THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Biogéochimie Marine

Ecole doctorale des Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED 129)

Laboratoire d'Océanographie et du Climat : Expérimentations et Approches Numériques

Présentée par

Laura PERRIN

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Physiologie du coccolithophoridé *Emiliania huxleyi* en co-limitation de nutriments et de lumière

Soutenue le 15 décembre 2016, devant le jury composé de :

Pr. CLAQUIN Pascal .....Rapporteur
UMR BOREA, Université de Basse-Normandie

Pr. LAROCHE Julie.....Rapporteur
Département de Biologie, Université de Dalhousie

Dr. BEAUFORT Luc.....Examinateur
CEREGE, Université d'Aix-Marseille

Dr. AUMONT Olivier.....Examinateur
LOCEAN, Université Pierre et Marie Curie

Pr. CARDINAL Damien.....Examinateur
LOCEAN, Université Pierre et Marie Curie

Dr. PROBERT Ian.....Membre invité
Station Biologique de Roscoff, Université Pierre et Marie Curie

Dr. ALOISI Giovanni.....Directeur de thèse
LOCEAN, Université Pierre et Marie Curie

***

« PASSION will move men beyond themselves, beyond their shortcomings, beyond their failures. »

Joseph Campbell

***

Merci au jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, et à Pascal Claquin et Julie LaRoche d'avoir accepté de le rapporter.

Car les « quelques » pages qui suivent ces remerciements n'auraient pas vu le jour sans l'aide, le soutien et la présence, tout simplement, de nombreuses personnes…

…MERCI A TOUS !

Mes premiers remerciements iront à mon directeur… Vanni !

Merci pour ton regard passionné sur les coccos et sur la science. Ton enthousiasme infaillible, ton perfectionnisme et ta soif de comprendre nous ont permis d'évoluer ensemble vers des contrées imprédictibles et au combien passionnantes! Merci pour ta confiance, ta critique toujours positive et ton humanité à mon égard. Merci de m'avoir poussé dans mes retranchements, de m'avoir appris à dialoguer avec Mathematica, ou presque !, et de m'avoir permis de partir à la conquête bretonne des cultures de coccos ! Merci pour les conférences ou workshop, en Crête, à la Nouvelle-Orléans, à Angers, à Marseille, que tu as rendu possible et qui sont venues enrichir ma connaissance du monde des coccos, de la science et de la narration orale ! Ces périples m'ont permis d'évoluer, avec autonomie, en tant qu'« apprentie chercheuse » ! Merci pour nos conversations passionnantes et si bénéfiques ! Merci pour toutes tes relectures précieuses et pour tes quelques notes humoristiques : en plus des quelques « je ne comprends pas ! », je retiendrai donc, entre autres, que la science « C'est une question de feeling, comme le jazz ! » et que lorsqu'il y a un souci, il suffit simplement « d'émigrer en Sibérie ! » !!

Trente minutes sur Skype un jour de Juillet 2013 m'auront propulsé dans cette belle aventure ! Merci pour tout Vanni, j'espère avoir été à la hauteur du rôle privilégié d'être une de tes 1ères doctorantes et j'espère que nos échanges ne s'arrêteront pas là !

Merci Ian pour m'avoir accueillie à Roscoff, pour le temps que tu m'as accordé là-bas et pour m'avoir aidée quotidiennement dans mes expériences de cultures malgré ton agenda parfois bien chargé ! Merci pour l'après-midi d'échantillonnage que tu as faite avec Gerald ! Merci pour les nombreuses corrections que tu as apportées à ce travail, manuscrit ou article. Merci pour les nombreuses conversations enrichissantes sur E. hux et les autres coccos, à chacune (ou presque !) de mes visites roscovites ! Et si on cultivait toutes les souches d'E. hux que tu as à la RCC…. ?!

Merci à Gerald … Vielen Dank Gerald, for the time you spent to learn me the cocco's cultures world and the carbon chemistry nightmare! Thank you so much to have been always available for my questions and really helpful! Next time I do cultures, I will try to sing to the cells, versprochen!

Merci à Alex, Chris et Jason pour m'avoir fait découvrir le monde des coccos ! Thank you guys for your help during my first approach to coccolithophores science in Southampton! Thank you Alex to have been part of my PhD Committee and to have been always really helpful!

Merci Fabrice, pour avoir relu mon introduction si gentiment et dans un délai très restreint ! Merci d'avoir apporté ton œil pédagogue et « géologue » à cette thèse pendant les comités.

Merci Luc pour m'avoir accueillie au CEREGE 2-3 jours et pour avoir fait parti de mon comité.

Merci à l'équipe de MOOSE pour avoir accepté que je fasse partie d'une de vos missions en mer ! Expérience incontournable d'un océanographe, ça aura été 10 jours fabuleux!

Merci à Florence et Irina pour m'avoir accueillie à Bondy et aidée pour les analyses ICP-MS.

Merci à l'équipe chimie marine de Roscoff : Yann, Cédric, Thierry et Marc pour leur gentillesse et leur disponibilité pour m'aider, me conseiller et répondre à toutes mes questions !

Merci à l'équipe roscovite : les filles, Momo, Valé, Marie-Jo et Domi pour votre aide à la station et votre bonne humeur ! Une belle équipe que j'aurai eu la chance de côtoyer.

Merci Dany...car sans toi le labo ne tournerait pas rond ! Tes sourires et ta gentillesse rendent nos vies de thésard plus sereines...Tu as été un pilier ensoleillé dans ma fin de thèse !

Merci à mes amis de longue date ! Estelle, Nono et Lisou (les « L » de ce manuscrit sont pour toi !) pour nos virées parisiennes et pour être là depuis tant d'années.

Merci à mes deux amies de master: Lauriane et Nin's pour nos aventures mémorables et nos premiers pas ensemble dans le monde de l'océano !

Merci à mes amis roscovites : Juju, Théophile, Dodo et Tritri pour cette belle amitié et pour avoir été d'un grand soutien dans cette fin de thèse. Merci aussi à Klervi et David !

Merci à mes copains piscines ! Claire, Clément, Vivi.... et mes copains du 5ème ! Blondie, Chris, Sébi, Alex, Mickael, Aïda, Mathieu. Merci Anastase pour ton aide précieuse en stats et tes « couscous » réguliers et Julien pour nos conversations matinales, le bureau 508 te sera toujours ouvert ! ...et à tous les gens du couloir 45/55 5ème étage et du labo qui ont rythmé mon quotidien !

Merci Sara, ma « jumelle » de fin de thèse !! T'avoir à mes côtés et avancer ensemble dans ce périple final a été d'un grand soutien et aura créé une belle amitié, qui je l'espère, ne fait que commencer !

Merci mes deux copines de thèse Zozo et Vio (alias p'tit scarabé) ! Zozo pour ta motivation sans faille pour m'accompagner à la piscine, ta joie de vivre et tes messages de reboostage...Vio pour tes encouragements passionnés, nos pauses gouté et commérages pour mes jambes lourdes et mon ventre affamé ! Merci à toutes les deux pour votre soutien précieux et pour votre amitié ! Sans vous, ça n'aurait pas été pareil et clairement moins fun ! Merci mes amies !

Merci infini à mes deux co-bureaux : Sally et Antoine, sans qui cette aventure aurait été bien terne! Les trois mousquetaires ont défié les lois du stress doctorant ! Merci Sally pour tes « A tes souhaits ! » infaillibles et tes « Ca va aller ! » réconfortants...merci pour ton aide quotidienne scientifique ou linguistique et ta présence calme dans ce bureau parfois turbulent ! Merci d'avoir été là du début à la fin ! Merci Antoine pour nos fous rires, pour les « t'es puissant ! », pour m'avoir tellement aidée ! Merci à vous deux, notre belle équipe me manque déjà mais les souvenirs du bureau 508 sont gravés dans ma mémoire !

Merci à ma famille sans qui je n'en serai pas arriver là...

...Maman et Domi pour votre confiance et votre fierté dans tout ce que j'entreprends depuis la sortie du lycée. Merci aussi à mes 4 sœurs « du sud » d'avoir enduré la distance que je vous ai imposée ces dernières années, pour votre soutien et pour votre présence inégalable ! Merci Rooney, tu es une des rares personnes de cette famille qui sache ce que sont les coccos ! Merci à ma filleule et à mon neveu pour être nés pendant cette thèse ! Deux rayons de bonheur dans mon cœur!

...Papa et Marianne « pour le gîte et le couvert » ! Un grand merci pour la petite assiette toujours prête sur la table pendant ces derniers mois et votre soutien et réconfort (voire incompréhension parfois !) dans mon périple doctorant ! Merci de m'avoir laissé champ libre dans mes allers-retours bretons ! Ces deux années m'ont permis de souder les liens qui nous unissent tant avec vous deux qu'avec mes deux petites sœurs adorées...nous aurons vécu ensemble pour de vrai!

Le plus grand des mercis sera pour toi, Hugo....merci d'avoir été là tous les jours depuis que nos routes se sont croisées en Bretagne...Merci pour ta confiance, pour nos échanges scientifiques passionnants, nos promenades bretonnes, parisiennes, portugaises ou jurassiennes ! Merci pour tous ces moments de rires, pour ton aide précieuse et pour ta patience ces derniers mois. Tu as été mon souffle de quiétude et de bonheur !

Merci pour tout ton amour !

RESUME

Les coccolithophoridés sont des microalgues unicellulaires calcifiantes qui jouent un rôle important dans le cycle du carbone océanique via leurs processus cellulaires de photosynthèse (puits de CO_2) et de calcification (source de CO_2). L'espèce la plus abondante dans l'océan moderne est l'espèce cosmopolite *Emiliania huxleyi*, qui est caractérisée par une forte tolérance à de larges gammes de température, d'irradiance et de concentrations en nutriments. La distribution d'*E. huxleyi* qui s'étend des régions subarctiques aux régions subéquatoriales et des eaux eutrophes aux eaux oligotrophes en fait l'espèce de coccolithophoridés la plus étudiée jusqu'à présent. Cependant, sa réponse physiologique à des conditions environnementales clés comme la co-limitation en lumière et en nutriments reste peu étudiée, que ce soit *in situ*, où ces conditions sont rencontrées dans les niches profondes de coccolithophoridés des gyres oligotrophes, ou en laboratoire. J'ai ainsi réalisé des expériences de culture et une approche de modélisation numérique afin d'étudier la réponse physiologique d'*E. huxleyi* en conditions de limitation en nutriments et en lumière, avec pour objectif d'améliorer notre compréhension du contrôle environnemental des niches profondes de coccolithophoridés.

La première partie de cette thèse a été dédiée à des expériences de culture en batch réalisées à la Station Biologique de Roscoff afin de tester la co-limitation en lumière et en nutriments (nitrate et phosphate) avec une souche d'*E. huxleyi* isolée dans le gyre Pacifique-Sud (transect BIOSOPE). Ces expériences ont permis l'étude de la morphologie et des taux métaboliques d'*E. huxleyi* dans ces conditions de co-limitation, qui n'ont quasiment jamais été testées avant ce travail. Cette étude en laboratoire a montré que les effets de co-limitation en lumière et nutriments sont différents des effets des limitations séparées. Un modèle physiologique simple basé sur la théorie de Droop a été appliqué aux expériences de culture afin d'obtenir les valeurs de paramètres physiologiques pour *E. huxleyi* comme la constante de demi-saturation pour l'assimilation en nutriment et le taux d'assimilation maximum. Ces paramètres physiologiques sont plus communément obtenus à partir d'expériences en chemostat plus coûteuses et plus longues. Mon approche fournit une procédure simple et rapide pour estimer ces paramètres fondamentaux dont les valeurs obtenues sont en accord avec celles disponibles dans la littérature pour les coccolithophoridés et mettent en évidence leur forte affinité pour les nutriments et leur fort taux de croissance maximal par rapport à d'autres groupes phytoplanctoniques. Cette capacité à croître dans des environnements si différents est confirmée par l'existence de niches profondes telle que celle du gyre Pacifique-Sud observée pendant la campagne BIOSOPE. Cette niche, caractérisée par une forte communauté d'Isochrysidales comme *E. huxleyi*, *Gephyrocapsa* sp. et *Reticulofenestra* sp., a été étudiée dans la troisième partie de cette thèse. Combinant les paramètres physiologiques et les données biogéochimiques in situ, une approche analytique a été utilisée pour estimer le taux de croissance et le taux de calcification d'*E. huxleyi* le long du transect BIOSOPE, montrant que les principaux facteurs environnementaux contrôlant ces deux taux métaboliques sont la disponibilité en nitrate et en lumière.

Mots clés : Coccolithophoridés ; *Emiliania huxleyi* ; Co-limitation ; Nutriments et lumière ; Physiologie ; Modèle de Droop ; Paramètres physiologiques ; Gyre Pacifique-Sud ; BIOSOPE.

ABSTRACT

Coccolithophores are unicellular calcifying marine algae that play an important role in the oceanic carbon cycle via their cellular processes of photosynthesis (a CO_2 sink) and calcification (a CO_2 source). The most abundant coccolithophore species in the modern ocean is the cosmopolitan species *Emiliania huxleyi* that is characterized by a strong tolerance to a wide range of light, nutrient and temperature conditions. The distribution of *Emiliania huxleyi* from subarctic to subequatorial regions and from eutrophic to oligotrophic waters makes it the most widely studied coccolithophore species. However, its physiologic response under key environmental conditions such as the co-limitation of light and nutrients remains poorly investigated, both in the laboratory and in the field, such as in deep niches of coccolithophores in oceanic gyres. I conducted laboratory culture and numerical modeling experiments to understand the controls on the physiology of *Emiliania huxleyi* in low-nutrient and low-light conditions, with the aim of better understanding environmental controls on deep ecological niches of coccolithophores.

The first part of this thesis was dedicated to batch cultures experiments carried out at the Station Biologique de Roscoff to test the co-limitation of nutrients (nitrate and phosphate) and light with an *E. huxleyi* strain isolated from the BIOSOPE transect (South Pacific Gyre). These experiments allowed the investigation of the morphology and metabolic rates of *E. huxleyi* under co-limitation; this had been very little investigated prior to this study. This laboratory study showed that the effect of co-limitation of nutrients and light are different from the effect of separate limitation, in terms of both the physiological and morphological response. A simple physiological model based on the Droop theory was applied to the culture experiments to obtain physiological parameters characteristic of *E. huxleyi* such as the half-saturation constant for nutrient uptake and the maximum nutrient uptake rate. These physiological parameters are usually obtained in more costly and time-consuming chemostat experiments. My approach provides a rapid, simpler procedure to estimate these fundamental parameters. The physiological parameter values obtained are consistent with those found in the coccolithophore literature and highlight their high affinity for nutrients and high maximum growth rate compared to other phytoplankton groups. Evidence of this capacity to grow in different environments can be found, for example, in the deep niche reported in the South-Pacific Gyre during the BIOSOPE cruise. This niche of coccolithophores, characterized by a strong community of Isochrysidales such as *E. huxleyi*, *Gephyrocapsa* sp. and *Reticulofenestra* sp., was investigated in the third part of this thesis. Combining physiological parameters and *in situ* biogeochemical data, I used a modeling approach to estimate the potential growth and calcification rates for *E. huxleyi* along the BIOSOPE transect, showing that the main environmental controls on these two important metabolic rates in this transect are light and nitrate availability.

Keywords : Coccolithophores ; *Emiliania huxleyi* ; Co-limitation; Nutrients and light; Physiology; Droop model ; Physiological parameters; South-Pacific Gyre; BIOSOPE.

AVANT-PROPOS

Contexte de la thèse

Cette thèse a été effectuée dans l'équipe « Biogéochimie-Traceurs-Paléoclimats » (BTP) au sein du Laboratoire d'Océanographie et du Climat : Expérimentations et Approches Numériques sous la direction de Giovanni Aloisi. Une partie de la thèse (6 mois) a été réalisée en collaboration avec Ian Probert à la Station biologique de Roscoff pour la partie cultures en laboratoire.

Les membres de l'équipe de Chimie Marine de la station de Roscoff (Yann Bozec, Thierry Cariou, Marc Vernet) et Cédric Leroux ont réalisé en majeure partie les analyses de matière particulaire, du système du carbone inorganique dissous et des nutriments sur mes échantillons. Dominique Marie de l'équipe DIPO de Roscoff m'a formé sur le cytomètre à flux et m'a régulièrement aidé lors des nombreux comptages.

La plateforme ALYSES à l'Institut de Recherche et du Développement de Bondy a permis la réalisation des analyses en ICP-MS des échantillons de carbone inorganique particulaire. Florence Le Cornec et Irina Djouraev m'ont encadré pour les manipulations préliminaires et ont fait les analyses.

Des échantillons pour l'analyse du phosphore organique particulaire ont été envoyés à l'IFREMER de Brest où les analyses et traitement des échantillons ont été effectués par Claire Labry et Agnès Youenou.

Soutien financier

Cette thèse a été en grande partie financée par une bourse ministérielle de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Le projet TELLUS CLIMAHUX (INSU-CNRS) et le projet MODIF de l'Institut Pierre Simon Laplace (IPSL) ont également participé de manière importante aux dépenses rencontrées lors de cette thèse. De plus, le projet CALHIS (ANR) a financé une partie de mon travail en laboratoire à la station biologique de Roscoff. Pour finir, une bourse internationale de mobilité « AGU Travel Grant » a permis de faire le déplacement à la conférence Ocean Sciences à la Nouvelle-Orléans en février 2016.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I 1

INTRODUCTION GENERALE 1

PREAMBULE.....3

1. Les Coccolithophoridés : nannoplancton calcaire 4

1.1 Taxonomie et découverte 4
1.2 Morphologie et fonction des coccolithes 5
1.3 Le cycle de vie des Coccolithophoridés 8
1.4 Le rôle biogéochimique des Coccolithophoridés 9
1.5 Biogéographie et stratégie écologique 13

2. Qui est *Emiliania huxleyi* ? 17

2.1 Taxonomie, origine et morphologie 17
2.2 Diversité biogéographique et stratégie écologique 19
2.3 Caractéristiques physiologiques d'*Emiliania huxleyi* 20
2.4 Limites de l'utilisation d'*Emiliania huxleyi* comme espèce modèle 25

3. Approches utilisées dans l'étude physiologique des coccolithophoridés.....25

3.1 Etudes physiologiques en laboratoire 26
3.2 Etudes de modélisation physiologique et écologique 29
3.3 Etudes de terrain : campagnes océanographiques 32

4. Objectifs de la thèse et plan du manuscrit 35

4.1 Questions scientifiques 36
4.2 Approches utilisées et plan du manuscrit 36

CHAPITRE II 39

METHODES EXPERIMENTALES ET TECHNIQUES D'ANALYSE DES CULTURES D'*E. HUXLEYI* EN LABORATOIRE 39

1. Contexte général et introduction aux techniques de culture.....41

1.1 Cultures en chemostat 42
1.2 Cultures en batch 43

2. Choix des conditions expérimentales 46

2.1 Choix de l'espèce et de la souche 46
2.2 Choix de la température, de l'intensité lumineuse et du cycle jour/nuit 47
2.3 Milieu de culture 49
2.4 Choix du pH et de la pression en dioxyde de carbone (pCO_2) 51

3. Mise en place des pré-cultures, des acclimatations et des expériences 53

3.1 Précautions de manipulation 53
3.2 Déroulement des cultures et schéma global (Figure II.7) 54

3.3 Mise en place des micro-cultures 54
3.4 Mise en place des pré-cultures et choix des concentrations en nitrate et phosphate initiales 55
3.5 Mise en place des acclimatations 57
3.6 Mise en place des expériences 58

4. Traitement des échantillons et analyses 61

4.1 DIC, pH_T et nutriments 61
4.2 POC, PIC, PON, POP et concentration en calcium 61
4.3 Microscopie électronique à balayage et microscopie optique 63

5. Conclusions 65

CHAPITRE III 67

REPONSES PHYSIOLOGIQUES D'*E.HUXLEYI* DANS LES EXPERIENCES DE CULTURES 67

1. Croissance des cultures 69

1.1 Description des courbes de croissance 69
1.2 Taux de croissance des expériences contrôles 71

2. Nutriments et système du carbone inorganique dissous 75

2.1 Consommation de nitrate et phosphate par les cellules 75
2.2 Le système du carbone inorganique dissous 77

3. Morphologie des cellules 80

3.1 Taille des coccosphères 80
3.2 Taille des cellules 81
3.3 Taille des coccolithes: DSL 82
3.4 Corrélation entre les trois mesures 83

4. Quotas et rapports de matière particulaire 85

4.1 Quotas de carbone inorganique particulaire : PIC 85
4.2 Quotas de carbone organique particulaire : POC 87
4.3 Quotas d'azote organique particulaire : PON 87
4.4 Quotas de phosphore organique particulaire : POP 88
4.5 Rapports de matière particulaire 89
4.6 Production de calcification et de photosynthèse pour les expériences contrôles 91

5. Interprétation des résultats par type d'expérience 92

5.1 Expériences P-lim 92
5.2 Expériences N-lim 96
5.3 Expériences N-P lim 96
5.4 Expériences LpH 97
5.5 Effet d'une diminution en lumière 98
5.6 Tableau récapitulatif des principaux effets sur les cultures d'*E.huxleyi* RCC911 101

6. Conclusions 102

CHAPITRE IV 105

MODELISATION DE LA CROISSANCE DE CELLULES D'*E. HUXLEYI* EN SYSTEME BATCH 105

1. Contexte général 107

2. Méthodes de modélisation physiologique.....108

2.1 Modèle physiologique de Monod 108
2.2 Modèle physiologique de Droop 110

3. Description des expériences de cultures « PML B92/11 » 115

3.1 Expériences de limitation 115
3.2 Résultats principaux..... 116
3.3 Conclusions majeures 117

4. Données simulées issues des expériences avec les souches RCC911 et PML B92/11 118

4.1 Choix des constantes indépendantes du temps 118
4.2 Données des densités cellulaires 119
4.3 Données de concentration du nutriment limitant 120
4.4 Données du quota cellulaire de l'élément limitant..... 120

5. Evolution des paramètres expérimentaux au cours du temps.....123

5.1 Résultats préliminaires et comparaison des deux modèles 123
5.2 Résultats du modèle Droop 126

6. Paramètres physiologiques contraints par le modèle.....136

6.1 Définition des traits et paramètres physiologiques 136
6.2 Paramètres estimés par le modèle de Droop 138
6.3 Test de sensibilité des paramètres physiologiques..... 140
6.4 Comparaison des paramètres physiologiques avec la littérature 142

7. Conclusion.....145

CHAPITRE V 149

EMILIANIA HUXLEYI DANS LE GYRE PACIFIQUE-SUD 149

1. Qu'est ce que BIOSOPE?.....152

1.1 Objectifs de la campagne et caractéristiques du Gyre Pacifique-Sud 152
1.2 Intérêt de la campagne BIOSOPE dans le cadre de cette thèse 154

2. Croissance potentielle d'*E. huxleyi* à la station GYR 156

2.1 Méthode appliquée 156
2.2 Taux de croissance potentiel estimé pour *E. huxleyi* à la station GYR... 161

3. *E. huxleyi* le long du transect BIOSOPE (article en préparation) 166

4. Conclusion du chapitre 195

CHAPITRE VI..... 197

DISCUSSION & PERSPECTIVES..... 197

REFERENCES 215

ANNEXES..... 229

Liste des figures

Figure I.1 : Classification du plancton en différentes classes de tailles..... 3
Figure I.2 : Premières illustrations et observations de coccosphères par Wallich (1861). 5
Figure I.3 : Différents types de coccosphères et de coccolithes (Guerreiro, 2013). 6
Figure I.4 : Diversité morphostructurale des coccosphères existantes et leurs hétérococcolithes..... 7
Figure I.5 : Représentation schématique du cycle de vie des coccolithophoridés..... 8
Figure I.6 : Rôle des coccolithophoridés dans les cycles biogéochimiques..... 12
Figure I.7 : Vue globale de la concentration en PIC prise par MODIS-Terra. 14
Figure I.8 : Schéma de la zone photique subtropicale. 15
Figure I.9 : Stratégie écologique des coccolithophoridés en fonction d'autres grands groupes phytoplanctoniques. 16
Figure I.10 : Coccosphère et coccolithes d'*Emiliania* sp..... 18
Figure I.11 : Efflorescence de phytoplancton, spécifiquement *Emiliania huxleyi*, dans la mer de Barents..... 20
Figure I.12 : Emiliania huxleyi exposée à une forte concentration en CO_2. 23
Figure I.13 : Nombre d'études faites en laboratoire sur *E. huxleyi* par paramètres principaux testés. 28
Figure I.14 : Figures représentant la distribution des coccolithophoridés au printemps (avril-juin)... 31
Figure I.15 : Production primaire mondiale océanique..... 33
Figure I.16 : Abondance relative d'*E. huxleyi* et *Florisphaera profunda* sur une période de janvier 1991 à janvier 1994 et sur une profondeur de 200 m..... 34
Figure II.1 : Schéma (A) et photo (B) d'un système de cultures en chemostat..... 42
Figure II.2 : Schéma (A) d'une bouteille batch fermée et photo (B) d'un incubateur utilisé pour ce type de cultures. 44
Figure II.3: Schéma explicatif de la croissance cellulaire typique dans un système fermé type batch. 45
Figure II.4 : Souches RCC963 et RCC911 d'*E. huxleyi* prises au microscope à balayage électronique (MEB). 46
Figure II.5 : Cycle d'irradiance à la surface de l'océan sur 24h à la station GYR et à la date d'arrêt du bateau à cette station..... 47
Figure II.6 : Incubateur et filtre neutre..... 49
Figure II.7 : Déroulement des cultures en laboratoire. 56
Figure II.8 : Images des mesures faites sur les cellules. 63
Figure III.1 : Densité cellulaire des expériences HL (A) et LL (B) en fonction du jour de l'expérience. 70

Figure III.2 : Figure explicative mettant en avant l'incapacité de calculer ou définir un taux de croissance pour une expérience limitée en nutriment. 72
Figure III.3 : Logarithme népérien des points de densité cellulaire pour les expériences contrôles en fonction du jour de l'expérience. 74
Figure III.4 : Logarithme népérien des points de densité cellulaire linéaires, pour les expériences non limitées en nutriments en HL (A) et LL (B)..... 74
Figure III.5 : Consommation en nutriments exprimée en % pour le nitrate et le phosphate. 77
Figure III.6 : Changement en DIC exprimé en %, au cours des expériences en HL et LL..... 80
Figure III.7 : Volume des coccosphères (A) et volume des cellules (B). 81
Figure III.8 : DSL en fonction de l'expérience. 82
Figure III.9 : Volume des cellules contre le volume des coccosphères pour les différentes expériences. 84
Figure III.10 : La longueur des coccolithes (DSL) en fonction du volume des cellules (A) et de celui des coccosphères (B). 84
Figure III.11 : Résultats et comparaison des deux méthodes d'analyses du PIC. 86
Figure III.12 : Quotas cellulaires de matière particulaire: PIC (A), POC (B), PON (C) et POP (D)..... 89
Figure III.13 : Rapports des quotas cellulaires : PIC:POC (A), POC:PON (B), POC:POP (C) et PON:POP (D)..... 91
Figure III.14 : Quota cellulaire en POC en fonction du volume des cellules internes. 94
Figure III.15 : Production de calcification en fonction de la pCO_2 du milieu pour les différentes souches d'*E. huxleyi* cultivées dans des conditions normales de lumière, température et riches en nutriments..... 98
Figure III.16 : Rapport PIC:POC d'*E. huxleyi* en fonction de l'irradiance. 100
Figure IV.1 : Représentation schématique cellulaire des deux modèles physiologiques. 110
Figure IV.2 : Forme de la courbe de quota normalisé (^{n}Quota) (équation IV-6). 111
Figure IV.3 : Figures de Langer et al. (2013). 117
Figure IV.4 : Comparaison du modèle de Monod et Droop. 123
Figure IV.5 : Courbe de croissance typique pour les microalgues. 125
Figure IV.6 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate pour PML B92/11. 127
Figure IV.7 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate pour PML B92/11. 128
Figure IV.8 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en nitrate pour PML B92/11. 129
Figure IV.9 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate et en conditions de forte lumière pour RCC911 : HL-LP. 130

Figure IV.10 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en nitrate et en conditions de forte lumière pour RCC911 : HL-LN..... 132
Figure IV.11 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate et en conditions de faible lumière pour RCC911 : LL-LP..... 133
Figure IV.12: Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en nitrate et en conditions de faible lumière pour RCC911 : LL-LN. 134
Figure IV.13 : Cadre conceptuel de l'effet de changements environnementaux sur la structure de communauté des plantes (ou biodiversité) et fonctionnement de l'écosystème..... 136
Figure IV.14 : Schéma de la relation existante entre le taux d'assimilation et la concentration externe en nutriment (A) ; et le taux de croissance et le quota cellulaire en nutriment (B)..... 138
Figure IV.15 : Tests de sensibilité des paramètres physiologiques pour l'expérience limitée en nitrate PML B92/11. 141
Figure IV.16 : Comparaison des paramètres physiologiques avec la littérature..... 144
Figure V.1 : Transect de la campagne BIOSOPE à travers le gyre Pacifique-Sud..... 152
Figure V.2 : Caractéristiques nutritives et d'abondance en coccolithophoridés le long du transect BIOSOPE..... 155
Figure V.3 : Taux de croissance instantané en fonction de l'irradiance pour l'espèce *E. huxleyi.* 159
Figure V.4 : Taux de croissance d'*E. huxleyi* simulé à la station GYR. 163
Figure V.5 : Equilibre de distribution des nutriments et lumière, donné à trois profondeurs z_l. 164
Figure V.6: Environmental variables along the BIOSOPE transect. 172
Figure V.7 : Dependence of the growth rate to the irradiance for *E. huxleyi.* 173
Figure V.8 : Dependence of the growth rate to the temperature for *E. huxleyi*..... 174
Figure V.9 : Dependence of the growth rate to the nitrate concentration for *E. huxleyi.* 176
Figure V.10 : Dependence of the calcification rate to the irradiance for *E. huxleyi*..... 178
Figure V.11 : Dependence of the calcification rate to the temperature for *E. huxleyi.* 179
Figure V.12 : Dependence of the calcification rate to the nitrate concentration for *E. huxleyi*. 180
Figure V.13: Modeled growth (in $days^{-1}$) for *E. huxleyi* along the BIOSOPE transect..... 181
Figure V.14 : Contribution of each term of the growth rate calculation..... 182
Figure V.15 : Spheres per mL along the BIOSOPE transect. 183
Figure V.16 : Correlation between the modeled growth rate and the number of sphere per mL. ... 184
Figure V.17: Potential cellular calcification rate (in $pg.cell^{-1}.d^{-1}$) of *E. huxleyi* estimated along the BIOSOPE transect..... 185
Figure V.18 : Contribution of each term of the calcification rate calculation. 186
Figure VI.1 : Images en MEB d'une cellule limitée en phosphate (A) et limitée en nitrate (B)..... 200
Figure VI.2 : Relation entre le quota cellulaire de POC et le volume des cellules..... 203
Figure VI.3 : Rapport de l'élément limitant sur le carbone et de l'élément non limitant sur le carbone pour l'azote et le phosphore, pour *E. huxleyi.* 209

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Liste des paramètres environnementaux étudiés sur *E. huxleyi* en cultures. 27

Tableau II.1 : Dates du prélèvement et concentration en nitrate et phosphate fournies par SOMLIT. 50

Tableau II.2 : Plan d'expérience avec les paramètres choisis préalablement. 58

Tableau II.3 : Liste des échantillons pris à la fin des expériences. 60

Tableau II.4 : Tableau récapitulatif des paramètres analysés.. 64

Tableau III.1 : Résultats des taux de croissance (µ) pour les expériences contrôles et à faible pH. ... 73

Tableau III.2 : Concentrations en nutriments dissous pour les milieux de cultures (A) et à la fin des expériences (B). 76

Tableau III.3 : Système du carbone inorganique dissous et saturation en calcium pour les milieux de cultures (A) et les expériences (B). 78

Tableau III.4 : Diamètre mesuré des coccosphères et des cellules et longueur des coccolithes (DSL). 83

Tableau III.5 : Quotas cellulaires de matière particulaire et erreur sur la mesure (n=6). 88

Tableau III.6 : Rapports des quotas de matière particulaire. 90

Tableau III.7 : Production de PIC (calcification) et de POC (photosynthèse) pour les expériences contrôles..... 92

Tableau III.8 : Récapitulatif des principaux effets et variations observées dans les expériences présentées dans ce manuscrit, référencées par différentes publications. 101

Tableau IV.1 : Type de culture et paramètres physico-chimiques du milieu des expériences réalisées par Langer et al. (2013). 116

Tableau IV.2 : Constantes indépendantes du temps. 118

Tableau IV.3 : Densité cellulaire en fonction du jour de l'expérience. 119

Tableau IV.4 : Données de concentrations en nutriments (NO_3 ou PO_4) pour les cultures RCC911 (A) et les cultures PML B92/11 (B). 120

Tableau IV.5 : Données du quota cellulaire maximal et minimal particulaire de l'élément limitant. 122

Tableau IV.6 : Résultats du meilleur ajustement entre le modèle et les données. 139

Tableau V.1 : Filtres appliqués à la base de données d'expériences de cultures sur *E. huxleyi* de Aloisi (2015). 157

Tableau V.2 : Valeurs des paramètres physiologiques estimés pour l'expérience RCC911 HL-LN.... 160

Tableau VI.1 : Abondance cellulaire d'*E. huxleyi* dans une zone d'efflorescence, un upwelling, une niche profonde et des cultures en laboratoire, avec la référence correspondante. 212

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

« Keep your head up, keep your heart strong
Keep your mind set, keep your air long »
Ben Howard

PREAMBULE

Environ 70 % de la surface de la Terre est recouverte par les océans où la vie est extrêmement diversifiée (Angel, 1993), des grands mammifères marins aux virus invisibles à l'œil nu. Quoique majoritairement microscopique, le plancton marin représente l'essentiel de la biomasse des océans, soit 98 %, alors que les 2 % de matière vivante restants dans l'océan sont dus aux mammifères marins, céphalopodes ou poissons (Sheldon et al., 1972). Les organismes planctoniques, regroupant les virus, les bactéries, les êtres unicellulaires eucaryotes (ou « protistes ») ou multicellulaires, dérivent au gré des courants et s'étendent sur une large gamme de taille, du méga- au pico-plancton (Figure I.1) (Sieburth, 1979). Certains d'entre eux, appelés le phytoplancton, sont capables d'effectuer la photosynthèse en utilisant l'énergie du soleil pour synthétiser leur propre matière organique alors que d'autres organismes planctoniques se préfèreront hétérotrophes ou même mixotrophes, combinant une activité autotrophique et hétérotrophique (Caron et al., 2012). Ce plancton végétal ou phytoplancton, en tant que producteur primaire marin, se retrouve à la base du développement de réseaux trophiques supérieurs et constitue la nourriture d'autres êtres unicellulaires, tels que les protistes animaux comme les radiolaires ou les foraminifères. Par l'absorption de gaz carbonique et/ou la séquestration du carbone organique vers l'océan profond, le plancton marin joue un rôle primordial dans la pompe biologique du carbone et est un outil précieux pour l'étude du changement climatique.

