Protocole mesure de fluorescence multispectrale

**Objectifs**

* Mesurer le rendement de fluorescence maximal pour différentes souches sélectionnées. représentatives d’environnements océaniques contrastés.
* Définir un ‘slope factor’. i.e. rapport entre le signal de fluorescence et la concentration en chlorophylle *a* déterminée par HPLC utilisée comme référénce. Ce slope factor doit servir à convertir les DC en [Chla] aux 3 longueurs d’onde.
* Calculer les différents rapports entre le signal de fluorescence aux trois longueurs d’onde (440/470. 440/532. 470/532) afin d’en dériver une ‘signature taxonomique’ pour chacune des souches étudiées.

**Protocole**

A l’aide de plusieurs capteurs WET Labs de type ECO. des mesures de fluorescence seront effectuées à une fréquence identique à l’acquisition *in situ* (1 Hz). dans les cultures des souches définies à différentes concentrations de chlorophylle-a. pendant 2 (TBD) minutes.

Les souches devront être acclimatées au noir et en phase exponentielle de croissance de façon à atteindre le potentiel maximum de fluorescence (Cosgrove and Borowitzka. 2010). Il pourra être discuté dans un second temps du comportement du signal de fluorescence au cours des deux minutes d’acquisition. de façon à évaluer l’influence du non-photochemical quenching (NPQ) sur la relation fluorescence-concentration en chlorophylle *a*.

La culture initiale devra être une culture monospécifique d’un volume de 3L. à une concentration d’environ 20 µg L-1. Un volume de 500mL de cette culture sera filtré sur filtre GF/F pour mesurer le spectre d’absorption de l’échantillon. puis déterminer sa composition pigmentaire par HPLC. Le volume restant de 2.5 L servira à établir une gamme de dilution comme détaillé dans le tableau ci-dessous. L’objectif de cette gamme de dilution est de connaitre le signal de fluorescence en fonction de la concentration et ainsi ressortir un slope factor qui permet de convertir des comptes numériques en concentration de chla.

Dilution de culture :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dilution n° | Volume culture (mL) (c = 20 µg L-1) | Volume milieu (mL) | Concentration finale (µg L-1) |
| 1 | 1000 | 0 | 20 |
| 2 | 500 | 500 | 10 |
| (3 | 250 | 750 | 5 |
| 4 | 125 | 875 | 2.5 |
| 5 | 75 | 925 | 1.25 |
| 6 | 38 | 962 | 0.76 |
| 7 | 19 | 981 | 0.38 |
| 8 | 10 | 990 | 0.2 |
| 9 | 5 | 995 | 0.1 |
| 10 | 2.5 | 997.5 | 0.05 |
| 11 | 1 | 999 | 0.025 |

Volume total de culture initiale (à 20 ug L-1) utilisé pour la gamme de dilution : 2.255L

Les mesures se feront à l’obscurité, dans un récipient pouvant contenir 1L de culture et accueillir le fluorimètre (TBD).

Il sera également nécessaire de mesurer la réponse en fluorescence du ou des milieux de culture utilisés ainsi que celle du fluorimètre en l’absence de lumière, dans le noir (scotch noir placé sur le capteur).

**Souches d’intérêt**

Le choix des souches se fait en fonction des données *in situ* dont nous disposons pour le fluorimètre 3X1M. Cela correspond à des mesures dans l’Océan Austral autour des îles Kerguelen (campagne SoClim), en Méditerranée (BOUSSOLE) et dans le Pacifique Sud Ouest (TONGA). Ces trois régions permettent de couvrir un large gradient trophique qui peut être rencontré dans l’océan ouvert.

Ci-dessous se trouve une liste des espèces sélectionnées comme représentatives des différents environnements étudiés. Elles ont été choisies d’après une revue de la littérature ainsi que des souches disponibles dans la RCC. Au final, pour pouvoir discriminer au mieux le signal de fluorescence entre taxa, le panel de souches qui sera retenu devra couvrir une large gamme de composition pigmentaire et de différentes classes de taille de cellule.

Souche de référence : *Thalassiosira weissflogii* (commande à Bigelow ?), souche utilisée par le constructeur pour calibrer le fluorimètre (Proctor and Roesler, 2010)

Milieux oligotrophes

Les zones oligotrophes telles que le centre du gyre Pacifique sud présentent principalement deux genres différents : *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. Les communautés phytoplanctoniques des milieux stratifiés oligotrophes sont principalement influencées par les conditions d’éclairement, qui vont entrainer une variabilité des pigments photoprotectants (Allali et al., 1997).

