

14 janvier 2008

**SPECIATION CHIMIQUE DU FER DANS L'OCEAN :**

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

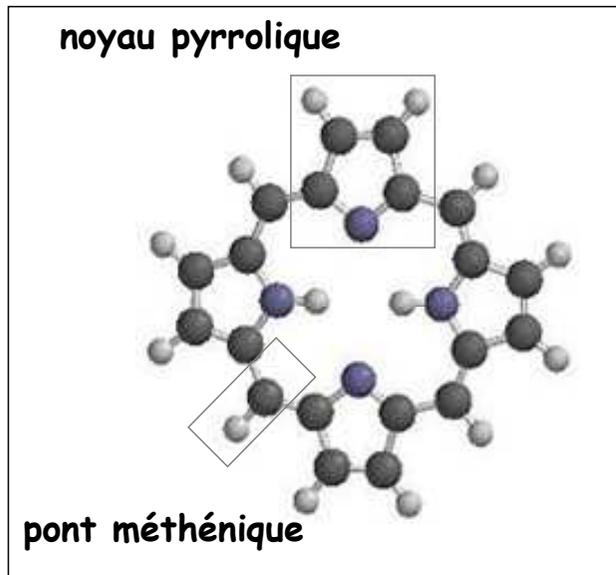
Soutenance de thèse  
présentée par **Lilita VONG**



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

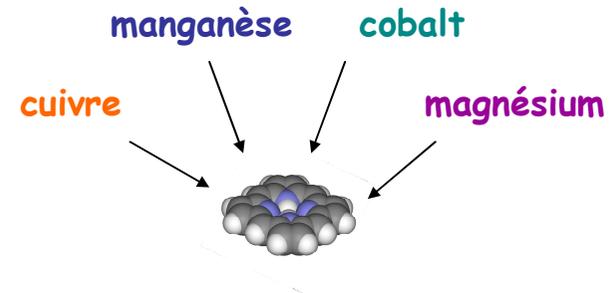
## Qu'est-ce qu'un complexe fer-porphyrine ?

### STRUCTURE COMMUNE DES PORPHYRINES



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

### METALLO-PORPHYRINES



### FER-PORPHYRINES

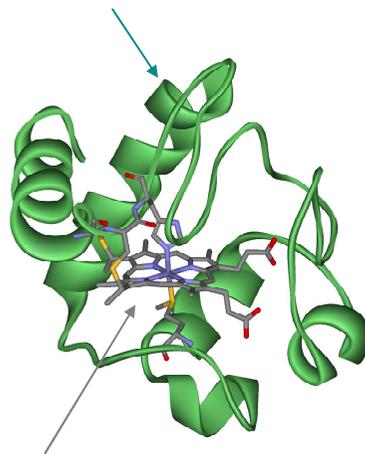


(ECHANGEURS D'ELECTRONS)  
Rôle dans les réactions biochimiques

## Rôles dans les fonctions physiologiques

ENZYME contenant  
une fer-porphyrine :

partie protéique



fer-porphyrine

## Exemples de complexes fer-porphyrines

Catalases

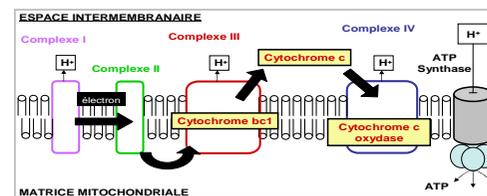
Peroxydases

Cytochromes (a, a<sub>3</sub>, b, b<sub>6</sub>, c, c<sub>1</sub>, d<sub>1</sub>, f, P450)

Hémoglobine, myoglobine

## Rôles clés dans les fonctions physiologiques

Chaînes de transfert d'électrons  
(respiratoires et photosynthétiques)

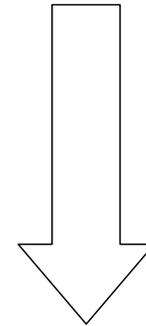


Élimination des radicaux libres  
Stockage et transport d'oxygène  
... etc.

## Les fer-porphyrines : des molécules ubiquistes

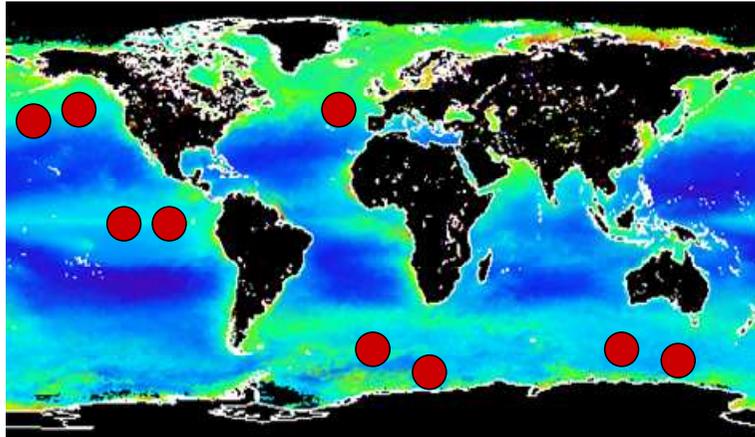


Lorsque ces organismes meurent, le contenu de leur(s) cellule(s) est libéré dans le milieu extérieur...