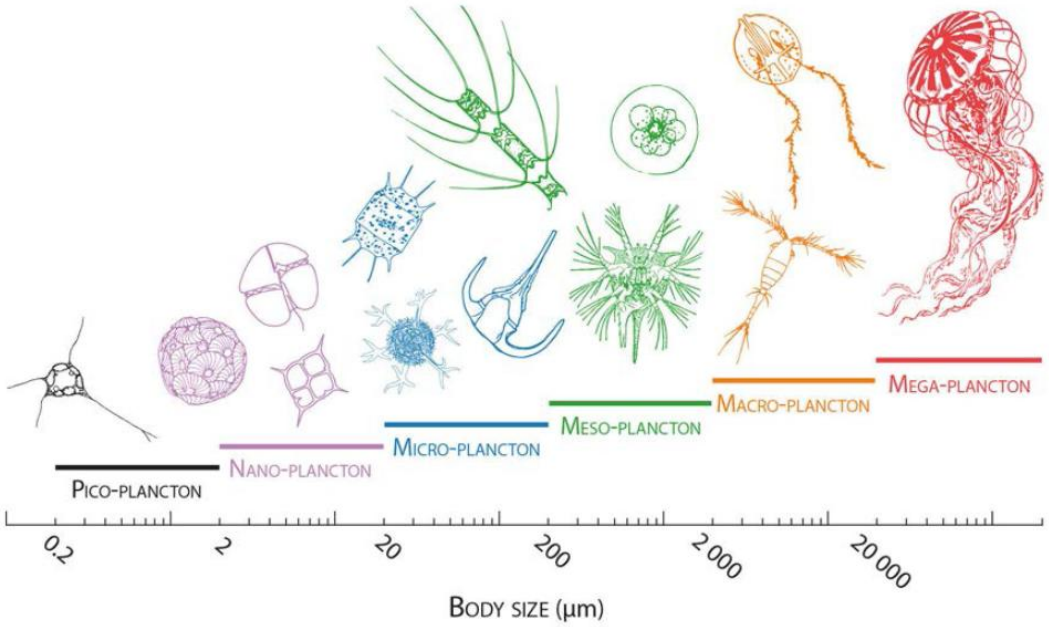


Figure I.1 : Classification du plancton en différentes classes de tailles. Figure prise dans Biard (2015).

Dans ce chapitre sera tout d'abord décrit le groupe des coccolithophoridés dans son ensemble, sa découverte, sa distribution géographique et son importance écologique. Ensuite l'espèce *E. huxleyi*, espèce étudiée dans cette thèse, sera présentée plus en détail ainsi que la connaissance actuelle de sa physiologie. Puis seront exposés les types d'approches utilisées pour l'étude de la physiologie des coccolithophoridés vivants. Enfin, l'ensemble des concepts exposés dans ce chapitre permettront d'introduire les objectifs de cette thèse, les méthodes utilisées pour y répondre et le plan du manuscrit.

1. Les Coccolithophoridés : nannoplancton calcaire

1.1 Taxonomie et découverte

Les coccolithophoridés sont des organismes eucaryotes unicellulaires, marins et phytoplanctoniques. Ils font partie du groupe des Haptophytes, de la classe des Coccolithophyceae et de la sous-classe des Prymnesiophyceae (Hibberd, 1976). La phylogénie complète est disponible sur le site web AlgaeBase[1]. Les coccolithophoridés, aussi nommés par l'anglicisme « coccolithophores », font partie du nannoplancton, c'est-à-dire du plancton de taille inférieure à 20 µm et supérieure à 2 µm (Figure I.1). Ils sont formés par une cellule entourée de petites plaques calcaires de différentes formes selon les espèces, appelées les coccolithes. Les espèces sont notamment différenciées par les propriétés cristallographiques et optiques des coccolithes (Young and Bown, 1991). L'ensemble des plaques calcaires entourant la cellule s'appelle la coccosphère. La taille des coccolithes varie de 1 à 10 µm (Young and Henriksen, 2003) et le diamètre des coccosphères d'environ 1 à 30 µm (de Vargas et al., 2007).

Les premières observations de coccolithes ont été faites en 1836 par Christian Gottfried Ehrenberg (1836), appelé « fondateur de la micropaléontologie », dans des échantillons de sédiments de la Mer Baltique où il décrivit de minuscules objets elliptiques. Il leur attribua alors une origine inorganique. En 1857, la Marine Américaine envoya des échantillons de sédiments de l'Atlantique Nord au biologiste Thomas Huxley (Pienaar, 1994) qui y trouva « une multitude de très curieux objets arrondis ». Huxley confirma alors l'hypothèse d'Ehrenberg, comme quoi ces petits objets seraient d'origine inorganique et les nomma alors « coccolithes » (du grec *κόκκος* qui signifie « de forme arrondie » ou « grain » et *λίθος* qui signifie « pierre »).

C'est en 1861 que Georges Charles Wallich découvrit les premières coccosphères entières qu'il illustra pour la première fois comme représenté par la Figure I.2. Par la suite, John Murray et ses collègues, pendant l'expédition du *Challenger* (1872-1876), décrivirent les coccosphères

[1] http://www.algaebase.org/

comme étant l'exosquelette d'une algue calcifiante (Murray and Renard, 1891). A partir de ces années-là, les découvertes et les recherches se succédèrent pour comprendre le lien entre les coccolithes et les coccosphères, identifier les différentes espèces trouvées dans la colonne d'eau et dans les sédiments, et définir l'utilité des coccolithes.

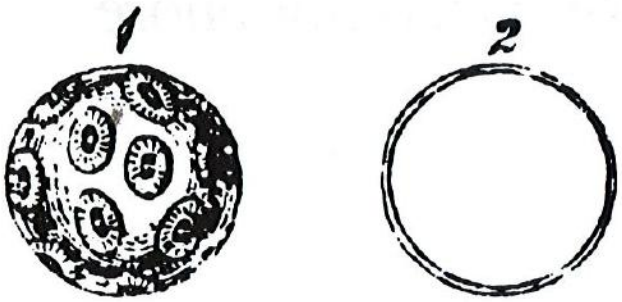


Figure I.2 : Premières illustrations et observations de coccosphères par Wallich (1861).

Le terme de « nannoplancton » fut proposé pour la première fois par H. Lohmann en 1902 afin de décrire le plancton de petite taille passant à travers une maille de filet à phytoplancton de 45-60 µm (Pienaar, 1994). Au début du XXe siècle, d'intenses travaux ont commencé à se systématiser sur le nannoplancton calcifiant, dont les coccolithophoridés, et plusieurs scientifiques dont H. Lohmann s'attelèrent à élaborer une description du nannoplancton calcifiant vivant, ainsi que de quelques fossiles (Siesser, 1994). L'arrivée de nouvelles techniques de microscopie dans les années 1950 a permis d'observer et d'illustrer un grand nombre d'organismes et d'améliorer la connaissance des espèces du groupe du nannoplancton, difficiles à observer avec précision avant ces années-là. Depuis les années 60-70, le microscope électronique à balayage est devenu un outil très utilisé, en complément du microscope optique, afin d 'étudier, d'identifier et d'illustrer le nannoplancton calcaire et sa morphostructure.

1.2 Morphologie et fonction des coccolithes

La morphologie des coccolithes est très diversifiée et sert de critère taxonomique. Il existe deux grands groupes de coccolithes : les holococcolithes et les hétérococcolithes (voir Figure I.3). Les holococcolithes sont composés de nombreux petits cristaux automorphes et seraient formés par une calcification extracellulaire (Young, 1989). Les hétérococcolithes, plus communs, sont composés d'une série radiale d'unités de cristaux complexes, sont biominéralisés intracellulairement et ensuite excrétés par la cellule pour former la coccosphère (Pienaar, 1994; Young et al., 1997).

La grande diversité morphologique qui existe entre les coccolithophoridés mais aussi au sein du groupe des hétérococcolithes est mise en avant par la Figure I.3. De plus, la Figure I.4 représente la diversité morphologique des coccosphères portant des hétérococcolithes et nous permet de voir la variation de taille entre les différentes espèces de la sous-classe Calcihaptophycidae (de Vargas et al., 2007), dont font partie plusieurs espèces de coccolithophoridés qui dominent dans l'océan moderne (ex. *E. huxleyi, Gephyrocapsa sp.*, *Coccolithus pelagicus* …). Les coccosphères composées d'hétérococcolithes sont formées par des assemblages de coccolithes qui peuvent être divers : certains s'emboitent comme les placolithes et d'autres se juxtaposent sans aucune interconnexion avec le coccolithe adjacent comme par exemple les caneolithes et les rhabdolithes (Figure I.3).

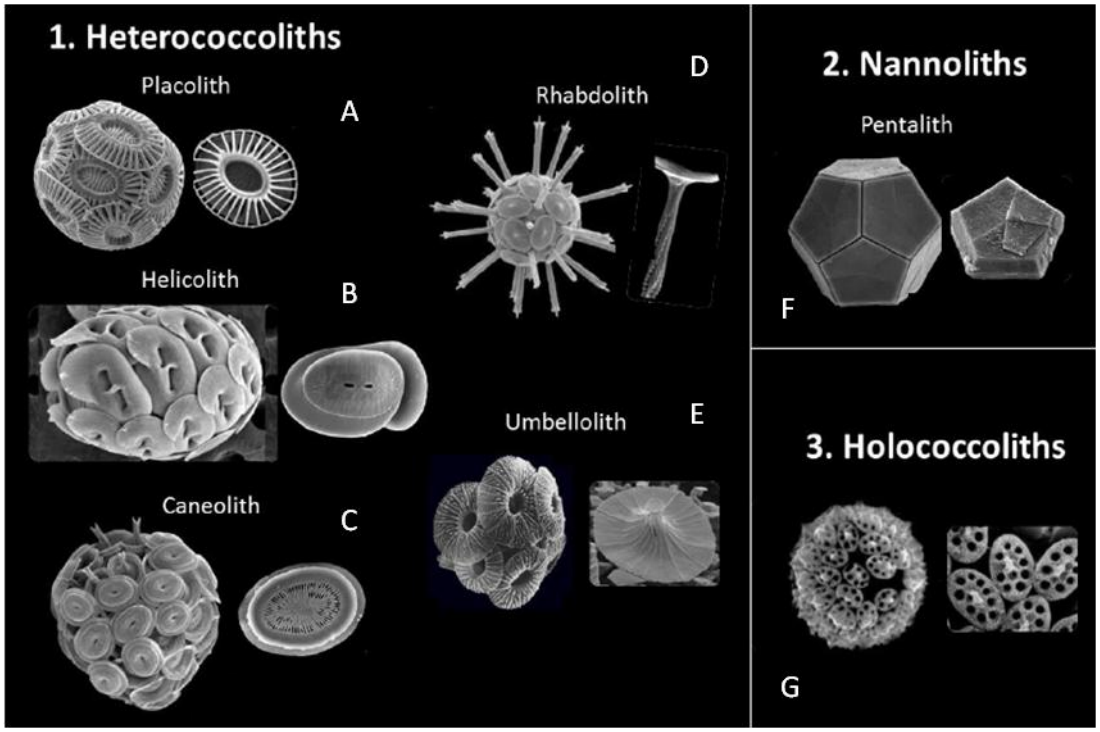


Figure I.3 : Différents types de coccosphères et de coccolithes (Guerreiro, 2013). A) *Emiliania huxleyi*, B) *Helicosphaera carteri*, C) *Syracosphaera pulchra*, D) *Rhabdosphaera clavigera*, E) *Umbellosphaera tenuis*, F) *Braarudospharea bigelowii* et G) *Syracolithus schilleri*.

La fonction des coccolithes est encore mal comprise. Young (1994) suggère quatre hypothèses pour expliquer l'existence des coccolithes et la formation de ces coccosphères. Premièrement, les coccolithes pourraient être une protection contre la prédation, contre les dommages physiques ou contre les bactéries, et/ou contre les chocs chimiques, osmotiques ou mécaniques (Manton, 1986). Deuxièmement, ils pourraient être impliqués dans la régulation de

densité et de flottabilité de la cellule, afin d'accélérer ou de décélérer la sédimentation des coccosphères. Troisièmement, la coccosphère peut avoir une fonction biochimique pour les cellules de par le lien physiologique qui pourrait exister entre la photosynthèse et la calcification où le dioxyde de carbone CO_2, produit par la calcification, serait utilisé par la photosynthèse (voir partie 1.4). Ainsi la calcification réduirait le coût énergétique de la photosynthèse (Sikes et al., 1980). Quatrièmement, les coccolithes pourraient permettre à la cellule de réguler la quantité de lumière qu'elle reçoit, soit en la réfléchissant dans la colonne d'eau soit en la réfractant dans la cellule, permettant aux coccolithophoridés de s'adapter à une large gamme d'irradiances (Winter et al., 1994).

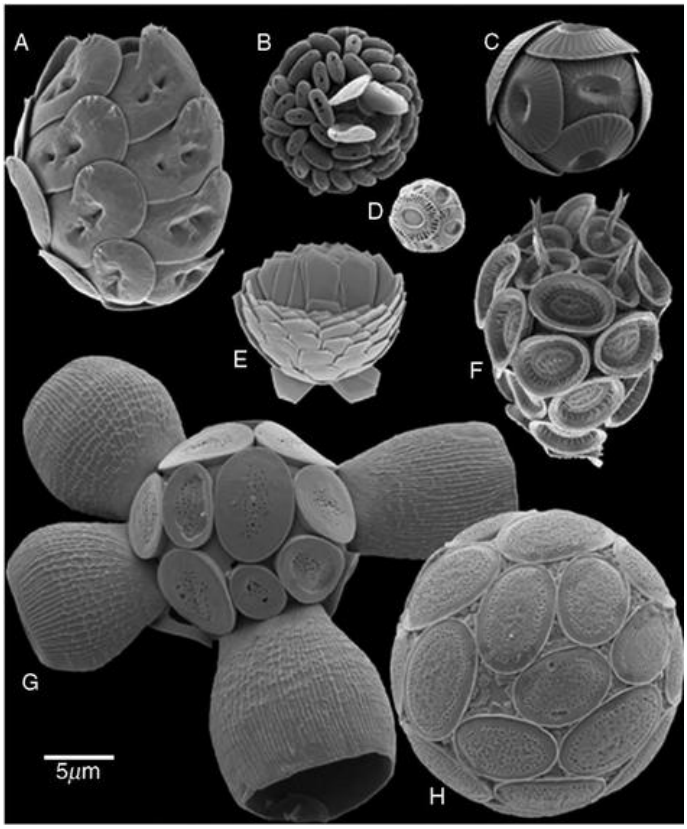


Figure I.4 : Diversité morphostructurale des coccosphères existantes et leurs hétérococcolithes. Ici sont représentées les morphostructures observées dans la sous-classe Calcihaptophycidae introduite par de Vargas et al. (2007). A) *Helicosphaera carteri*, B) *Algirosphaera robusta*, C) *Coccolithus pelagicus*, D) *Emiliania huxleyi*, E) *Florisphaera profunda*, F) *Syracosphaera pulchra*, G) *Scyphosphaera apsteinii* et H) *Pontosphaera japonica*. Figure de de Vargas et al. (2007).

1.3 Le cycle de vie des Coccolithophoridés

Le cycle de vie des coccolithophoridés est hétéromorphique[2], avec deux phases bien distinctes : la phase diploïde où les cellules produisent des hétérococcolithes et sont non mobiles (sans flagelle) et la phase haploïde où elles produisent soit des holococcolithes, soit aucun coccolithe et sont non calcifiées (Young et al., 2005). Lors de la phase haploïde, les cellules ont des flagelles et sont donc mobiles (Billard and Inouye, 2004; Houdan et al., 2003).

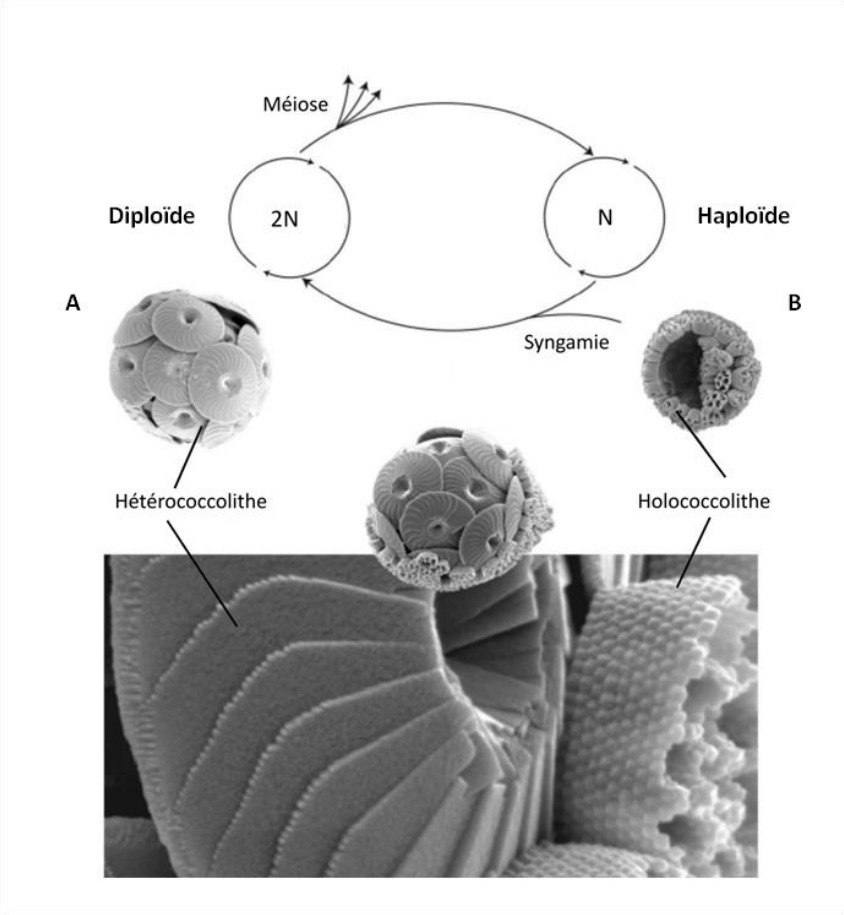


Figure I.5 : Représentation schématique du cycle de vie des coccolithophoridés. Phases diploïde et haploïde qui produisent respectivement des hétérococcolithes et des holococcolithes (ou des cellules non calcifiées comme *E. huxleyi* en phase haploïde). Avec en A) *Calcidiscus leptoporus* et en B) *Calcidiscus quadriperforatus*. La combinaison des deux est montrée au milieu et représente une étape de transition entre les deux phases (Young et al., 2005). La syngamie (fusion des gamètes) se traduit par la superposition des holococcolithes sur les hétérococcolithes comme montré sur la photo en bas de la figure (prise en microscopie électronique à balayage: MEB). Figure prise dans Young and Henriksen (2003).

Les hétérococcolithes et les holococcolithes sont produits par une seule espèce dans des phases différentes de son cycle de vie (Figure I.5) mais peuvent aussi être présents

[2] Qui présente des formes très différentes chez une même espèce.

simultanément chez certaines espèces, ce qui a amené la communauté scientifique à revisiter la taxonomie (Young et al., 2003). Ce cycle de vie est représenté par la Figure I.5 où le processus de méiose (processus se déroulant durant l'élaboration des gamètes[3] chez les espèces dites diploïdes) amène les cellules dans une phase haploïde. Chacune de ces deux phases sont capables de se reproduire de façon asexuée.

Sur approximativement 300 espèces d'Haptophytes présentes dans l'océan moderne, environ 200 sont des coccolithophoridés (Billard and Inouye, 2004; Young et al., 2003) et ceci contribue fortement à la biodiversité de ce groupe (Jordan and Chamberlain, 1997). Parmi ces 200 coccolithophoridés, certains sont non calcifiants (que ce soit à un des stades de leur vie ou pendant les deux phases décrites précédemment), notamment chez les familles des Noelaerhabdaceae, des Hymenomonadaceae et des Pleurochrysidaceae (Young et al., 2003). Le cycle de vie des coccolithophoridés a été largement étudié en culture en laboratoire et sous l'effet de différentes conditions environnementales (ex. Fiorini et al., 2011; Predotti, 2012), ainsi sa compréhension fait partie des intérêts majeurs de la recherche sur les coccolithophoridés.

1.4 Le rôle biogéochimique des Coccolithophoridés

Par leurs processus physiologiques de photosynthèse et de calcification, les coccolithophoridés jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique du carbone de l'océan actuel (Rost and Riebesell, 2004). Leur rôle est également évoqué, même si c'est avec un degré de certitude moindre, comme facteur de régulation du flux de CO_2 entre l'océan et l'atmosphère (Rost and Riebesell, 2004). Du fait de leur longue histoire évolutive (apparus il y a 200 millions d'années), les coccolithophoridés ont probablement joué un rôle important dans le cycle biogéochimique du carbone dans l'océan ancien (Bown, 2005).

Pendant le processus de photosynthèse, les coccolithophoridés utilisent la lumière comme source d'énergie pour synthétiser du carbone organique à partir du dioxyde de carbone (CO_2) dissous dans l'eau (équation I-1). Ils contribuent à plus de 10 % de la production primaire marine nette qui compte au total pour environ 50 PgC par an (Field et al., 1998; Poulton et al., 2007). Après la mort des cellules, une partie de la matière organique ainsi formée par les coccolithophoridés est exportée de l'océan de surface vers l'océan profond (> 200 m). Ainsi, les coccolithophoridés participent à la pompe biologique du carbone qui est le principal puits de carbone dans l'océan de surface (Rost and Riebesell, 2004) (voir Figure I.6). En effet, environ 25% du carbone fixé par le phytoplancton est exporté vers l'océan profond (Falkowski et al.,

[3] Cellule reproductrice arrivée à maturité, capable de fusionner avec un autre gamète.

2000), alors que les 75% restant sont minéralisés par les microorganismes et restent sous forme minérale dans l'océan de surface.

Photosynthèse: $$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \quad \text{(I-1)}$$

Pendant le processus de calcification, les coccolithophoridés forment la calcite ($CaCO_3$) des coccolithes à partir des ions Ca^{2+} et HCO_3^- dissous dans l'eau (équation I-2). Contrairement à la photosynthèse, le processus de calcification induit une augmentation de la concentration de CO_2 dissous dans l'eau. On appelle donc ce processus la « contre-pompe » des carbonates (Rost and Riebesell, 2004). La calcification est le troisième processus principal au sein du cycle du carbone océanique (Falkowski et al., 2000). Les coccolithophoridés sont responsables d'environ la moitié de la production océanique des carbonates (Broecker and Clark, 2009) et forment ainsi un maillon primordial dans la pompe des carbonates.

Calcification: $$Ca^{2+} + 2HCO_3^- \rightarrow CaCO_3 + CO_2 + H_2O \quad \text{(I-2)}$$

La calcite est la forme la plus stable de carbonate de calcium et est produite dans l'océan pélagique en grande partie par les coccolithophoridés (Broecker and Clark, 2009). Après la mort de l'organisme, les coccolithes vont être exportés vers l'océan profond en tant que particules indépendantes ou inclues dans des pellets (de Vargas et al., 2007). Exposés à l'eau ambiante, ils pourront subir une dissolution si l'eau est sous-saturée par rapport à la calcite. Le degré de saturation par rapport à la calcite dépend de la concentration des ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} et de la constante de solubilité stœchiométrique de la calcite, K_{sp}, elle-même dépendante de la température, de la salinité et de la pression (Zeebe et Wolf-Gladrow, 2001) :

$$\Omega_{Ca} = \frac{[Ca^{2+}][CO_3^{2-}]}{K_{sp}} \quad \text{(I-3)}$$

Avec K_{sp} la constante de solubilité stœchiométrique de la calcite (Mucci, 1983; Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001). Dans l'océan moderne, la concentration de calcium est considérée constante (ne varie qu'avec la salinité), ainsi la concentration en ions carbonates est la seule variable de l'équation I-3. La calcite sera dissoute lorsque l'état de saturation (Ω_{Ca}) sera inferieur à 1 (eaux sous-saturées), alors que la calcite sera thermodynamiquement stable (pas de dissolution) si l'état de saturation est supérieur à 1 (eaux sursaturées). La valeur de la constante de solubilité K_{sp} augmente fortement avec la profondeur, avec la diminution de la température et

l'augmentation de la pression dans l'océan, de façon telle que l'état de saturation de l'océan par rapport à la calcite diminue avec la profondeur (Gangstø et al., 2008; Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001). La profondeur en dessous de laquelle toute la calcite est dissoute, et qui correspond alors à une constante de saturation de la calcite Ω_{Ca} inférieure à 1 (Figure I.6), s'appelle la Profondeur de Compensation des Carbonates (en anglais, CCD : « Carbonates Compensation Depth »). En se dissolvant, les coccolithes libèrent le Ca^{2+} et le CO_3^{2-}, ce dernier augmentant l'alcalinité des eaux et contribuant à redistribuer l'alcalinité à l'échelle de l'océan global.

Les coccolithophoridés sont capables de faire de vastes efflorescences à la surface des océans pouvant recouvrir une surface supérieure à 100 000 km² (Brown and Yoder, 1994) et visibles depuis les satellites grâce aux propriétés optiques importantes des coccolithes permettant la réflexion de la lumière incidente. Ces efflorescences printanières ont un impact direct sur les flux de dioxyde de carbone (CO_2) à l'interface air-océan, notamment celles de l'Atlantique-Nord (Shutler et al., 2013; Sabine et al. 2004). Sur les 30% d'émissions de CO_2 anthropiques enfouis annuellement dans l'océan global, environ un quart est absorbé par l'Atlantique-Nord (Sabine et al., 2004). Les évènements d'efflorescence de l'espèce *Emiliania huxleyi* dans l'Atlantique-Nord ont montré, sur dix années de données, une capacité à augmenter la pCO_2 dans les eaux de surface et par conséquent, réduire le flux air-mer de CO_2 (Shutler et al., 2013). Cette réduction du flux peut persister durant 6 mois, ou plus, après l'extinction de l'efflorescence et Shutler et al. (2013) estiment que ces efflorescences printanières peuvent réduire de 3 à 28% le puits net de CO_2 de l'Atlantique-Nord.

A la fois source et puits de CO_2, les coccolithophoridés ont donc un double effet sur le flux de CO_2 vers l'océan qui dépend du rapport entre la production de carbone organique particulaire (POC : « Particulate organic carbon ») réalisée par la photosynthèse et celle de carbone inorganique particulaire (PIC : « Particulate inorganic carbon ») réalisée par la calcification (Shutler et al., 2013).

Les coccolithophoridés participent aussi au cycle biogéochimique du soufre puisqu'ils sont un des organismes phytoplanctoniques à produire le plus de diméthylsulfures (DMS) dans l'océan (Malin and Steinke, 2004). Dans l'atmosphère, les diméthylsulfures, qui sont des dérivés des DMSP (diméthylsulfoniopropionate), participent à la nucléation des nuages. Le produit de l'oxydation atmosphérique de ces DMS est la source majeure d'aérosols marins. Ces aérosols marins influencent le climat global de façon directe en réfractant et en absorbant les radiations et de façon indirecte en augmentant l'effet albédo des nuages (Malin and Erst, 1997; Simó, 2001).

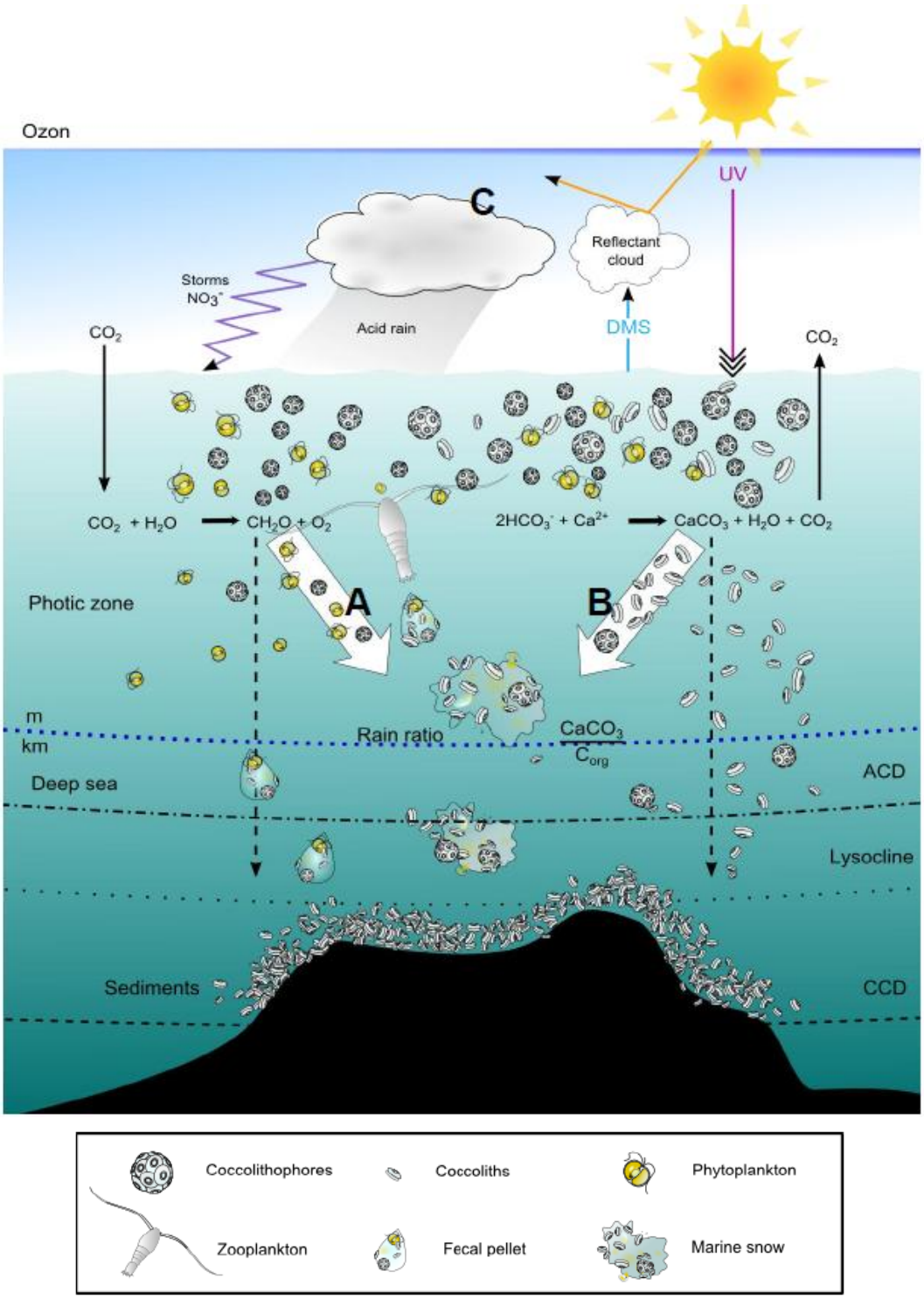


Figure I.6 : Rôle des coccolithophoridés dans les cycles biogéochimiques. Schéma représentant A) la pompe biologique du carbone et B) la contre-pompe des carbonates. $CaCO_3$ est le carbonate de calcium et C_{org} est le carbone organique. ACD est la profondeur de compensation de l'aragonite4, la lysocline est la profondeur à partir de laquelle la dissolution des carbonates va augmenter, CCD est la profondeur de compensation des carbonates. UV sont les rayons ultra-violets arrivant à la surface de l'océan et les DMS sont des composés diméthylsulfures produits par le phytoplancton. Schéma pris dans Bendif (2011) modifié à partir de de Vargas et al. (2007).

