

Version : 2020

Date de création : 06 Avril 2010

Date de dernière modification : 20 Décembre 2016

Prélèvement, Fixation, Stockage et
Envoi des échantillons pour analyse du
paramètre « pico-nanoplancton »
par cytométrie en flux

Rédigé par :

Ian SALTER
Nicole GARCIA
Fabienne RIGAUT-JALABERT
Gérald GREGORI
Dominique MARIE

Evolutions/Corrections

Fabienne RIGAUT-JALABERT

Visé par :

Nicole GARCIA, responsable
qualité national :
Le 31 Janvier 2020



1- Introduction :

Intérêt du paramètre : L'activité microbienne est très importante dans le fonctionnement des écosystèmes marins. Les organismes photosynthétiques convertissent le carbone inorganique dissous en biomasse organique qui peut ensuite être reminéralisée, principalement par les organismes hétérotrophes. La répartition de la biomasse carbonée microbienne, entre les groupes fonctionnels écologiques et les différentes classes de taille, est importante pour la compréhension des interactions trophiques et du cycle de l'énergie à travers les écosystèmes microbiens. Des séries temporelles à long terme fournissent un cadre utile pour établir les relations statistiquement fiables entre contrôles environnementaux et dynamiques des populations microbiennes.

Dans ce contexte, la cytométrie en flux est une technologie à haut débit fiable pour la mesure de l'abondance microbienne, condition indispensable pour générer les premières données biologiques dans un réseau multi-sites tel que le SOMLIT.

Difficultés particulières : Les cellules pico et nanoplanctoniques sont fragiles et peu nombreuses pour certaines. Une attention particulière sera portée à chaque étape : prélèvement, fixation, conservation de l'échantillon et respect de la chaîne du froid lors des envois des échantillons à la plateforme de Banyuls sur Mer.

La fixation est effectuée dès le prélèvement de l'échantillon avec un mélange Glutaraldéhyde 25% + Poloxamer (ex-Pluronic) 10%.

Le Poloxamer 10% est un surfactant non ionique, non toxique, utilisé en culture de cellules et cryoconservation. Dans notre cas, le Poloxamer sera utilisé à une concentration finale de 0,01% et sera associé au Glutaraldéhyde (concentration finale 0,25%). Cet ajout de surfactant au fixateur limitera l'adhérence des cellules microbiennes entre elles ou sur les parois des cryotubes et les protégera lors des phases de congélation et décongélation. Il permettra donc une meilleure quantification des cellules lors des mesures par cytométrie en flux.

Les modifications du présent protocole (concentration finale de Glutaraldéhyde et ajout de surfactant) s'appuient sur la publication de Marie et al. 2014 et ont été validées par les tests effectués par la communauté « pico-nano » du SOMLIT.

Type de mesure : En cytométrie en flux, des cellules en suspension dans un liquide de gaine (eau de mer filtrée) passent une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser (excitation en lumière bleue de longueur d'onde 488nm, et en lumière rouge de longueur

d'onde 631 nm). Des détecteurs captent les signaux de diffusion et de fluorescence émis par chaque cellule. Dans le cas des cellules autotrophes, photosynthétiques, la fluorescence est principalement produite par les cellules elles-mêmes dans différentes longueurs d'ondes en fonction de leur contenu pigmentaire (émission dans le rouge pour la chlorophylle, dans l'orange pour la phycoérythrine, ...). Pour les populations hétérotrophes (non photosynthétiques), une émission de fluorescence verte est induite par le marquage spécifique de l'ADN des cellules par le SYBR Green I.

La lumière diffusée à 90 degrés par les cellules (SSC) est également mesurée car elle apporte des informations sur la structure interne et la granularité des cellules.

Unité : cellule/ml; SSC*; rouge/orange/vert fluorescence*

* Les valeurs de SSC et de fluorescence sont normalisées par rapport à des billes ajoutées en tant que références internes (voir protocole analytique).

Précision souhaitée : En cytométrie en flux, les volumes analysés sont généralement inférieurs à 1 ml. La précision des mesures peut avoir un impact direct sur l'abondance ou l'absence d'une population donnée dans le volume analysé (voir protocole analytique).