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

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



**Limitation en FER**

40 % de la surface  
océanique mondiale

La croissance du phytoplancton peut être limitée par le fer

LE PROBLEME :



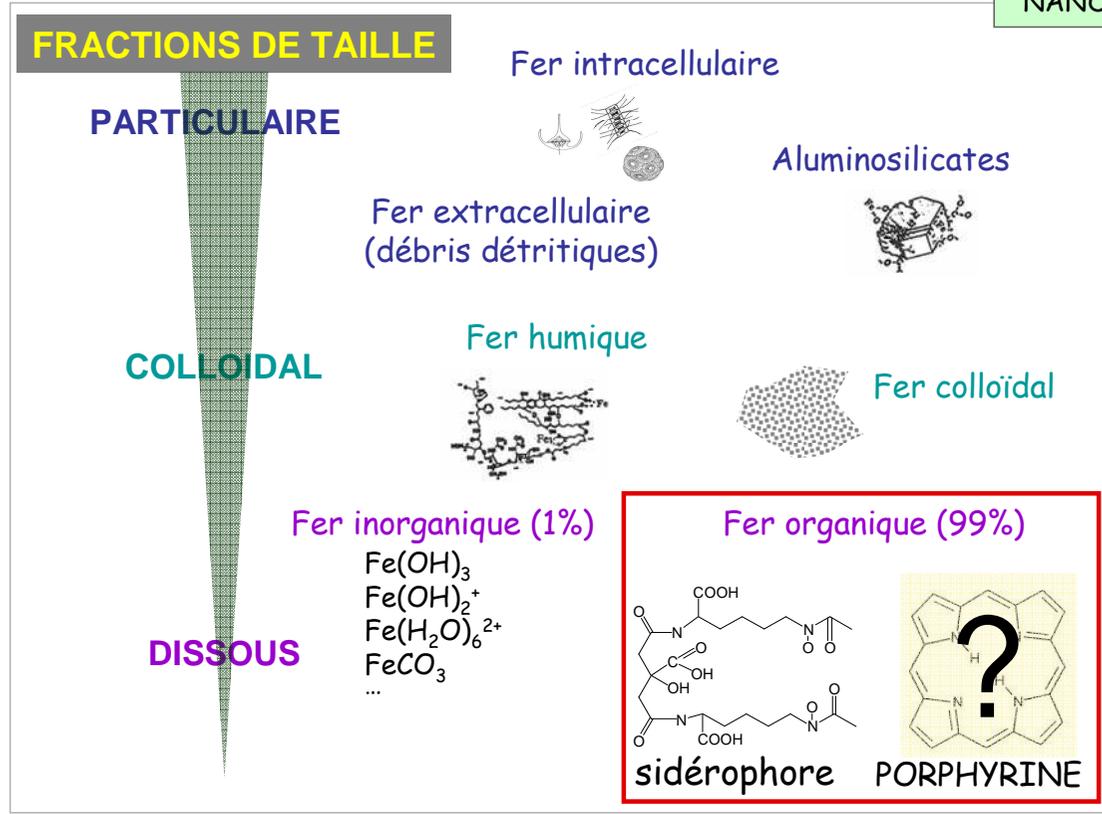
La biodisponibilité en fer  
est TRES PEU CONNUE



RESOUDRE LA  
SPECIATION CHIMIQUE du fer

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

Ordre du NANOMOLAIRE



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

**Objectifs :**

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

Objectif 1:

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

Objectif 2:

Étudier un mécanisme de production des fer-porphyrines.

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

**Le point de départ ...**

Le luminol



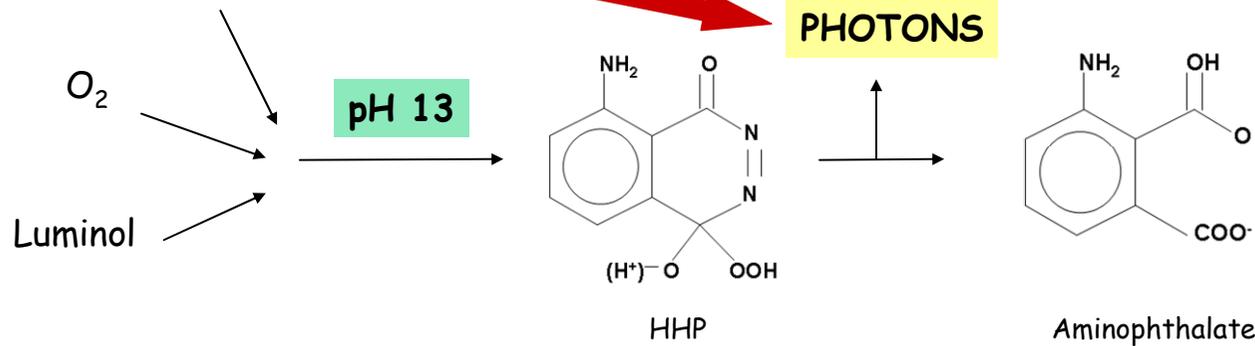
Réaction de chimiluminescence avec l'hémoglobine