[4] Minéral carbonaté, polymorphe stable à haute température et haute pression du carbonate de calcium.

Par leurs processus métaboliques, les coccolithophoridés participent ainsi à plusieurs cycles biogéochimiques dont le cycle du carbone, des carbonates et des sulfures. De cette façon, ils affectent le climat via les échanges entre l'océan et l'atmosphère. La composition carbonatée de cette microalgue et donc des sédiments qu'elle enrichit en font, de plus, une candidate particulièrement sensible à l'augmentation globale de la pression de CO_2 dans l'océan à long terme (Riebesell and Tortell, 2011) (voir partie 2.3.3 pour de plus amples détails).

1.5 Biogéographie et stratégie écologique

La biogéographie générale et les habitats des coccolithophoridés ont été étudiés par l'intermédiaire d'échantillonnage de sédiments de surface des fonds océaniques, d'eaux de surface et/ou de la colonne d'eau (Brand, 1994; Roth, 1994; Steinmetz, 1994; Winter et al., 1994). La distribution verticale et horizontale des coccolithophoridés dans l'océan mondial dépend de processus physiques tels que la circulation océanique et la sédimentation des cellules dans la colonne d'eau (McIntyre and Bé, 1967; Okada and Honjo, 1973; Winter et al., 1994), de processus écologiques comme le broutage et la mort cellulaire, et de facteurs environnementaux tels que les nutriments, la salinité, la température, la disponibilité en lumière, les vitamines et les minéraux tel que le fer (Martin et al., 1989). Tous ces facteurs environnementaux contrôlent le taux de croissance des cellules (Paasche, 2002).

La distribution globale de surface des coccolithophoridés est visible sur la Figure I.7 qui représente la concentration en PIC visible depuis le satellite MODIS-Terra pour les périodes estivales de chaque hémisphère. Cette figure montre une concentration importante de la calcite, et donc indirectement une abondance de coccolithophoridés importante, dans l'Atlantique et le Pacifique Nord subpolaires et tempérés et à la limite de l'océan austral, notamment dans l'Atlantique Sud-Ouest. De plus, les upwellings côtiers sont aussi des écosystèmes propices à la prolifération de coccolithophoridés (voir Figure I.7).

Cinq grandes zones océaniques de floraison ont été définies pour les coccolithophoridés par McIntyre and Bé (1967) dans l'Atlantique Nord et reprises par Okada and Honjo (1973) dans le Pacifique. Ces zones ont permis d'unifier la description de la distribution des coccolithophoridés. A chaque zone a été attribué un assemblage dominant de coccolithophoridés et celui-ci semble être assez similaire entre les deux hémisphères à part pour les zones polaires (Winter et al., 1994) :

- Subarctique : principalement *Coccolithus pelagicus* et *Calciopappus caudatus* dans l'océan ouvert et pendant les mois d'été, et *Emiliania huxleyi* et *Algirosphaera robusta* dans les eaux d'origine atlantique.

- Tempérée : dominée pendant la majorité de l'année par *Emiliania huxleyi*

- Subtropicale : diversité importante sur la verticale, dominée par des holococcolithes

- Tropicale : dominée par les coccosphères à placolithes, particulièrement *Emiliania huxleyi*, *Calcidiscus leptoporus* et *Gephyrocapsa oceanica*

- Subantarctique : les seuls coccolithophoridés vivant dans cette zone sont ceux appartenant aux *Papposphaeraceae* ou des genres partiellement calcifiés.

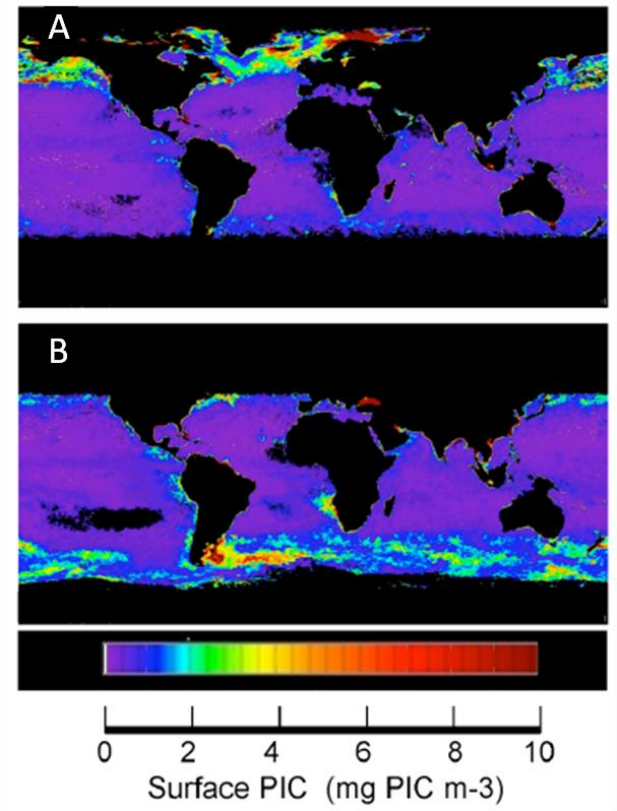


Figure I.7 : Vue globale de la concentration en PIC prise par MODIS-Terra. A) de Juillet à Septembre, B) de Octobre à Décembre. Figure prise dans Balch (2004).

Les coccolithophoridés, comme les autres groupes de plancton photosynthétiques, vivent généralement dans la zone photique de l'océan car ils ont besoin d'un minimum de lumière (voir Figure I.8). La profondeur de cette zone photique, définie comme étant celle où l'irradiance est égale à 1 % de l'irradiance de surface, dépend de la latitude : elle se trouve aux alentours de 30 m pour les hautes latitudes et peut se trouver à 120 m dans les zones

subtropicales (Winter et al., 1994) où l'irradiance de surface est plus importante et où la biomasse est moindre ce qui rend les eaux plus claires. Les assemblages et préférences des espèces de coccolithophoridés seront différents selon la région, comme nous l'avons noté ci-dessus, mais aussi selon la profondeur et donc selon la zone de la couche photique. Selon Winter et al. (1994), les coccolithophoridés porteurs de placolithes n'ont pas de préférence et peuvent vivre à toutes les profondeurs de la couche photique. Par contre, certaines espèces comme par exemple *Umbellosphaera* spp. ne vivent que dans la zone photique supérieure. La zone photique intermédiaire sera caractérisée par la présence d'*Umbellosphaera tenuis, Syracosphaera* spp. et les espèces portant des placolithes. Pour finir, *Florisphaera profunda*, et d'autres espèces, sont adaptées à la vie dans la zone photique inférieure où l'irradiance se trouve en dessous de 1% de l'irradiance de surface (Figure I.8).

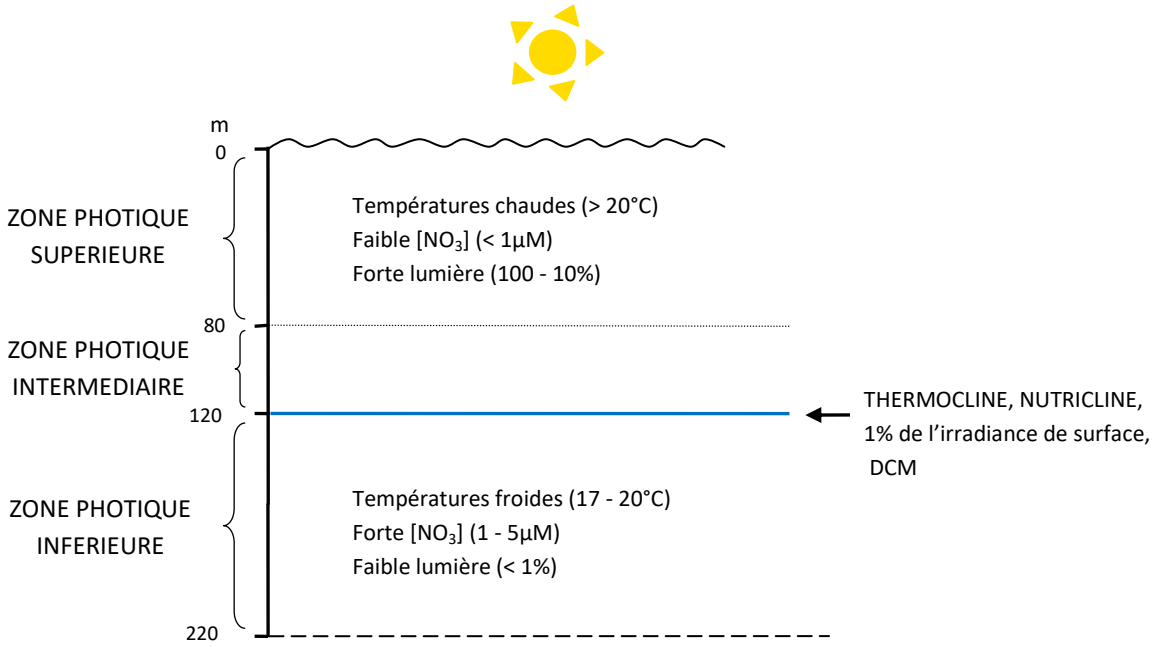


Figure I.8 : Schéma de la zone photique subtropicale. Redessinée à partir de Winter et al. (1994), données collectées dans l'Atlantique Nord-est (R. Jordan, données non publiées). [NO3] = concentration en nitrate ; µM =µmol.L^{-1}; DCM = « Deep Chorophyll Maximum » soit la profondeur du maximum de chlorophylle.

Contrairement aux espèces des régions côtières et/ou polaires, les espèces océaniques vont devoir être plus compétitives pour obtenir des nutriments dont le flux à travers la zone photique est faible (Brand, 1994). De par leur taux de croissance élevé, les espèces des eaux côtières et polaires semblent adaptées à des environnements plus variables mais riches en nutriments. Ces espèces peuvent donc engendrer de larges efflorescences de

coccolithophoridés. Au contraire, les espèces des eaux océaniques s'adaptent à des eaux pauvres en nutriments mais ne s'adaptent pas à un large panel d'environnements variables c'est pourquoi elles ne réagiront pas à un évènement brusque d'apports en nutriments. Ces deux stratégies écologiques sont nommées « K-strategy » et « r-strategy » et ont été introduites par Margalef (1978). La stratégie-K décrit les organismes qui croissent lentement et qui s'adaptent aux environnements stratifiés et pauvres en nutriments. La stratégie-r décrit ceux qui croissent rapidement et adaptés aux environnements eutrophiques et turbulents où les nutriments sont disponibles en grande quantité (Margalef, 1978). Margalef (1978) classifie traditionnellement les groupes phytoplanctoniques selon leurs réponses aux nutriments en fonction de la turbulence. Il place les coccolithophoridés à une place intermédiaire entre les diatomées et les dinoflagellés (voir Figure I.9). Cependant, ce paradigme est à manipuler avec précaution car Margalef (1978) n'a pas pris en compte les autres grands groupes phytoplanctoniques tels que les cyanobactéries ou les prochlorophytes et car d'autres facteurs tels que la taille des cellules ou la prédation peuvent influer sur leur comportement et leur distribution (Balch, 2004).

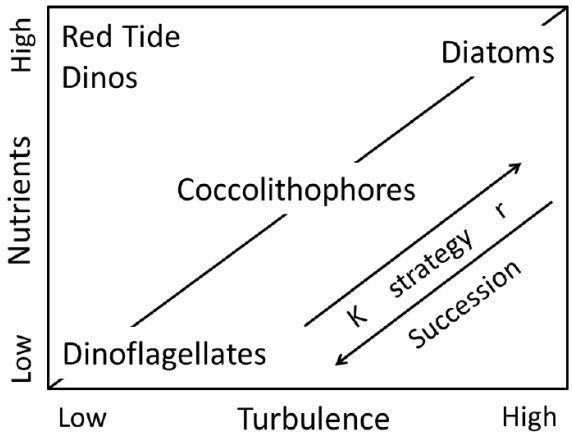


Figure I.9 : Stratégie écologique des coccolithophoridés en fonction d'autres grands groupes phytoplanctoniques. Figure inspirée à partir de Margalef (1978) et redessinée par Balch (2004).

Le groupe des coccolithophoridés dans son ensemble est considéré « K-selected » et la plupart des espèces de ce groupe le sont aussi, caractérisées par leur adaptation à des eaux oligotrophes chaudes et stratifiées dans les faibles et moyennes latitudes (Brand, 1994; Winter et al., 1994; Ziveri et al., 2004). Cependant certaines espèces révèlent un comportement de stratégie-r comme *Emiliania huxleyi* ou *Gephyrocapsa oceanica* qui sont retrouvées en grande abondance dans les zones d'upwelling, à la limite des gyres ou à l'extérieur des plateaux continentaux où de plus grandes quantités en nutriments sont disponibles (Brand, 1994). Ces deux espèces sont capables de former de larges efflorescences (Holligan et al., 1993a; Souza et

al., 2012) ce qui confirme leur comportement de stratégie-r. Ces deux espèces abondantes dans les zones polaires ou dans les zones tropicales enrichies en nutriments ont des taux de croissance maximum plus élevés que les autres espèces. Les coccolithophoridés sont donc distribués le long d'un fort gradient en nutriments et peuvent être caractérisés par une réponse de stratégie écologique K ou r, des zones eutrophiques côtières et polaires jusqu'aux gyres centrales subtropicales et oligotrophes (Brand, 1994).

Alors que Marañón et al. (2013) montre en effet que les coccolithophoridés ont le plus grand taux de croissance maximal comparés aux autres grands groupes phytoplanctoniques, Litchman et al. (2007) soulignent l'affinité intermédiaire des coccolithophoridés pour le nitrate avec une constante de demi-saturation pour l'assimilation du nitrate se trouvant entre celles des diatomées et celles des cyanobactéries ou chlorophytes. Ceci est donc cohérent avec la théorie de Margalef (1978) définissant les coccolithophoridés comme un groupe pouvant se diviser très rapidement et pouvant supporter une gamme assez large de concentration en nutriments.

2. Qui est *Emiliania huxleyi* ?

2.1 Taxonomie, origine et morphologie

L'espèce moderne *Emiliania huxleyi* (Lohman, 1902) (Hay et al., 1967) appartient à l'ordre des *Isochrysidales* (Pascher, 1910) (Edvardsen et al., 2000), à la famille des *Noerlaerhabdaceae* (Jerkovic, 1970) (Young and Bown, 1997) qui se caractérise par des espèces qui calcifient dans une phase de leur cycle de vie (Young et al., 2005) et au genre *Emiliania* (Hay et al., 1967). Cette famille des *Noerlaerhabdaceae* comprend les trois genres : *Emiliania*, *Gephyroscapsa* et *Reticulofenestra*.

L'espèce *Emiliania huxleyi* a été décrite pour la première fois en 1902 mais sa physiologie et sa distribution sont étudiées de façon importante depuis les années 60 (Paasche, 1962, 1964). Cette espèce apparut il y a 278 000 ans et domine les assemblages nannofossiles depuis 85 000 ans (Thierstein et al., 1977). *E. huxleyi* est donc une espèce moderne qui est notamment étudiée pour mieux comprendre la réponse de l'océan actuel aux changements environnementaux.

Cette espèce est calcifiante dans sa phase diploïde et est alors non mobile et porte des hétérococcolithes (Young et al., 2005), comme montré sur la Figure I.10. Ces hétérococcolithes sont formées par deux plaques calcaires ovales (Figure I.10) reliées par des cristaux de calcite disposés perpendiculairement (tube interne sur la Figure I.10) et entourant une aire centrale.

Young and Westbroek (1991) définissent 3 principaux morphotypes d'*Emiliania huxleyi*, différenciés par le degré de calcification ou la forme de leurs hétérococcolithes (Young et al., 2003): morphotypes A, éléments de l'aire centrale incurvés ; B, coccolithes plus larges et éléments plus irréguliers ; et C, aire centrale ouverte ou remplie par une couche très fine. Leur taille peut donc varier selon le morphotype allant de 2.5-3.5 µm pour les morphotypes A et C à 3.5-4.5 µm pour les morphotypes B (Paasche, 2002) mais dépendra aussi des conditions environnementales. L'espèce *E. huxleyi* est relativement petite parmi les coccolithophoridés (en moyenne 5 µm ; Paasche, 2002) avec un contenu cellulaire en calcite relativement faible (0.22 – 1.1 pmolC.cell^{-1}; Fritz and Balch, 1996; Hoppe et al., 2011 et Paasche, 2002), et est donc un contributeur mineur dans l'export de calcite (Ziveri et al., 2007).

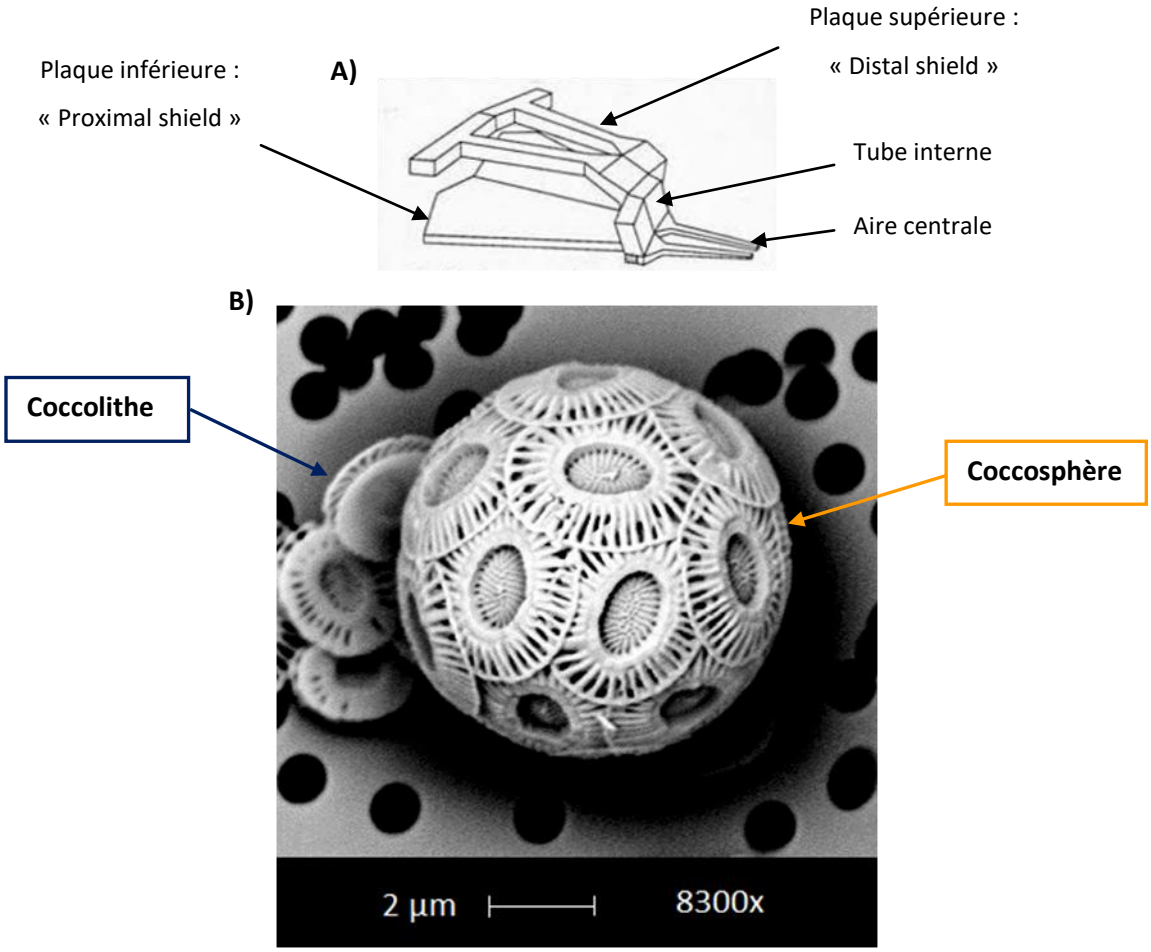


Figure I.10 : Coccosphère et coccolithes d'*Emiliania* sp.. A) Schéma de la structure d'un coccolithe du genre *Emiliania* (pris de Young, 1992). B) Coccosphère d'*Emiliania huxleyi* prise personnellement au microscope électronique à balayage (MEB).

2.2 Diversité biogéographique et stratégie écologique

Comme mentionné dans la partie 1.5, *Emiliania huxleyi* est considérée plus « r-selected » que les autres coccolithophoridés, ce qui est suggéré par son fort taux de croissance intrinsèque et sa prédominance dans les environnements riches en nutriments et peu stratifiés (Paasche, 2002). Cependant, malgré cette stratégie écologique, *E. huxleyi* est une espèce cosmopolite et abondante qui s'adapte à des intervalles très larges en température (1 à 30°C) (Winter et al., 1994) et en salinité (de 11 à environ 40). Sa capacité à dominer dans les zones eutrophiques mais aussi à croître dans les gyres oligotrophes montre sa grande adaptabilité à des concentrations en nutriments très différentes. De plus, elle peut tolérer des niveaux de lumière très différents (Cortés et al., 2001; Okada and Honjo, 1973) et peut même croître à la limite de la couche photique (Winter et al., 1994). En effet, *E. huxleyi* peut être présente dans les communautés de coccolithophoridés à travers les 200 premiers mètres de la colonne d'eau même si elle ne domine pas forcément les assemblages de coccolithophoridés comme montré par Jordan (1988). Malgré cela, *E. huxleyi* reste l'espèce de coccolithophoridés la plus abondante dans l'océan mondial à nos jours, montrant la distribution la plus étendue et la meilleure tolérance aux changements environnementaux (Westbroek et al., 1993). Ce comportement atypique justifie l'étendue des études faites sur cette espèce et l'intérêt toujours grandissant pour mieux comprendre sa physiologie et sa distribution dans l'océan.

L'espèce *E. huxleyi* forme des efflorescences printanières massives dans les régions côtières et continentales tempérées (suivant les efflorescences de diatomées) et polaires. Ces efflorescences, appelées efflorescences « laiteuses », peuvent couvrir des surfaces immenses de l'océan comme celle d'environ 250 000 km^2 observée dans l'Atlantique Nord en 1991 par Holligan et al. (1993). Elles sont ainsi visibles de l'espace (Figure I.11) de par les propriétés optiques des coccolithes qui permettent de réfléchir la lumière (Balch et al., 1999; Voss et al., 1998) et par conséquent, *E. huxleyi* comme les autres coccolithophoridés, a un effet direct sur l'albédo. Ces efflorescences d'*E. huxleyi* peuvent être observées et analysées par imagerie satellite et permettent d'estimer le carbone inorganique particulaire issu des coccolithophoridés à la surface des océans (Balch et al., 1991; Holligan et al., 1993a) ainsi que la quantité de DMS produits lors de ces efflorescences (Brown and Yoder, 1994).

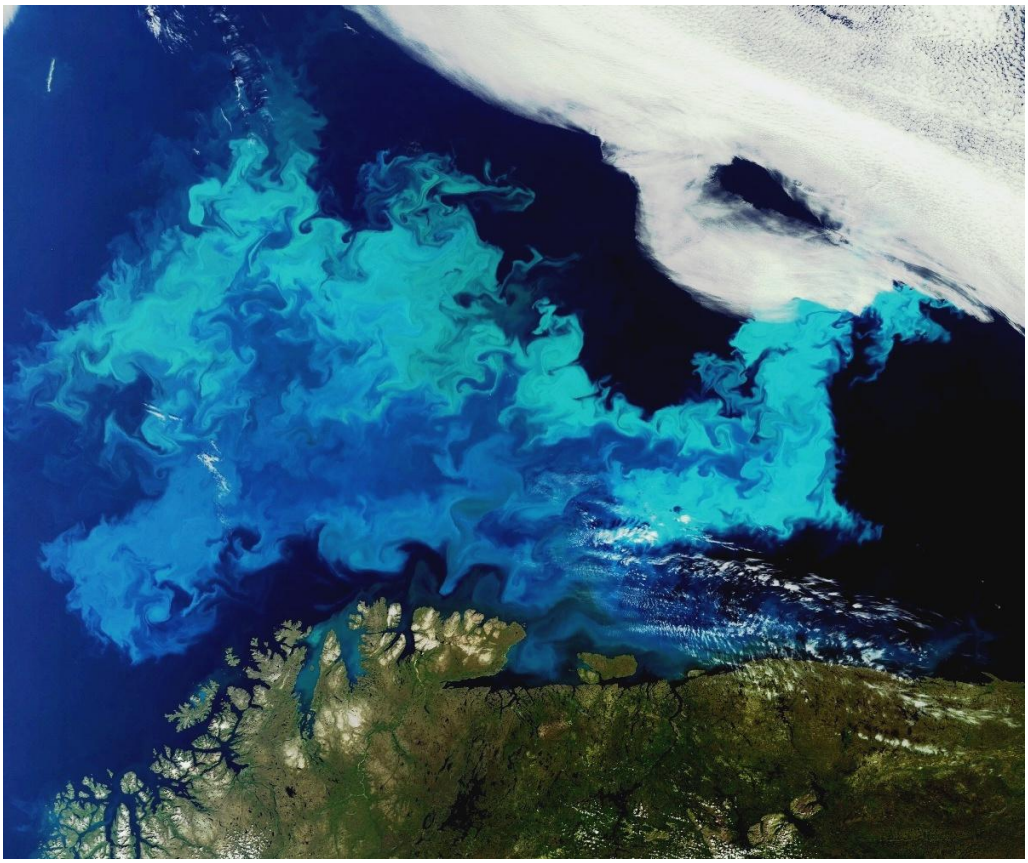


Figure I.11 : Efflorescence de phytoplancton, spécifiquement *Emiliania huxleyi*, dans la mer de Barents. Extrait d'une image prise par le satellite ENVISAT le 17 août 2011 à 9h25 UTC.

2.3 Caractéristiques physiologiques d'*Emiliania huxleyi*

L'espèce *E. huxleyi* étant cosmopolite, sa distribution géographique dépend de son adaptation aux conditions environnementales, elle-même reflétée par de nombreux traits physiologiques : son taux de croissance et sa préférence de température, sa tolérance à la salinité, son taux de production de calcite, sa composition en alcénones (Conte et al., 1998) et sa composition en pigments dans le chloroplaste (Stolte et al., 2000). Dans cette partie, seul l'effet de quelques paramètres environnementaux sur la physiologie des cellules d'*E. huxleyi* est présenté : la température, l'intensité lumineuse et la disponibilité en nutriments.

2.3.1 Effet de la température

La température est l'un des paramètres environnementaux les plus influents sur la distribution biogéographique d'*E. huxleyi* (Brand, 1994; Winter et al., 1994). En effet, comme mentionné précédemment, cette espèce s'adapte à de larges intervalles de température, de 1 à 30°C ce qui lui permet de survivre dans un vaste panel d'environnements très différents, des

zones polaires aux zones subtropicales. Paasche (2002) explique cette distribution par l'existence d'écotypes de température. Il établit un tableau des différentes études reportant des maximums de croissance d'*E. huxleyi* mesurés à des températures différentes selon la souche étudiée et son lieu d'origine. Ces températures de croissance maximale varient de 10°C dans le Golfe du Maine (Brand, 1982) à 26°C dans la Mer du Nord (van Bleijswijk et al., 1994). Une étude de cultures faite par Rosas-Navarro et al. (2016) a récemment montré que le taux de croissance maximal de plusieurs souches différentes d'*E. huxleyi* se trouvait toujours entre 20 et 25°C. Ces auteurs montrent aussi que le carbone inorganique particulaire (PIC) qui est associé au processus de calcification et le carbone organique particulaire (POC), lui associé au processus de photosynthèse, sont positivement corrélés avec la température. Cependant le rapport entre les deux (PIC:POC) montre un minimum à la température optimale ce qui a été peu observé jusqu'ici mais cette réponse serait fortement affectée par les conditions de lumière et nutriments utilisées (Oviedo et al., 2014; Trimborn et al., 2007; Zondervan, 2007).

2.3.2 Effet de la lumière

Une des caractéristiques importantes d'*E. huxleyi* est que des irradiances élevées n'ont quasiment pas d'effet inhibiteur sur leur photosynthèse (Nanninga and Tyrrell, 1996; Paasche, 2002; Rost and Riebesell, 2004) ce qui a été montré pour des irradiances de plus de 1700 et 2500 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (Nanninga and Tyrrell, 1996). Sa capacité à disperser la lumière grâce à ses coccolithes permettrait de réguler la lumière atteignant l'intérieur de la cellule en la réfléchissant si celle-ci est trop importante et en la redirigeant vers la cellule dans un environnement faiblement lumineux. Des observations mensuelles de données satellites faites par Iglesias-Rodríguez et al. (2002) suggèrent que les efflorescences d'*E. huxleyi* se produisent principalement dans les océans tempérés et de hautes latitudes avec une irradiance relativement forte en surface. Nanninga and Tyrrell (1996) et Tyrrell and Taylor (1996) avancent qu'une forte irradiance est un des prérequis essentiel à la formation d'une efflorescence d'*E. huxleyi* dans l'océan. Cependant, cette espèce croît aussi à de faibles intensités lumineuses. Van Bleijswijk et al. (1994) montre que la croissance d'*E. huxleyi* est dépendante de la lumière entre 5.9 et 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, avec un arrêt de cette croissance en dessous de 5.9 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} à 10°C.

La croissance d'*E. huxleyi* devient saturée par la lumière à des intensités lumineuses comprises entre environ 100 et 300 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} selon les températures (van Bleijswijk et al., 1994; Nanninga and Tyrrell, 1996; Paasche, 2002). Cette irradiance de saturation dépend de la température et augmente avec cette dernière (Zondervan, 2007). Comme pour beaucoup

d'autres algues, *E. huxleyi* croît selon un cycle diurne jour:nuit et atteint son maximum de croissance à un nombre d'heures de jour de 12 à 16h par 24h (Paasche, 2002; Price et al., 1998). Dans le cas d'un fort taux de croissance, les cellules peuvent se diviser pendant le jour mais elles se divisent préférentiellement pendant la nuit le reste du temps (van Bleijswijk et al., 1994).