2- Hygiène et sécurité

Précautions particulières :

Le produit utilisé pour la fixation est le Glutaraldéhyde. Selon la fiche toxicologique l'INRS (<http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%20171>), le produit, irritant par contact, doit être manipulé avec des gants, lunettes et blouse.

Afin de ne pas respirer les vapeurs dégagées lorsque le produit est à température ambiante, le remplissage des cryotubes avec le mélange Glutaraldéhyde + Poloxamer sera effectué sous hotte chimique.

Lors de la fixation en mer, les aliquotes de Glutaraldéhyde+Poloxamer dans les cryotubes de prélèvements seront maintenus congelés dans le NUNC Labtop Cooler (voir 6- Prélèvement et fixation durant la sortie).

Evacuation des déchets :

Les déchets de Glutaraldéhyde sont traités selon les règles d'hygiène et sécurité en vigueur par la plateforme de cytométrie en flux de la station de Banyuls sur Mer qui analyse les échantillons.

3- Matériel:

Matériel pour le prélèvement en mer et la fixation des échantillons :

- 3 cryotubes (prélèvements effectués en 3 exemplaires) en Polypropylène NUNC
- Mélange Glutaraldéhyde + Poloxamer
- Le NUNC Labtop Cooler fourni par la station de Banyuls préalablement congelé, permettant le transport des tubes d'échantillonnage contenant le fixateur et la conservation des échantillons congelés durant 2 heures. Référence du labtopcooler chez Fisher Scientific : 10292581 (139€ en 2019).



https://fr.fishersci.com/fr/index.php?option=com_insight2&task=getproduct&productCode=10292581

- Une glacière (ou à défaut une boîte polystyrène) avec des packs de glace.
- Un flacon opaque de type flacon de prélèvement pour les sels nutritifs.
- Une pipette automatique 0-5ml (volume 1.485ml) et des pointes autoclavées.
- Feutre fin spécial cryogénie.

Matériel pour l'envoi et le stockage des échantillons :

- Cryoboîtes pour le stockage et l'envoi des échantillons. Il en faut 3 pour l'année : deux servant à l'envoi des échantillons à Banyuls (répliquas 1 et 2) et une restant au laboratoire (répliqua 3 de secours). La boîte d'envoi sera restituée lors de l'intercomparaison annuelle.
- Un surgélateur -80°C ou un container d'azote liquide.

4- Produits chimiques et/ou réactifs :

- Glutaraldéhyde, solution à 25% (OHC₃H₆HCO)

Afin que la même référence de fixateur soit utilisée pour toutes les stations du réseau, la plateforme de Banyuls sur mer a fourni, dès les premiers prélèvements, un lot d'ampoules de 10x10ml de chez *Electron Microscopy Sciences*, pour chacune. Le produit dans son emballage d'origine est à conserver entre 4 et -20°C (selon les recommandations du fournisseur).

Références EMS :

Glutaraldehyde 25% aqueous solution - 16220 - box 10x10ml

Conditions de conservation des ampoules : 4 à -20°C

Pas de date de péremption du produit dans son conditionnement d'origine

En vue des commandes futures de Glutaraldéhyde par les stations, une nouvelle référence est recommandée.

En effet, afin de faciliter la gestion des stocks de fixateur et limiter les risques de contamination lors de l'ouverture des ampoules de 10ml pour la préparation des aliquotes (10 ml s'avérant être un volume important en regard des volumes utilisés pour une année dans chaque station), il sera conseillé aux stations de commander le Glutaraldehyde 25% en lot de 10x1ml. Le produit, dans son emballage d'origine, sera conservé dans les conditions recommandées par le fournisseur. Afin d'éviter toute contamination, les ampoules seront ouvertes juste avant préparation des aliquotes.

Référence SIGMA-ALDRICH :

Glutaraldehyde solution, Grad I 25% - G5882 -10x1ML

Conditions de conservation des ampoules : -20°C

Pas de date de péremption du produit dans son conditionnement d'origine

- Pluronic ou Poloxamer 188 solution (10%)

Référence SIGMA-ALDRICH :

Poloxamer 188 solution 10% - P5556-100ML

NB : A réception du Poloxamer en flacon de 100ml, il est recommandé d'effectuer des aliquotes en tubes et de les conserver à -20°C, afin d'éviter toute contamination dans le temps.