Pour des tests d'immuno-essais:

(Motsenbocker et al., 1993)

METALLOPORHYRINES  
(fer-porphyrines)



**Quelles sont les principales exigences de ce développement analytique ?**

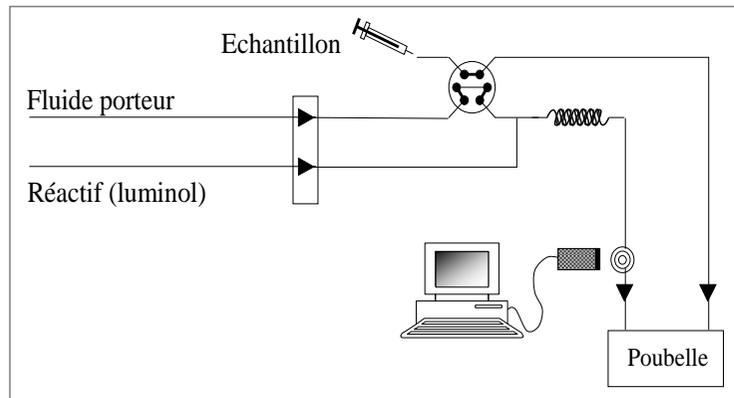
Pour être utilisée en océanographie, la réaction doit être :

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

Peut-on appliquer la réaction de chimiluminescence en FIA ?

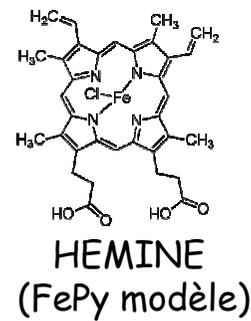
étape 1

FIA = Analyse par injection en flux



**Avantages :**

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



**CALIBRATION avec l'HEMINE**

- Commercialisée
- Soluble



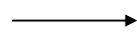
**nM d'équivalent hémine**

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

étape 2

**SANS TRAITEMENT** ... **NON**

**pH 13**



**Formation de précipités:**

Incompatibles avec la FIA

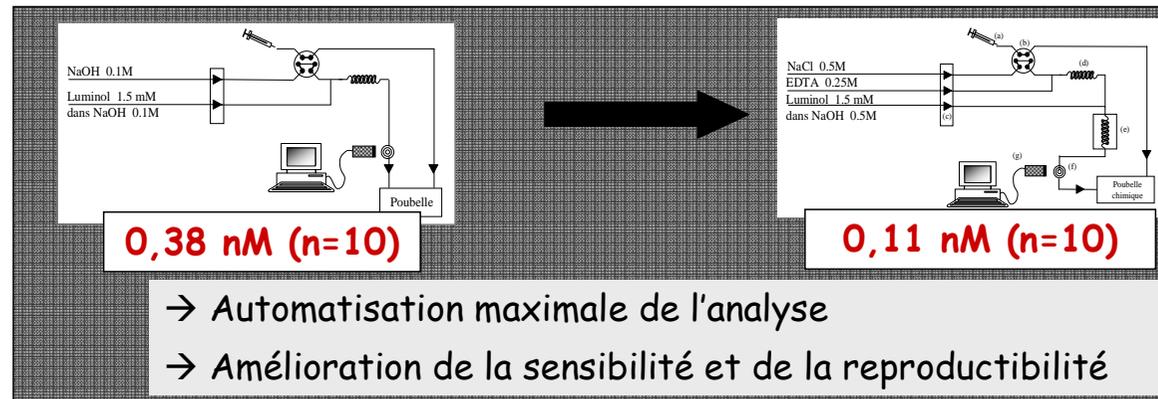
Risque d'adsorption des fer-porphyrines

**AVEC TRAITEMENT** ... **OUI**

**Hors ligne**

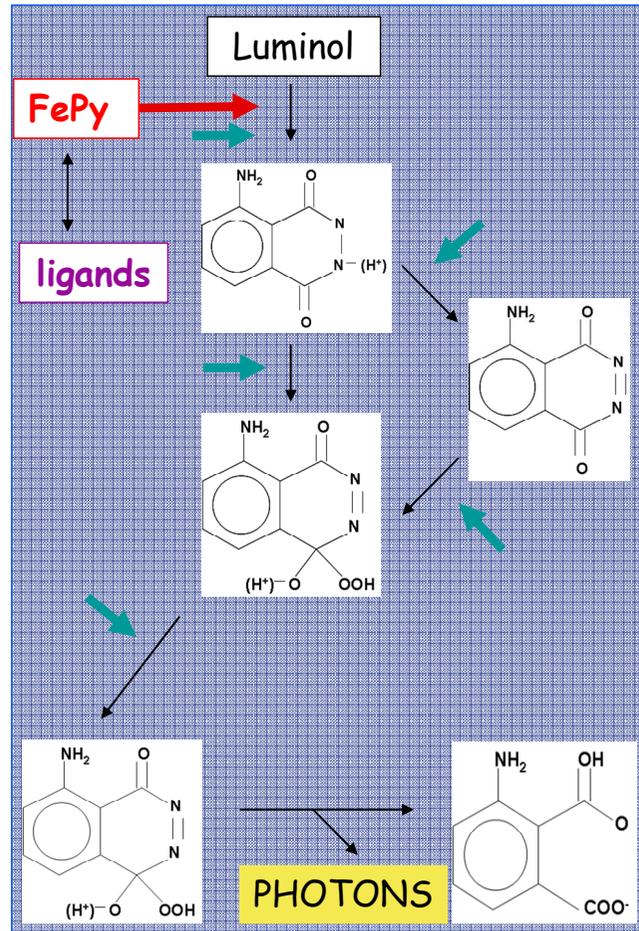
→ Utilisation de l'EDTA qui empêche la précipitation

