just before analysis.

Fig. 4 shows the evolution of Fe–Py concentrations as a function of time when samples are filtered immediately after sampling and then stored at ambient temperature (Fig. 4a) or frozen (Fig. 4b). At ambient temperature, Fe–Py concentrations decreased from days 1 to 23 and then increased from days 23 to 48. The concentration in frozen samples decreased also between days 1 and 23, but remained constant for the next 20 days. Biological activity (bacteria and viruses) as well as abiotic processes like aggregation–desegregation or desorption–adsorption could be responsible for the lack of stability of the sample, but the exact causes of these changes remain unknown. In order to improve the storage protocol, we have stored unfiltered samples poisoned with HgCl₂. This protocol precludes biological activity and does not modify the initial speciation of the sample especially the balance between particles and dissolved species. The results are shown in Fig. 5. Despite some variability, the concentration in the samples was stable during 15 days whatever the tempera-

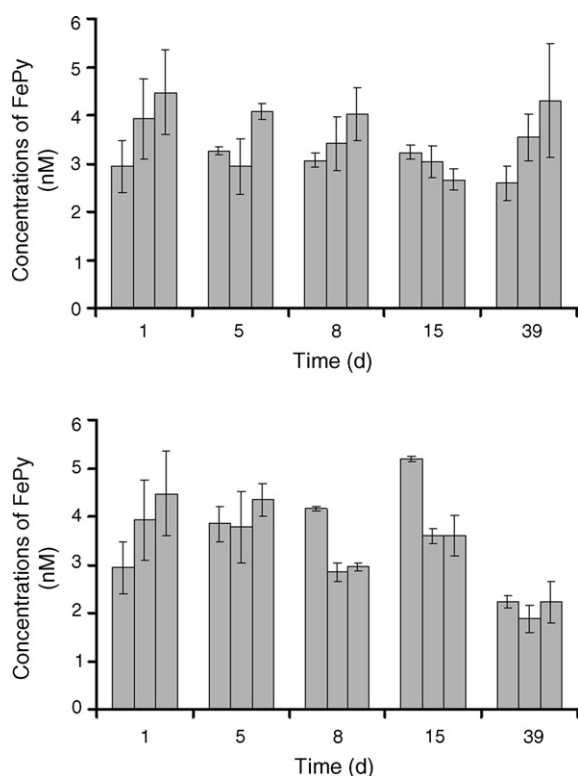


Fig. 5. Stability of sample (river water). Non-filtered and poisoned with HgCl_2 : (a) at ambient temperature and (b) frozen (-20°C).

ture of storage. At ambient temperature, a slight decrease was observed 39 days after sampling. This was not the case with the frozen samples.

3.9. Applications

3.9.1. Culture experiments

The aim of this experiment was to demonstrate that our analytical method could detect Fe–Py complexes like those biosynthesised by phytoplankton. During our culture experiment, carried out in duplicate, we determined intracellular content of Fe–Py-like complexes of 1.0×10^{-18} and 5.0×10^{-18} mol of equivalent hemin per cell. The exact amount of this kind of complexes within phytoplankton is not known accurately, but it can be roughly estimated. The iron content of cells growing under non-Fe limiting conditions was reported to be around 10^{-16} mol Fe cell $^{-1}$ [43]. Only one third of the atom (3×10^{-17} mol cell $^{-1}$) is likely associated with iron–protein [44]. Considering that Fe–Py protein are a fraction of the iron protein we found this number is likely an upper limit. For bacteria, direct measurements of hemeprotein (catalase or cytochrome *c*) have been reported in the range 10^{-19} to 10^{-20} mol cell $^{-1}$ [45,46]. Therefore, our measurements of the intracellular content of Fe–Py fall in this range. Recently, a new HPLC–spectrophotometric method for the direct determination of heme *b* content of planktonic organisms was reported [47]. In this study, the intracellular content of heme *b* of *D. tertiolecta* was of 2.41 nmol L $^{-1}$ with a cell abundance of 18×10^7 cell L $^{-1}$. The intracellular

Table 3
Fe–Py concentrations in natural waters

Sampling site	Salinity	Concentrations of Fe–Py (nM of equivalent hemin)
Austral ocean	33.8	Under LD
Guiana	30–34	2.1 ± 0.4
Berre	22	11.5 ± 1.3
Rhône	0	9.2 ± 0.9

quota is therefore of 1.34×10^{-17} mol heme *b* cell $^{-1}$. For the same phytoplankton we found a cellular quota in the range of $1\text{--}5 \times 10^{-18}$ mol FePy cell $^{-1}$. The agreement is good considering that the cellular quota very likely depend on the conditions (light, nutrient) prevailing during the culture. This comparison confirms that the FIA chemiluminescent method is a valuable tool for measuring Fe–Py-like complexes produced by living organisms.