5- Préparation du matériel pour le prélèvement :

Il est recommandé de préparer TOUS les cryotubes nécessaires aux sorties SOMLIT d'une année en une seule fois. Prévoir quelques tubes en plus sans annotation.

Annotation des cryotubes :

Afin de faciliter le traitement des échantillons par la plateforme de Banyuls, la nomenclature des échantillons doit comporter trois éléments :

- **Un code de 4 lettres pour le site d'échantillonnage** (ex : BANS pour Banyuls Sola).
- **La profondeur d'échantillonnage et un numéro de répliqua** (ex: 3m-n où n = 1 à 3).
- **La date** au format de six chiffres aammjj (ex : 150521).

Exemple : BANS 3m-1

150521 = Sortie Banyuls du 21 Mai 2015- Répliqua 1- prélèvement à 3m.

Pour chaque sortie, 3 tubes seront préparés. L'année et le mois peuvent être inscrits lors de la préparation annuelle, la date du jour sera ajoutée au moment de la sortie (ex : 1506__). La profondeur (Toujours surface = 1m ou 3m) et les numéros de répliquas peuvent aussi être inscrits lors de la préparation annuelle. Ces tubes seront stockés au congélateur à -20°C.

Préparation du fixateur (Glutaraldéhyde + Poloxamer) et des aliquotes :

Une fois l'identification des tubes effectuée, évaluez le volume de fixateur nécessaire pour une année d'échantillonnage.

Exemple pour une année d'échantillonnage à Roscoff :

2 stations, 3 tubes par station, 24 sorties par an, 15µl par tube :

$2 \times 3 \times 24 \times 15 = 2160\mu\text{l}$ de fixateur, arrondis à 2500µl,

Soit **2500µl de Glutaraldéhyde 25% + 250µl de Poloxamer 10%**, à aliquoter.

- Préparer sous hotte chimique le mélange Glutaraldéhyde + Poloxamer (**TOUJOURS 10 fois plus de Glutaraldéhyde que de Poloxamer en volume**) :

10X µl de Glutaraldéhyde 25% + X µl de Poloxamer 10%

- Mélanger délicatement par renversement afin d'éviter que le mélange ne « mousse » trop.
- Distribuer 15 μ l du mélange Glutaraldéhyde + Poloxamer dans les cryotubes annotés destinés à l'échantillonnage.
- Bien fermer les cryotubes et les stocker au congélateur à -20°C.

Les concentrations finales dans chaque échantillon après **ajout de 1,485ml d'eau de mer** seront donc : 0,25% final de Glutaraldéhyde et 0,01% final de Poloxamer.

Matériel pour le transport des cryotubes :

Afin de conserver le mélange Glutaraldéhyde + Poloxamer congelé, et ainsi éviter tout contact avec les vapeurs (voir fiche de sécurité) lors de l'échantillonnage, les cryotubes seront transportés du laboratoire au lieu de prélèvement dans le NUNC Labtop Cooler.

- Stocker Le Nunc Labtop Cooler dans un congélateur à -20°C afin qu'il soit congelé le jour de la sortie.
- Prévoir une glacière ou une boîte isotherme pouvant contenir le Nunc Labtop Cooler pour le transport du lieu de la sortie au lieu de stockage du laboratoire.

Remarque :

Afin d'assurer l'homogénéité de la température de congélation au sein du NUNC Labtop Cooler et son efficacité dans le temps, il est recommandé par le fournisseur de le décongeler, le sécher puis le recongeler régulièrement (tous les 2-3 mois).

6- Prélèvement et fixation durant la sortie:

Il est impératif de s'assurer de la conservation de l'échantillon durant toute la phase de prélèvement et de fixation.

Remarque :

Pour le bon déroulement de tous les prélèvements effectués en surface durant les sorties SOMLIT, il est conseillé d'échantillonner le pico-nano à partir de la bouteille Niskin destinée au « particulaire ».