**En ligne**



La FIA est-elle spécifique aux fer-porphyrines?

étape 3



Tests de spécificité :

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

➔ **PAS D'INTERFERENCES !**

Application de la FIA ?

étape 4



*Dunaliella tertiolecta*  
PHYTOPLANCTON

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



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



Spectrophotométrie (Gledhill, 2007)

!! PREMIERES CONCENTRATIONS EN MILIEU NATUREL !!

~ 9 nM (Rhône)

~ 11 nM (Etang de Berre)

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

(Océan austral)

< LD



(En phase dissoute)

**Conclusions :**

... a-t-on répondu à nos objectifs ?

Pour être utilisée en océanographie, la réaction doit être :

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

## La suite de ce travail

### BILAN POSITIF :

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

Limite de détection : 0,11 nM équivalent hémine

#### 1<sup>ère</sup> possibilité:

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

#### 2<sup>ème</sup> possibilité:

ETUDE DES MECANISMES DE PRODUCTION de FePy  
(cultures)

**PARTIE 2**  
Étude de mécanismes  
de production des fer-porphyrines

**Quel mécanisme choisit-on d'étudier ?**

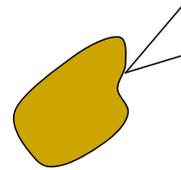
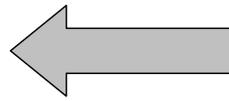
**LA PREDATION (=LE BROUTAGE)**