3.9.2. Determination in natural waters

We have also applied the method to a few natural waters with different salinity. The results are summarised in Table 3. Fe–Py-like complexes were not detectable in the samples coming from the surface water of the Southern Ocean. Dissolved iron concentration, that includes all the dissolved organic and inorganic forms of iron, did not exceed 0.3 nM (Blain et al., in preparation). If Fe–Py were present in the sample, it could only be a fraction of 0.3 nM. Thus, the concentration of Fe–Py-like was below the limit of detection of our method. A pre-concentration step will be required for analysing open ocean waters. However, in pond and river waters, signal corresponding to 8 nM equivalents of hemin were measured. These results are encouraging because they indicate that Fe–Py might be present in natural waters with high iron and high organic matter contents.

4. Conclusions

This work presents the first FIA method for determining of Fe–Py-like complexes in natural waters. The complexes can be detected at the nanomolar levels without any major interferences. It will allow further studies of the biogeochemistry of these complexes in natural waters and represent a step forward to a better knowledge of iron speciation in aquatic environments.

Acknowledgements

This work was supported by INSU CNRS. We thank E. Gouze and P. Raimbault for providing the samples from étang de Berre and Rhone.

References

- [1] J.H. Martin, Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea (1992) 123–137.
- [2] H.J.W. de Baar, P.W. Boyd, K.H. Coale, M.R. Landry, A. Tsuda, P. Assmy, D.C.E. Bakker, Y. Bozec, R.T. Barber, M.A. Brzezinski, K.O. Buesseler, M. Boye, P.L. Croot, F. Gervais, M.Y. Gorbunov, P.J. Harrison, W.T. Hiscock, P. Laan, C. Lancelot, C.S. Law, M. Levasseur, A. Marchetti, F.J. Millero, J.