Durant le prélèvement à la bouteille Niskin, indiquer le jour (ou la date dans sa totalité si cela n'a pas été fait) de la sortie sur les 3 cryotubes contenant le mélange Glutaraldéhyde + Poloxamer.

Il est conseillé d'emporter un tube supplémentaire « de secours » sans aucune indication qui pourra être utilisé en cas perte ou souillure de l'un des cryotubes.

- Noter l'heure d'arrivée de la bouteille Niskin à bord sur la feuille de terrain.
- A l'aide d'un tuyau en silicone (le même que pour l'oxygène), échantillonner avec précaution pour la **SURFACE uniquement**, 50 ml d'eau de mer dans un flacon opaque préalablement rincé.
- **Immédiatement** après ce sous-échantillonnage dans le flacon opaque, prélever et remplir les 3 cryotubes contenant le mélange Glutaraldéhyde + Poloxamer (à raison de 1,485mL par tube) à la pipette avec des cônes stériles.
- Retourner **délicatement** 2 ou 3 fois chaque cryotube afin de bien homogénéiser échantillon et fixateur.
- Dès la fixation, maintenir les échantillons à **température ambiante et à l'obscurité pendant au minimum 15 minutes.**

TRES IMPORTANT : Il est impératif de respecter ce temps minimum de 15 minutes à température ambiante afin d'assurer la fixation optimale des cellules avant la congélation. **Les cryotubes seront ensuite placés dans le Nunc Labtop Cooler pour la congélation douce qui suit la fixation.**

- Noter l'heure d'échantillonnage (fixation dans le cryotube) sur la feuille de terrain.
 - Après minimum 15 minutes (et au maximum 3 heures) après la fixation, placer les cryotubes dans le Nunc Labtop Cooler congelé. Remettre ce dernier dans la glacière ou boîte isotherme. Si un congélateur est disponible à bord du bateau, y déposer le Nunc Labtop Cooler avec les 3 cryotubes, sinon le conserver dans la glacière jusqu'au retour au laboratoire.
 - Noter l'heure de congélation (dépôt des cryotubes dans le NUNC Labtop Cooler) sur la feuille de terrain.
- Les heures de d'échantillonnage et congélation seront reportées ultérieurement dans le fichier hydrobio.

Il est TRES IMPORTANT de maintenir les échantillons à une température de -20°C afin d'obtenir une congélation « douce » et constante, assurance d'une bonne conservation des cellules.

7-Stockage des échantillons au laboratoire :

Il est impératif de s'assurer de la température de conservation de l'échantillon durant toute la phase de stockage.

De retour au laboratoire, le stockage des échantillons se fait indifféremment :

- dans l'azote liquide
- dans un congélateur à -80°C.

Les cryotubes doivent être stockés dans des boîtes pour le stockage à long terme, dites cryoboîtes avec emplacements numérotés. Pensez à identifier vos boîtes (ex : SOMLIT-ROSCOFF Piconanoplancton) afin qu'elles vous soient rendues sans erreur lors de l'intercomparaison annuelle.

Nous conseillons d'avoir deux boîtes de stockage au laboratoire : une boîte contenant les répliquas 1 et 2 qui seront envoyés à Banyuls pour analyse et une autre boîte dans laquelle seront gardés les répliquas 3 conservés au laboratoire en secours. Ceci permettra de ne pas sortir les tubes des boîtes au moment de l'envoi et ainsi de les garder en permanence à la bonne température.

De plus, si cela est possible, conserver les deux boîtes de stockage dans deux surgélateurs différents afin de ne pas perdre tous les échantillons en cas de panne du surgélateur.

Exemple de boîtes proposées par Fisher Scientific :



https://webshop.fishersci.com/insight2_fr/getProduct.do?productCode=11764703

La boîte d'envoi sera expédiée telle quelle à Banyuls **sans transfert des tubes dans un autre contenant** afin de ne pas rompre la chaîne du froid (voir 8- Envoi des échantillons).

Remarques :

- Aucune différence n'est faite entre les deux types de stockage (-80°C ou azote liquide) ; ils sont équivalents pour la conservation des cellules (Voir Compte rendu Atelier 2013 Paris).