MODELE SIMPLE : Phytoplancton - Microzooplancton



Phytoplancton

Phagotrophie



Microzooplancton

Cause de mortalité  
souvent dominante  
dans le domaine  
pélagique

**CULTURES NON AXENIQUES**

Phytoplancton



*Dunaliella salina*  
CHLOROPHYCEE

Prédateur associé

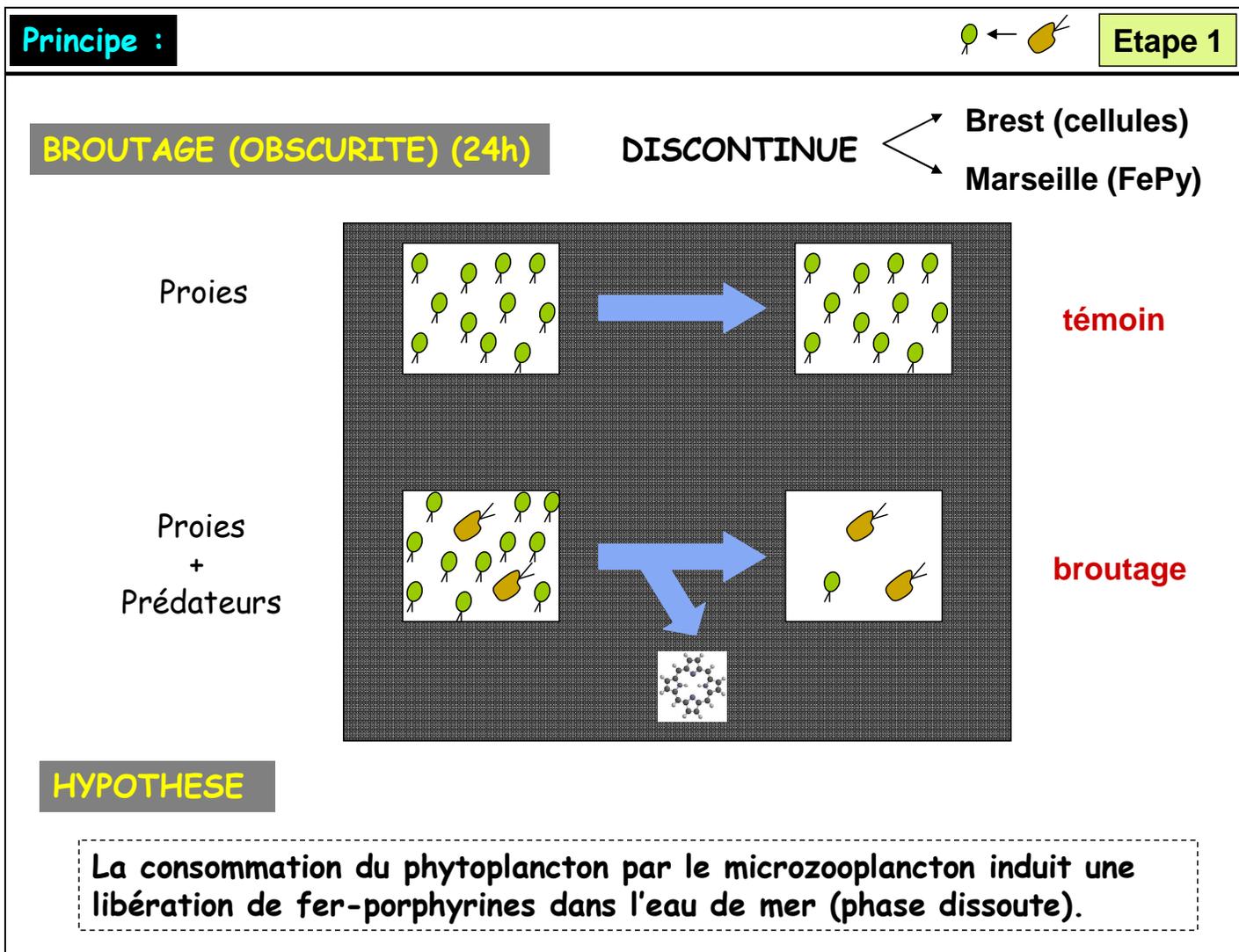


(5 fois plus gros)

Microzooplancton



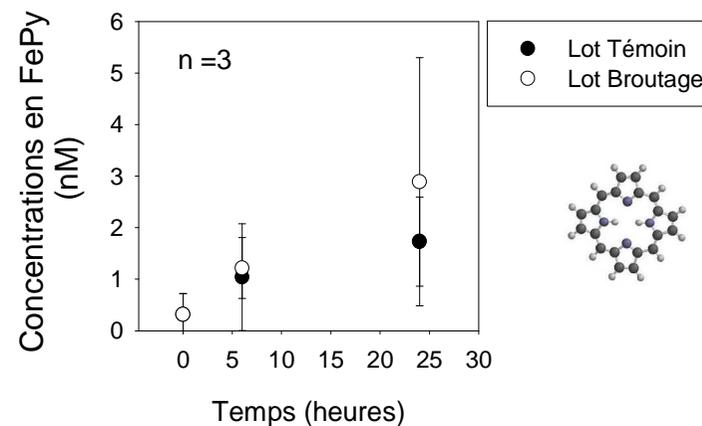
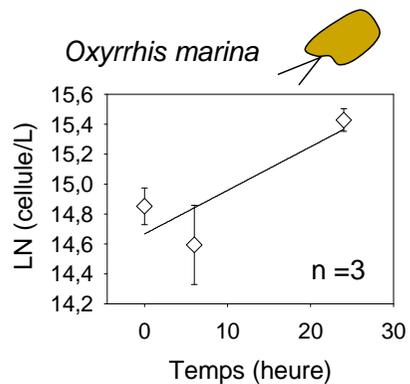
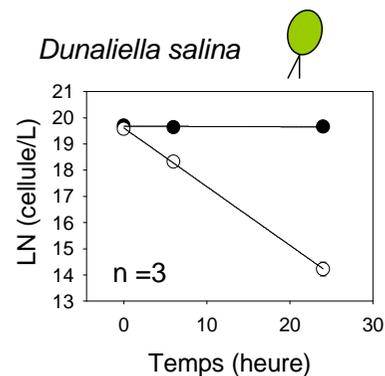
*Oxyrrhis marina*  
DINOPHYCEE



Résultats et discussion :



Etape 1



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

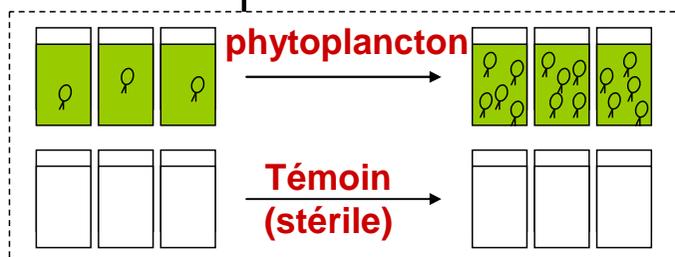
Libération de fer-porphyrines dans les cultures de phytoplancton

CONSOMMATION du phytoplancton par le microzooplancton

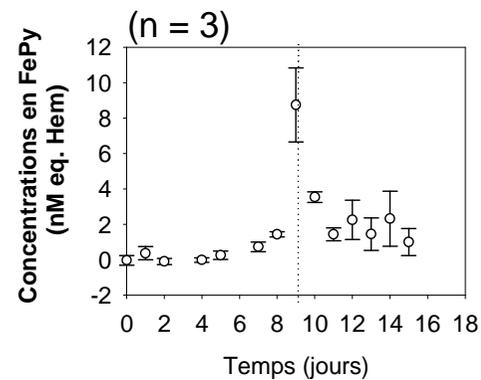
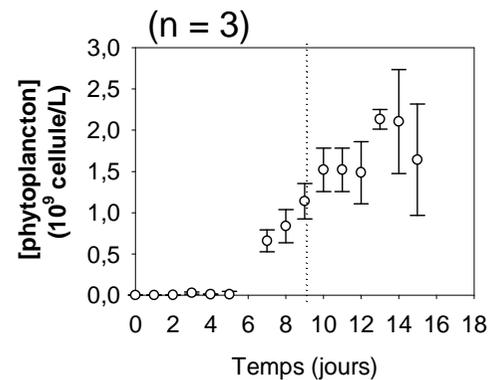
**Principe et résultats:**