- Nishioka, Y. Nojiri, T. van Oijen, U. Riebesell, M.A. Rijkenberg, H. Saito, S. Takeda, K.R. Timmermans, M.J.W. Velduis, A.M. Waite, C.S. Wong, J. Geophys. Res. 110 (2005) 1–24.
- [3] P.L. Croot, M. Johansson, *Electroanalysis* 12 (2000) 565–576.
- [4] M. Gledhill, C.M.G. van den Berg, *Mar. Chem.* 47 (1994) 41–54.
- [5] E.L. Rue, K.W. Bruland, *Mar. Chem.* 50 (1995) 117–138.
- [6] J. Wu, G.W. Luther III, *Mar. Chem.* 50 (1995) 159–177.
- [7] M. Gledhill, C.M.G. van den Berg, R.F. Nolting, K.R. Timmermans, *Mar. Chem.* 59 (1998) 283–300.
- [8] A.E. Witter, G.W. Luther III, *Mar. Chem.* 62 (1998) 241–258.
- [9] E.L. Rue, K.W. Bruland, *Limnol. Oceanogr.* 42 (1997) 901–910.
- [10] C.M.G. van den Berg, *Mar. Chem.* 50 (1995) 139–157.
- [11] A. Witter, B.L. Lewis, G.W. Luther III, *Deep-Sea Res. II* 47 (2000) 1517–1539.
- [12] J. Granger, N.M. Price, *Limnol. Oceanogr.* 44 (1999) 541–555.
- [13] S.W. Wilhelm, C.G. Trick, *Limnol. Oceanogr.* 39 (1994) 1979–1984.
- [14] S. Kilz, C. Lenz, H. Budzikiewicz, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 281–290.
- [15] M. Gledhill, *Analyst* 126 (2001) 1359–1362.
- [16] P. McCormack, P.J. Worsfold, M. Gledhill, *Anal. Chem.* (2003) 2647–2652.
- [17] W.S. Caughey, *Annu. Rev. Biochem.* 36 (1967) 611–644.
- [18] P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, S. Forbes, P. Worsfold, *J. Luminescence* 16 (2001) 1–23.
- [19] H. Obata, H. Karatani, E. Nakayama, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1524–1528.
- [20] H. Obata, H. Karatani, M. Matsui, E. Nakayama, *Mar. Chem.* 56 (1997) 97–106.
- [21] J.T.M. de Jong, J. den Das, U. Bathmann, M.H.C. Stoll, G. Kattner, R.F. Nolting, H.J.W. de Baar, *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 113–124.
- [22] W.R. Seitz, D.M. Hercules, *Anal. Chem.* 44 (1972) 2143–2149.
- [23] D.W. King, H.A. Lounsbury, F. Millero, *J. Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 818–824.
- [24] D.W. O'Sullivan, A.K. Hanson, D.R. Kester, *Mar. Chem.* 49 (1995) 65–77.
- [25] R.T. Powell, D.W. King, W.M. Landing, *Mar. Chem.* 50 (1995) 13–20.
- [26] A.R. Bowie, E.P. Achterberg, R. Fauzi, C. Mantoura, P. Worsfold, *J. Anal. Chim. Acta* 361 (1998) 189–200.
- [27] S.J. Ussher, M. Yaqoob, E.P. Achterberg, A. Nabi, P. Worsfold, *J. Anal. Chem.* 77 (2005) 1971–1978.
- [28] M. Motsenbocker, Y. Ichimori, K. Kondo, *Anal. Chem.* 65 (1993) 397–402.
- [29] Z. Song, L. Wang, S. Hou, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 529–535.
- [30] R.R.L. Guillard, J.H. Ryther, *Can. J. Microbiol.* 8 (1962) 229–239.
- [31] R.R.L. Guillard, *Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates*, Plenum Press, New York, 1975.
- [32] G. Merényi, J. Lind, T.E. Eriksen, *J. Biolumin. Chemilumin.* 5 (1990) 53–56.
- [33] A.L. Rose, T.D. Waite, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5909–5920.
- [34] G. Merényi, J. Lind, 5th Symposium on Radiation Chemistry, 1983, pp. 103–108.
- [35] J. Lind, G. Merényi, T.E. Eriksen, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7655–7661.
- [36] P. O'Neill, S. Davies, E.M. Fielden, L. Calabrese, C. Capo, F. Marmocchi, G. Natoli, G. Rotilio, *Biochem. J.* 251 (1988) 41–46.
- [37] L.L. Klopff, T.A. Nieman, *Anal. Chem.* 55 (1983) 1080–1083.
- [38] J. Buffle, F.L. Greter, W. Haerdi, *Anal. Chem.* 49 (1977) 216–222.
- [39] A. Witter, D.A. Hutchins, A. Butler, G.W. Luther III, *Mar. Chem.* 69 (2000) 1–17.
- [40] J.A. Marshall, M. de Salas, T. Oda, G. Hallegraef, *Mar. Biol.* (2005) 541–549.
- [41] A.B. Kustka, Y. Shaked, A.J. Milligan, D.W. King, F.M.M. Morel, *Limnol. Oceanogr.* 50 (2005) 1172–1180.
- [42] A.L. Rose, A. Waite, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 2645–2650.
- [43] R.J.M. Hudson, F.M.M. Morel, *Limnol. Oceanogr.* 35 (1990) 1002–1020.
- [44] J.A. Raven, *New Phytologist*. 109 (1988) 279–287.
- [45] C.A. Miller, P. Vogelhut, *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1978) 813–816.
- [46] L. Ewetz, A. Thore, *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1978) 790–793.
- [47] M. Gledhill, *Mar. Chem.* 103 (2007) 393.