Du point de vue des taux métaboliques, une augmentation de la lumière engendre une augmentation de la production de photosynthèse (POC_{prod} = µ*POC) et de calcification (PIC_{prod} = µ*PIC) exprimé en $pg.cell^{-1}.j^{-1}$ (van Bleijswijk et al., 1994; Nimer and Merrett, 1993; Paasche, 1999; Zondervan et al., 2002). La lumière de saturation du taux de photosynthèse (production de POC) est controversée : Nimer and Merrett (1993) trouvent que ce taux de photosynthèse est limité par la lumière à partir de 50 µmol $photons.m^{-2}.s^{-1}$; van Bleijswijk et al. (1994) et Zondervan et al. (2002) définissent cette saturation de la photosynthèse avant 140-150 µmol $photons.m^{-2}.s^{-1}$ alors que Nanninga and Tyrrell (1996) reportent des taux de photosynthèse maximaux à 500 µmol $photons.m^{-2}.s^{-1}$ qui se stabilisent ensuite. La calcification est aussi un processus fortement dépendant de la lumière (Raven and Crawfurd, 2012) cependant sa saturation est observée à de plus faibles irradiances que pour la photosynthèse (van Bleijswijk et al., 1994; Paasche, 1998; Zondervan et al., 2002). Ainsi, du fait de cette irradiance de saturation plus faible pour la calcification, le rapport de la calcification avec la photosynthèse (PIC:POC) devrait augmenter avec une diminution de l'intensité lumineuse. Cependant, un déclin plus rapide de la calcification par rapport à la photosynthèse conduit le rapport PIC:POC à diminuer dans des conditions de forte limitation en lumière. Par conséquent, ce rapport devrait tout d'abord augmenter avec la profondeur et ensuite diminuer à de plus grandes profondeurs.

2.3.3 Effet des nutriments

Dioxyde de carbone CO_2

De manière générale, la production de PIC d'*E. huxleyi* diminue avec une augmentation de la concentration en CO_2 (Riebesell et al., 2000; Sciandra et al., 2003; Zondervan et al., 2002) (voir Figure I.12). L'effet d'une augmentation du CO_2 sur la production de POC semble moins évident, plusieurs études ont montré que cet effet dépendrait des concentrations en nitrate. En effet, Riebesell et al. (2000) et Zondervan et al. (2001) trouvent que la production de POC augmente en augmentant le CO_2 en conditions riches en nitrate et forte lumière. Au contraire, Sciandra et al. (2003) montrent une diminution du POC avec une augmentation du CO_2 en conditions appauvries en nitrate alors que Engel et al. (2005) font état d'une production constante de POC avec une limitation intermédiaire en nitrate.

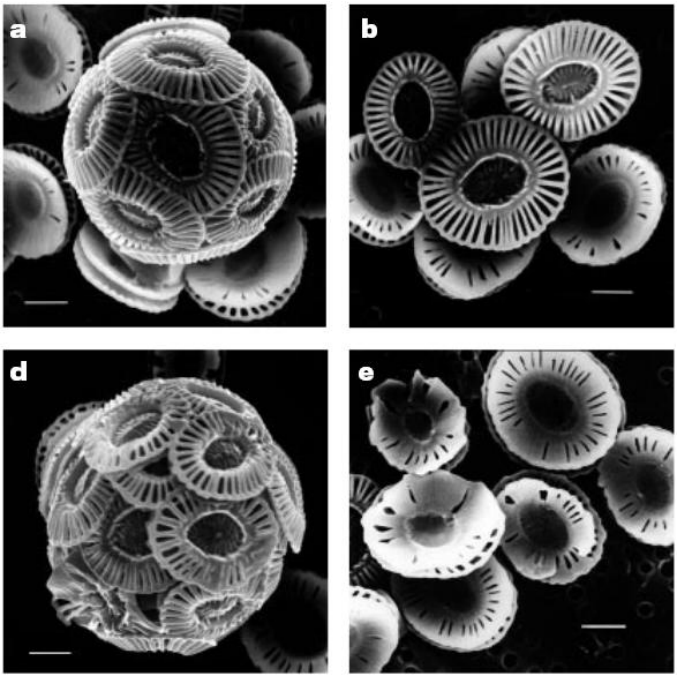


Figure I.12 : *Emiliania huxleyi* exposée à une forte concentration en CO_2. Figures prises dans Riebesell et al. (2000). Images de coccosphères et coccolithes prises au MEB. Cultures incubées avec : pCO_2 ~ 300 µatm (a-b) et pCO_2 ~ 780-850 µatm (d-e). La barre d'échelle représente 1 µm.

Nitrate et phosphate

La plupart des coccolithophoridés sont autotrophes et utilisent des nutriments inorganiques comme la plupart des organismes phytoplanctoniques. Les efflorescences d'*E. huxleyi* sont souvent observées dans des environnements pauvres en nitrate et/ou phosphate (Balch et al., 1991; Holligan et al., 1993a; Iglesias-Rodríguez et al., 2002; Tyrrell and Merico, 2004). Ceci montre que cette espèce est un meilleur compétiteur face à des conditions limitantes en nutriments par rapport aux autres espèces de phytoplancton comme les diatomées ou dinoflagellés. Zondervan (2007) reporte que *E. huxleyi* croît cependant très bien dans des environnements riches en nitrate et phosphate ou à de forts ou faibles rapports nitrate:phosphate (N:P). Les efflorescences de diatomées sont généralement suivies par celles des coccolithophoridés lorsque les eaux sont plus stratifiées et plus appauvries en nutriments (Holligan et al., 1993b; Zondervan, 2007). La capacité d'*E. huxleyi* à utiliser d'autres sources d'azote comme l'ammonium ou l'urée (Brand, 1994; Paasche, 2002) et à assimiler efficacement le phosphate (Riegman et al., 2000) rend cette espèce très compétitive dans des environnements appauvris en nutriments. Cependant, comme précisé précédemment, les efflorescences d'*E. huxleyi* ne sont pas seulement engendrées par les concentrations en nutriments mais par une combinaison de facteurs : température, lumière, nutriments.

Bien que les nutriments ne contrôlent pas totalement l'apparition d'efflorescences d'*E. huxleyi*, ceux-ci ont un fort impact dans la régulation de leur calcification et photosynthèse cellulaire. Des travaux en laboratoire ont permis de trouver des variations similaires lors d'une limitation en phosphate et/ou en nitrate. Une limitation en phosphate entraine une augmentation de la taille des cellules, contrairement à une limitation en nitrate (Müller et al., 2008; Paasche, 1998; Riegman et al., 2000). Sciandra et al. (2003) montrent que le volume cellulaire d'*E. huxleyi* est plus faible avec une limitation en nitrate de leurs cultures, sûrement en relation directe avec la diminution en POC observée. De plus, le contenu cellulaire en carbone inorganique et organique augmente de façon importante avec une limitation en phosphate et le rapport PIC:POC augmente aussi (Langer et al., 2013; Oviedo et al., 2014; Riegman et al., 2000). Il a été montré par Riegman et al. (2000) qu'une limitation en nitrate entraine une diminution du volume cellulaire, du PIC et du POC par rapport aux cellules en conditions de limitation de phosphate. De plus, Paasche (1998) montre que les coccolithes produits sous une limitation en nitrate sont sous-calcifiés alors que ceux produits sous une limitation en phosphate sont sur-calcifiés. Ces résultats sont appuyés par des valeurs moyennes en calcium par coccolithes qui diminuent avec une limitation en nitrate et qui augmentent avec une limitation en phosphate.

Métaux traces

Plusieurs études ont montré que le métabolisme d'*E. huxleyi* nécessiterait des métaux traces tels que le fer, le zinc, le cobalt, le sélénium et le manganèse (Paasche, 2002; Zondervan, 2007). Le besoin en fer d'*E. huxleyi* est plus faible que celui des diatomées et aussi faible que pour les autres espèces océaniques de coccolithophoridés, comme *G. oceanica* (Brand, 1991; Muggli and Harrison, 1997). Ces besoins assez faibles en Fer permettraient à *E. huxleyi* de croître dans des régions de l'océan où la croissance des diatomées est limitée par le fer (Brand, 1991; Muggli and Harrison, 1997) ou par le zinc (Sunda and Huntsman, 2000). Sunda and Huntsman (2000) montrèrent de plus que *E. huxleyi* peut substituer le zinc par le cobalt, bien que ses besoins en zinc soient faibles. Une limitation en fer engendre une diminution de la croissance et de la production en carbone inorganique particulaire et azote organique particulaire de la cellule (Schulz et al., 2004). Au contraire, une limitation en zinc semble provoquer une augmentation du PIC cellulaire. Quelques études ont montré que les besoins en manganèse d'*E. huxleyi*, comme les autres coccolithophoridés océaniques, étaient très faibles, plus faibles que pour les autres phytoplanctons (Brand et al., 1983; Muggli and Harrison, 1996).

2.4 Limites de l'utilisation d'*Emiliania huxleyi* comme espèce modèle

Bien que l'espèce *E. huxleyi* forme de larges efflorescences sur de grandes surfaces de l'océan mondial (Iglesias-Rodríguez et al., 2002), elle ne domine probablement pas en terme de production et d'export vertical de calcite de par la petite taille de ses coccolithes et de sa cellule (Ziveri et al., 2007). Les deux espèces *Coccolithus pelagicus* et *Coccolithus leptoporus*, coccolithophoridés vivants étant les plus lourdement calcifiés du fait de leur fort contenu en calcite par coccolithe, sont probablement les deux espèces clés dans l'export de calcite vers l'océan profond et les sédiments (Ziveri et al., 2000, 2007).

L'espèce *E. huxleyi* est très facile à cultiver en laboratoire et se trouve être l'espèce la plus étudiée et la mieux connue à ce jour parmi les coccolithophoridés (Paasche, 2002). Cependant, même s'il a été pensé qu'elle pourrait être un cas modèle pour le groupe des coccolithophoridés afin de mieux comprendre leur métabolisme et leur comportement vis-à-vis d'un climat changeant, cette approche n'est pas toujours applicable pour toutes les espèces et pour tous les facteurs (Langer et al., 2006; Zondervan, 2007). Il est donc important de ne pas généraliser constamment à partir de l'étude seule de cette espèce, mais dans la mesure du possible de comparer avec les études réalisées sur des espèces différentes pour retrouver des comportements communs.

Pour finir, la date d'apparition de cette espèce en fait une espèce moderne idéale pour étudier la réponse de l'océan actuel à des changements environnementaux mais nécessite d'intégrer d'autres espèces pour une approche paléoocéanographique, de par son enregistrement stratigraphique plus récent que de nombreuses espèces de coccolithophoridés (Raffi et al., 2006).

3. Approches utilisées dans l'étude physiologique des coccolithophoridés

Le coccolithophoridé *Emiliania huxleyi* est largement utilisé par la communauté scientifique en laboratoire dans de nombreux domaines : télédétection, géochimie et paléocéanographie, biologie et chimie marines, biotechnologie, etc. Dans cette partie introductive, seulement trois types d'approches scientifiques et océanographiques seront abordées : les études physiologiques faites en laboratoire, les études *in situ* lors de campagnes en mer et l'approche de modélisation. Ces trois approches sont appliquées aussi aux autres espèces de coccolithophoridés, cependant nous concentrerons notre intérêt particulièrement sur les travaux qui ont permis d'étudier l'espèce *E. huxleyi*.

3.1 Etudes physiologiques en laboratoire

De nombreuses études physiologiques en laboratoire sur *Emiliania huxleyi* ont été réalisées de façon fréquente depuis les années 2000. Celles-ci s'intéressent généralement à l'effet de paramètres environnementaux sur les taux métaboliques, la composition chimique de la biomasse et la taille des cellules et des coccolithes. Le Tableau I.1 donne une liste des principaux paramètres testés sur *E. huxleyi* en culture en laboratoire. Ces paramètres environnementaux sont très variés (Tableau I.1) et ont été étudiés, le plus souvent, seuls afin d'isoler l'effet sur le comportement des cellules, et parfois à deux pour évaluer le co-effet de deux paramètres simultanés sur les cellules.

Différents types de culture sont utilisés pour cultiver les coccolithophoridés et, entre autre, *E. huxleyi* : 1) des cultures dites en chemostat, 2) des cultures dites en batch et 3) des cultures dites semi-continues. Ces méthodes de culture seront brièvement introduites ici et sont plus amplement détaillées dans le chapitre II.

Les cultures en **chemostat** se caractérisent par un système de culture amené à l'équilibre avec un flux continu de milieu entrant et sortant du contenant de culture ; et un taux de croissance, une densité cellulaire et une concentration en nutriments constants dans le temps (LaRoche et al., 2010). Du fait de la possibilité d'atteindre un état stationnaire à des faibles concentrations de nutriments, le chemostat est la méthode de culture le plus couramment utilisée pour étudier la limitation des nutriments.

Les cultures faites en **batch** se caractérisent par l'absence du renouvellement du milieu de culture, une concentration en nutriments qui diminue avec le temps, une densité cellulaire qui augmente et un taux de croissance calculable seulement pour les expériences sans limitation en nutriments (voir détails dans chapitre III). Bien que très simple à mettre en œuvre, le système de culture en batch limite le nombre d'échantillons que l'on peut prélever de par le volume fixe des cultures, et permet difficilement de suivre quotidiennement chaque variable (nutriments, matière particulaire, densité cellulaire, DIC, …) (LaRoche et al., 2010). Les cultures en chemostat nécessitent cependant un équipement bien plus sophistiqué, et par conséquent, bien plus coûteux que les cultures faites en batch. Elles sont principalement utilisées pour les expériences de limitation en nutriments et/ou de changements de la pCO_2 (LaRoche et al., 2010); alors que les cultures en batch sont plutôt utilisées pour tester les effets de la lumière et/ou de la température. Les avantages et inconvénients de ces deux principaux systèmes de culture seront développés plus amplement dans le chapitre II.

Les cultures **semi-continues** sont un peu différentes des cultures batch du fait que les cultures sont maintenues en phase exponentielle de croissance (phase où la croissance est

optimale selon l'intensité lumineuse et la température) pendant une longue période. Elles sont aussi différentes des cultures en chemostat car elles sont diluées uniquement une fois par jour ou à intervalle de temps (jours) régulier dépendant du taux de croissance des cellules (LaRoche et al., 2010), alors que dans un chemostat la dilution est constante. Ce type de cultures est adapté à l'étude de l'effet de la limitation en métaux traces sur les cellules phytoplanctoniques (Sunda and Huntsman, 1995).

Tableau I.1 : Liste des paramètres environnementaux étudiés sur *E. huxleyi* en cultures. Une référence récente par paramètre testé a été indiquée comme exemple.

Paramètres environnementaux étudiés sur *E. huxleyi*	Exemples de références associées
Température	Rosas-Navarro et al. (2016)
Lumière	Harris et al. (2005)
Cycle jour:nuit	Price et al. (1998)
CO_2, pH	Bach et al. (2011)
DIC, Alcalinité	Hoppe et al. (2011)
Calcium, Magnésium	Müller et al. (2011)
NO_3, PO_4	Langer et al. (2013)
Fer	Schulz et al. (2004)
Zinc, Cobalt, Manganèse, Cadmium	Sunda and Huntsman (2000)
Bore	Stoll et al. (2012)

Les expériences de cultures avec les coccolithophoridés ont permis d'étudier l'effet de nombreux paramètres environnementaux listés dans le Tableau I.1. La Figure I.13 montre que certains paramètres ont été plus étudiés que d'autres, notamment le système du carbone inorganique dissous, les nutriments, la température, l'irradiance, mais très peu l'effet de la concentration du calcium et du magnésium dissous. Parmi les principaux paramètres étudiés, il est évident que l'intérêt majeur, depuis les années 2000, a été pour le système du carbone et son effet sur la physiologie d'*E. huxleyi.* Cet effort commun a été induit par la volonté de comprendre l'effet de l'acidification des océans sur les organismes calcifiants. Les nutriments et la température occupent les 2èmes et 3èmes places tandis que l'irradiance est le 4ème paramètre le plus étudié. Bien entendu, la liste de références répertoriées pour établir cet histogramme n'est

pas exhaustive et ne précise pas le nombre de co-expériences réalisées avec deux (ou trois) paramètres variables. Dans le cas de co-expériences, chaque paramètre a été compté individuellement.

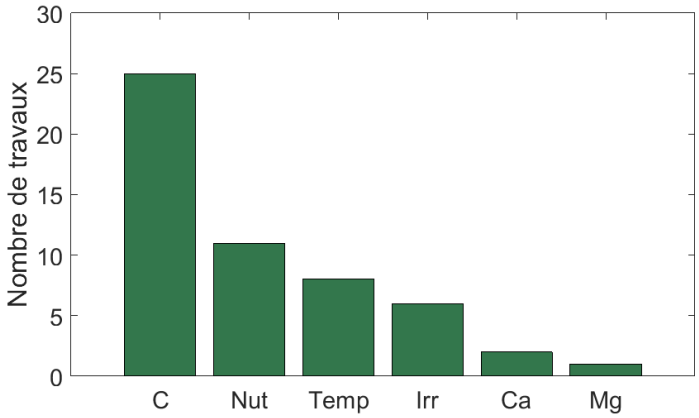


Figure I.13 : Nombre d'études faites en laboratoire sur *E. huxleyi* par paramètres principaux testés. Echantillons de 37 références différentes entre 1999 et 2016 avec, pour certaines, plusieurs paramètres testés à la fois. C : changement du système du carbone, CO_2, pH, alcalinité, DIC ; Nut : nutriments, NO_3 et/ou PO_4 ; Temp : température ; Irr : irradiance ; Ca : calcium et Mg : magnésium.

Les principales combinaisons de paramètres étudiées sont : 1) CO_2 et température ; 2) CO_2 et nutriments ; 3) CO_2 et irradiance ; 4) Irradiance et température ; 5) Température et nutriments et 6) Irradiance et nutriments. La seule étude répertoriée ayant fait une co-limitation en irradiance et nutriments est celle de Leonardos and Geider (2005). Cependant, cette étude a utilisé une souche non calcifiante (donc en phase haploïde) d'*E. huxleyi,* afin d'étudier l'impact de la pCO_2 sur la partie organique de la cellule, ce qui rend la comparaison avec d'autres études utilisant une souche calcifiante plus compliquée. La compréhension de cette co-limitation est pourtant essentielle pour comprendre l'adaptation d'*E. huxleyi* dans le milieu naturel où les gradients verticaux en nutriments et en lumière sont forts.

Les expériences de culture sont faites également pour obtenir des estimations de paramètres physiologiques caractéristiques d'une espèce (Eppley et al., 1969; Marañón et al., 2013; Riegman et al., 2000; Terry, 1982). Ces paramètres physiologiques résument de façon quantitative la dépendance des taux métaboliques (croissance, photosynthèse, calcification, assimilation des nutriments) aux conditions environnementales telles que l'intensité lumineuse, la température etc. Ces paramètres sont caractéristiques d'une espèce et par conséquent, sont fondamentaux pour déterminer la distribution d'une espèce ou d'un groupe le long de gradients environnementaux. Du point de vue des ressources en nutriments, ils sont par exemple le taux

de croissance maximale μ_{max}, le taux d'assimilation maximal en nutriment normalisé à la surface de la cellule V_{max}, la constante de demi-saturation pour l'assimilation du nutriment considéré K_R et les quotas cellulaires maximaux et minimaux en nutriment (Litchman et al., 2007; Litchman and Klausmeier, 2008). Il existe peu de littérature sur ces paramètres en comparaison du nombre important de cultures faites sur les coccolithophoridés. Certains scientifiques, comme par exemple Litchman et al. (2007), ont estimé ces paramètres, à partir de cultures déjà réalisées, en utilisant un modèle physiologique simple. D'autres comme Marañón et al. (2013) et Riegman et al. (2000) les ont estimé en cultivant respectivement plusieurs espèces de phytoplancton dont *E. huxleyi* et seulement l'espèce *E. huxleyi*. De manière générale, peu d'études ont estimé ces paramètres physiologiques, par méthode analytique ou par le biais de cultures en laboratoire, pour le nitrate (et/ou ammonium) et le phosphate ; particulièrement pour l'espèce *Emiliania huxleyi*.

3.2 Etudes de modélisation physiologique et écologique

Dans le but de mieux comprendre le rôle de régulation des communautés microbiennes en général sur l'environnement et dans les cycles biogéochimiques, les modèles de biogéochimie et d'écosystèmes marins se sont développés largement durant la dernière décennie (Follows and Dutkiewicz, 2011). La diversité de ces populations microbiennes marines en fait des acteurs importants d'un point de vue écologique et biogéochimique. Les modèles numériques et mathématiques permettent d'étudier conceptuellement les rétroactions et les interconnections complexes existantes entre l'écologie marine, la biogéochimie et la diversité physiologique (Follows and Dutkiewicz, 2011). Un moyen pour tous ces modèles afin de simuler la réponse à des changements environnementaux est de considérer les contraintes comme les traits fonctionnels et les « trade-offs » via les relations existantes entre la morphologie structurale, l'allocation de ressources ou encore la description mécanistique d'énergie (Litchman and Klausmeier, 2008) au niveau de l'individu (Follows and Dutkiewicz, 2011).

Modèle à l'échelle de la cellule ou de la culture

A l'échelle de la cellule, de nombreux modèles ont été mis en place pour mieux comprendre les processus intracellulaires ou morphologiques de la cellule d'*E. huxleyi* et/ou des coccolithophoridés. Ces modèles s'intéressent à la composition isotopique des cellules comme celui développé par Bolton and Stoll (2013), à leur production relative en calcite (Daniels et al., 2014), à leur production de carbone organique et inorganique (Holtz et al., 2015) ou à leurs

quotas intracellulaires en nutriments (nitrate et phosphate notamment) et traits physiologiques (Litchman et al., 2007).

Les modèles biogéochimiques et d'écosystèmes marins à large échelle sont basés sur la paramétrisation physiologique sous-jacente au niveau de la cellule (Follows and Dutkiewicz, 2011). Pour ce faire, la description simple de la physiologie cellulaire couramment utilisée est l'approche par la théorie de Monod (Monod, 1949), qui définit le taux de croissance d'une population comme une fonction de Michaelis-Menten de la concentration environnementale de l'élément limitant. Une des grandes limites de cette approche est le lien direct entre l'assimilation en nutriment et la croissance cellulaire, et le fait que le quota cellulaire de l'élément limitant est fixe dans le temps. L'alternative utilisée afin de contourner cette limite est l'approche des réserves internes de Droop (Droop, 1968) dans laquelle l'assimilation de nutriment est liée à la concentration interne en nutriment dans la cellule et est découplée de la croissance cellulaire (Follows and Dutkiewicz, 2011). Ce modèle permet par conséquent de simuler les quotas cellulaires et les rapports élémentaires de la matière organique au sein de la cellule en réponse à des changements environnementaux. De plus, utilisant des paramètres physiologiques, ou traits physiologiques, associés à l'assimilation du nutriment considéré limitant, ce modèle de Droop est un outil d'une grande utilité pour l'étude de la réponse physiologique des cellules phytoplanctoniques. Cette approche a été utilisée par exemple par Litchman et al. (2007) pour plusieurs espèces dont *E. huxleyi* ou par Flynn (2008) pour une diatomée et une algue verte. Cependant, ces modèles à l'échelle cellulaire sont encore très complexes et sont encore trop peu étudiés, permettant malgré tout une étude physiologique de l'organisme significative et l'estimation de paramètres physiologiques relatifs à l'assimilation en nutriments pouvant être utilisés dans les modèles à l'échelle plus large de la communauté planctonique.

Modèles à l'échelle du groupe

La modélisation à l'échelle du groupe des coccolithophoridés nécessite des équations bien plus simples que celles utilisées dans les modèles à l'échelle cellulaire et demande généralement de nombreuses hypothèses pour simplifier cette approche. Comme mentionné dans la partie précédente, ces modèles sont souvent basés sur la paramétrisation physiologique réalisée à l'échelle de la cellule de l'organisme.

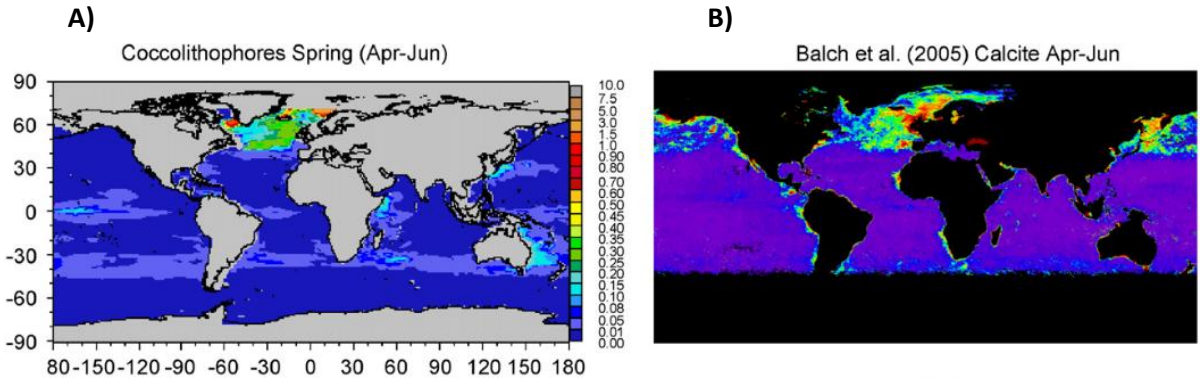


Figure I.14 : Figures représentant la distribution des coccolithophoridés au printemps (avril-juin). A) Modèle de Gregg and Casey (2007) représentant la chlorophylle (en $mg.m^{-3}$) due aux coccolithophoridés. B) Données satellites de concentrations en calcite de MODIS-Terra de Balch et al. (2005).

Le groupe des coccolithophoridés (et parfois seulement *E. huxleyi*) est régulièrement utilisé dans des modèles globaux et/ou climatiques comme un des grands groupes phytoplanctoniques majeurs de l'océan, de par sa contribution importante au cycle de carbone, et son rôle de producteur primaire comme les autres groupes phytoplanctoniques (Gregg and Casey, 2007; Le Quéré et al., 2005; Tyrrell and Taylor, 1996). Certains modèles se focalisent sur l'étude de la dominance du groupe dans l'océan mondial en fonction de la période de l'année telle qu'elle est influencée par le transport océanique, par des facteurs biologiques (broutage, mortalité..) et par des facteurs environnementaux (température, irradiance, nutriments…).

Gregg and Casey (2007) ont fait ce type d'étude à partir de données d'abondance de surface des groupes phytoplanctoniques et ont modélisé la distribution de surface et verticale de 4 grands groupes phytoplanctoniques: les diatomées, les cyanobactéries, les chlorophytes et les coccolithophoridés. La Figure I.14 montre un exemple d'une de leurs comparaisons effectuées avec des données satellites de concentration en calcite. Une de leurs conclusions principales sur la distribution des coccolithophoridés est que la clé de leur succès est de trouver des régions où les nutriments et la lumière sont assez faibles pour inhiber la croissance des diatomées et des chlorophytes (et/ou après leurs efflorescences respectives) ou des régions où ils peuvent trouver des nutriments à des profondeurs qui sont encore illuminées mais dans tous les cas, où le mélange vertical est suffisant pour éviter leur sédimentation vers l'océan profond. Ils montrent en effet que les coccolithophoridés peuvent être abondants et dominés aux alentours de 100 m de profondeur en terme de chlorophylle dans le centre de l'Atlantique Nord par rapport aux diatomées, cyanobactéries et chlorophytes. Ces gyres oligotrophes sont en effet

marqués par des niches profondes qui sont encore trop peu étudiées vis-à-vis de la compréhension de la distribution des coccolithophoridés dans l'océan global. Afin d'améliorer leur précision, ces modèles de distribution doivent être contraints par des données environnementales qui nécessitent des campagnes en mer pour récolter des données in situ.

3.3 Etudes de terrain : campagnes océanographiques

Le troisième type d'approche scientifique, vis-à-vis des coccolithophoridés en général mais aussi spécifiquement de l'espèce *E. huxleyi,* est les études de terrain de type campagnes océanographiques. Diverses campagnes ont été menées en mer afin de mieux comprendre les coccolithophoridés dans le monde vivant et dans le monde fossile. Le but de cette partie n'est pas d'énumérer toutes les campagnes réalisées jusqu'ici mais de faire un résumé de ce qui a été fait afin d'étudier la distribution horizontale et verticale des coccolithophoridés et d'*E. huxleyi,* et d'en tirer de plus amples informations sur d'une part leurs niches écologiques et d'autre part leur adaptation à l'environnement dans lequel ils vivent.

Ces campagnes océanographiques ont permis l'étude et l'échantillonnage de la colonne d'eau dans son ensemble et/ou une partie de la colonne d'eau (Beaufort et al., 2008; Charalampopoulou et al., 2011; Haidar and Thierstein, 2001; Oviedo et al., 2015; Poulton et al., 2014; Triantaphyllou et al., 2010) ou de sédiments (Baumann, 2004; Broerse et al., 2000; Ziveri et al., 2007) ou encore les deux comme réalisé par Bollmann and Herrle (2007).

Des pièges à sédiments (Ziveri et al., 2000) permettent d'étudier les assemblages de coccolithes qui sédimentent au fond de l'océan et d'en déduire les flux de carbonates exportés vers les fonds océaniques (Baumann, 2004). Des bouteilles de prélèvements permettent, elles, d'échantillonner la colonne d'eau jusqu'à la profondeur désirée et de récolter des échantillons de plancton (Poulton et al., 2014). Tandis que les efflorescences de coccolithophoridés et d'*E. huxleyi* ont été largement étudiées grâce à des campagnes océanographiques (Poulton et al., 2014; Rhodes et al., 1995), les connaissances de la distribution et des ressources nutritives des coccolithophoridés dans les gyres océaniques sont basées sur peu d'études détaillées (voir Winter et al., 1994).

Cas des « niches profondes »

Certaines régions de l'océan sont caractérisées par une concentration en chlorophylle de surface très faible, indicateur d'une faible biomasse phytoplanctonique. Ces régions sont appelées « gyres océaniques » ou « gyres subtropicaux » de par leur position aux longitudes subtropicales (voir Figure I.15) : le Pacifique Nord et Sud, l'Atlantique Nord et Sud et le sud de

l'Océan Indien. Ces gyres sont très étendus et occupent environ 40% de la surface globale de la terre (McClain et al., 2004). Ces zones sont caractérisées par des eaux de surface pauvres en nutriments, une profonde pycnocline[5] en leur centre et de forts gradients horizontaux de température et salinité. Les zones intérieures de ces gyres sont des régions où l'apport en nutriments est minime et où la concentration en nutriments et la biomasse sont relativement faibles durant l'année. Cependant malgré une productivité biologique relativement faible au sein des zones oligotrophes des gyres, leur contribution totale à la biomasse globale océanique est significative de par la taille immense de ces gyres (McClain et al., 2004).

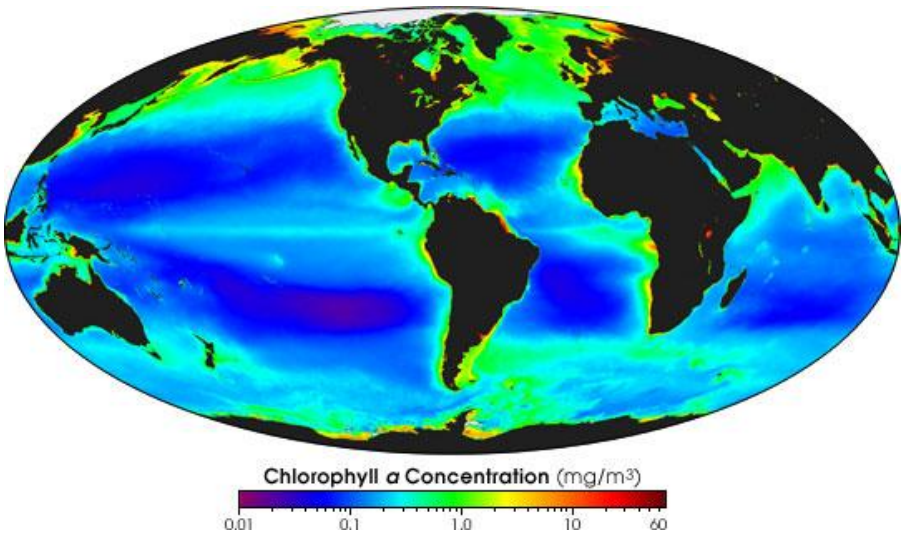


Figure I.15 : Production primaire mondiale océanique. Concentration de chlorophylle a moyennée depuis le lancement de SeaWiFs en 1997. Cette figure montre les régions subtropicales où la chlorophylle est très faible (gyres océaniques) et les régions tempérées, équatoriales et côtières où celle-ci est élevée. Site web : http://earthobservatory.nasa.gov/IOTD/view.php?id=4097.