*- Prochlorococcus marinus*, organisme photosynthétique le plus abondant dans l’océan, présente des dérivés de chlorophylle uniques au genre (Divinyl) (Partensky et al., 1999). **RCC269**

Nous pouvons envisager d’utiliser deux souches de *P. marinus,* de type LL et HL de façon à comparer les réponses de fluorescence en fonction du rapport DVChla/DvChlb.

*- Synechococcus sp.* Ubiquiste, il représente une proportion importante des communautés en milieux oligotrophes (Flombaum et al., 2013, Moore et al., 1995) **RCC487**

Il me semble intéressant de choisir différentes souches de *Synechoccocus* en fonction de leur capacité d’adaptation à la lumière, ceci permettrait d’avoir une estimation du rôle des pigments photoprotectants dans la fluorescence *in situ*. Nous avons pu observer sur la campagne BIOSOPE une différence significative entre F440 et F470 corrélée avec la concentration en zéaxanthine.

Océan Austral

Nous allons également nous intéresser à la zone australe où nous avons des mesures *in situ* de fluorescence multispectrale en surface, dans le secteur Indien à proximité des Iles Kerguelen.

Les communautés phytoplanctoniques y sont majoritairement composées de diatomées, avec deux environnements contrastés, la zone HNLC principalement limitée en fer et la zone enrichie à l’Est du Plateau des Kerguelen (Armand et al., 2008; Lasbleiz et al., 2016).

Pour la zone HNLC :

- *Fragilariopsis kerguelensis (***RCC4604**) : Diatomée endémique de l’Austral, qui peut représenter jusqu’à 90% de l’abondance des diatomées (Cortese and Gersonde, 2007)

Pour la zone enrichie durant la période du bloom :

- *Chaetoceros brevis* (**RCC4095**) : Diatomée Australe de plus petite taille que *F. kerguelensis,* diamètre d’environ 4 µm. (van Oijen et al., 2004)

- *Emiliana huxleyi* (**RCC6071 | RCC6856**) : Il existe 5 morphotypes (A, B, B/C, C et R). Le A est le plus courant. Mais le type B/C est typique de l’Austral avec un ratio 19’-HF/Chla > 1 (Cook et al., 2011). On suppose qu’une composition pigmentaire plus riche en 19’-HF permettra une meilleure estimation du signal de fluorescence induit par ce pigment. Le morphotype B/C est donc un meilleur candidat. Cependant, je n’ai pas réussi à savoir quel était le morphotype des deux souches de la RCC isolées en Austral.

NW Méditerranée

La Méditerranée NW est caractérisée par une saisonnalité marquée. La biomasse phytoplanctonique est dominée toute l’année par des algues contenant de la 19’-HF. En hiver, les diatomées dominent la communauté. Au début de la stratification estivale la proportion de zéaxanthine augmente avant d’arriver au pic des divinyl caractéristiques des prochlorophytes (Marty et al., 2008). Marty *et al.* (2002). On peut également observer un pic récurrent de péridinine, vers le printemps, marqueur des dinoflagellés. Récemment il a également été mis en évidence l’importance des diatomées nanophytoplanctoniques dans le bassin Méditerranéen Nord Occidental (Leblanc et al., 2018).

- Pelagophytes → *Pelagomonas calceolata* (**RCC100**) Picophyto, low-light adapted, riche en fuco et 19’BF. On le retrouve principalement au niveau du DCM en Méditerranée NW. La photoprotection de cette souche a été étudié par Dimier et al., 2009.

- *Minidiscus* *sp.*(**RCC4213**) Intéressant pour avoir une estimation de l’effet de la taille.