**Etape 2**

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

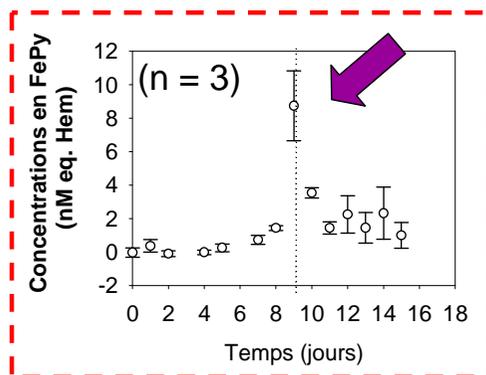


Production de fer-porphyrines  
lors de la phase exponentielle



**Discussion :**

Etape 2



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

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

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

0,3 à 1,4

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

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

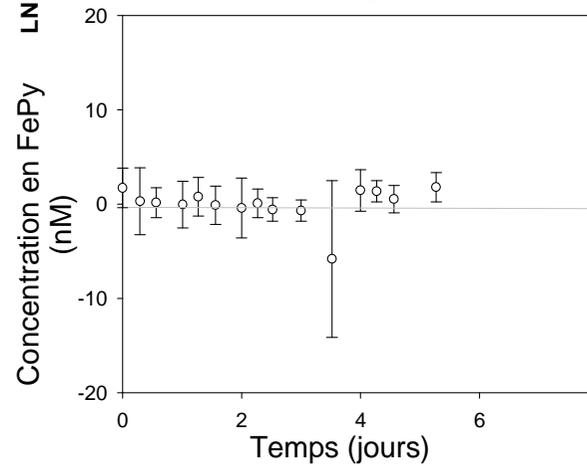
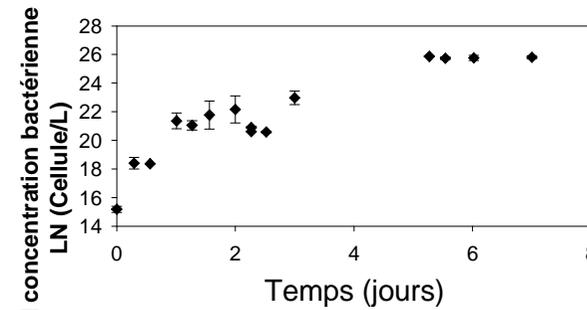
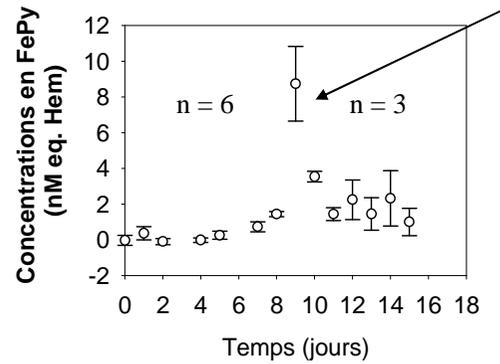
→ HYPOTHESE 2 : Une interférence chimique (chimiluminescence)?

Hypothèse 1 : production par les bactéries ?