Les premières observations d'une zone profonde au sein de la couche photique avec la présence d'une flore phytoplanctonique, spécifiquement dans les subtropiques, ont été faites par Okada and Honjo (1973). Plusieurs travaux assez récents ont étudié la distribution horizontale et/ou verticale des coccolithophoridés dans les gyres de l'Océan Atlantique (Haidar and Thierstein, 2001; Jordan and Winter, 2000; Poulton et al., 2006) alors que d'autres travaux se sont concentrées sur les gyres de l'Océan Pacifique (Beaufort et al., 2008; Cortés et al., 2001). Tandis que l'espèce *Florisphaera profunda* domine généralement les assemblages dans la zone photique inférieure (voir Figure I.16) (Cortés et al., 2001; Okada and McIntyre, 1979; Winter et

[5] Couche d'eau à fort gradient vertical de densité.

al., 1994), *E. huxleyi* domine régulièrement les assemblages des zones photiques supérieures. Cependant, cette espèce est retrouvée aussi dans les autres zones de la couche photique, comme observé par exemple par Beaufort et al. (2008), Jordan and Winter (2000) et Haidar and Thierstein (2001). Dans la partie 2.2 de cette introduction, l'espèce *E. huxleyi* a été présentée comme une espèce cosmopolite et de sélection-r par rapport aux autres espèces de coccolithophoridés de par sa large distribution dans les eaux eutrophiques. Cependant, Beaufort et al. (2008) retrouvent cette espèce en co-dominance avec *Gephyrocapsa* sp. et *Reticulofenestra* sp. à la limite inférieure de la zone photique, située à environ 150-200 m au milieu du gyre Pacifique-Sud. Cette même profondeur est caractérisée, lors de la campagne BIOSOPE réalisée au sein de ce gyre Pacifique-Sud, par l'emplacement du maximum de chlorophylle ainsi que des nutriclines en nitrate et phosphate (Claustre et al., 2008b). De plus amples études sont nécessaires pour comprendre comment cette espèce peut subvenir à ses besoins dans des environnements si diversifiés, notamment ces environnements oligotrophes profonds.

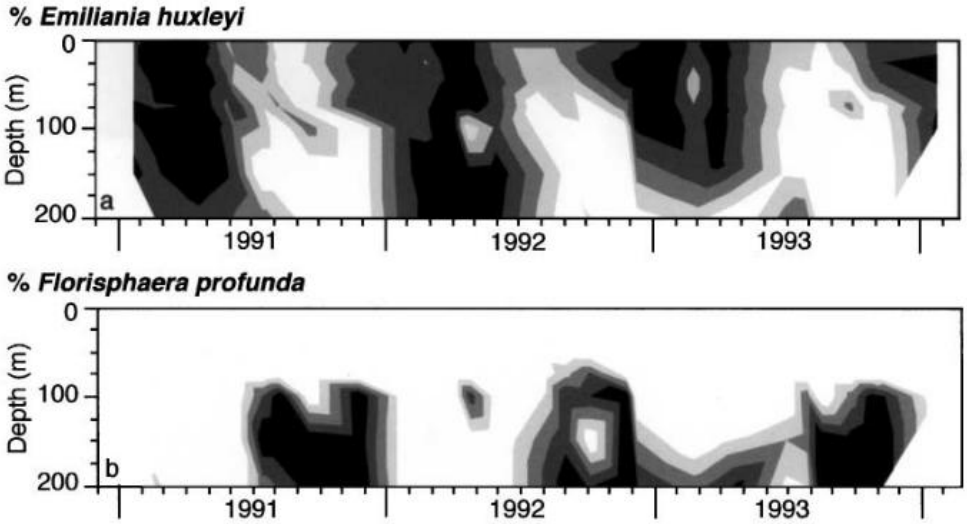


Figure I.16 : Abondance relative d'*E. huxleyi* et *Florisphaera profunda* en Atlantique Nord près des Bermudes sur une période de janvier 1991 à janvier 1994 et sur une profondeur de 200 m. Figure prise de Haidar and Thierstein (2001).

4. Objectifs de la thèse et plan du manuscrit

Les trois premières parties de cette introduction ont apporté de nombreuses informations sur l'origine et la découverte des coccolithophoridés mais aussi sur leur diversité, leur distribution, leur métabolisme et les approches scientifiques utilisées dans l'étude physiologique des coccolithophoridés. Leur rôle dans les différents cycles biogéochimiques en fait un groupe phytoplanctonique primordial pour la compréhension de la régulation climatique et leur rôle de producteurs primaires engendre un fort intérêt pour ce groupe afin de mieux comprendre les niveaux trophiques supérieurs. De plus amples détails ont été donnés sur *E. huxleyi* qui est l'espèce étudiée dans le cadre de cette thèse. Sa distribution cosmopolite, son adaptation à des conditions très diversifiées de température, de concentrations en nutriments, de salinité et de lumière en font une espèce très étudiée. La facilité avec laquelle il est possible de la cultiver en laboratoire conduit aussi bon nombre de scientifiques à la choisir préférentiellement pour tester des paramètres environnementaux (Winter et al., 1994).

Cette introduction a montré l'engouement de ces dernières années pour l'étude de l'acidification de l'océan et son impact sur les coccolithophoridés, et l'espèce *E. huxleyi*. S'il est bien connu qu'un réchauffement climatique génère déjà et va générer une augmentation de la pCO_2 dans les océans (Gattuso and Hansson, 2011), il est important de fixer autant d'attention sur les autres facteurs qui vont changer avec ces changements climatiques, entre autre la température, les nutriments, la disponibilité en lumière, … Une base de données des expériences en cultures faites sur l'espèce *E. huxleyi,* réalisée avant le commencement de cette thèse et améliorée pendant celle-ci, a permis de se rendre compte qu'il manquait cruellement des expériences de co-limitation en nutriments et en lumière. De plus, la tolérance spectaculaire d'*E. huxleyi* à des environnements si diversifiés tant eutrophes qu'oligotrophes et tant en surface qu'en profondeur nous a conduit vers la nécessité de mieux comprendre la réponse physiologique de cette espèce à de tels changements environnementaux. Ceci a donc amené à l'élaboration de cultures en laboratoire afin de tester une co-limitation en nutriments et lumière sur l'espèce *E. huxleyi*.

Nous avons discuté de l'intérêt de définir les paramètres physiologiques propres à une espèce ou à un groupe d'organismes. Ces paramètres restent encore peu référencés pour les coccolithophoridés en général mais aussi pour l'espèce *E. huxleyi*. Tandis que certains d'entre eux ne sont estimés qu'à partir de cultures faites en batch, les paramètres physiologiques liés à l'assimilation de nutriments sont pour la plupart déterminables avec des cultures en chemostat ainsi qu'avec des modèles physiologiques simples tel que le modèle de Droop. Dans le but d'étoffer la connaissance des traits physiologiques relatifs à l'acquisition des ressources pour *E.*

huxleyi très peu étendue jusqu'ici et compléter, de plus, les informations découlant des expériences de cultures en laboratoire, un modèle simple de Droop a été créé pour simuler la croissance cellulaire dans les expériences déjà réalisées dans la première partie de la thèse et estimer les paramètres physiologiques pour *E. huxleyi*.

Les coccolithophoridés sont amplement décrits pour leur capacité à produire de larges efflorescences mais le nombre d'études s'intéressant à leur capacité à pousser dans des zones telles que les gyres oligotrophes restent encore insuffisant. Dans cette thèse, nous nous intéresserons de plus près à la campagne BIOSOPE faite en 2004 dont le transect traverse d'ouest en est le gyre Pacifique-Sud. Ce gyre est décrit comme étant le plus oligotrophe de tous les gyres subtropicaux (Claustre et al., 2008b) et une niche profonde de coccolithophoridés, dont l'espèce *E. huxleyi,* y a été observée (Beaufort et al., 2008). Cette particularité d'*E. huxleyi* à pouvoir pousser dans un environnement oligotrophe et à la base de la zone photique où la disponibilité en lumière est très faible nous amène à définir le troisième objectif de cette thèse.

4.1 Questions scientifiques

- *Quels sont les effets d'une co-limitation lumière-nutriments sur la croissance d'Emiliania huxleyi en laboratoire ?*

- *Quels sont les apports de la modélisation pour l'obtention de paramètres physiologiques d'E. huxleyi liés aux ressources nutritives et pour la compréhension de cultures en batch?*

- *Les paramètres physiologiques et expérimentaux déterminés peuvent-ils aider à expliquer la présence d'E. huxleyi dans la niche profonde du gyre Pacifique-sud ? Et quels sont les facteurs environnementaux qui permettent à E. huxleyi de vivre dans un environnement tel que celui de la niche profonde?*

4.2 Approches utilisées et plan du manuscrit

Pour répondre à la première question et être en accord avec le troisième objectif, des cultures en laboratoire ont été mises en place tout en considérant les conditions *in situ* de la niche profonde observée pendant la campagne BIOSOPE. Leur organisation et méthodologie seront décrites dans le chapitre II de cette thèse tandis que le chapitre III décrira les résultats de ces expériences en laboratoire et amènera à discuter leur interprétation.

La deuxième question de ma thèse sera résolue en utilisant un modèle physiologique de croissance cellulaire simple qui permettra d'une part, de reproduire les expériences faites en laboratoires et d'autre part, d'estimer *de novo* les paramètres physiologiques d'*E. huxleyi*. La description du modèle physiologique et les résultats qui en découlent seront présentés dans le chapitre IV de ce manuscrit.

La troisième et dernière question de cette thèse sera explorée avec une combinaison des paramètres physiologiques d'*E. huxleyi*, d'une base de données sur les résultats de cultures en laboratoire réalisées sur *E. huxleyi* dans la littérature et de données biogéochimiques *in situ* issues de la campagne BIOSOPE. Le chapitre V sera dédié à cette question.

Pour finir, une discussion générale de l'ensemble de ces résultats ainsi que les perspectives qui en découlent clôtureront ce manuscrit.

CHAPITRE II

METHODES EXPERIMENTALES ET TECHNIQUES D'ANALYSE DES CULTURES D'*E. HUXLEYI* EN LABORATOIRE

« Ces expériences de culture en laboratoire ont été réalisées à la station biologique de Roscoff, au son du doux sifflement du vent, du cri harmonieux des goélands et au rythme des marées impressionnantes de Bretagne »

Le but de ce chapitre est de (1) faire la description des méthodes de cultures, et (2) d'introduire les expériences de culture qui m'ont permis de tester la réponse physiologique du coccolithophoridé *Emiliania huxleyi* dans des conditions de co-limitation en lumière et en nutriments. Dans la suite de ce chapitre seront expliqués les choix pour ce qui est de l'organisation des expériences de culture, des différents paramètres environnementaux utilisés et testés, des analyses réalisées, et pour finir, des traitements des échantillons et des résultats. Ces cultures ont été réalisées sous l'encadrement de Ian Probert à la station biologique de Roscoff et les analyses des échantillons ont nécessité la collaboration avec de nombreuses personnes de différents laboratoires (détaillés dans ce chapitre). Le large panel d'échantillons récoltés et des analyses réalisées a permis une étude poussée des résultats afin de mieux comprendre l'impact des paramètres environnementaux testés sur la physiologie des cellules (voir résultats dans le chapitre III).

1. Contexte général et introduction aux techniques de culture

Le principe des cultures en laboratoire est de maintenir en vie des souches clonales *in vitro* dans des conditions adaptées à la souche, à l'espèce et/ou au type d'étude réalisée. Les expériences de cultures de coccolithophoridés ont démarré dans les années 60 (Paasche, 1962, 1964) et se sont considérablement répandues depuis les années 2000, suite à la constatation que le changement climatique aurait probablement un effet sur le développement de ce groupe phytoplanctonique important (Riebesell et al., 2000). Du point de vue de la méthode expérimentale, deux types de cultures ont été beaucoup utilisées ces dernières années: les cultures en chemostat (ex. Borchard et al., 2011; Lefebvre et al., 2012; Leonardos and Geider, 2005; Riegman et al., 2000; Sciandra et al., 2003) et les cultures en batch (e.g. Bach et al., 2011; Fiorini et al., 2011; Harris et al., 2005; Hoppe et al., 2011; Krug et al., 2011; Langer et al., 2006; Müller et al., 2011; van Rijssel and Gieskes, 2002; Sett et al., 2014). Les expériences de cultures présentées dans ce chapitre ont pour but de tester la co-limitation en nutriments et lumière et de reproduire au mieux les conditions *in situ* observées dans la niche profonde de coccolithophoridés dans le Gyre Pacifique-Sud (brièvement présenté dans le chapitre I).

1.1 Cultures en chemostat

Lors des expériences en chemostat, un flux équivalent de milieu de culture entrant et sortant (voir Figure II.1) permet d'atteindre des conditions stationnaires caractérisées par une densité cellulaire constante dans le temps. De même, le taux de croissance ainsi que les propriétés chimiques (pH, nutriments) seront aussi constants en fonction du temps (LaRoche et al., 2010). La méthode de culture en chemostat est la méthode la plus utile pour étudier la physiologie du phytoplancton en conditions de limitation en nutriments (Langer et al., 2013; LaRoche et al., 2010).

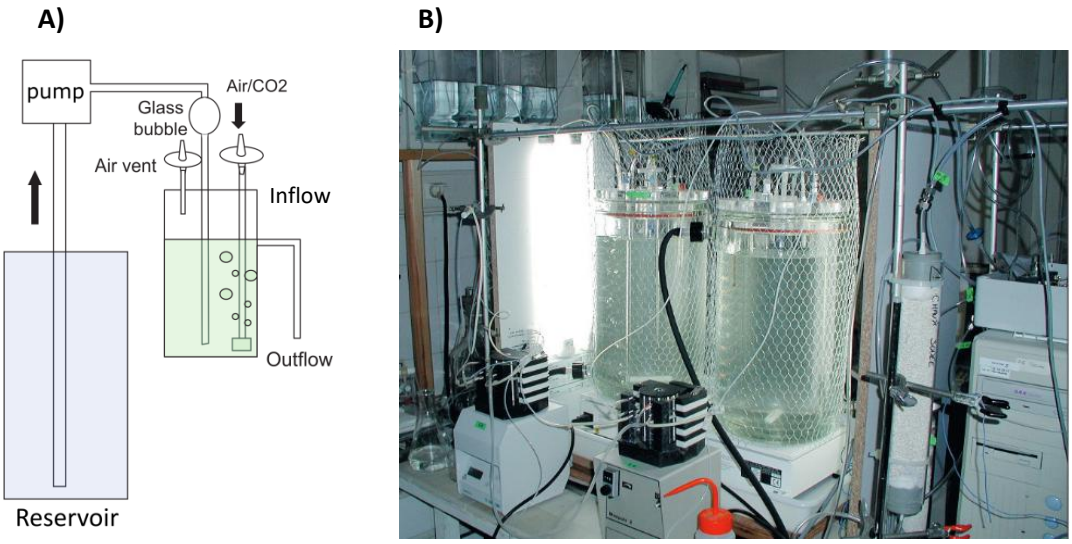


Figure II.1 : Schéma (A) et photo (B) d'un système de cultures en chemostat. Exemple représentant des manipulations de pression de CO_2. (A) « Inflow » = le flux entrant de milieu de culture et « Outflow » = le flux sortant de culture (milieu + cellules), (B) Expérience de forte pression de CO2 sur l'espèce *E. huxleyi* faite par Sciandra et al. (2003). Le schéma et la photo ont été pris dans LaRoche et al. (2010) (crédit de la photo : J.P. Gattuso).

Alors que le taux de croissance est un paramètre clé qui quantifie la vitesse à laquelle une population de cellules augmente avec le temps du fait des divisions cellulaires, le taux de dilution, lui, est équivalent au taux de renouvellement de la culture c'est-à-dire au rapport entre le flux entrant de milieu (ou sortant car ils sont égaux) et le volume de la culture dans le chemostat.

Ce type de culture nécessite un grand volume de milieu de culture dépendant de la taille de l'incubateur et du taux de dilution (D). Selon LaRoche et al. (2010), la plupart des expériences en chemostat sont commencées par des cultures en batch pour atteindre la densité cellulaire voulue et ensuite réaliser les cultures en chemostat avec cette densité cellulaire à l'équilibre et

un taux de dilution imposé. Pour les expériences en chemostat qui atteignent un état stationnaire, le taux de croissance (μ) est égal au taux de dilution de l'expérience, soit μ=D. Les cultures en chemostat sont donc très utiles pour une étude de limitation en nutriments et apportent une bonne reproductibilité des conditions de croissance. Cependant, ce type de culture est souvent contaminé par des bactéries malgré l'utilisation de matériel stérile et nécessite une grande quantité de milieu ainsi que des équipements sophistiqués (Figure II.1) (LaRoche et al., 2010).

1.2 Cultures en batch

Au contraire, dans les expériences faites en batch, expériences réalisées pendant cette thèse, le système de culture est fermé et la densité cellulaire, ainsi que la composition du milieu de culture, évoluent dans le temps (Figure II.2). Il est donc nécessaire de suivre la densité cellulaire dans le temps pour connaître le taux de croissance des cellules (Bach et al., 2011; Fiorini et al., 2011). L'étude du taux de croissance dans des conditions de limitation en nutriments est, dans ce cas, plus difficile que dans des cultures en chemostat car lorsque une expérience en batch entre dans la phase de limitation en nutriment le taux de croissance instantané change au cours du temps (LaRoche et al., 2010).

Dans cette thèse, il a été décidé de faire des cultures en batch pour étudier les conditions de limitation en lumière et en nutriments car ce type de cultures est plus facile à mettre en place et à répliquer. Les cultures en batch sont aussi moins coûteuses et demandent bien moins de matériels que les cultures en chemostat. Il est plus facile de les maintenir à l'abri d'une contamination en bactéries si la culture initiale est axénique (c'est-à-dire dans un milieu exempt d'éléments pathogènes ou de bactéries ; LaRoche et al., 2010). Cependant, les cultures en batch limitent le nombre d'échantillons que l'on peut prélever pour garder un volume suffisant dans la bouteille et le taux de croissance, la concentration en nutriments et le nombre de cellules varient au cours du temps. Même si les cultures en batch sont plus adaptées à des expériences en conditions riches en nutriments (LaRoche et al., 2010), elles ont été utilisées dans cette thèse. Une méthode de modélisation sera introduite, détaillée et utilisée dans le chapitre IV pour s'affranchir d'une partie des limites liées aux cultures en batch, en conditions de limitation en nutriments.

Généralement, une croissance cellulaire en système de culture *batch* (fermé) se déroule en trois, voire quatres étapes (Figure II.3) (LaRoche et al., 2010). Elle commence par une phase de latence où les cellules s'acclimatent au nouveau milieu de culture et se démarque par une

croissance relativement faible par rapport à la phase successive (taux de croissance μ très proche de zéro). Suivra une phase exponentielle où la croissance des cellules sera maximale selon les conditions de lumière et température définies (taux de croissance : μ > 0). Pour finir, la phase stationnaire sera atteinte lorsqu'un nutriment (dans un milieu riche en nutriments) sera entièrement consommé par les cellules et dans ce cas la croissance diminue et devient nulle (μ = 0). Il peut y avoir, si l'expérience est continuée, une phase de déclin du nombre de cellules (μ < 0) due à la mort d'une partie de celles-ci voire à la formation d'agrégats de cellules. Cependant nous ne parlerons pas de cette phase dans ce manuscrit car les cultures n'ont pas été suivies après la phase stationnaire.

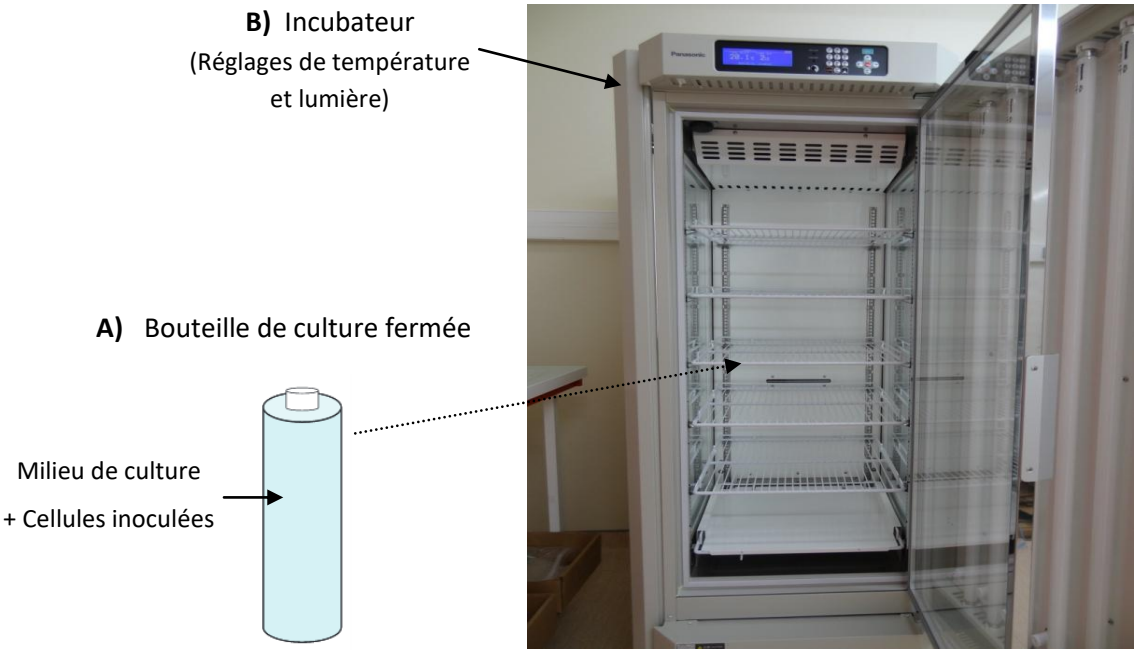


Figure II.2 : Schéma (A) d'une bouteille batch fermée et photo (B) d'un incubateur utilisé pour ce type de cultures. Schéma pris dans LaRoche et al. (2010) et photo prise personnellement.

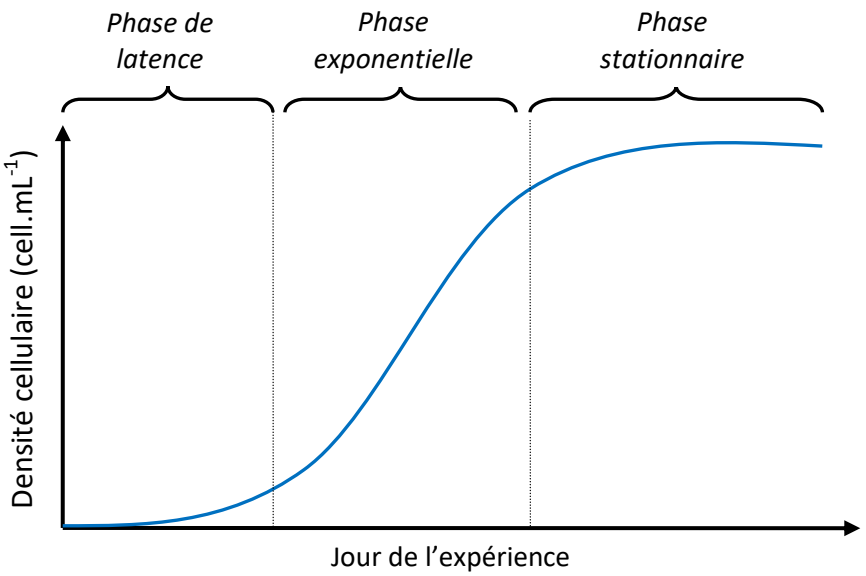


Figure II.3: Schéma explicatif de la croissance cellulaire typique dans un système fermé type *batch*.

Dans une expérience de batch, le taux de croissance est la dérivée du nombre de cellules par rapport au temps sur l'échelle logarithmique (Müller et al., 2008), soit la relation :

$$\mu = \frac{d \ln C}{dt} \qquad \text{(II-1)}$$

Avec C la densité cellulaire en cells.mL^{-1}, t le temps en jours et µ le taux de croissance en j^{-1}.
De ce fait, sur un diagramme logarithmique, le taux de croissance (µ) correspond à la pente de la droite des données dans la phase exponentielle de croissance. Le taux de croissance peut donc facilement être calculé avec deux comptages successifs de cellules dans la phase exponentielle. Dans la phase de limitation en nutriments, par contre, la relation entre le nombre de cellules et le temps n'est plus linéaire et il devient difficile de quantifier la diminution dans le temps du taux de croissance au fur et à mesure que les nutriments s'épuisent.

Le temps de génération est le temps nécessaire pour qu'une division cellulaire ait lieu. La relation existante entre le taux de croissance et le temps de génération est la suivante :

$$\mu = \frac{\ln 2}{G_T} \qquad \text{(II-2)}$$

Avec G_T le temps de génération en jours.

Le taux de division cellulaire est le nombre de division cellulaire en 24h (1 jour) et est l'inverse du temps de génération, soit la relation suivante :

$$G_T = (d)^{-1} \quad \text{(II-3)}$$

Avec d le taux de division en jours^{-1}.

2. Choix des conditions expérimentales

Cette partie présente les différents choix des conditions expérimentales qui ont permis de réaliser ces expériences. Ces choix ont été conduits de façon à répondre à deux objectifs majeurs : (1) tester et comprendre une co-limitation en nutriments et lumière sur l'espèce *Emiliania huxleyi ;* et (2) reproduire les conditions environnementales de la niche profonde de coccolithophoridés observée dans le gyre Pacifique-Sud.

2.1 Choix de l'espèce et de la souche

Comme un des objectifs était d'étudier le gyre sud-Pacifique où la campagne BIOSOPE a eu lieue, nous avons choisi de cultiver une souche de coccolithophoridés isolée dans cette région. De par sa simplicité à être cultivée en laboratoire, sa grande répartition dans l'océan et son adaptation à de grands intervalles de température, l'espèce *Emiliania huxleyi* a été choisie pour mener à bien ses expériences.

RCC963 **RCC911**

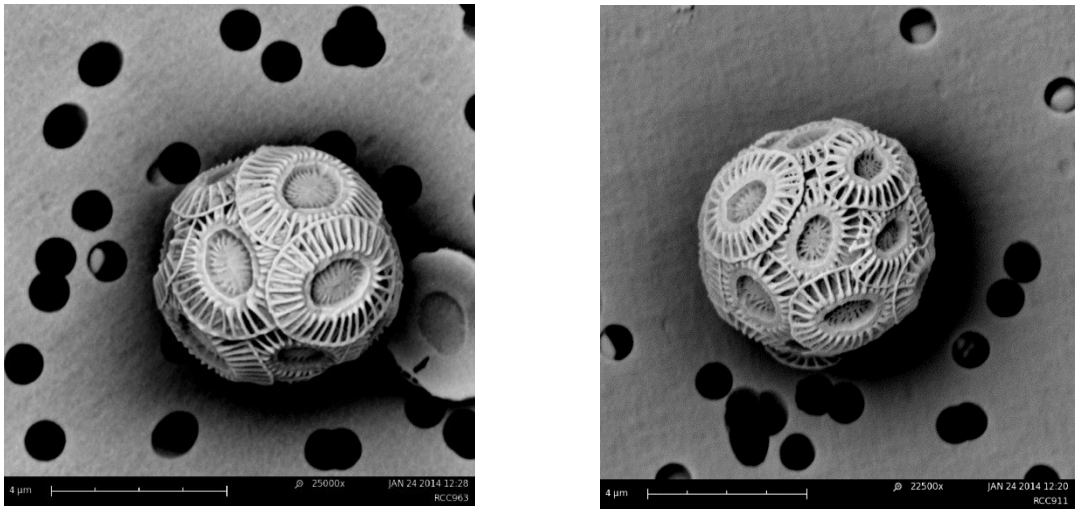


Figure II.4 : Souches RCC963 et RCC911 d'*E. huxleyi* prises au microscope à balayage électronique (MEB).

Deux souches, non axéniques, étaient disponibles dans la collection de culture de Roscoff (RCC: http://roscoff-culture-collection.org/), toutes les deux isolées dans le transect BIOSOPE proches des îles Marquises à 10 m de profondeur : RCC911 et RCC963 (Figure II.4). La souche RCC911, plus calcifiée (conclusion faite à l'œil nu sur les images prises au MEB), a été sélectionnée et inoculée dans le nouveau milieu afin de l'acclimater aux différents changements de conditions (lumière, milieu et température).

2.2 Choix de la température, de l'intensité lumineuse et du cycle jour/nuit

A la station GYR du transect BIOSOPE, entre 100 et 200 m de profondeur, la température est comprise entre 21 et 18°C (Claustre et al., 2008; et la base de données BIOSOPE : http://www.obs-vlfr.fr/proof/vt/op/ec/biosope/bio.htm). Pour simplifier, nous avons choisi une température de 20°C pour réaliser les cultures, température des eaux se trouvant environ à 160 m de profondeur, donc au sein du maximum de chlorophylle et de la niche profonde écologique et permettant la comparaison avec de nombreuses expériences réalisées à cette température (Feng et al., 2008; Langer et al., 2006; Sett et al., 2014).

La durée de l'insolation journalière sur la période de la mission BIOSOPE a été obtenue avec un modèle d'irradiation réalisé par Giovanni Aloisi sur le logiciel Mathematica. Ce modèle utilise les équations fondamentales expliquées dans Campbell and Norman (1998) et permet de calculer le cycle journalier du rayonnement photosynthétiquement actif (en anglais : Photosynthetic Active Radiation - PAR) à n'importe quelle date et n'importe quelle position géographique sur la terre en fonction de paramètres astronomiques (déclinaison solaire, l'angle horaire du soleil et l'angle du zénith du soleil) et atmosphériques (absorption) (Aloisi, 2008).

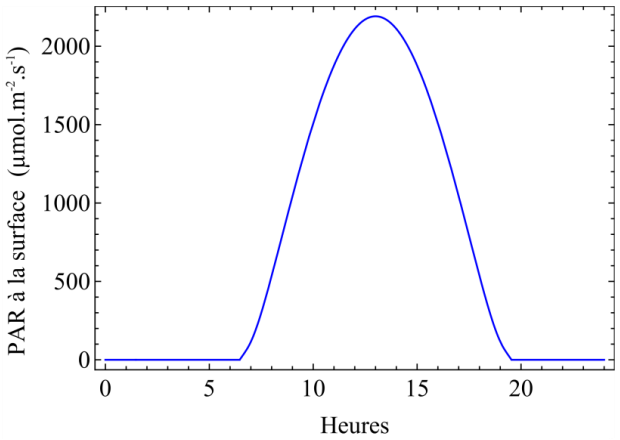


Figure II.5 : Cycle d'irradiance à la surface de l'océan sur 24h à la station GYR et à la date d'arrêt du bateau à cette station. Cycle calculé avec le modèle d'irradiation (Aloisi, 2008) (0 = 00h00, minuit).

La Figure II.5 montre le cycle d'irradiation pour la station GYR calculé avec le modèle d'irradiation. Le cycle moyen jour/nuit sur l'ensemble du transect se trouve entre 12h:12h et 14h:10h (heures jour:nuit). Pour les expériences de cultures, le cycle 12h:12h a été choisi, ce qui correspond au cycle jour:nuit durant l'échantillonnage à la station GYR.

En ce qui concerne le choix de l'intensité lumineuse et pour mener à bien une « limitation » de la lumière, il a été décidé de tester deux niveaux de lumière. La condition dite de « forte lumière » a été fixée à 140 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (micromoles de photons par mètre carrés par seconde) car elle se trouve dans l'intervalle de lumière fréquemment utilisée dans d'autres études faites sur les coccolithophoridés (Engel et al., 2014; Müller et al., 2011; Riegman et al., 2000; Rost et al., 2002), qui simulent des conditions de lumière saturante pour la croissance. La condition dite de « faible lumière » a été définie en étudiant les valeurs de lumière calculées à la station GYR du transect BIOSOPE au sein de la niche écologique : ~15 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (Claustre et al., 2008b)**.** Ces valeurs ont été définies en utilisant les données de PAR normalisées à l'irradiance de surface (~ 1800 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} ; Claustre et al., 2008) disponibles dans la base de données BIOSOPE jusqu'à 117 m. Les valeurs d'irradiance ont ensuite été extrapolées jusqu'à 250 m en utilisant la loi de Beer-Lambert (équation II-4) et en considérant un coefficient d'atténuation constant de 0.025 m^{-1} (Claustre et al., 2008).

Loi de Beer-Lambert : $$\mathrm{I(z)} = \mathrm{I}_0 \cdot e^{(-K_d \cdot (z - z_o))} \qquad \text{(II-4)}$$

Avec I_0 la lumière incidente en µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, z la profondeur en mètre où la valeur de la lumière est désirée, z_0 la profondeur d'arrivée de la lumière incidente et K_d le coefficient d'atténuation de la lumière en m^{-1}.