- Lors du transfert des échantillons de -20°C (Nunc Labtop Cooler) à -80°C (ou azote liquide) il faut impérativement veiller à effectuer ce transfert le plus rapidement possible afin de ne pas décongeler les échantillons sortis du Nunc Labtop Cooler.

- La conservation à -20°C peut durer plusieurs jours sans problème de conservation (ex : sorties Gironde). Si les échantillons sont bien conservés au congélateur -20°C avant le stockage au laboratoire à -80°C (ou azote liquide), cela n'entraîne aucun dommage significatif pour les cellules pour une durée inférieure à 3 mois.

8- Envoi des échantillons

Périodicité :

Chaque station envoie les échantillons à la plateforme **UNE FOIS PAR AN** selon un calendrier prédéfini comme suit pour l'année 2020. Ce planning sera établi chaque fin d'année pour l'année suivante.

Calendrier 2020

Mois	Station
Janvier	Banyuls
Février	Marseille
Mars	La Rochelle - Anglet
Avril	Villefranche/mer
Mai	Luc sur mer
Juin	Wimereux
Juillet	Brest
Septembre	Sète
Octobre	Dinard
Novembre	Roscoff
Décembre	Arcachon

Suite à la réception des échantillons, la plateforme de cytométrie de Banyuls analysera immédiatement la série (dans les deux semaines qui suivent) et retournera rapidement à la station concernée les données obtenues pour validation scientifique (codes qualité) et vérification des dates d'échantillonnage. Le but est de ne pas dépasser un mois entre l'envoi des échantillons à la plateforme et la mise en base des données.

Modalités :

L'envoi se fera par la société Cryo Express (Air Liquide) afin de garantir la chaîne du froid et donc la conservation et l'intégrité des échantillons. En 2020, le prix d'un envoi (boîte S carboglace en 24/48H) était autour de 150€ HT.



<http://www.cryoexpress.com/fr/nos-produits-services/cryoglobe-1/passer-une-commande.html>

Les contacter afin d'établir devis, bon de commande et fixer la date d'enlèvement au laboratoire et la date d'arrivée à Banyuls (entre 24 et 48h selon leur contrat).

Contactez la plateforme de Banyuls afin de s'assurer que les échantillons seront réceptionnés pour être immédiatement stockés à -80°C (ou azote liquide) :

Responsable : David PECQUEUR 04 68 88 73 71 david.pecqueur@obs-banyuls.fr

Technicien : Christophe SALMERON 0430192413 christophe.salmeron@obs-banyuls.fr

Pour chaque sortie, 2 des 3 répliquas seront envoyés à Banyuls, le 3ème étant conservé à la station en cas de problème analytique. Les répliquas de secours non utilisés seront conservés à la station jusqu'à la validation des données et leur mise en base. Ils seront alors éliminés selon les règles d'hygiène et sécurité en vigueur.

Conjointement à cet envoi, 3 fichiers seront envoyés avec les échantillons :

- 1- Un fichier Excel représentant le plan de la boîte d'envoi dans lequel apparaît clairement l'identification des cryotubes (voir section 5) afin d'éviter toute erreur lors de l'analyse à Banyuls puis de la restitution des résultats à la station. Il est vivement conseillé de remplir ce fichier au fur et à mesure du dépôt des tubes.

Ex : Echantillons venant de Marseille, sorties du 1^{er} et 15 Mai 2019, profondeur 1m.

1 MRS 1m- 1 190501	2 MRS 1m- 2 190501	3 MRS 1m- 1 190515	4 MRS 1m- 2 190515	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45

Procédure : Protocole national Prélèvement, fixation, stockage et envoi des échantillons pour la cytométrie en flux



46	47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60	61	62	63
64	65	66	67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81

2- Un fichier Excel contenant les informations supplémentaires (heures de fixations en rouge dans le tableau concernant le prélèvement) issues du fichier Hydrobio (onglet « Fiche terrain »).

Ex : Feuille « Fiche terrain » Marseille pour le mois de Mai 2019 avec les caractéristiques du prélèvement Pico nanoplancton.