Etape 3

**HYPOTHESE 1:**  
Une production par les bactéries ?

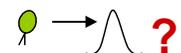


Bactéries

**NON**



**Hypothèse 2 : existence d'un interférent ?**

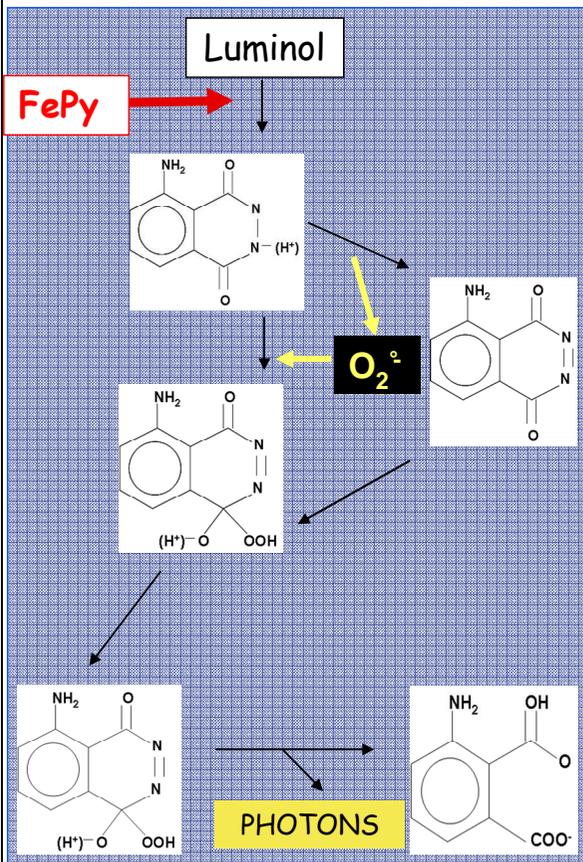


**Etape 3**

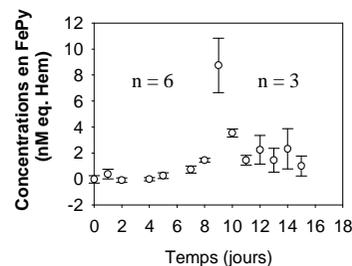
**1<sup>er</sup> INDICE:**

intervient dans l'oxydation du luminol...

... si oui, quel est-il ?



**2<sup>ème</sup> INDICE:**



produit pendant la phase exponentielle...

**3<sup>ème</sup> INDICE:**

**Le radical superoxyde**

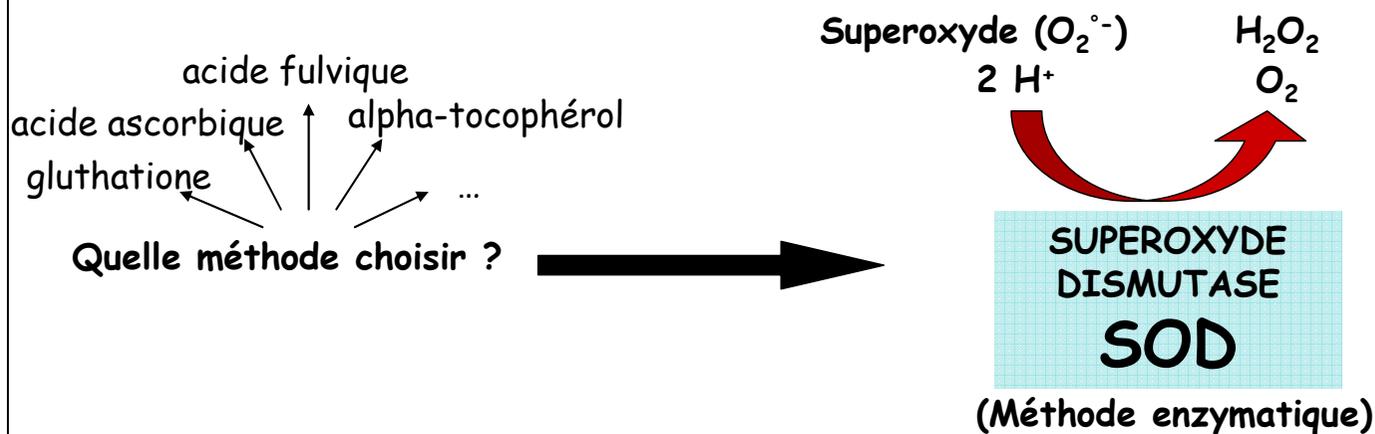
Production par le phytoplancton de superoxyde (phase exponentielle)

(Marshall et al., 2005)

## Comment éliminer les radicaux superoxydes ?



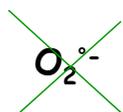
Etape 3



### MISE AU POINT: PROTOCOLE D'ELIMINATION DES SUPEROXYDES

pH eau de mer

SOD active



pH 13

SOD inactive

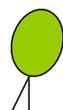
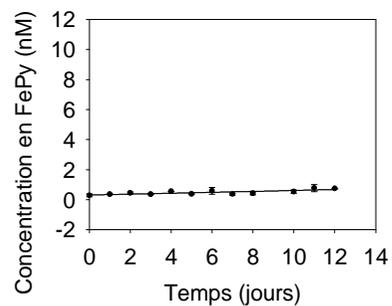
La SOD n'empêchera pas la chimiluminescence  
provoquée par les fer-porphyrines

Vérification :