Il est très difficile de cultiver les cellules avec une intensité lumineuse aussi faible de par la durée des acclimatations et de l'expérience qui aurait nécessité quelques semaines en plus, c'est pourquoi nous avons décidé de réaliser les expériences à 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Par la suite, les expériences en forte intensité lumineuse seront nommées les expériences **« HL » pour « high light »** : forte lumière et celles en faible intensité lumineuse **« LL » pour « low light »** : faible lumière.

Afin d'obtenir une irradiance de 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (conditions LL) dans l'incubateur, l'intensité lumineuse d'un des deux incubateurs a été ajustée avec des filtres à densité neutre visibles sur la Figure II.6. Ces filtres permettent de réduire l'intensité lumineuse venant des néons tout en gardant les propriétés de la lumière intacte : couleur, longueur d'ondes etc. Pour

l'incubateur à forte lumière HL, il a suffit d'allumer seulement 2 néons sur 5 par côtés (voir Figure II.6). L'intensité lumineuse a été mesurée avec une sonde Biospherical Instrument QSL2101 et un logiciel associé Quantamètre.

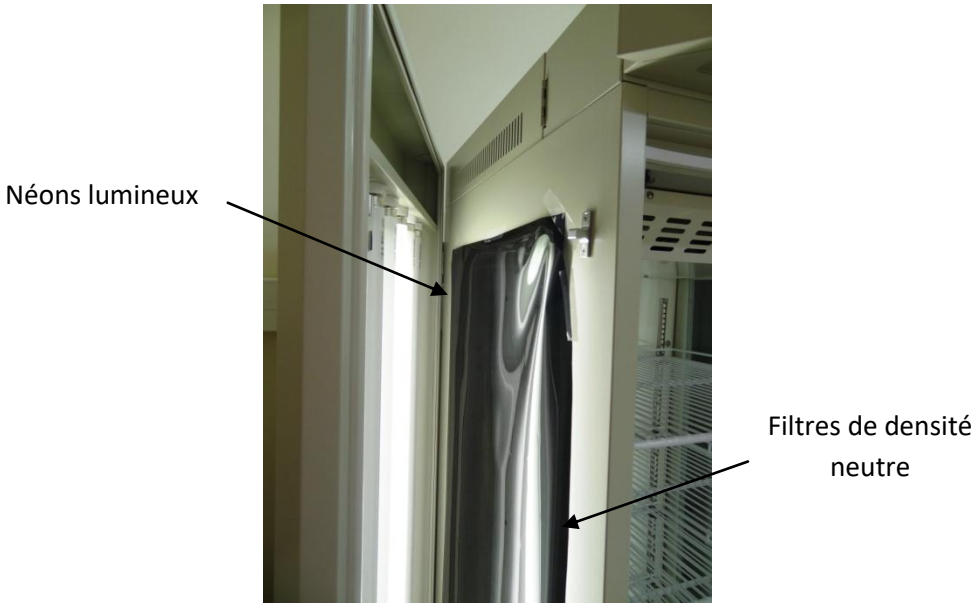


Figure II.6 : Incubateur et filtre neutre. Incubateur avec 2 néons allumés et un filtre neutre posé devant la vitre transparente séparant les néons de l'intérieur de l'incubateur.

2.3 Milieu de culture

Eau de mer initiale

Le milieu de culture a été préparé à partir d'un mélange de deux prélèvements d'eau de mer naturelle collectée, dans la Manche, à 1 m de profondeur à la station de prélèvement « Estacade » au large de la station biologique de Roscoff le 31 juillet 2014 et le 18 août 2014.

La concentration en nutriments (nitrate et phosphate) dans cette eau de départ a été obtenue en consultant la base de données SOMLIT[6] (Service d'Observation en Milieu Littoral). Cette base de données est tenue par la station marine d'Arcachon (UMR EPOC) et alimenté par les 11 stations SOMLIT du littoral français. Ce service d'Observation permet d'examiner les changements des systèmes côtiers sur le long terme et permet une homogénéisation de l'acquisition de paramètres (hydro-climatiques, chimiques et biologiques). Ces concentrations en nutriments ont donc été fournies après avoir fait une demande sur le site de la base de données SOMLIT, pour les dates de prélèvement à la station de l'Estacade de Roscoff de l'eau

[6] Site web : http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/

de mer utilisée (Tableau II.1). Les concentrations de nitrate et phosphate au site de prélèvement sont très faibles (Tableau II.1).

Tableau II.1 : Dates du prélèvement et concentration en nitrate et phosphate fournies par SOMLIT.

Site	Date	Heure	Coefficient marée	Profondeur (*m*)	NO_3 (*µmol.L^{-1}*)	PO_4 (*µmol.L^{-1}*)
estacade	2014-07-21	12:05	48	1	0.3	0.11
estacade	2014-08-05	10:27	44	1	0.6	0.14
estacade	2014-08-19	11:40	40	1	1.3	0.20
				Moyenne	0.7	0.15

Manipulations préliminaires

L'eau de mer est restée 2 mois dans le noir complet ce qui a normalement contribué à la dégradation de la matière organique par les bactéries. Elle a tout d'abord été filtrée sur des filtres de 1 µm et 0.22 µm afin de retirer les grosses et plus petites particules et bactéries, et a été transvasé en même temps dans des bouteilles ou des bidons préalablement lavés. Les bouteilles ou les bidons ont été prélavés à l'acide chlorhydrique pour désinfecter et tuer toutes particules présentes, et rincés à l'eau distillée et à l'eau MilliQ afin d'éliminer l'acide chlorhydrique restant sur les parois et purifier la bouteille. Ces bouteilles ou bidons remplis d'eau de mer ont ensuite été autoclavés à 100°C pendant 10 minutes afin de tuer les bactéries présentes dans l'eau de mer initiale, ce qui est appelé « pasteurisation ». La pasteurisation permet une stérilisation du milieu en évitant un dégazage et donc un changement de la chimie du carbone trop important.

Création du milieu de culture

L'eau de mer pasteurisée a ensuite été modifiée en ajoutant les éléments du milieu K basés sur celui définit par Keller et al. (1987) et modifié par Ian Probert, détaillé dans l'annexe 1. Ces différents éléments sont essentiels pour la croissance d'un organisme unicellulaire phytoplanctonique océanique tel *que E. huxleyi* (LaRoche et al., 2010). L'éthylène diamine tétracétate de fer et de sodium NaFeEDTA qui est nécessaire entre autre au processus de photosynthèse, les vitamines qui sont nécessaires à la synthèse d'acide aminés (Croft et al., 2005), les métaux traces qui sont des co-facteurs essentiels pour les métalloenzymes (Sunda, 1989) et le Na_2EDTA (éthylène diamine tétracétate de sodium) qui permet de chélater les

formes toxiques de métaux et/ou de rendre biodisponibles certains ions comme le fer (Jackson and Morgan, 1978). De l'hydroxyde de sodium NaOH a été ajoutée pour tamponner l'eau de mer et amener à un pH temporaire d'environ 7-8 (ce pH sera par la suite fixé à une valeur prédéfinie). Les nutriments, dihydrogénophosphate de sodium NaH_2PO_4 et nitrate de sodium $NaNO_3$, n'ont pas été ajoutée suivant ce milieu de référence mais en se basant sur le choix préalable des concentrations présenté dans la partie 3.4. Il est important de préciser que le chlorure d'ammonium NH_4Cl présent dans le milieu de référence n'a pas été rajouté pour ne pas apporter deux sources différentes d'azote aux cellules et ne pas entraver la limitation voulue en nitrate. Toutes ces solutions ont été préparées dans des flacons en verre prélavés et stérilisés.

L'ajout de nutriments, vitamines, métaux et autres composés du milieu K a été fait sous hotte à flux laminaire comme toutes les autres manipulations. L'ajustement du pH (voir section 2.4) s'est fait avant que le milieu soit filtré sur Stericup (système de filtration stérile avec un filtre de 0.22 µm). Ce milieu est ensuite transvasé dans de nouvelles bouteilles ou bidons préalablement lavés (acide chlorhydrique, eau distillée et eau MilliQ) et stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

2.4 Choix du pH et de la pression en dioxyde de carbone (pCO_2)

2.4.1 Choix du pH et de la pCO2

Concernant le système du carbone, la pression partielle de dioxyde de carbone (pCO_2) a été choisie en étudiant les profils de pCO_2 issus de la base de données BIOSOPE. La pCO_2 a été obtenue à partir des données de carbone inorganique dissous (DIC), d'alcalinité totale (TA), de salinité et de température disponibles dans la base de données BIOSOPE (voir chapitre V pour les détails de la méthode de calcul de la pCO_2). Il en résulte que la pCO_2 à la station GYR est d'environ 385 µatm à 160 m et 390 µatm à 180 m. Il a donc été décidé de fixer la pCO_2 à 390 µatm au début de l'expérience qui correspond aussi en moyenne à la pCO_2 atmosphérique actuelle qui frôle les 400 µatm (Le Quéré et al., 2015). Deux expériences supplémentaires (en conditions non limitées en nutriments) avaient pour but d'étudier, en parallèle, l'unique effet d'une augmentation de pCO_2 d'environ 150 µatm et donc d'une diminution équivalente de pH entre 0.14 et 0.35 unités de pH (IPCC, 2007) prédite d'ici la fin du siècle.

2.4.2 Calcul du pH à partir de la pCO2 et du DIC

Pour connaître le pH_T donnant lieu aux valeurs de pCO_2 souhaitées de 390 et 650 µatm, le système du carbone inorganique dissous a été résolu à partir des valeurs de pCO_2 et de DIC de la

façon décrite ci-dessous. La concentration du CO_2 est obtenue à partir de la pCO_2 via la loi d'Henry :

$$pCO_2 = \frac{10^6 \cdot CO_2}{K_H} \quad \text{(II-5)}$$

Puis le système suivant de trois équations a été résolu pour trouver H_i, la concentration des ions hydrogène:

$$DIC = CO_{3\ eq}^{2-} + HCO_{3eq}^{-} + CO_{2eq}^{*} \quad \text{(II-6)}$$

$$K_1 = \frac{HCO_{3eq}^{-} \cdot Hi^{+}}{CO_{2eq}^{*}} \quad \text{(II-7)}$$

$$K_2 = \frac{CO_{3\ eq}^{2-} \cdot Hi^{+}}{HCO_{3eq}^{-}} \quad \text{(II-8)}$$

Dans ces équations, le DIC est la somme de la concentration des espèces de carbone inorganique dissous ($CO_2 + HCO_3^- + CO_3^{2-}$) et K_1 et K_2 sont la première et deuxième constante de dissociation de l'acide carbonique :

$CO_2 + H_2O \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ constante de dissociation K_1

$HCO_3^- \Leftrightarrow CO_3^{2-} + 2H^+$ constante de dissociation K_2

K_1 et K_2 sont obtenues en fonction de la température et de la salinité selon Zeebe and Wolf-Gladrow (2001) (page 255).

Ces trois équations permettent de créer un système à trois inconnues et d'en déduire la concentration des ions hydrogène H_i^+. La relation entre le pH et cette concentration permet d'en déduire aussi la valeur du pH_T ($pH_T = -\log([H_i^+])$). Ce modèle nous a permis de trouver le pH_T nécessaire pour fixer la pCO_2 à 390 µatm puis à 650 µatm : 8.075 et 7.875. Cependant la précision de la mesure du pH étant de ± 0.02 unité, il existe donc un intervalle d'erreur sur le pH voulu qui sera donc compris entre 8.05 et 8.09 pour le pH « élevé » et 7.85 et 7.89 pour le pH plus « faible ».

Dans la procédure détaillée dans le paragraphe précédent, le carbone inorganique dissous (DIC), le pH échelle totale pH_T et la salinité du milieu de culture K ont été analysés avant de faire les inoculations. Le DIC du milieu de culture était de 2107 ± 2 $\mu mol.kg^{-1}$, la salinité mesurée avec

un conductimètre de 34.67 et le pH_T de 7.36 ± 0.02 mesuré avec un pHmètre-potentiomètre à 25°C (voir détails Tableau II.4). Nous avons mesuré le pH sur l'échelle totale (pH_T) car cette échelle (et son étalonnage) est appropriée pour la composition ionique de l'eau de mer (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001). Le pH_T des milieux a été ajusté aux valeurs voulues en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium NaOH grâce aux propriétés basiques de ce composé. L'ajout de NaOH implique un changement de pH, de CO_2 et d'alcalinité mais n'affecte en rien le DIC (Langer et al., 2006).

De plus, le taux de saturation par rapport à la calcite a été calculé, comme ce qui suit, d'après Mucci (1983) :

$$\Omega_{Ca} = \frac{CO_3^{2-}{}_{eq} \cdot SwCa}{K_{sp}} \qquad \text{(II-9)}$$

SwCa et $CO_3^{2-}{}_{eq}$ les concentrations du calcium et des ions carbonates dissous, et K_{sp}, la constante de solubilité de la calcite dans l'eau de mer. La constante K_{sp} est obtenue en fonction de la température et de la salinité selon Zeebe and Wolf-Gladrow (2001). La calcite aura tendance à se dissoudre lorsque le taux de saturation sera plus petit que 1 ($\Omega_{Ca} < 1$) (eau de mer sous-saturée en calcite) ; lorsque le taux de saturation par rapport à la calcite sera plus grand que 1 ($\Omega_{Ca} > 1$) la calcite pourra se former par précipitation des ions carbonates et calcium (eau de mer sursaturée) (Morse and Mackenzie, 1990).

3. Mise en place des pré-cultures, des acclimatations et des expériences

3.1 Précautions de manipulation

Toutes les bouteilles et matériels (type fiole, bécher, éprouvette, système de filtration non stérile, flacons, bouteilles échantillonnage,…) ont été lavés dans un bain de solution d'acide chlorhydrique, rincés à l'eau distillée et rincés à l'eau MilliQ ; et mises en milieu à chaque fois avant de les utiliser. Ces lavages ont été faits afin d'éviter toute contamination bactérienne ou extérieure (par exemple matière particulaire).

Toutes les bouteilles de cultures ont été remplies quasiment jusqu'au bouchon pour éviter un espace d'air trop important et donc un échange de CO_2 avec l'air présent dans la bouteille. Chaque manipulation d'échantillons et de bouteilles (milieux, solutions diverses, pré-cultures, acclimatations ou encore expériences) ont été faites sous une hotte à flux laminaire avec des gants et blouse.

3.2 Déroulement des cultures et schéma global (Figure II.7)

L'étape des « **micro-cultures** » sert à maintenir en vie les cellules de la souche isolée et de commencer simultanément une acclimatation à la lumière. L'étape des « **pré-cultures** » permet de faire le choix des concentrations initiales pour que la limitation en nutriments soit atteinte (voir partie 3.4). Une fois ces concentrations définies, des cultures « d'**acclimatation** » ont été mises en place dans de plus grandes bouteilles (voir partie 3.5) et ont été faites 2 à 3 fois selon les expériences et le calendrier (il a fallu préparer tous le matériel et les milieux pour les expériences avant d'arrêter les acclimatations). La dernière étape dans le déroulement des cultures a été la mise en place des « **expériences** » de culture (voir partie 3.6) après la préparation des bouteilles et des milieux pour celles-ci. Il a été impossible de lancer toutes les expériences en même temps (15 bouteilles d'expériences pour HL et 15 pour LL) de par la place dans les incubateurs et de par l'aspect pratique (temps et nombre d'échantillonnage, et manipulations des bouteilles), c'est pourquoi il a fallu gérer les acclimatations et en recommencer de nouvelles si nécessaire. Ces différentes étapes sont toutes représentées dans la Figure II.7.

3.3 Mise en place des micro-cultures

Tout d'abord, après le choix de la souche RCC911, quelques gouttes ont été inoculées dans des bouteilles ventilées[7] de cultures stériles et dans du milieu K/2 (Figure II.7). Ce milieu, fait par Ian Probert avant le début de notre collaboration, est basé sur un milieu K de Keller et al. (1987) dilué deux fois et se trouve être le milieu où la souche est maintenue en vie dans la Collection de Culture de Roscoff (RCC). La souche d'origine était très concentrée en cellules à mon arrivée donc nous avons décidé de l'inoculer dans deux bouteilles stériles de cultures différentes, dans le même milieu K/2 et de les placer séparément dans les incubateurs à « forte lumière » et à « faible lumière » de mes futures expériences. Une fois le milieu K préparé (avec les concentrations en nutriments non limitées en nutriments définies dans la partie 3.4.2), nous avons inoculé, dans ce nouveau milieu, les deux cultures arrivées à une forte concentration de cellules (Figure II.7). Pour ces nouvelles cultures, des bouteilles de cultures non ventilées et stériles ont été utilisées afin de se rapprocher des conditions des futures expériences où aucun échange d'air avec l'extérieur ne sera possible. Ces micro-cultures permettent de maintenir la souche en vie tout en commençant à l'acclimater au milieu et aux deux lumières qui serviront pour les expériences. Ces **micro-cultures** ont été répétées plusieurs fois pour permettre d'avoir

[7] Ayant une aération sur le bouchon pour permettre l'échange d'air avec l'extérieur de la bouteille de culture.

le temps nécessaire pour préparer les prochains milieux de cultures utilisés par la suite pour les pré-cultures.

3.4 Mise en place des pré-cultures et choix des concentrations en nitrate et phosphate initiales

Les **pré-cultures** ont permis de définir la concentration initiale en nutriments qui permettra d'atteindre la limitation en nutriments à la fin de l'expérience. Les différents milieux ont été préparés, en suivant les concentrations de nitrate et phosphate décrites dans la partie 3.4.1 et 3.4.2 ci-dessous, dans des bouteilles Nalgène de 1L et les pré-cultures ont été faites dans des bouteilles de cultures stériles de 200 mL.

3.4.1 Choix des concentrations pour les expériences limitées en nutriments

En étudiant les concentrations observées dans la zone de maximum de chlorophylle à la station GYR entre 150 et 250 m, des concentrations se trouvant entre 0.49 et 4.12 µmol.L^{-1} pour le nitrate et entre 0.14 et 0.47 µmol.L^{-1} pour le phosphate ont été relevées. Pour les expériences limitées en nutriments, le but est d'aboutir à la limitation en nutriments des cellules avec des densités cellulaires maximales aux alentours de 100000-150000 cells.mL^{-1} lorsque la phase stationnaire est atteinte. De plus, l'objectif est d'éviter qu'une limitation par le carbone inorganique dissous se produise avant celle en nitrate ou phosphate et que le système du carbone inorganique dissous ne soit trop modifié par le nombre de cellules (si possible < 10% de changement de DIC à la fin de l'expérience). Pour ce faire il est nécessaire de restreindre le nombre de cellules atteint dans la culture (<150000 cells.mL^{-1}; communication personnelle Gerald Langer) car une densité cellulaire trop importante pourrait modifier, de manière significative (> 10% voire plus), le système du carbone inorganique dissous du milieu de culture (LaRoche et al., 2010). Tout d'abord la limitation avec 3 différentes concentrations pour chaque nutriment, autour des valeurs *in situ*, a été testée: 5, 3 et 1 µmol.L^{-1} pour le nitrate ; et 0.1, 0.2 et 0.3 µmol.L^{-1} pour le phosphate. Afin de respecter l'objectif de ne pas atteindre une densité cellulaire trop élevée dans la phase stationnaire, les concentrations limitantes choisies à la suite de ces expériences préliminaires ont donc été de 1 µmol.L^{-1} pour le nitrate et de 0.2 µmol.L^{-1} pour le phosphate (Figure II.7).

Par la suite, les expériences avec une concentration limitante en nitrate seront nommées **« LN »** pour l'anglais **« low nitrate »**, celles avec une concentration limitante en phosphate **« LP »** pour **« low phosphate »** et celles avec une concentration limitante pour le nitrate et le phosphate seront nommées **« LNP »** pour **« low nitrate and phosphate ».**

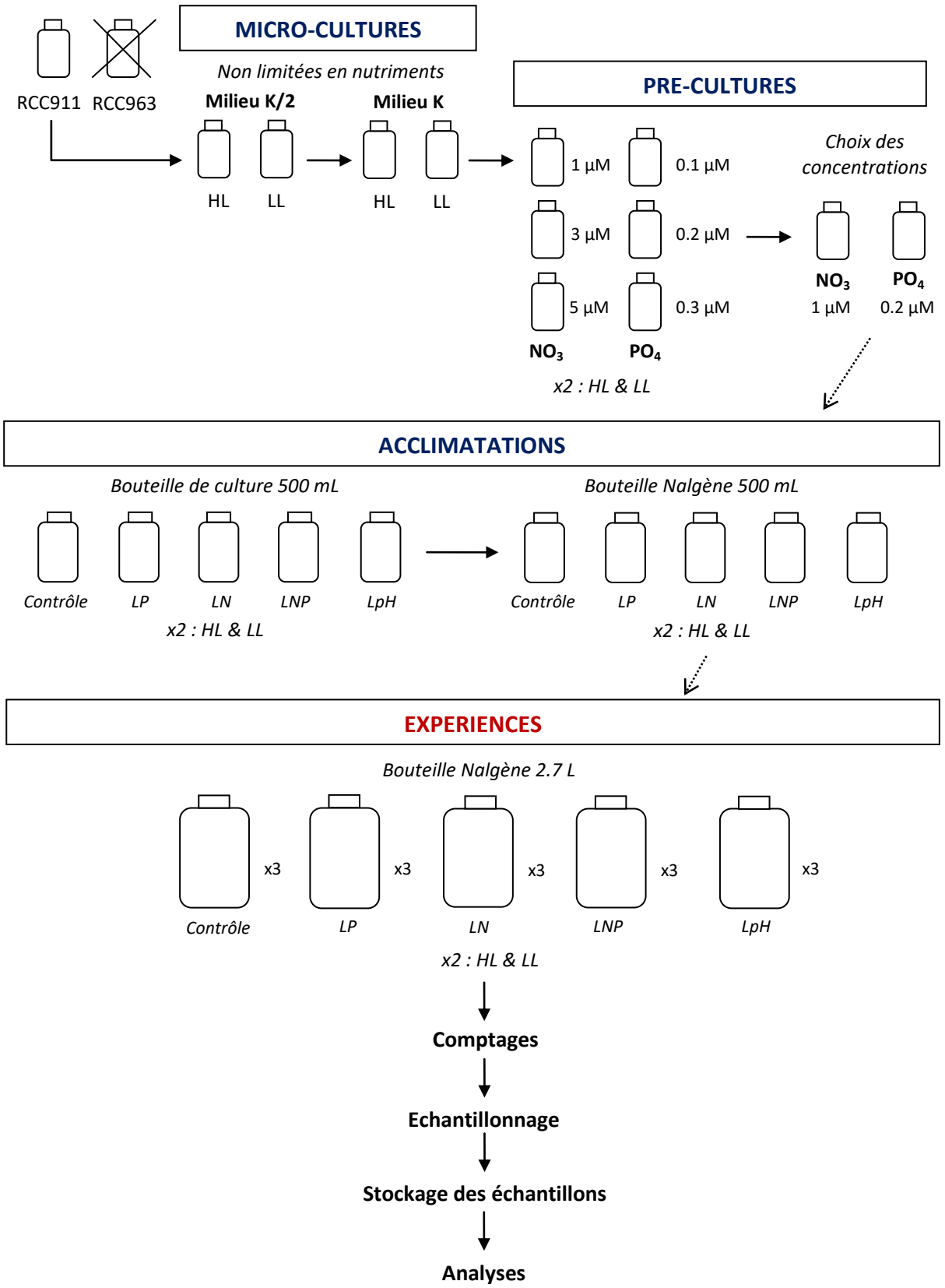


Figure II.7 : Déroulement des cultures en laboratoire : du choix de la souche aux analyses. HL: forte lumière ; LL : faible lumière, LP: limité en phosphate, LN : limité en nitrate, LNP : limité en nitrate et phosphate, LpH : à faible pH et µM = µmol.L^{-1}.

3.4.2 Choix des concentrations pour les expériences non-limitées en nutriments

Concernant les concentrations pour les expériences non-limitées en nitrate et/ou en phosphate, nous avons orienté notre choix vers les concentrations couramment utilisées, avec un rapport N:P de 16:1 (rapport de Redfield, 1963), 100 µmol.L^{-1} pour le nitrate et 6.25 µmol.L^{-1} pour le phosphate (Langer et al., 2009; LaRoche et al., 2010; Zondervan et al., 2002). Ces concentrations sont plus que suffisantes pour que les expériences non limitées en nitrate et en phosphate, restent dans la phase exponentielle de croissance pour les densités cellulaires considérées (entre 100000 et 150000 cells.mL^{-1}).

Les expériences non limitées en nutriments et à pH dit « élevé » seront nommées les expériences **« contrôles ».** Les expériences non limitées en nutriments et à « faible » pH seront nommées les expériences **« LpH »** pour l'anglais **« low pH ».**

3.5 Mise en place des acclimatations

L'**acclimatation** permet de mettre en conditions les cellules aux conditions physico-chimiques du milieu de culture. Les 5 milieux d'acclimatation ont été préparés dans des bouteilles Nalgène de 4L prélavées et stérilisées comme indiqué dans la partie 2.3, en respectant le choix des concentrations en nitrate et phosphate. Environ 10000 cells.mL^{-1} ont été inoculées pour LL et 250 cells.mL^{-1} pour HL. Ces acclimatations permettent d'acclimater les cultures à la lumière et à la chimie du milieu mais la limitation en nutriment n'arrivant qu'après la phase exponentielle (voir partie 1.2 de ce chapitre), acclimater les expériences à de faibles concentrations en nutriments n'est pas possible pour des cultures en batch (un chemostat serait nécessaire). Les acclimatations on été réalisées dans des bouteilles de 500 mL stériles non ventilées et ensuite, dans des bouteilles Nalgène de 500mL (prélavées et stérilisées) (voir Figure II.7). Les bouteilles ont été placées, couchées sur le flanc, au centre de l'incubateur et changées de niveaux tous les jours pour assurer une homogénéité de l'intensité lumineuse reçue par les cellules. De plus, elles ont été mélangées délicatement tous les jours afin de maintenir les cellules en suspension et éviter les agrégats. Ceux-ci ont aussi permis d'homogénéiser les cultures avant les comptages.

3.6 Mise en place des expériences

3.6.1 Plan des expériences

Après la détermination des différents paramètres et le choix des concentrations en nutriments, un plan d'expérience (voir Tableau II.2) a pu être mis en place afin de faciliter la compréhension, la mise en place et le suivi des expériences.

Tableau II.2 : Plan d'expérience avec les paramètres choisis préalablement. Abréviations définies dans la légende de la Figure II.3. La température et la salinité sont les mêmes que pour les milieux (voir parties 2.2 et 3.4).

1ère EXPÉRIENCE : Changement de lumière et concentration en NO_3 et PO_4

	Paramètres					Nombre de cultures	
	Irradiance	**Nitrate**	**Phosphate**	**pH_T**	**pCO_2**	**ACCLIMATATION**	**EXPERIENCES**
	µmol photons.m^{-2}.s^{-1}	*µmol.L^{-1}*	*µmol.L^{-1}*		*µatm*		Réplicats
HL	150	100	6.25	8.08	390	2 ou 3	3
HL-LP	150	100	0.2				
HL-LN	150	1	6.25				
HL-LNP	150	1	0.2				
LL	30	100	6.25				
LL-LP	30	100	0.2				
LL-LN	30	1	6.25				
LL-LNP	30	1	0.2				

2ème EXPÉRIENCE : Changement lumière et de pCO_2

	Paramètres					Nombre de cultures	
	Irradiance	**Nitrate**	**Phosphate**	**pH_T**	**pCO_2**	**ACCLIMATATION**	**EXPERIENCES**
	µmol photons.m^{-2}.s^{-1}	*µmol.L^{-1}*	*µmol.L^{-1}*		*µatm*		Réplicats
HL-LpH	150	100	6.25	7.9	650	2 ou 3	3
LL-LpH	30						

3.6.2 Début des expériences

Les 5 milieux pour les expériences ont été préparés dans des bidons Nalgène de 10L prélavés et stérilisés. Les mêmes milieux ont été préparés deux fois à la suite par manque de bidons de 10L (chaque milieu a donc nécessité au total 4 bidons de 10L : 2 pour réaliser les milieux et 2 pour les conserver après filtration). Des échantillons du milieu ont été pris pour analyser les nutriments, le DIC, le pH_T. Les expériences ont été faites dans des bouteilles de 2.7L et en 3 réplicats. Chaque expérience a été inoculée avec les cellules de sa dernière acclimatation en phase exponentielle. Pour les expériences en HL, 500 cells.mL^{-1} ont été inoculées, alors que pour réduire la durée de l'expérience, 5000 cells.mL^{-1} ont été inoculées en LL ce qui a permis de gagner plusieurs jours. En effet, les cellules se divisent bien moins vite en LL (observé grâce aux comptages de cellules) et il est préférable d'inoculer plus de cellules comparé à l'expérience HL pour atteindre plus rapidement la phase stationnaire.

3.6.3 Suivi de la croissance cellulaire

Les expériences ont été suivies en comptant les cellules utilisant un cytomètre à flux BDFacs Canto II (formation et aide apportées par Dominique Marie) presque quotidiennement et au même moment de la journée. Comme pour les pré-cultures et les acclimatations, les bouteilles des expériences ont été posées dans l'incubateur sur le flanc et mélangées délicatement et changées de place tous les jours. Le comptage des cellules a nécessité, à chaque fois, seulement 1 ou 2 mL de cultures ce qui n'a pas grandement changé le volume de cultures dans la bouteille.

3.6.4 Fin des expériences et échantillonnage

La fin des expériences contrôles a été définie de façon à limiter la croissance cellulaire à une densité d'environ 150000 cells.mL^{-1}, densité affectant le système du carbone inorganique dissous sans amener à une limitation par le carbone et en respectant un changement du DIC restreint (communication personnelle Gerald Langer) (< 10% dans la plupart des cas, 12 et 13% pour deux expériences, voir chapitre III section 2.2). Pour ce qui est des expériences limitées en nutriments, elles ont été arrêtées une fois l'état stationnaire atteint (voir chapitre III), 2 ou 3 jours après la fin de la phase exponentielle.

Les expériences ont toutes été échantillonnées l'après-midi entre 12h et 16-17h. Chaque bouteille, tube, fiole ou éprouvette utilisé a été préalablement rincé avec le milieu de cultures. Ci-dessus un tableau récapitulatif des échantillons pris, du volume prélevé, et du type de filtre utilisé (Tableau II.3). Pour le DIC, le pH_T et les nutriments, le filtrat a été utilisé pour remplir les

échantillons et les analyser par la suite. Pour les autres échantillons, ce sont les filtres qui ont été conservés et analysés ensuite. Idéalement, et pour un suivi de la concentration en nutriments au cours de l'expérience, il aurait fallu prendre des échantillons pour les analyses en nutriments tous les 2 jours. Cependant dans notre cas et considérant le nombre déjà important d'échantillons à prélever à la fin de l'expérience, ceci aurait demandé une bouteille de culture avec un plus grand volume et aurait nécessité environ 100 mL de cultures à chaque prélèvement. Ces prélèvements auraient donc modifié le niveau de culture dans la bouteille de façon importante au cours de l'expérience en créant ainsi un espace d'air plus important entre le niveau du milieu et le haut de la bouteille. Nous parlerons plus tard dans ce manuscrit de l'analyse suivie des nutriments faites par Langer et al. (2013) et qui est d'une grande utilité pour ce travail de thèse, mais seulement 30 mL ont été nécessaires pour chaque prélèvement ce qui facilitent la régularité des prélèvements.

Tableau II.3 : Liste des échantillons pris à la fin des expériences. Le volume prélevé, les filtres utilisés (GF/F : glass fiber filter, PC : polycarbonate) et le stockage des échantillons (PE : polyéthylène) sont indiqués. PIC : « particulate inorganic carbon » = carbone inorganique particulaire, POC : « particulate organic carbon » = carbone organique particulaire, PON : « particulate organic nitrogen » = azote organique particulaire et POP : « particulate organic phosphorus » = phosphore organique particulaire.