ANNEXE 4 : « Le Nouveau Chapitre de la thèse »
soutenu par l'Association Bernard Grégory

(écrit en juin 2007)

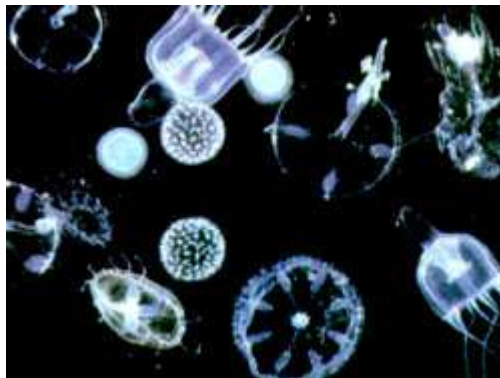
Valorisation des compétences – un nouveau chapitre de la thèse

par l' **Association Bernard Grégory**

(campagne JUIN 2007)

**CYCLE BIOGEOCHIMIQUE DES COMPLEXES FER-
PORPHYRINES DANS L'OCEAN :**

par Lilita VONG



Mentor : Catherine ECHENNE-PLACA

Ecole doctorale : Ecole des Sciences de l'Environnement Marin

Université : Université Aix-Marseille II

Cadre général, Enjeux et Présentation du projet de recherche :

Contexte général :

Les recherches menées ces dernières décennies ont démontré le rôle majeur des océans dans la régulation climatique. Ainsi, la recherche océanographique sous ses différents aspects physique, biologique et géochimique a pris une place prépondérante dans la compréhension du phénomène de réchauffement climatique.

À ce titre, une des principales problématiques scientifiques est d'appréhender la capacité des océans à séquestrer le gaz carbonique (CO₂) atmosphérique émis par les activités humaines. En effet, l'océan dispose de deux pompes pour soutirer le carbone de l'atmosphère. La première, physique, correspond à la plongée vers le fond d'eaux de surface chargées en carbone dissous. La seconde, biologique, résulte d'un processus de fixation du carbone par les organismes marins, comme lors de la photosynthèse du phytoplancton. Or, différentes études ont mis en évidence le fait que la croissance du phytoplancton serait limitée par la solubilité et la disponibilité du fer dans l'eau de mer, nécessaire au métabolisme du plancton végétal. Cette constatation revêt une importance primordiale car une augmentation de ce pompage biologique pourrait modifier le rôle des océans dans l'assimilation du carbone anthropique.

Une des solutions envisagées depuis le début des années 1990 pour absorber une partie du CO₂ et limiter ainsi le réchauffement climatique, est la technique de "fertilisation" artificielle des océans, qui consiste à répandre du fer sous forme de sulfate de fer dans certaines régions de l'océan afin d'y favoriser la croissance du phytoplancton.

Toutefois, les choses ne sont pas si simples et la biogéochimie du fer dans les océans reste encore largement inconnue. Nous savons que les formes naturelles de fer présent dans les eaux de mer sont plus complexes et diverses que celle du fer apporté lors de fertilisations artificielles. Le fer est complexé à des ligands organiques qui le rendraient plus facilement assimilable par le phytoplancton, mais ces ligands n'ont pas été caractérisés chimiquement.

Des limitations techniques telles que les faibles concentrations en fer dans l'eau de mer, les risques de contamination par le fer ambiant lors de l'étape de prélèvement, ou encore le manque de méthodes analytiques adéquates, sont à l'origine de nos lacunes actuelles dans la compréhension de la biogéochimie du fer.

Mon projet de thèse s'est inscrit dans ce contexte particulier, il avait pour but de caractériser un type de ligands supposés du fer, les porphyrines, jusqu'alors non mesurées dans l'eau de mer.

La thèse dans son contexte :

Ce projet comportait deux objectifs principaux, le premier d'ordre technique et le second d'ordre appliqué :

- La mise au point d'une méthode de dosage des complexes fer-porphyrines. Pour cela, nous avons choisi comme stratégie d'adapter une réaction de chimiluminescence déjà utilisée en milieu biomédical pour des analyses dans l'eau de mer,

- L'étude biogéochimique des porphyrines en milieu marin naturel ou en laboratoire par la technique nouvellement développée. Ceci afin de déterminer les processus de relargage par le phytoplancton des porphyrines dans le milieu environnant.

Les travaux expérimentaux ont été réalisés dans l'UMR CNRS 6535 – Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie (LOB) basée sur le campus de Luminy de l'université de la Méditerranée (Aix-Marseille II).