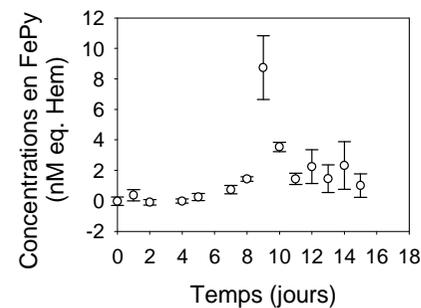


Etape 3

**AVEC SOD**



**SANS SOD  
(résultat précédent)**



**DONC :**

**INTERFERENCE AVEC LES SUPEROXYDES (ARTEFACT)**

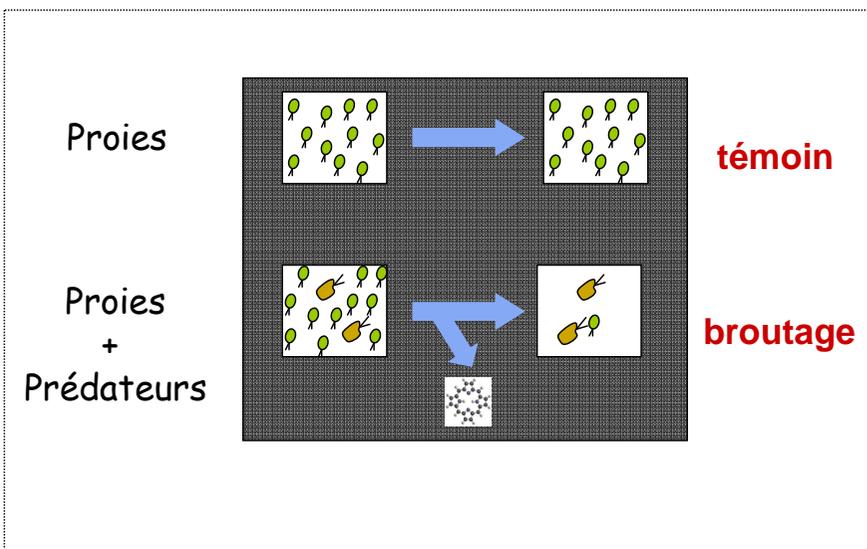
**Principe :**



Etape 4

**EXPERIENCE DE BROUTAGE**

CONTINUE: Marseille (cellules + FePy)



+ SOD

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

**HYPOTHESE**

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

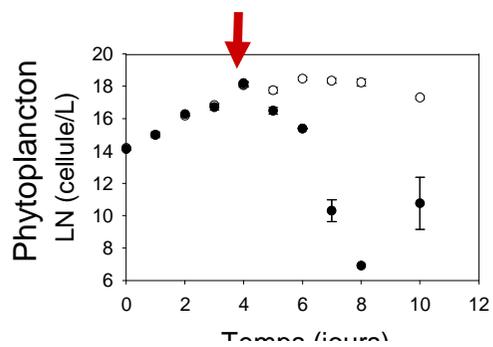
Résultats :



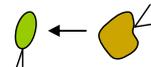
Etape 4

En phase exponentielle

ajout du prédateur

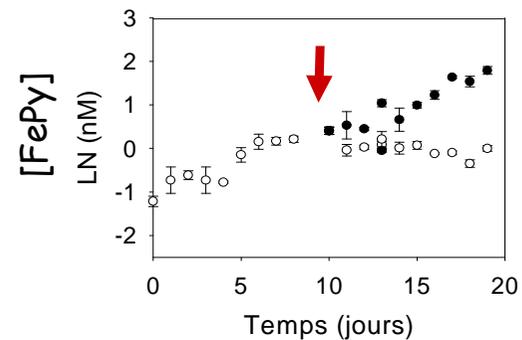
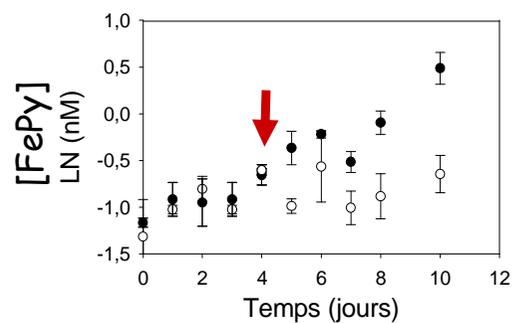
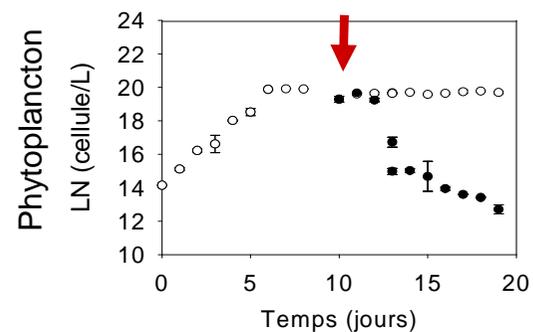


- Broutage
- Témoin



En phase stationnaire

ajout du prédateur



Discussion :



Etape 4

**CAPACITE DE RELARGUAGE :**

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

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

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

**Il est PLAUSIBLE :**

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

Le broutage est un mécanisme de production des fer-porphyrines

**CONCLUSIONS GENERALES  
et  
PERSPECTIVES**

**Conclusions:**

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

**Partie 1 :**

**DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE:**

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

**Partie 2 :**

**ETUDE DE MECANISME DE PRODUCTION :**

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



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

**Perspectives :**

**Sur la méthodologie :**

**Efforts sur la diminution de la limite de détection**

**Méthode de pré-concentration**

**Possibilité de travailler sur la phase particulaire**

**Méthode de dissolution/désorption**

**Développer un protocole pour mesurer les porphyrines libres**

**Indirectement avec une ferrochélatase**



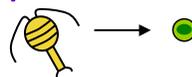
## Perspectives :

### Sur la biogéochimie des complexes fer-porphyrines :

#### Processus de production de fer-porphyrines

Broutage (autre mode)

Lyse virale



#### Processus de « dégradation » de fer-porphyrines

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

Faible solubilité qui entraîne :

ADSORPTION

AUTO-AGGREGATION

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

Les fer-porphyrines sont-elles biodisponibles ?

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

**Merci de votre attention ...**

**...et...**