Site	Date	Heure	Coef marée	marée	Prof (m)	T,S			O ₂		pH	
						Rec Profil	Val T (°C)	Val S (psu)	Rec Prel	Val O (ml/l)	Rec Mes	Val
	AAAA-MM-JJ	HH:MM:SS										
11	2019-05-01	06:07:00	0	inc	1	OK	14,9936	38,0084	OK	999 999	OK	8,172
11	2093-05-01	06:07:00	0	inc	32	OK	14,6889	38,1556	OK	999 999	OK	8,165
11	2019-05-01	06:07:00	0	inc	55	OK	14,6889	38,1556	OK	999 999	OK	8,165
11	2019-05-15	06:30:00	0	inc	1	OK	13,9107	38,2171	OK	999 999	OK	8,162
11	2019-05-15	06:30:00	0	inc	30	OK	13,8392	38,2392	OK	999 999	OK	8,163
11	2019-05-15	06:30:00	0	inc	55	OK	13,6635	38,3125	OK	999 999	OK	8,153

..../

NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻	Si(OH) ₄	MES		COP, NOP (CHN)		Isotopes		Chla/Pheo		pico nano			
			Rec Prel	Vol filtré (ml)	Rec Prel	Vol filtré (ml)	Rec Prel	Vol filtré (ml)	Rec Prel	Vol filtré (ml)	Rec Prel	Heure fermeture Niskin (hh:mm:ss)	Heure échantillonnage dans cryotube (hh:mm:ss)	Heure de congélation à -20°C dans le laptopcooler (hh:mm:ss)
OK	OK	OK	OK	2000	OK	2000	OK	6000	OK	550	OK	07:12:00	07:30:00	07:46:00
OK	OK	OK	OK	2000	OK	2000	OK	0	OK	550				
OK	OK	OK	OK	2000	OK	2000	OK	0	OK	550				
OK	OK	OK	OK	2000	OK	2000	OK	8000	OK	550	OK	07:13:00	07:35:00	07:52:00
OK	OK	OK	OK	2000	OK	2000	OK	0	OK	550				
OK	OK	OK	OK	2000	OK	2000	OK	0	OK	550				

3 - Un fichier type « Hydrobio » pré-rempli avec site, date, heure, marée, coeff marée, prof texte, prof numérique pour les 7 premières colonnes et les 4 premières lignes identiques. Ajouter également toutes les colonnes du paramètre pico-nano comme sur le fichier ci-dessous :

Ex : Fichier Hydrobio type pour le piconanoplancton uniquement

...

RECAPITULATIF DONNEES POUR LA BDD													
Ligne 4 = intitulés de correspondance des paramètres (pour la BdD)													
ID_SITE	DATE	HEURE	COEF_MAREE	MAREE	PROF_TEXT	PROF_NUM	TotBac cells/mL	qTotBac cells/mL	TotBac SSC/1µm	qTotBac SSC/1µm	TotBac FL verte/1µm	qTotBac FL verte/1µm	
ID_SITE	DATE	HEURE	COEF_MAREE	MAREE	PROF_TEXT	PROF_NUM	TBACC	qTBACC	TBACSSC	qTBACSSC	TBACFLV	qTBACFLV	
xx	aaaa-mm-jj	hh:mm:ss	xx	xx	S	1							
xx	aaaa-mm-jj	hh:mm:ss	xx	xx	S	1							
xx	aaaa-mm-jj	hh:mm:ss	xx	xx	S	1							
xx	aaaa-mm-jj	hh:mm:ss	xx	xx	S	1							
xx	aaaa-mm-jj	hh:mm:ss	xx	xx	S	1							
xx	aaaa-mm-jj	hh:mm:ss	xx	xx	S	1							

...

Nombreuses colonnes non représentées.....

Ceci permettra la mise en base annuelle des données sans erreur de format.

La plateforme de Banyuls devra uniquement inclure les données obtenues après analyse avec les codes qualité **analytiques**. Le spécialiste piconanoplancton de la station validera les données à son tour d'un point de vue **scientifique**, les codes qualité pourront donc être modifiés si nécessaire (voir chapitre 10). Enfin, le responsable base de données enverra le fichier (après transformation en .csv) à la BDD.