Le LOB est organisé autour de 2 équipes. La première se penche sur l'étude des processus physiques et des réponses biologiques dans l'environnement côtier. La seconde s'occupe des cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du phosphore, silicium et du fer en relation avec la structure fonctionnelle des communautés pélagiques. C'est au sein de cette deuxième équipe que je me suis intégrée lors de ma thèse, sous la direction du Professeur Stéphane Blain.

Ce projet a été soutenu par des financements publics. Lors de ce travail de thèse de doctorat, j'ai bénéficié d'une allocation de recherche attribuée par le Ministère délégué à l'Enseignement supérieur et à la Recherche. La logistique nécessaire à l'expérimentation a été supportée par les fonds de l'Institut National des Sciences de l'Univers (INSU), du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), puis de l'Institut Paul Emile Victor (IPEV) pour la campagne océanographique.

Les choix du projet de thèse :

Motifs professionnels :

D'un point de vue scientifique, ce travail est une possibilité de répondre à des questions essentielles en biogéochimie et de faire progresser les connaissances actuelles sur la complexation organique du fer. À long terme, je souhaite qu'il me permette une meilleure compréhension du contrôle de la production phytoplanctonique.

De plus, cette étude a l'avantage d'aborder la problématique posée, d'une manière novatrice, par la mise au point d'une nouvelle technique permettant l'exploration d'un champ de recherche jusqu'alors méconnu. La maîtrise de cette technique m'apporte ainsi une expertise technique dans ce domaine, ce qui pourrait, je l'espère, m'être profitable pour le développement de ma future carrière.

Motifs personnels :

La raison principale de mon attachement à ce projet scientifique est avant tout un profond intérêt personnel pour ce domaine de recherche : la biogéochimie marine. En effet, c'est lors de ma formation universitaire à l'Institut Universitaire Européen de la Mer de l'Université de Bretagne Occidentale que j'ai reçu mes premiers cours de biogéochimie. Passionnée par cette approche de l'océanographie, j'ai complété ma formation par le DEA de biogéochimie du Centre Océanologique de Marseille, Université d'Aix-Marseille II. L'étude du fer dans l'océan dans le cadre d'un projet de thèse universitaire m'apparu alors comme une

opportunité unique d'acquérir un maximum de connaissances sur les processus qui régissent le fonctionnement de l'océan, et de satisfaire ainsi ma curiosité personnelle.

La campagne en mer, proposée dans le cadre de ce travail, a également été l'occasion de satisfaire une envie déjà très prononcée pour les écosystèmes polaires. Etant étudiante à Brest, je m'étais déjà renseignée par le passé pour le volontariat en terres australes, organisé par l'Institut Paul Emile Victor (IPEV), à l'époque encore appelé Institut Français pour la Recherche et la Technologie Polaire (IFRTP).

Déroulement, gestion et coût du projet :

La préparation du projet :

La préparation du projet KEOPS a été bien préparée 2 ans avant par Stéphane blain.

La conduite du projet et réaction du candidat :

Les différentes étapes du projet :

La première étape fut la préparation et la participation à une campagne océanographique dans l'océan austral, près des îles Kerguelen et à bord du navire océanographique *Le Marion Dufresne*. Cette campagne, d'une durée de 1,5 mois, a commencé dès le début de ma thèse. Aussi, dès mon arrivée au laboratoire, j'ai immédiatement entrepris des expériences de mise au point de la méthode analytique destinée à donner les premières concentrations en fer-porphyrines dans l'eau de mer. J'ai également préparé la campagne par l'estimation et la préparation des réactifs et consommables que j'allais utiliser à bord. Cette préparation a demandé de l'attention car les oublis ne sont pas pardonnés pour des longs séjours en mer. Une fois la campagne démarrée, l'application de la méthode fut décevante en raison des concentrations de fer-porphyrines dans l'eau de mer inférieures à la limite de détection de la méthode. Les moyens étant limités à bord d'un navire, j'ai néanmoins réalisé d'autres tests pour essayer d'augmenter la sensibilité de la méthode, avec les réactifs disponibles à bord, mais sans succès. La première partie de cette thèse fut la plus éprouvante car on y apprend à gérer sa frustration et le jugement des autres.