Echantillons	Volume filtré (*mL*)	Filtres	Récipient	Stockage
DIC	100	25mm GF/F calcinés	Bouteilles	Réfrigérateur
Nutriments	75-100	25mm GF/F calcinés	Bouteilles en PE	Congélateur
pH_T	100	25mm GF/F calcinés	Bouteilles en PE	Température ambiante
PIC	200-250 (x2)	25mm GF/F calcinés	Pilulier en verre	Congélateur
POC, PON	200-250 (x2)	25mm GF/F calcinés	Pilulier en verre	Congélateur
POP	200-250 (x2)	25mm GF/F calcinés	Boîtes de pétri	Congélateur
Ca^{2+}	200-250 (x2)	25 mm 0,8 µm PC	Falcon 50 mL	Au sec
MEB	2/5	25mm 0,8 µm PC	Boîtes de pétri	Au sec
Microscope opt.	100	25 mm 0,8 µm PC	Lames	/

4. Traitement des échantillons et analyses

Le Tableau II.4 détaille les paramètres analysés à la suite de l'échantillonnage et du stockage des échantillons, le traitement appliqué à ces derniers, les appareils utilisés afin de les analyser, le laboratoire où a été effectué les analyses et pour finir, les personnes (chercheurs, ingénieurs, assistants ingénieur) qui ont contribué aux traitements des échantillons et faits par la suite leurs analyses sur les appareils indiqués.

4.1 DIC, pH_T et nutriments

Le pH_T a été mesuré directement après échantillonnage avec une précision sur la mesure de ±0.02 unité de pH. Le DIC et les nutriments ont été analysés quelques mois après leur échantillonnage. Les limites de détection sont de ±2 $\mu mol.kg^{-1}$ pour les analyses de DIC et de ±0.003 µM et ±0.01 µM respectivement pour le phosphate et le nitrate. Chaque réplicat a été prélevé une fois par paramètres et la moyenne sur les trois réplicats a été calculée.

Nous avons choisi d'analyser le couple le DIC et le pH_T pour calculer le système du carbone inorganique dissous complet en accord avec les explications présentées dans le livre de Zeebe and Wolf-Gladrow, (2001). A l'aide du même modèle Mathematica, présenté dans la partie 2.4, qui permet de calculer le système du carbone inorganique dissous, les résultats obtenus à la fin des expériences dont le pH_T et le DIC ont permis d'utiliser ce même modèle et de définir le système du carbone inorganique dissous entièrement : concentrations des ions HCO_3^-, CO_2, CO_3^{2-} et la saturation en calcite: Ω_{Ca}.

4.2 POC, PIC, PON, POP et concentration en calcium

Les filtres GF/F ont été préalablement calcinés à 450°C pendant 4h pour enlever toute matière organique ou inorganique particulaire présente sur les filtres (voir Tableau II.3 dans la partie 3.6.4). De même, les piluliers en verre gravés avec le nom de l'échantillon ont, eux aussi, été calcinés avant utilisation. Pour les échantillons de POC et PON, analysés sur le même filtre, les filtres ont été acidifiés à l'acide chlorhydrique fumant dans un dessiccateur pour enlever toutes traces de composés inorganiques. En ce qui concerne le PIC, deux méthodes différentes ont été réalisées : la première (faite à la station biologique de Roscoff et appelé $PIC_{Roscoff}$) permet d'obtenir le PIC par différence du carbone total particulaire et du POC (Langer et al., 2006), et la deuxième (faite au LOCEAN et appelé PIC_{LOCEAN}) a permis d'analyser les ions calcium présents sur le filtre (Daniels et al., 2012). Le protocole suivi pour l'échantillonnage et le traitement des échantillons de POC et PON est celui décrit par Bichon and Savoye (2013), protocole national SOMLIT. Le POP est obtenu par différence du phosphore total particulaire

(TPP) et du phosphore inorganique particulaire (PIP) (méthode modifiée par Labry et al., 2013) d'où l'échantillonnage de deux filtres pour obtenir une mesure de POP par réplicat. Des blancs ont été faits pour chaque expérience afin d'analyser le filtre sans matière filtrée et soustraire la valeur à celle de l'échantillon filtré.

4.2.1 POC, PON, PIC et POP

Les valeurs de POC, PON et PIC ont été obtenues en µg et ont été converties en pg.cell^{-1} après avoir soustrait la valeur du blanc et ramenées au nombre de cellules et au volume filtré par expérience. Les valeurs présentées dans la partie résultats sont les moyennes et erreurs sur les trois réplicats et sur leurs deux analyses chacun : ce qui fait 6 valeurs au total par expérience et un blanc respectivement.

Pour le POP, les valeurs ont été données en µmol.L^{-1} et, de même que pour le POC, PON et PIC, converties en pg.cell^{-1}et moyennées sur les 6 valeurs obtenues après avoir déduit les blancs des concentrations en TPP et PIP.

4.2.2 Ca^{2+}: calcium

Tout d'abord, la concentration de l'ion calcium (Ca) a été analysée sur un spectromètre de masse (ICP-MS). La concentration de cet ion de masse atomique 43 a été utilisée comme résultat car il y a des interférences entre l'argon 40, utilisé comme gaz vecteur dans l'ICP-MS, et le calcium 40. En parallèle, le sodium (Na) de masse atomique 23 a été analysé pour soustraire la concentration de calcium, pouvant substituer Na dans le réseau cristallin de chlorure de sodium NaCl (Pilson 1998), à la valeur du calcium présent dans l'échantillon. Cette substitution du sodium par le calcium est égale à 0,038214 fois la concentration de sodium comme indiqué dans Pilson (1998).

Avant de soustraire la valeur des blancs aux concentrations mesurées dans l'échantillon (en µg.L^{-1}), la dérive du spectromètre de masse a été calculée en utilisant des solutions standards de concentrations connues pour le calcium et le sodium qui ont été analysées entre chaque set d'échantillons d'une expérience (2 échantillons par réplicat donc 6 échantillons par expérience). Après la correction de la dérive et des blancs, les résultats ont été ramenés en µg en appliquant les facteurs de dilution appliqués pendant le traitement des échantillons. La concentration en calcium (en µmol) venant des cristaux de sel substitués a alors pu être déduite de celle du calcium total présent dans l'échantillon (aussi en µmol). Finalement les concentrations en calcium ont été exprimés en pg.cell^{-1} grâce au volume filtré et au nombre de cellules par mL; et moyennées sur les 6 valeurs obtenues par expérience. La concentration en calcium est ramenée

à la concentration en PIC en considérant un ratio 1:1 Ca^{2+}:PIC et que tout le calcium présent sur les filtres provient des carbonates $CaCO_3$ (Fagerbakke et al., 1994).

4.3 Microscopie électronique à balayage et microscopie optique

Les filtres, traités comme définit dans le Tableau II.4 pour l'étude d'imagerie en microscopie optique et microscopie électronique à balayage (MEB) ont permis d'obtenir des images pour mesurer respectivement la taille des cellules internes (sans les coccolithes) et la taille des coccosphères et coccolithes à l'aide du logiciel ImajeJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Dans la mesure du possible et selon la qualité des filtres, le diamètre de 100 cellules et coccosphères a été mesuré pour chaque réplicat (dont deux mesures par coccosphères ou par cellules) (voir Figure II.8A et C) et 300 longueurs de coccolithes (appelés « Distal Shield Lenght » soit DSL) ont été mesurées par expérience (un réplicat par expérience) (voir Figure II.8B).

Pour les mesures de taille de coccosphères et de cellules, la moyenne sur toutes les mesures des trois réplicats d'une même expérience a été calculée ainsi que l'écart type. De plus, le volume a été calculé en considérant les coccosphères et les cellules de forme sphérique. Pour les mesures de coccolithes, un seul réplicat a été mesuré par expérience de par le temps que cela demande et la similarité entre les trois réplicats de chaque expérience.

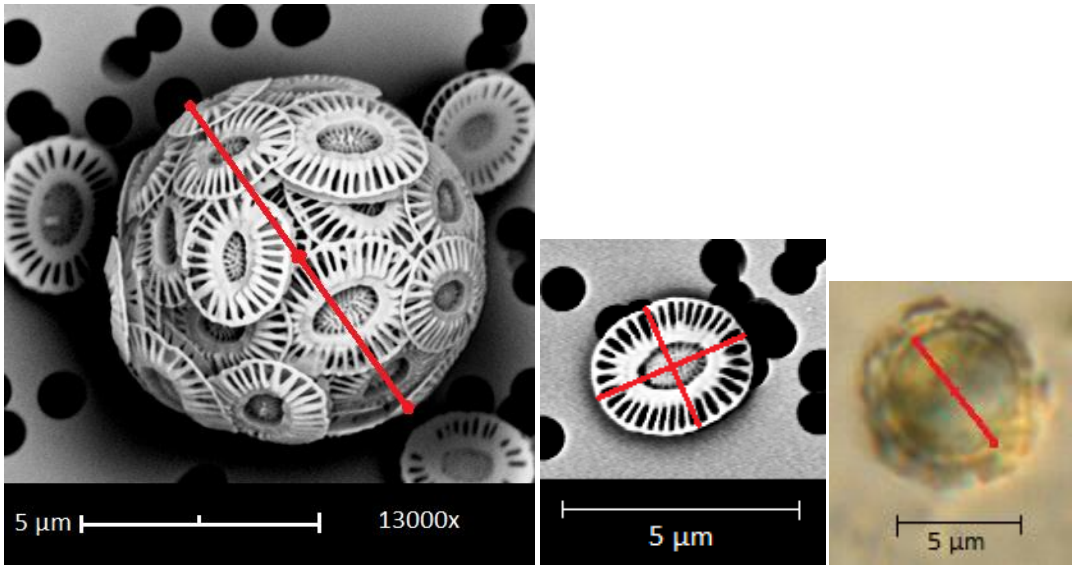


Figure II.8 : Images des mesures faites sur les cellules. Mesures du diamètre des coccosphères (A), de la longueur des coccolithes (B) et du diamètre des cellules internes (C).

Tableau II.4 : Tableau récapitulatif des paramètres analysés. Détails des traitements des échantillons, des appareils utilisés, du laboratoire et des personnes ayant fait le traitement et/ou les analyses (SBR : Station Biologique de Roscoff ; IRD : Institut de Recherche et du Développement).

Paramètres analysés	Traitement	Appareil utilisé	Laboratoire d'analyse	Personne(s) ayant traité et/ou analysé les échantillons
DIC	Empoisonnement à l'$HgCl_2$	Analyseur de gaz CO_2/H_2O LICOR7000	SBR	M. Vernet et Y. Bozec
pH_T	Bain thermostaté 25°C Calibré avec un tampon TRIS	pHmètre-potentiomètre pHenomenal pH1000L (Ross ultra combination pH electrode)	SBR	Moi
Nutriments	/	Autoanalyseur Seal Analytical AA3	SBR	T. Cariou
MEB	Rincé avec une solution de NH_4OH 25% Séché à l'étuve 55°C-1h Montage sur plot en aluminium et recouvert d'or-paladium	Microscope électronique à balayage Phenom G2 pro desktop	SBR	moi (et I. Probert)
PIC	Etuve à 50°C pendant la nuit	NC analyseur Flash EA 1112	SBR	C. Leroux
POC, PON	Dessiccateur d'HCl fumant Etuve à 50°C pendant la nuit	NC analyseur Flash EA 1112	SBR	T. Cariou et C. Leroux
POP	**TPP :** Séché à 95°C - 3h dans 2mL $MgSO_4$ Carbonisé à 550°C -2h, Hydrolysé dans 5mL HCl (1M) à 20°C-18h Dilué à l'eau MilliQ déionisée **PIP :** Séché à 50°C - 3h Hydrolysé dans 5mL HCl (1M) à 20°C-18h Dilué à l'eau MilliQ déionisée	Autoanalyseur 3 Seal analytical	IFREMER de Brest	C. Labry et A. Youenou
Ca^{2+}	Rincé avec une solution de NH_4OH Séché à l'étuve 55°C-1h Extraction avec une solution d'HNO_3 69%	ICP-MS 7500cx Agilent	IRD de Bondy	moi, F. Le cornec et I. Djouraev

5. Conclusions

Ce chapitre a pour but de décrire les méthodes utilisées et le choix des expériences de cultures réalisées en laboratoire à la station biologique de Roscoff. Il a fallu être rigoureux dans l'organisation de ces expériences : mise en place du protocole de cultures, formation sur les différents appareils utilisés, collaboration avec les différentes personnes et laboratoires pour l'analyse des échantillons, commandes diverses pour avoir le matériel nécessaire dans les délais, et bien sûr, suivi quotidien de l'avancement des cultures et anticipation des échantillonnages, lavages… Malgré la complexité et l'organisation que demande ce travail en laboratoire, les nombreuses expériences réalisées par d'autres scientifiques ont permis de mener ces expériences dans les meilleures conditions et d'avoir de nombreux protocoles à disposition.

CHAPITRE III

REPONSES PHYSIOLOGIQUES D'*E.HUXLEYI* DANS LES EXPERIENCES DE CULTURES

« La représentation des résultats et leurs interprétations se sont faites de retour au LOCEAN entourée de mes acolytes de bureau et de belles photos de coccolithophoridés »

Dans ce chapitre sont présentés les résultats des expériences de culture en batch dont la méthodologie a été décrite dans le chapitre II. L'étude de la littérature permet de valider ou d'apporter de nouvelles observations et hypothèses quant à la croissance d'*E. huxleyi* en conditions limitées de lumière et de nutriments. Ce chapitre a été découpé en 5 parties de façon à décrire les résultats, les interpréter et les discuter. La **première partie** décrit les résultats de croissance cellulaire et de taux de croissance. La **deuxième partie** présente les résultats des concentrations en nutriments dissous dans le milieu et du changement du système du carbone au cours de l'expérience. La morphologie des cellules est abordée dans la **troisième partie** avec l'explication et la représentation des résultats de mesures des coccosphères, cellules et coccolithes. Ces mesures sont largement utilisées par les scientifiques pour comprendre l'impact des changements environnementaux sur la morphologie des cellules de coccolithophoridés (ex. De Bodt et al., 2010; Iglesias-Rodriguez et al., 2008; Riegman et al., 2000; Sciandra et al., 2003). Une **quatrième partie** décrit les quotas cellulaires et les rapports de matière particulaire afin de comprendre comment le métabolisme des cellules a réagi aux changements de conditions de cultures. Ces analyses de quota et calcul des rapports de quotas permettent de comparer les variations observées avec la littérature: par exemple avec Engel et al. (2014); Krug et al. (2011); Oviedo et al. (2014); Rokitta and Rost (2012); Trimborn et al. (2007). Pour finir, cette comparaison avec la littérature est faite de façon plus détaillée dans la **cinquième partie** où une discussion plus générale de chaque effet testé sera faite.

1. Croissance des cultures

1.1 Description des courbes de croissance

Les comptages de cellules quasiment journaliers ont permis un suivi précis des cultures de chaque expérience. La Figure III.1 montre que les expériences en HL ont dues être comptées tous les jours de par la faible durée des expériences : de 6 à 9 jours. Cependant les expériences en LL ayant duré entre 12 et 19 jours, les comptages ont parfois été faits tous les 2 jours, ce qui a permis un gain de temps de manipulation. Ceci a aussi permis d'éviter d'utiliser trop de volume de cultures ce qui aurait généré un espace d'air plus important entre la surface de la culture et le bouchon (en anglais « headspace »). Il est important de minimiser ce headspace qui peut influer sur les conditions du système du carbone inorganique dans le milieu si celui-ci est différent de l'atmosphère.

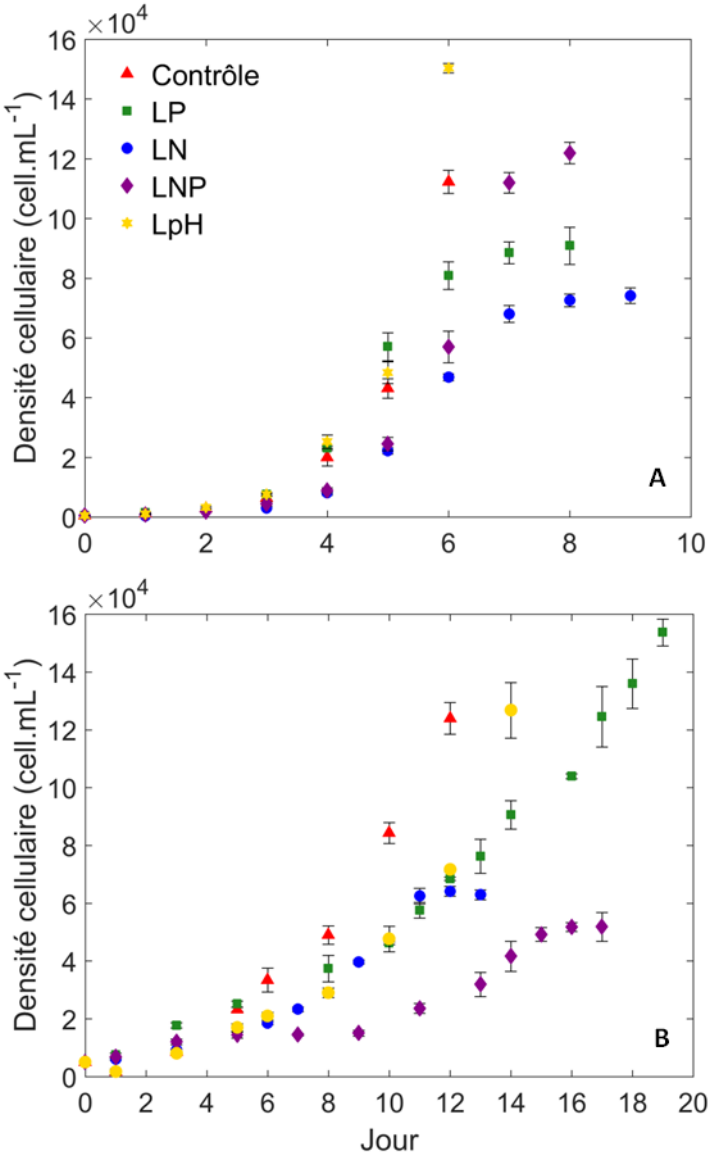


Figure III.1 : Densité cellulaire des expériences HL (A) et LL (B) en fonction du jour de l'expérience. « Contrôle » signifie riche en nutriments (et pCO_2 = 390 µatm) ; LP, LN et LNP signifient respectivement limitée en PO_4, limitée en NO_3 ; et limitée en NO_3 et PO_4; LpH signifie faible pH (pCO_2 = 650 µatm).

Les courbes de croissance montrent que les expériences HL ont une densité cellulaire qui augmente bien plus vite que les expériences en LL (Figure III.1). Alors que les expériences HL ont atteint une densité cellulaire d'environ 50 000 cells.mL^{-1} autour du 5ème ou 6ème jour (Figure III.1A), les expériences LL l'ont atteint aux alentours du 8ème ou 10ème jour d'expérience (Figure III.1B). Concernant les cultures en conditions non limitées en nutriments, les courbes de croissance mettent en avant la croissance exponentielle en HL et en LL. En HL, la croissance des expériences dites « contrôles » et celles non limitées en nutriments à faible pH « LpH » se superposent parfaitement. Alors qu'en LL, la densité cellulaire a augmenté plus rapidement

pour l'expérience LpH (faible pH) que l'expérience contrôle. Ceci peut s'expliquer par une petite différence dans le nombre de cellules inoculées par mL au départ qui peut induire un changement plus important dans les générations suivantes.

La pente des phases exponentielles dépend majoritairement des conditions de lumière et de température, il était donc attendu les mêmes phases exponentielles pour une condition de lumière (la température étant la même pour toutes les expériences). A un jour près de décalage, les phases exponentielles de toutes les expériences HL se suivent et sont similaires. Les phases exponentielles des expériences non limitées en nutriments et LP en HL se superposent, alors que celles des expériences LN et LNP commencent au jour 4 plutôt qu'au jour 3 et sont donc décalées d'un jour. En LL, les phases exponentielles de toutes les expériences (sauf LNP) sont aussi assez similaires. La phase exponentielle de l'expérience LNP ne suit pas du tout la même phase que les expériences non limitées. On observe en effet un plateau de densité cellulaire après la phase de latence ce qui peut être une conséquence d'une mauvaise homogénéisation lors des comptages ou encore d'un souci dans la division cellulaire.

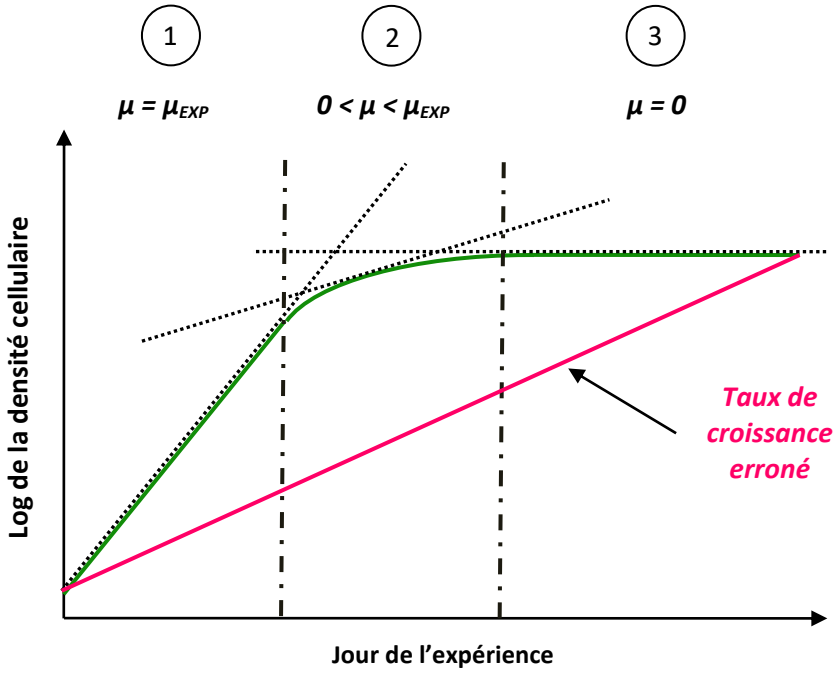
La limitation en nutriments intervient lorsque l'élément limitant arrive à épuisement et est mise en avant par la phase stationnaire de l'expérience. Ainsi, les expériences limitées en nutriments, excepté celle en LL-LP, ont toutes atteint une phase stationnaire ce qui indique que la limitation en nutriments a été réussie. Les phases stationnaires en HL commencent au 6ème ou 7ème jour, et celle en LL commence au jour 11 (selon l'expérience LL-LN). Cette différence nous donne déjà un aperçu de l'impact de la limitation en lumière sur la croissance des cellules avant que la limitation en nutriments intervienne. L'expérience LP-LL sera détaillée dans la partie 5.1.

1.2 Taux de croissance des expériences contrôles

1.2.1 Calcul du taux de croissance

Comme présenté dans le chapitre II, le taux de croissance est égal à la pente de la régression linéaire sur les données de densité cellulaire sur l'échelle logarithmique dans la phase exponentielle de croissance. La Figure III.2 nous montre graphiquement que cette définition du taux de croissance n'est pas valable pour une expérience dans la phase de limitation en nutriments où le taux de croissance instantané diminue dans le temps et les densités cellulaires ne s'alignent pas sur une droite. Dans la phase transitoire (phase 2 sur la Figure III.2), le taux de croissance est égal à la tangente de la courbe de densité cellulaire, qui est une quantité très difficile à déduire en pratique. Dans ces conditions, le taux de croissance sera compris entre zéro et le taux de croissance de la phase exponentielle (phase 1 sur la Figure

III.2) alors que dans la phase stationnaire le taux de croissance sera égal à zéro (phase 3 sur la Figure III.2).



1 : Phase exponentielle où μ = constante
2 : Phase de transition en limitation où μ est la pente de la tangente
3 : Phase stationnaire où μ = 0

Figure III.2 : Figure explicative mettant en avant l'incapacité de calculer ou définir un taux de croissance pour une expérience limitée en nutriment. La droite verte représente la droite schématique des données de densité cellulaire sur l'échelle logarithmique. Les courbes en pointillés noires représentent les tangentes de la courbe verte dans chaque phase 1, 2 et 3. La droite rose représente la détermination erronée du taux de croissance.

Dans la littérature, le taux de croissance est parfois calculé dans des expériences faites en batch, en utilisant la pente de la droite qui unit le début de la phase exponentielle de croissance avec un point à la fin de la phase de limitation (ex : Langer et al., 2013). Cette procédure n'a pas de sens scientifique. En effet, cette utilisation des données de densité cellulaire pour calculer un taux de croissance dans des expériences limitées en nutriments induit une erreur importante car un taux de croissance supérieur à zéro est calculé dans des expériences de croissance qui ont atteint la phase stationnaire.

Ainsi comme décrit dans le papier de Langer et al. (2013), le taux de croissance moyen déterminé pour une expérience limitée en nutriments ne sera pas représentatif ni de la phase exponentielle, ni de la phase stationnaire de l'expérience. Ce taux de croissance n'est donc pas

utilisable pour une expérience de ce type et n'aura pas de sens physiologique. De plus, il ne peut en aucun cas être utilisé pour calculer des taux métaboliques tels que la production de photosynthèse (POC_{prod}=µ * POC) et de calcification (PIC_{prod}=µ * PIC) (voir Langer et al., 2013).

Par conséquent, les densités cellulaires seront utilisées dans ce chapitre pour calculer le taux de croissance uniquement pour les expériences non limitées en nutriments. Dans ces conditions, le taux de croissance est fonction de la lumière et de la température. Nous aborderons dans le chapitre IV l'utilisation des densités cellulaires dans des conditions de limitation en nutriments.

1.2.2 Résultats des taux de croissance

Le taux de croissance de chaque réplicat a été calculé et les trois taux de croissance obtenus ont été moyennés et l'écart type calculé (voir Tableau III.1).

Tableau III.1 : Résultats des taux de croissance (µ) pour les expériences contrôles et à faible pH.

Expériences	µ (j^{-1})	*std*
HL-Contrôle	0.91	*0.028*
HL-LpH	0.96	*0.011*
LL-Contrôle	0.28	*0.014*
LL-LpH	0.23	*0.003*

Si nous regardons la différence des taux de croissance entre les deux conditions de lumière appliquées, nous verrons que la Figure III.3 confirme les variations déduites de façon qualitatives quant aux taux de croissance (Figure III.1). La température ayant été fixée et gardée constante, le taux de croissance dans ses expériences sera uniquement fonction de la lumière fixée. Comme deux irradiances différentes ont été choisies, l'une faible (~ 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et l'autre assez élevée (~ 140 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) pour permettre une bonne croissance, une différence dans la durée des expériences était attendue, et donc aussi dans la valeur du taux de croissance. La Figure III.3 nous indique l'exactitude de ses hypothèses de par la durée de l'expérience plus longue pour les expériences LL : 12-14 jours au lieu de 6 jours pour les expériences HL ; et de par le taux de croissance bien plus faible pour ces mêmes expériences : de 0.28 ± 0.014 j^{-1} en LL et de 0.91 ± 0.028 j^{-1} en HL par exemple pour les expériences contrôles

(voir Tableau III.1). Ces résultats mettent en avant la réussite de la limitation de la croissance cellulaire par la lumière.

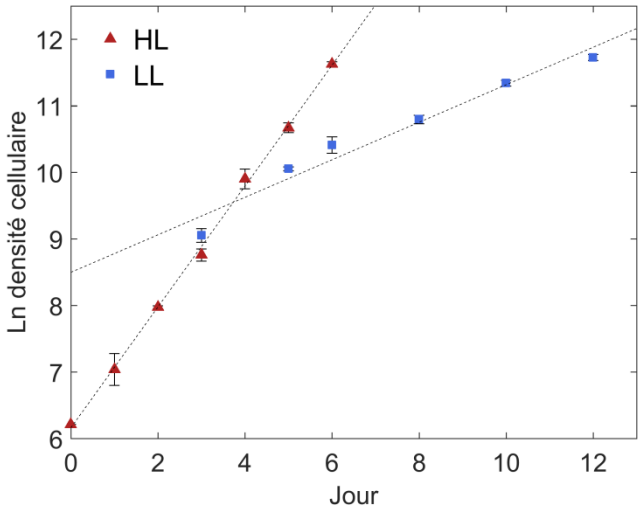


Figure III.3 : Logarithme népérien des points de densité cellulaire pour les expériences contrôles en fonction du jour de l'expérience. Les données représentées sont les points de densité cellulaire pendant la phase exponentielle de l'expérience.

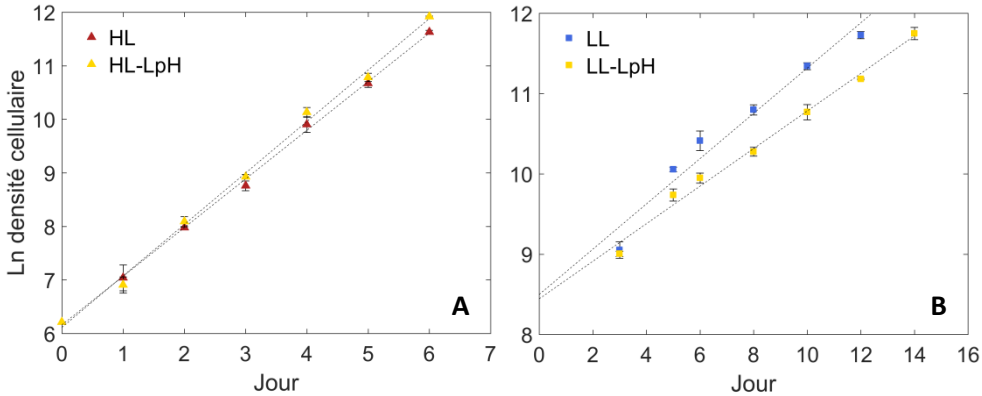


Figure III.4 : Logarithme népérien des points de densité cellulaire linéaires, pour les expériences non limitées en nutriments en HL (A) et LL (B).

Des différences de second ordre sont aussi présentes pour un niveau de lumière donné. La Figure III.4 nous montre que le taux de croissance en conditions HL est un peu plus faible pour l'expérience contrôle que pour l'expérience LpH. Celui-ci est par contre plus faible pour l'expérience LpH que l'expérience contrôle en conditions LL. Sachant que les bouteilles utilisées sont les mêmes et que les incubateurs aussi, cette petite différence ne pourrait être liée qu'à un changement de position dans l'incubateur (6 niveaux avec au maximum deux bouteilles par

niveaux changées de place et de niveaux tous les jours). Cependant considérant l'écart type (Tableau III.1), les valeurs restent très proches.

2. Nutriments et système du carbone inorganique dissous

2.1 Consommation de nitrate et phosphate par les cellules

La concentration en nitrate et en phosphate a été analysée pour les milieux de cultures ainsi qu'à la fin des expériences. Malgré une grande rigueur dans la réalisation des solutions de nitrate et phosphate, et dans la préparation des milieux, nous pouvons noter qu'il y a une différence importante entre les concentrations voulues (100 et 1 µmol.L^{-1} pour le nitrate, et 6.25 et 0.2 µmol.L^{-1} pour le phosphate) et les concentrations analysées (voir Tableau III.2A). Cette différence est d'autant plus importante pour l'expérience contrôle en HL (environ 20%) et pour les concentrations limitantes que ce soit en nitrate ou phosphate (entre 125 et 400% d'erreur). Pour expliquer ces dernières observations, nous pouvons revenir au tableau de valeurs en nutriments i*n situ* mesurées par SOMLIT et présentées dans le chapitre II. En soustrayant ces valeurs de concentrations *in situ* aux concentrations mesurées dans les milieux, nous réduisons le biais d'erreur entre 49 et 97 % pour le phosphate mais celui-ci reste cependant élevé pour le nitrate (340, 170 et 80%). Ce que nous pouvons retenir de ces résultats est que malgré les antécédents en nutriments dans l'eau de mer prélevée, aussi faibles soient-ils, et malgré la rigueur appliquée pour la mise en place de ces milieux, il a été difficile d'obtenir la concentration exacte désirée pour des concentrations aussi faibles en nutriments et pour des volumes aussi importants de milieux (10 L). En effet, ce grand volume a demandé de nombreux prélèvements répétés ce qui ajoutent les incertitudes du prélèvement et de la précision du pipeteur.

Les concentrations en nutriments à la fin des expériences sont cohérentes avec les observations faites dans la partie 1.1 sur les courbes de croissance cellulaire. En effet, les faibles concentrations atteintes pour les expériences limitées confirment le fait que la limitation en nutriment a été atteinte. Lorsque les concentrations en nitrate ou phosphate étaient faibles au début de l'expérience (voir Figure III.5), entre 92.8 et 98.7% de l'élément limitant ont été consommés. Lorsque les concentrations en nutriments étaient élevées, entre 6.4 et 25.2% de nitrate et/ou de phosphate ont été consommés.