- *Chaetocros diadema* (**RCC1717**) une diatomée microphytoplanctonique du genre *Chaetoceros* très commun en méditerranée (Crombet et al., 2011)

-

**Bibliographie**

Allali, K., Bricaud, A., Claustre, H., 1997. Spatial variations in the chlorophyll-specific absorption coefficients of phytoplankton and photosynthetically active pigments in the equatorial Pacific. J. Geophys. Res. 102, 12413–12423. <https://doi.org/10.1029/97JC00380>

Armand, L.K., Cornet-Barthaux, V., Mosseri, J., Quéguiner, B., 2008. Late summer diatom biomass and community structure on and around the naturally iron-fertilised Kerguelen Plateau in the Southern Ocean. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 55, 653–676. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2007.12.031>

Cook, S.S., Whittock, L., Wright, S.W., Hallegraeff, G.M., 2011. PHOTOSYNTHETIC PIGMENT AND GENETIC DIFFERENCES BETWEEN TWO SOUTHERN OCEAN MORPHOTYPES OF EMILIANIA HUXLEYI (HAPTOPHYTA)1: EMILIANIA HUXLEYI MORPHOTYPES. Journal of Phycology 47, 615–626. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00992.x>

Cortese, G., Gersonde, R., 2007. Morphometric variability in the diatom Fragilariopsis kerguelensis: Implications for Southern Ocean paleoceanography. Earth and Planetary Science Letters 257, 526–544. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2007.03.021>

Cosgrove, J., Borowitzka, M.A., 2010. Chlorophyll Fluorescence Terminology: An Introduction, in: Suggett, D.J., Prášil, O., Borowitzka, M.A. (Eds.), Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9268-7_1>

Crombet, Y., Leblanc, K., Quéguiner, B., Moutin, T., Rimmelin, P., Ras, J., Claustre, H., Leblond, N., Oriol, L., Pujo-Pay, M., 2011. Deep silicon maxima in the stratified oligotrophic Mediterranean Sea. Biogeosciences 8, 459–475. <https://doi.org/10.5194/bg-8-459-2011>

Dimier, Cé., Brunet, C., Geider, R., Raven, J., 2009. Growth and photoregulation dynamics of the picoeukaryote Pelagomonas calceolata in fluctuating light. Limnology and Oceanography 54, 823–836. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.3.0823>

Flombaum, P., Gallegos, J.L., Gordillo, R.A., Rincon, J., Zabala, L.L., Jiao, N., Karl, D.M., Li, W.K.W., Lomas, M.W., Veneziano, D., Vera, C.S., Vrugt, J.A., Martiny, A.C., 2013. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria Prochlorococcus and Synechococcus. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 9824–9829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307701110>

Lasbleiz, M., Leblanc, K., Armand, L.K., Christaki, U., Georges, C., Obernosterer, I., Quéguiner, B., 2016. Composition of diatom communities and their contribution to plankton biomass in the naturally iron-fertilized region of Kerguelen in the Southern Ocean. FEMS Microbiology Ecology 92, fiw171. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw171>

Leblanc, K., Quéguiner, B., Diaz, F., Cornet, V., Michel-Rodriguez, M., Durrieu de Madron, X., Bowler, C., Malviya, S., Thyssen, M., Grégori, G., Rembauville, M., Grosso, O., Poulain, J., de Vargas, C., Pujo-Pay, M., Conan, P., 2018. Nanoplanktonic diatoms are globally overlooked but play a role in spring blooms and carbon export. Nat Commun 9, 953. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03376-9>

Marty, J.-C., Chiavérini, J., Pizay, M.-D., Avril, B., 2002. Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean Sea at the DYFAMED time-series station (1991–1999). Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 49, 1965–1985. <https://doi.org/10.1016/S0967-0645(02)00022-X>

Marty, J.-C., Garcia, N., Raimbault, P., 2008. Phytoplankton dynamics and primary production under late summer conditions in the NW Mediterranean Sea. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 55, 1131–1149. https://doi.org/10.1016/j.dsr.2008.05.001

Moore, L., Goericke, R., Chisholm, S., 1995. Comparative physiology of Synechococcus and Prochlorococcus: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. Mar. Ecol. Prog. Ser. 116, 259–275. <https://doi.org/10.3354/meps116259>

Partensky, F., Hess, W.R., Vaulot, D., 1999. Prochlorococcus, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63, 106–127. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.106-127.1999>

Proctor, C.W., Roesler, C.S., 2010. New insights on obtaining phytoplankton concentration and composition from in situ multispectral Chlorophyll fluorescence: In situ phytoplankton composition. Limnol. Oceanogr. Methods 8, 695–708. https://doi.org/10.4319/lom.2010.8.0695

van Oijen, T., van Leeuwe, M.A., Gieskes, W.W., de Baar, H.J., 2004. Effects of iron limitation on photosynthesis and carbohydrate metabolism in the Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae). European Journal of Phycology 39, 161–171. https://doi.org/10.1080/0967026042000202127