La deuxième étape fut la validation de la méthode. La méthode n'ayant pas été assez précise lors de la campagne, de multiples tests ont été effectués au laboratoire pour tenter de diminuer la limite de détection. Des tests sur d'interférence, de conservation, d'étude de spécificité de la méthode ont été effectués. L'application de cette dernière s'est faite sur des eaux plus chargées, eaux naturelles de salinités différentes ou eaux de mer issues de culture phytoplanctonique. Cette partie a duré 1 an et s'est finalisée par une publication validant ainsi la méthodologie de dosage des fer-porphyrines dans l'eau de mer.

La troisième partie fut l'application de la méthode à des cultures de micro-organismes marins. Cette partie est celle qui demande le plus de travail en raison de la maintenance des cultures, mais surtout en raison des expériences relativement lourdes et étalées dans le temps. Cette partie m'a demandé une grande patience et une endurance physique car les suivis de

cultures sont longs. En cas de résultats peu concluants lors de ce type d'expériences (qui sont souvent des expériences de tâtonnement), il faut avoir de l'énergie pour se re-motiver physiquement et moralement, et même dans le cas où il pourrait y avoir des facteurs environnementaux défavorables.

Coût du projet :

FINANCEMENT DE THESE :

	Statut	Salaires euros
Directeur de thèse	Professeur, HDR	154 800
Moi-même	Doctorat	50 400
	Monitorat	12 066
TOTAL :		260 217 euros

DEPENSES ASSOCIEES AU PROJET DE THESE :

	Coût euros
Déplacements (colloques, campagnes en mer...)	
Déplacement à La Réunion	500
Congrès « Ocean Sciences meeting » à Hawaii	1500
Congrès des doctorants à Marseille	150
Doctoriales	200
Matériels dédiés à bureautique (ordinateur)	1600
Matériels dédiés à l'expérimentation	
Equipement d'analyse (vanne, FIA, bain marie...)	
Petits consommables (réactifs, pipettes, cônes...)	11 000
Coût du navire (campagne océanographique)	1 600 000
TOTAL : 1 614 250 euros	

Compétences et savoir faire, qualités professionnelles et personnelles :

SAVOIR SCIENTIFIQUE

Au cours de ma formation universitaire, j'ai pu acquérir des connaissances scientifiques diversifiées dans les domaines généraux de la biologie et de la chimie à l'université Henri Poincaré (Nancy) avec une licence de biochimie. Mes connaissances scientifiques se sont ensuite précisées dans les sciences marines à l'université de Bretagne Occidentale (Brest) avec une licence de biologie des organismes et une maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes, mention milieu marin. Ma spécialisation en biogéochimie marine s'est définie à l'Université de la Méditerranée (Marseille) avec le DEA des sciences de l'environnement marin option biogéochimie.

Toutes ces connaissances théoriques ont pu être mises à profit lors de ces trois années de doctorat. Elles ont trouvées leurs prolongements dans certaines disciplines telles que la microbiologie et la chimie marines. Le travail de thèse m'a aujourd'hui permis d'acquérir des connaissances plus approfondies sur la biogéochimie et particulièrement sur la biogéochimie du fer dans l'océan.

SAVOIR FAIRE

La conduite de cette thèse a également fait appel à divers savoir-faires, les premiers étant techniques et les seconds étant complémentaires.

Savoir-faire technique :

- Analyse d'injection en flux et détection par chimiluminescence
- Techniques de marquage et d'observation en microscopie à épifluorescence
- Dosage de chlorophylle
- Préparation et maintien de culture de bactéries marines, phytoplancton et microzooplancton.

Savoir-faire complémentaire :

Méthodologie de gestion de projet :

Le travail de thèse est un véritable projet en soi, avec des objectifs à définir et à atteindre, tout en respectant du mieux que possible les contraintes de temps qui sont inféodées à ces derniers. Ainsi, lors de ce travail, l'évaluation continue des résultats obtenus a permis de redéfinir quand il le fallait de nouveaux objectifs et de rebondir également sur de nouvelles stratégies pour les atteindre. Cette démarche a ainsi permis de concrétiser tous les travaux de recherche menés sur la partie de mise au point de la méthode par la sortie d'une publication dans une revue internationale de chimie analytique.