9- Entretien du matériel et flaconnage :

Le flacon Nalgène de prélèvement est à nettoyer régulièrement : rinçage minutieux à l'eau distillée.

10- Codes Qualité et base de données :

Les codes qualité attribués par la plateforme de Banyuls peuvent être modifiés par le responsable pico-nanoplancton de la station (code 2 = aucun problème à code 7 = hors protocole) si :

1 - Le délai entre le prélèvement et la fixation par le mélange glutaraldéhyde + Poloxamer a été supérieur à 1 heure.

2 - Le délai entre prélèvement et fixation avec le mélange glutaraldéhyde + Poloxamer et la congélation a été supérieur à 2 heures.

3 - Les échantillons n'ont pas été stockés à -80°C ou dans de l'azote liquide au retour au laboratoire.

Pour information, les intitulés des colonnes piconanoplancton du fichier hydrobio sont explicités dans le tableau ci-contre :

	Intitulé du tableau hydrobio	Dénomination
Total Bactéries	Val TotBac cells/mL	Nombre total de cellules bactériennes par mL
	Val TotBac SSC/1 μ m	Intensité de la Diffusion lumineuse à 90° (indicatrice de structuration interne d'une cellule, notamment) normalisée par rapport à celle des billes de 1 μ m (standard interne)
	Val TotBac FL verte/1 μ m	Intensité de Fluorescence verte, conséquence du marquage SybR Green, toujours normalisée par rapport à celle du standard interne
Bactéries HNA	Val HNABac cells/mL	Nombre de cellules bactériennes représentantes de la fraction High Nucleic Acid HNA de la communauté totale
	Val HNABac SSC/1 μ m	idem pour fraction bactéries HNA
	Val HNABac FL verte /1 μ m	idem pour fraction bactéries HNA
Bactéries LNA	Val LNABac cells/mL	Nombre de cellules bactériennes représentantes de la fraction Low Nucleic Acid LNA de la communauté totale
	Val LNABac SSC/1 μ m	idem pour fraction bactéries LNA
	Val LNABac FL verte/1 μ m	idem pour fraction bactéries LNA
Cryptophytes	Val Cry cell/mL	Nombre total de Cryptophyceae
	Val Cry SSC/1 μ m	idem pour Cryptophytes
	Val Cry FL rouge/1 μ m	Auto-Fluo rouge de la chlorophylle
	Val Cry FL orange/1 μ m	Auto-Fluo orange de la phycoérythrine
Synechococcus	Val Syn cell/mL	Nombre total de Synechococcus sp.
	Val Syn SSC/1 μ m	idem pour Synechococcus
	Val Syn FL rouge/1 μ m	Auto-Fluo rouge de la chlorophylle
	Val Syn FL orange/1 μ m	Auto-Fluo orange de la phycoérythrine
Prochlorococcus	Val Pro cell/mL	Nombre total de Prochlorococcus sp.
	Val Pro SSC/1 μ m	idem pour Prochlorococcus
	Val Pro FL rouge/1 μ m	Auto-Fluo rouge de la chlorophylle
Picoeucaryotes	Val PicoE cell/mL	Nombre total de pico-eucaryotes
	Val PicoE SSC/1 μ m	idem pour Picoeucaryotes
	Val PicoE FL rouge/1 μ m	Auto-Fluo rouge de la chlorophylle
Nanoeucaryotes	Val NanoE cell/mL	Nombre total de nano-eucaryotes
	Val NanoE SSC/1 μ m	idem pour Nanoeucaryotes
	Val NanoE FL rouge/1 μ m	Auto-Fluo rouge de la chlorophylle

10 -Bibliographie

- Vaultot D, Courties C, Partensky F. 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry* 10:629-636.
- Troussellier M, Courties C, Zettelmaier S. 1995. Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: Fixation and storage effects. *Est Coast Shelf Sci* 40:621-633.
- Marie D., Brussaard C., Partensky F. and Vaultot D. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. 1999. In: *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc. 11.11.1-11.11.15.
- Marie, D., Rigaut-Jalabert, F. and Vaultot, D. (2014), An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry*, 85: 962-968. doi: 10.1002/cyto.a.22517.