Gestion de l'information et communication :

Les années de thèse permettent par ailleurs de travailler certaines capacités à chercher, intégrer, stocker et communiquer les informations. En effet, en tant que doctorante j'ai été amenée au cours de mes travaux à m'informer dans mon domaine par la recherche de publications. Différents exercices m'ont permis d'acquérir et de développer certaines compétences telle que la transmission d'informations sous forme de publications, de poster ou de communications orales internes, ceci en faisant appel à un travail sur les capacités de synthèse, de rédaction et oratoire. L'expérience d'enseignement acquise par le monitorat m'a également été profitable car elle a mis l'accent sur le réel souci d'être bon pédagogue et m'a incitée à travailler au mieux mon expression orale.

Travail en équipe :

Apprendre à travailler parmi et avec les autres a également été une aptitude que j'ai apprise à développer au cours de mon doctorat. La gestion de la relation avec les autres s'est faite aussi bien dans le quotidien du laboratoire que dans des espaces clos tels que les navires océanographiques (1,5 mois en mer). Dans cette véritable expérience professionnelle qu'est la thèse, on apprend à gérer un éventail de personnalités : d'âge, de cultures et de fonctions différentes. On apprend à gérer des difficultés relationnelles et à essayer d'interagir positivement avec.

Par ailleurs, j'ai pu également participer à l'encadrement d'un stagiaire de master 1, Mathias Girault, venu travailler 1 mois au laboratoire. Ceci m'a permis de tester mes capacités à manager le travail d'une autre personne.

Gestion du temps :

Le travail en laboratoire est semblable au travail en entreprise, avec une attente de production de résultats dans des délais imposés. La gestion du temps pendant le travail de thèse a également été travaillée au mieux.

Savoir faire à l'achat et gestion administrative :

En tant qu'expérimentatrice, on est amené à prévoir régulièrement de nouveaux protocoles de manipulation. Cela nécessite une recherche et un inventaire des divers produits à utiliser lors de la mise en œuvre des prochaines expériences : réactifs chimiques, consommables de laboratoire... ainsi, mon travail de thésard consistait aussi à gérer des stocks de divers produits nécessaires au bon déroulement de mes manipulations, de m'occuper des commandes auprès des fournisseurs et de la réception des produits. Avec cette tâche, la prise en contact avec des commerciaux a été indispensable et fréquente.

Compétences linguistiques :

L'anglais est la principale langue de communication d'informations scientifiques. Même si je ne suis pas bilingue aujourd'hui, j'ai quand même pu travailler la compréhension de mon anglais scientifique au cours de lecture de publications. J'ai également participé à un congrès international.

SAVOIR ETRE

Les trois années passées ont permis de révéler des savoir être.

Autonomie :

J'ai rapidement appris à être autonome dans le travail en laboratoire. J'ai appris à rechercher les informations pratiques auprès de différentes sources ou de chercheurs et doctorants afin de pouvoir mener à bien mes projets et expériences. De cette façon, j'ai pu intégrer dans ma thèse des études sur des cultures de bactéries marines, de phytoplancton et plus récemment de micro-zooplancton.

Détermination et rigueur :

De manière générale, pour conduire un projet d'une durée relativement longue (3 ans), il faut avoir de la détermination. La rigueur scientifique doit également être de mise, notamment lors de la mise en place et de la critique d'expériences. Au cours de ces années, il faut savoir maintenir sa détermination même dans des conditions qui peuvent être peu encourageantes. Ceci a été le cas lors de la campagne océanographique où aucune concentration de fer-porphyrines n'a pu être déterminée, ou de façon plus récurrentes, lors d'expériences de mise au point de la méthode et de mise en place de culture.

Adaptabilité :

Ce travail de thèse a révélé également ma capacité à m'adapter à techniques de travail comme la mise au point de méthode de dosage.

Mais également au niveau relationnel, j'ai appris à m'adapter aux différentes personnalités rencontrées lors du travail et à gérer les quelques relations conflictuelles rencontrées.

Bilan et impact de la thèse en terme de pistes professionnelles :

BILAN ET IMPACT DE LA THESE :

Ces trois années de thèse ont contribué à la mise au point d'une première méthode de dosage des complexes fer-porphyrines dans l'eau de mer. De ce fait, le laboratoire possède à ce jour une technique d'analyse qui n'existe pas ailleurs, et bénéficie ainsi d'une approche originale pour appréhender complexation organique du fer dans l'océan, et donc sa solubilité et sa biodisponibilité vis-à-vis du phytoplancton.

D'un point de vue scientifique, les progrès techniques sont souvent un encouragement à de nouvelles découvertes et à l'introduction de nouveaux concepts. Bien que le travail effectué pendant ces trois années de thèse n'a pas la prétention de définir de nouvelles théories sur la complexation organique, il constitue néanmoins le début à des études plus poussées sur le rôle des porphyrines dans l'eau de mer dans le développement des espèces planctoniques.

PISTES PROFESSIONNELLES :

Désirant m'orienter dans un premier temps vers la recherche académique et l'enseignement, la réalisation de cette thèse m'a apporté une expérience préliminaire dans ces deux domaines, avec d'une part la recherche menée en laboratoire universitaire et d'autre part avec le monitorat. Cela a permis de confirmer un peu plus l'orientation que je souhaiterais donner à ma future carrière professionnelle. Il me paraît dès lors indispensable de faire fructifier les bases professionnelles que m'a apportées ma formation de la meilleure manière possible, afin de pouvoir donner cette orientation à ma carrière.

Ainsi, je me suis activement mise à la recherche d'un post-doctorat que j'espère réaliser à l'étranger dans un pays anglophone. Cette expérience devrait me permettre :

- i) de parfaire ma culture scientifique en explorant de nouvelles voies dans le même domaine de recherche,
- ii) d'apprendre d'autres manières travailler en évoluant dans une autre équipe que j'espère la plus cosmopolite possible,
- iii) et enfin, de maîtriser l'anglais, langage scientifique international et donc indispensable à la poursuite d'une carrière professionnelle ambitieuse.

Toutefois, si les événements devaient prendre une autre orientation sachant que les offres d'emploi sont bien inférieures à la demande, je reste intéressée par :

- i) le journalisme scientifique, et ainsi permettre, grâce à ma culture et mon expérience scientifiques, la vulgarisation de problématiques complexes pour les rendre accessibles au plus grand nombre,
- ii) ou le travail en ONG en tant que « chargé de mission » ou « volontaire », ONG ciblées sur la protection de l'environnement ou sur l'éducation et l'enseignement.

Résumé

La biodisponibilité du fer est un facteur limitant de la production phytoplanctonique dans de nombreuses régions océaniques. Le fer dissous ($<0,2 \mu\text{m}$) consommé par les micro-organismes est complexé à 99 % par des ligands organiques dont l'origine et la nature chimique restent peu connues.

Les porphyrines, molécules ubiquistes synthétisées par tous les organismes, sont capables de chélater le fer, sous la forme de complexes fer-porphyrines. A la mort des organismes, ces complexes pourraient donc être libérés dans l'eau de mer en tant que produits de dégradation cellulaire et pourraient participer à la complexation organique du fer. L'objectif de ce travail de thèse est donc de tester cette hypothèse.

La première partie consistait à mettre au point une première méthode de dosage correspondant à une analyse par injection en flux et détection par chimiluminescence (FIA-CL). Un protocole a été développé pour l'analyse d'échantillons d'eau de mer. Des tests d'interférences suggèrent que la FIA-CL est bien spécifique aux complexes fer-porphyrines. Plusieurs tests d'augmentation de la sensibilité ont permis d'atteindre une limite de détection de 0,11 nM d'équivalent hémine (fer-porphyrine de référence). Des premières concentrations en fer-porphyrines ont ainsi pu être déterminées dans différents types d'environnements naturels (eau de mer, eau douce et eau intermédiaire) riches en matière organique.

La seconde partie visait à étudier un processus de relargage des fer-porphyrines, tel que le broutage du phytoplancton par le zooplancton. Lors de cette étude, l'existence d'une interférence provoquée par les radicaux superoxyde générés lors de la croissance du phytoplancton a été mise en évidence, lors de la mesure des fer-porphyrines. Un protocole d'élimination de ces interférences a donc été établi. Par des expériences de culture, avec un modèle simple « phytoplancton-zooplancton », la libération des fer-porphyrines dans l'eau de mer a pu être mise en évidence.

Ce travail de thèse pourra permettre d'étudier le devenir des fer-porphyrines dans l'eau de mer et leur rôle dans la complexation organique du fer.