Pour les expériences non limitées en nutriments (contrôles en HL et LL, HL-LpH et LL-LpH), le pourcentage de consommation est en général quasiment le même entre le nitrate et le phosphate, ou seulement 2% d'écart comme pour l'expérience HL. En effet le rapport

nitrate:phosphate initial dans le milieu pour ces expériences étaient proche du rapport de Redfield[8] (N:P = 16 ; Redfield, 1963), c'est-à-dire entre 15.6 pour l'expérience HL-LpH et 17.2 pour l'expérience contrôle en HL. Ainsi les cellules ont consommé le nitrate et le phosphate suivant un rapport de Redfield pour les expériences non limitées en nutriments.

Tableau III.2 : Concentrations en nutriments dissous pour les milieux de cultures (A) et à la fin des expériences (B).

A)

Milieux	NO_3 $\mu mol.L^{-1}$	PO_4 $\mu mol.L^{-1}$
HL-Contrôle	81.8	4.90
HL-LP	100.4	0.55
HL-LN	2.50	6.13
HL-LNP	4.8	0.50
LL-Contrôle	94.2	5.90
LL-LP	100.7	0.45
LL-LN	5.10	6.31
LL-LNP	3.4	0.47
HL-LpH	92.6	5.95
LL-LpH	97.5	6.27

B)

Expériences	NO_3 $\mu mol.L^{-1}$	*std*	PO_4 $\mu mol.L^{-1}$	*std*
HL-Contrôle	67.92	*1.98*	3.95	*0.12*
HL-LP	80.88	*0.35*	0.01	*0.00*
HL-LN	0.18	*0.03*	5.74	*0.00*
HL-LNP	0.08	*0.00*	0.01	*0.01*
LL-Contrôle	79.10	*1.15*	4.90	*0.04*
LL-LP	75.25	*1.24*	0.01	*0.01*
LL-LN	0.13	*0.02*	5.83	*0.02*
LL-LNP	0.15	*0.07*	0.03	*0.02*
HL-LpH	80.68	*2.10*	5.18	*0.12*
LL-LpH	79.71	*1.20*	5.08	*0.09*

Pour les expériences LL-LP et HL-LNP, les concentrations analysées en phosphate étaient en dessous de la limite de détection pour un réplicat sur trois (LL-LP) et pour deux réplicats sur trois (HL-LNP). En ce qui concerne l'expérience LL-LP, sa courbe de croissance n'ayant pas atteint la phase stationnaire, il est difficile, à cette étape du chapitre, de trouver une cohérence avec la faible concentration en phosphate analysée (de plus amples indications seront fournies par la valeur du quota cellulaire en phosphore POP ; voir partie 4.4).

[8] Rapports de Redfield (Redfield, 1963) : rapport atomique de carbone, azote et phosphore trouvé dans le phytoplancton et dans l'océan profond. C/N/P = 106/16/1.

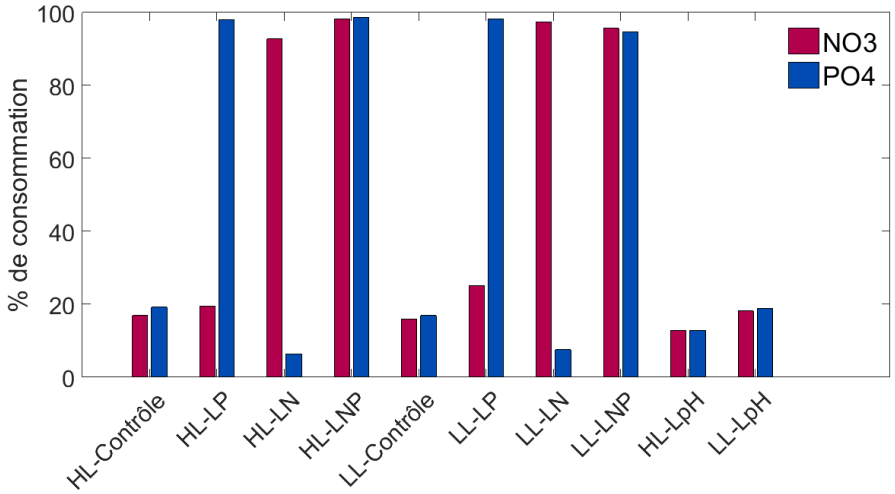


Figure III.5 : Consommation en nutriments exprimée en % pour le nitrate et le phosphate.

2.2 Le système du carbone inorganique dissous

Pour éviter un changement important du DIC à l'intérieur de la culture et une limitation éventuelle par le CO_2 (qui peut arriver avant la limitation en nutriments selon les concentrations de ces derniers et selon la durée de l'expérience), il a fallu garder un système du carbone inorganique dissous quasi-constant au cours de l'expérience.

Comme détaillé dans le chapitre II, le but était d'obtenir une pCO_2 de 390 µatm (pH_T de 8.075) pour les 8 premières expériences et 650 µatm (pH_T de 7.875) pour les deux dernières. Le Tableau III.3A nous montre que la pCO_2 pour les milieux de culture se trouve entre 373 et 436 µatm (soit un pH_T entre 8.11 et 8.05) et à 637 et 696 µatm (soit un pH_T de 7.89 et 7.86). Nous avons donc plutôt bien réussi à obtenir les pCO_2 voulues, malgré la délicatesse de maniement du système du carbone avec 10L de milieu à chaque fois. Pour ce qui est de la concentration en DIC dans les milieux, celles-ci se trouvent ente 2155 et 2255 µmol.kg^{-1} pour les expériences avec une pCO_2 d'environ 400 µatm, et à 2151 et 2166 µmol.kg^{-1} pour les expériences avec une pCO_2 d'environ 650 µatm.

Comme attendu et en accord avec la littérature (ex. Feng et al., 2008; Rokitta and Rost, 2012), l'état de saturation du milieu par rapport à la calcite, Ω_{Ca} est plus faible pour les milieux LpH: moyenne de 4.3 alors qu'elle se situe entre 6.38 et 7.23 pour les autres milieux. De plus, nous pouvons noter que pour tous les milieux de culture ainsi qu'à la fin de chaque expérience, le taux de saturation en calcite Ω_{Ca} est bien supérieur à 1 (entre 4.17 et 9.23). Par conséquent, le carbonate produit par les cellules est thermodynamiquement stable et n'aura pas tendance à se dissoudre lors des expériences.

Tableau III.3 : Système du carbone inorganique dissous et saturation en calcium pour les milieux de cultures (A) et les expériences (B). ΔpCO2 et ΔDIC correspond à la consommation entre le milieu et l'expérience. ΔpHT correspond à l'augmentation en pH exprimée en % entre le milieu et l'expérience.

A)

Milieux	pH_T	pCO_2 *µatm*	DIC *µmol.kg^{-1}*	Ω_{Ca}
HL-Contrôle	8.05	436	2224	6.38
HL-LP	8.07	401	2155	6.46
HL-LN	8.08	393	2161	6.58
HL-LNP	8.11	373	2169	6.98
LL-Contrôle	8.08	413	2254	6.89
LL-LP	8.11	384	2255	7.23
LL-LN	8.10	388	2225	7.08
LL-LNP	8.08	410	2250	6.92
HL-LpH	7.89	637	2151	4.44
LL-LpH	7.86	696	2166	4.17

B)

Expériences	pH_T	*std*	pCO_2 *µatm*	*std*	ΔpCO_2 *%*	DIC *µmol.kg^{-1}*	*std*	ΔDIC *%*	Ω_{Ca}	*std*
HL-Contrôle	8.13	*0.01*	351	*16.2*	**19.4**	2177	*19.1*	**2.1**	7.31	*0.14*
HL-LP	8.21	*0.01*	248	*4.8*	**38.1**	1894	*21.0*	**12.1**	7.45	*0.19*
HL-LN	8.14	*0.01*	323	*3.7*	**17.9**	2060	*3.6*	**4.7**	7.10	*0.05*
HL-LNP	8.17	*0.01*	304	*20.0*	**18.5**	2028	*9.2*	**6.5**	7.55	*0.23*
LL-Contrôle	8.13	*0.02*	353	*21.1*	**14.7**	2161	*7.6*	**4.1**	7.22	*0.30*
LL-LP	8.30	*0.01*	199	*7.4*	**48.3**	1956	*8.3*	**13.2**	9.23	*0.20*
LL-LN	8.09	*0.00*	381	*4.2*	**1.6**	2139	*4.2*	**3.9**	6.68	*0.05*
LL-LNP	8.09	*0.00*	383	*2.5*	**6.6**	2128	*1.7*	**5.4**	6.60	*0.03*
HL-LpH	8.07	*0.01*	377	*21.1*	**40.8**	1980	*23.1*	**7.9**	5.83	*0.19*
LL-LpH	8.01	*0.01*	456	*10.6*	**34.5**	2092	*5.7*	**3.4**	5.57	*0.08*

Le Tableau III.3A et Tableau III.3B relatent des résultats avant le début des expériences et à la fin des expériences et nous permet de voir le changement en DIC (représenté par la Figure III.6), en pH_T et pCO_2 et en Ω_{Ca}. Clairement nous pouvons voir qu'il y a une augmentation du pH_T et Ω_{Ca} au cours de l'expérience alors que la pCO_2 et DIC diminuent. Ce phénomène s'explique par les équations chimiques de photosynthèse et calcification (équations III-1 et III-2) :

Photosynthèse :	$CO_2 + H_2O \rightarrow CH_2O + O_2$	puits de DIC	pH↗	(III-1)
Calcification:	$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3$	puits de DIC	pH↘	(III-2)

Ces équations de processus métaboliques réalisés par les coccolithophoridés (Paasche, 2002) nous montrent que les deux processus, favorisés par une augmentation du nombre de cellules, sont un puits de DIC de par la consommation du CO_2 par la photosynthèse et celle du CO_3^{2-} par la calcification. Cependant, le pH est contrôlé par la consommation de l'acide faible CO_2, qui de par sa consommation pendant le processus de photosynthèse génère une augmentation de pH, et la base faible CO_3^{2-}, qui de par sa consommation pendant le processus de calcification, génère une diminution du pH. La variation du pH dépendra donc de l'équilibre de ce double effet (c'est-à-dire du rapport PIC :POC).

Des changements importants du système du carbone inorganique dissous sont observés pour les expériences limitées en phosphate, HL-LP et LL-LP où le pH_T a augmenté de 0.14 et 0.19 unités de pH respectivement (Tableau III.3B) et la saturation en calcite de 0.99 et 2 respectivement. Le DIC et la pCO_2 ont eux tous deux diminué pour les mêmes expériences : le DIC de 12.1% et 13.2% pour l'expérience HL-LP et LL-LP respectivement et la pCO_2 de 38.1% et 48.3% pour l'expérience HL-LP et LL-LP. Ces expériences LP ont la consommation en DIC la plus importante parmi toutes les expériences et la diminution en pCO_2 la plus élevée (en dehors des expériences LpH qui ont aussi une diminution de pCO2 de 40.8% et 34.5% respectivement pour l'expérience HL-LpH et LL-LpH). Le changement en DIC le moins important est observé pour les expériences contrôles en HL et LL-LpH avec 2.1% et 3.4% de consommation respective.

Comme nous venons de le noter, la pCO_2 des expériences en LpH a diminué de façon plus importante que les autres expériences excepté les expériences LP : elle est passée de 637 et 696 µatm dans les milieux, respectivement en HL et LL, à 377 et 456 µatm à la fin de l'expérience. Le taux de saturation en calcite voit des pourcentages d'augmentation maximaux pour ces expériences LpH : 31 et 34% respectivement pour HL-LpH et LL-LpH. La diminution importante de la pCO_2 pourrait être expliquée par un éventuel équilibre de celle-ci avec la pression atmosphérique lors de l'ouverture de la bouteille pour l'échantillonnage et/ou avec le peu d'espace d'air laissé dans la bouteille. Cependant, si tel était le cas, cet équilibre serait vérifié pour les autres expériences où une diminution de la pCO_2 a été reportée jusqu'à une valeur minimale de 200 µatm. Nous préférons donc expliquer cette diminution en pCO_2 et augmentation en pH par un effet physiologique des cellules avec l'augmentation de la densité cellulaire dans le milieu au cours de l'expérience et donc de la demande en CO_2.

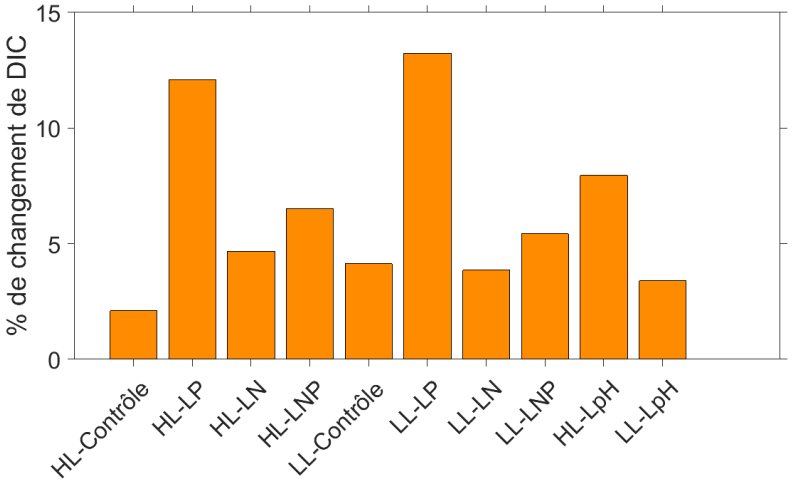


Figure III.6 : Changement en DIC exprimé en %, au cours des expériences en HL et LL.

Ces observations nous montrent aussi la complexité du système du carbone inorganique dissous où le DIC n'est pas relié linéairement aux variations de pCO_2 et inversement, de par la contribution des ions bicarbonates (HCO_3^-), des ions carbonates (CO_3^{2-}) et du dioxyde de carbone (CO_2) au DIC; et où le pH_T sera, quant à lui, directement lié à la pCO_2 (voir début du paragraphe et équations chimiques III-1 et III-2).

3. Morphologie des cellules

Le diamètre mesuré et le volume des coccosphères, cellules et la longueur des coccolithes ont permis d'authentifier un comportement morphologique des cellules vis-à-vis de leurs conditions de culture. Pour ce faire, un grand nombre de mesures a été fait pour obtenir des valeurs statistiquement valides. Cependant les écarts types sont souvent très élevés et empêchent parfois une différentiation claire pour isoler un comportement morphologique lié à la physiologie.

3.1 Taille des coccosphères

Comme décrit dans le chapitre II, la taille des coccosphères a été mesurée pour chaque expérience sur des images prises au MEB. Cependant certains filtres ont montré une absence de coccosphères ou un nombre insuffisant de coccosphères mesurables (voir Tableau III.4) :

- expérience contrôle en LL : coccosphères non conservées sur le filtre
- expérience LL-LpH : un seul réplicat correct mais seulement 70 coccosphères trouvées et mesurées.

La Figure III.7A représente la variation en volume des coccosphères par expérience et indique un volume plus important pour les expériences limitées en phosphate : 259.6 ± 84.4 µm^3 et 168.7 ± 54.9 µm^3 respectivement pour les expériences HL-LP et LL-LP. De plus, nous pouvons observer un volume minimal pour l'expérience LL-LN à 85.4 ± 24.9 µm^3. Les autres expériences ont des volumes assez similaires et l'écart type important sur les valeurs ne permet pas de les différencier. Les diamètres mesurés sont restitués dans le Tableau III.4 et sont situés entre 6.37 ± 0.61 µm pour l'expérience HL-LP et 5.42 ± 0.50 µm pour l'expérience LL-LN.

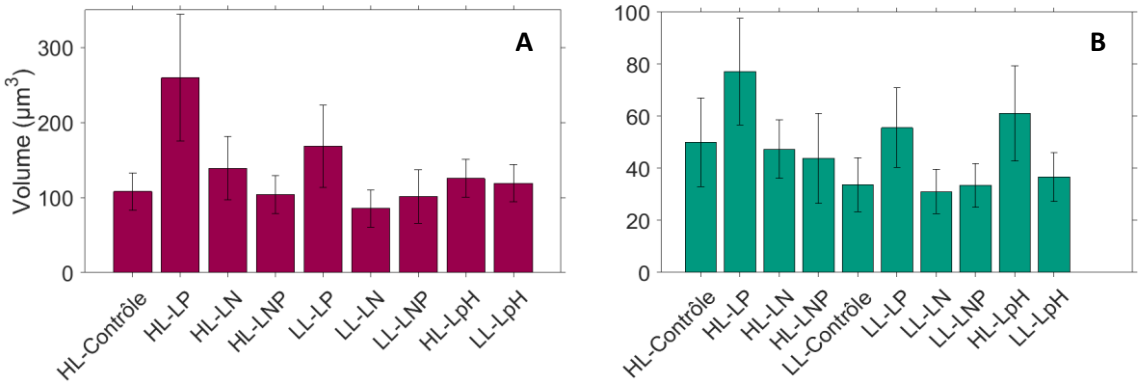


Figure III.7 : Volume des coccosphères (A) et volume des cellules (B). Volumes en µm^3 moyennés sur les trois réplicats où 100 mesures ont été faites par réplicats donc n=300 ; sauf pour les cellules de l'expérience HL-LNP où que deux réplicats ont pu être utilisés donc n=200 et l'expérience LL-LpH où seulement un réplicat a été mesuré avec n=100. Il faut noter qu'il n'y a pas de mesures de coccosphères pour l'expérience contrôle en LL.

3.2 Taille des cellules

Les images prises au microscope optique ont permis de mesurer le diamètre des cellules internes (cellule sans les coccolithes ; voir Tableau III.4) et de calculer leur volume. Comme pour les coccosphères, certains échantillons n'ont pas permis de prendre des images et donc de faire des mesures :

- expérience HL-LNP : cellules dans un très mauvais état et non mesurables pour un des réplicats alors que pour les deux autres les cellules étaient normales et mesurables ; dans ce cas nous avons utilisé les deux réplicats pour faire la moyenne (n=200).
- expérience LL-LpH : un seul des réplicats a permis de mesurer les cellules mais celles-ci se trouvaient sans coccolithes ce qui facilitent la mesure mais est inquiétant d'un point de vue de la calcification des cellules (observations à recouper avec le PIC de l'expérience).

La Figure III.7B montre la variation en volume des cellules internes et malgré des écarts types importants, nous pouvons identifier des volumes maximaux pour les expériences HL-LP, LL-LP et

HL-LpH, respectivement 77.2 ± 20.4 µm^3, 55.6 ± 15.3 µm^3 et 61.1 ± 18.3 µm^3 ; et des volumes minimaux pour les expériences LL, LL-LN et LL-LNP, respectivement 33.7 ± 10.4 µm^3, 31.1 ± 8.5 µm^3 et 33.5 ± 8.3 µm^3. Pour ce qui est des diamètres mesurés, ils varient d'une valeur maximale de 5.24 ± 0.46 µm pour l'expérience HL-LP à une valeur minimale de 3.87 ± 0.34 µm pour l'expérience LL-LN.

3.3 Taille des coccolithes: DSL

La longueur distale des coccolithes (DSL) a été mesurée utilisant des images prises au MEB. Elle est la plus grande longueur des coccolithes comme montré dans le chapitre II. Comme pour les mesures de coccosphères, nous n'avons pas pu mesurer de coccolithes pour l'expérience contrôle en LL par manque de coccosphères et de coccolithes sur les filtres. Les mesures reportées dans le Tableau III.4 et représentées par la Figure III.8 montrent encore une fois un écart type important qui ne permet pas de différencier statistiquement les valeurs. Nous pouvons éventuellement déceler une tendance, précédemment observée pour les coccosphères et les cellules ; plus spécifiquement une valeur maximale pour l'expérience HL-LP à 3.27 ± 0.27 µm et une valeur minimale pour l'expérience LL-LN à 2.64 ± 0.21 µm.

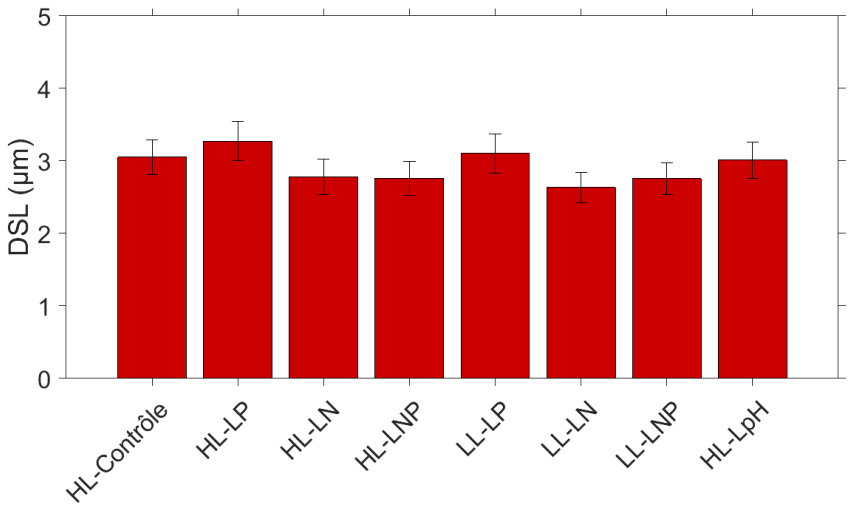


Figure III.8 : DSL en fonction de l'expérience. La longueur distale des coccolithes (DSL) moyennée sur les trois réplicats par expérience (n=900).

Tableau III.4 : Diamètre mesuré des coccosphères et des cellules et longueur des coccolithes (DSL). Avec n=70 coccosphères et n= 100 cellules pour l'expérience LL-LpH, n=200 pour l'expérience HL-LNP pour les cellules, n=300 pour les autres expériences pour les coccosphères et cellules et n=900 pour les coccolithes.

	Coccosphères		**Cellules**		**Coccolithes (DSL)**	
	µm	*std*	*µm*	*std*	*µm*	*std*
HL- Contrôle	5.88	*0.43*	4.51	*0.51*	3.05	*0.24*
HL-LP	7.83	*0.81*	5.24	*0.46*	3.27	*0.27*
HL-LN	6.37	*0.61*	4.46	*0.36*	2.78	*0.24*
HL-LNP	5.80	*0.46*	4.31	*0.55*	2.76	*0.24*
LL-Contrôle	/	/	3.97	*0.38*	/	/
LL-LP	6.79	*0.64*	4.70	*0.42*	3.10	*0.27*
LL-LN	5.42	*0.50*	3.87	*0.34*	2.64	*0.21*
LL-LNP	5.73	*0.58*	3.97	*0.33*	2.76	*0.22*
HL-LpH	6.19	*0.40*	4.84	*0.48*	3.01	*0.25*
LL-LpH	6.07	*0.41*	4.09	*0.35*	/	/

3.4 Corrélation entre les trois mesures

Il existe une corrélation significative entre le volume des cellules et des coccosphères mise en avant par la Figure III.9 ($R^2 = 0.77$, p-value < 0.03) ce qui est en accord avec différentes études qui montrent notamment une augmentation de la taille des coccosphères et des cellules avec une limitation en phosphate (Müller et al., 2008; Oviedo et al., 2014). Nous pouvons y associer aussi une légère augmentation de la longueur distale des coccolithes. Que ce soit pour le volume des coccosphères ou celui des cellules, ou la taille des coccolithes, malgré les erreurs importantes sur les mesures, nous pouvons noter une tendance à la diminution généralement observée pour les expériences limitées en nitrate et/ou limitées en nitrate et phosphate. Nous montrerons dans la partie suivante que les deux expériences HL-LNP et LL-LNP sont en réalité limitées par le nitrate et non par le phosphate dû à leur comportement morphologique et métabolique similaire à celui des expériences uniquement limitées en nitrate.

Nous notons aussi une relation statistiquement significative entre la longueur DSL des coccolithes et le volume des cellules: corrélation avec un coefficient $R^2 = 0.84$ et une p-value < 0.001 (Figure III.10A). Cependant, la relation entre la DSL et le volume des coccosphères n'est pas statistiquement significative : $R^2 = 0.65$, p-value < 0.08 (Figure III.10B). De similaires relations entre les coccolithes et les cellules ont été reportées par Gibbs et al.(2013) et Henderiks (2008) dans les fossiles et Aloisi (2015) en combinant un grand nombre d'expériences de cultures faites sur les coccolithophoridés.

Malgré les barres d'erreurs importantes, nous remarquons que les expériences limitées en phosphate (surtout HL-LP) se démarquent des autres expériences avec des tailles/volumes de coccosphères/cellules et de coccolithes plus grandes. A l'opposé, les deux figures (Figure III.9 et Figure III.10) nous montrent que l'expérience LL-LN engendre les plus petites cellules et/ou coccosphères et coccolithes.

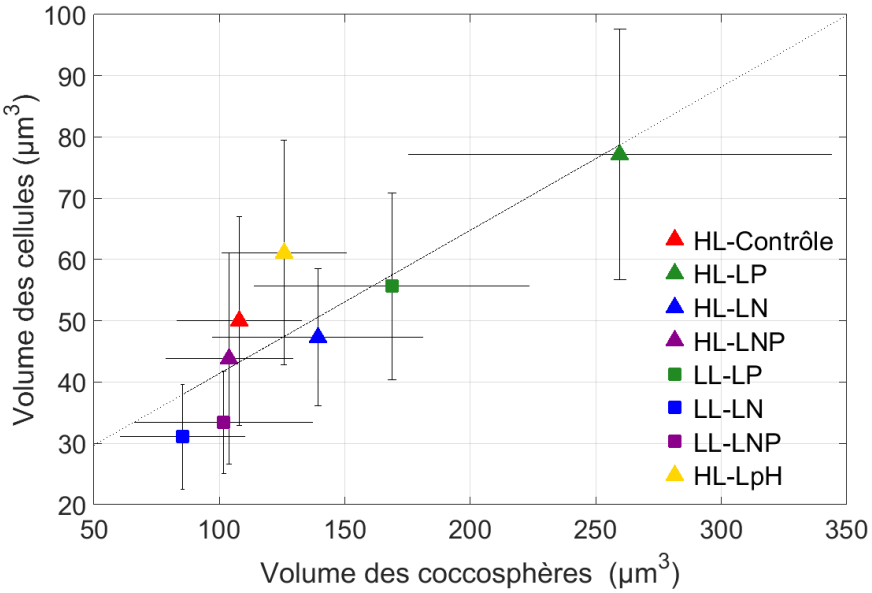


Figure III.9 : Volume des cellules contre le volume des coccosphères pour les différentes expériences.

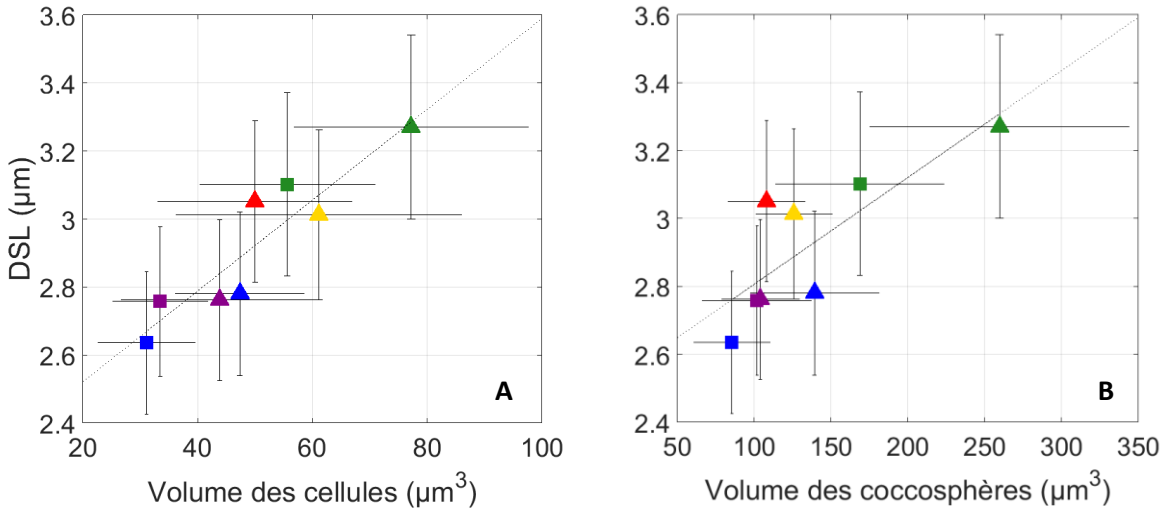


Figure III.10 : La longueur des coccolithes (DSL) en fonction du volume des cellules (A) et de celui des coccosphères (B). La légende est la même que pour la Figure III.9.

Müller et al. (2008) proposent une explication afin de mieux comprendre cette augmentation en taille en conditions de limitation en phosphate et cette diminution (quoique partiellement observée ici) en conditions de limitation en nitrate. Ils observent dans des expériences en batch que lorsque les cellules se trouvent dans la phase de synthèse de l'ADN (S) et de division cellulaire (G2+M), qui a lieu durant le cycle nuit, elles ont une forte demande en phosphate; et que lorsqu'elles se trouvent dans la phase d'assimilation et de grossissement de la cellule (phase de jour : G1), elles préféreront l'azote (et donc le nitrate) pour accumuler de la biomasse. Ainsi une limitation en phosphate conduit à une inhibition de la phase de division cellulaire et par conséquent à une augmentation de la taille des cellules, alors qu'une limitation en nitrate inhibe l'accumulation en biomasse de la cellule et conduit par conséquent à une diminution de la taille des cellules. Cette dernière conclusion n'est pas clairement observable dû aux barres d'erreurs trop importantes pour vraiment établir un comportement morphologique vis-à-vis d'une limitation en nitrate, cependant une tendance à la diminution a été remarquée en regardant les valeurs absolues.

4. Quotas et rapports de matière particulaire

4.1 Quotas de carbone inorganique particulaire : PIC

4.1.1 PIC_{LOCEAN}: Carbonate analysé par analyses des ions calcium

Le carbone inorganique particulaire (PIC) (analysé à l'UMR LOCEAN) a été déduit à partir de l'analyse de la concentration en ions calcium. Les résultats se trouvent dans le Tableau III.5 et sont représentés dans la Figure III.12A. Le PIC est visiblement le plus élevé pour l'expérience HL-LP à 14.16 ± 3.19 pg.cell^{-1} et le plus faible pour l'expérience contrôle HL à 3.46 ± 0.36 et l'expérience LpH en LL à 0.66 ± 0.06 pg.cell^{-1}. De plus, de manière générale, nous pouvons souligner que le PIC est plus faible en conditions LL qu'en HL pour toutes les expériences. La valeur du PIC très faible pour les expériences LL-LpH et contrôle en LL sont en accord avec l'absence de coccolithes sur les images prises en microscopie et donc l'impossibilité de mesurer les coccosphères et les DSL des coccolithes. La question que nous pouvons nous poser est : ces résultats sont-ils témoins du simple effet inhibiteur de la lumière sur la calcification?

4.1.2 $PIC_{Roscoff}$: différence entre le total et l'organique

Le PIC (analysé à la station biologique de Roscoff) a été calculé comme la différence entre le carbone total particulaire et le carbone organique particulaire décrit dans la partie 4.2. Ces résultats sont reportés dans le Tableau III.5: valeur maximale pour l'expérience HL-LP à 20.32 ±

1.49 pg.cell^{-1} et valeurs minimales pour l'expérience contrôle en HL à 5.07 ± 0.35 pg.cell^{-1} et pour l'expérience LL-LpH à 0.92 ± 0.25 pg.cell^{-1}.

4.1.3 Comparaison entre les 2 méthodes d'analyse de PIC

Les deux méthodes d'analyses de PIC ont permis de comparer ces deux méthodes qui sont toutes les deux utilisées dans les études en laboratoire réalisées sur les coccolithophoridés. La méthode d'analyse du calcium a été utilisée par Daniels et al. (2012) et Rouco et al. (2013) par exemple et la méthode de détermination du PIC par différence du total et de l'organique a été utilisée par exemple par Benner et al. (2013) et Borchard et al. (2011).

Le Tableau III.5 et Figure III.11 nous montrent la similarité dans les résultats des deux méthodes et la corrélation entre les résultats (R^2= 0.98 et p-value < 10^{-5}). Nous retrouvons les mêmes variations pour les deux PIC analysés c'est-à-dire un PIC maximal pour l'expérience HL-LP et un PIC minimal pour les expériences non limitées en nutriments en LL (contrôle en LL et LL-LpH). De plus, cette figure nous montre que quelle que soit les conditions de nutriments et la méthode d'analyse utilisée, le PIC diminue avec la lumière.

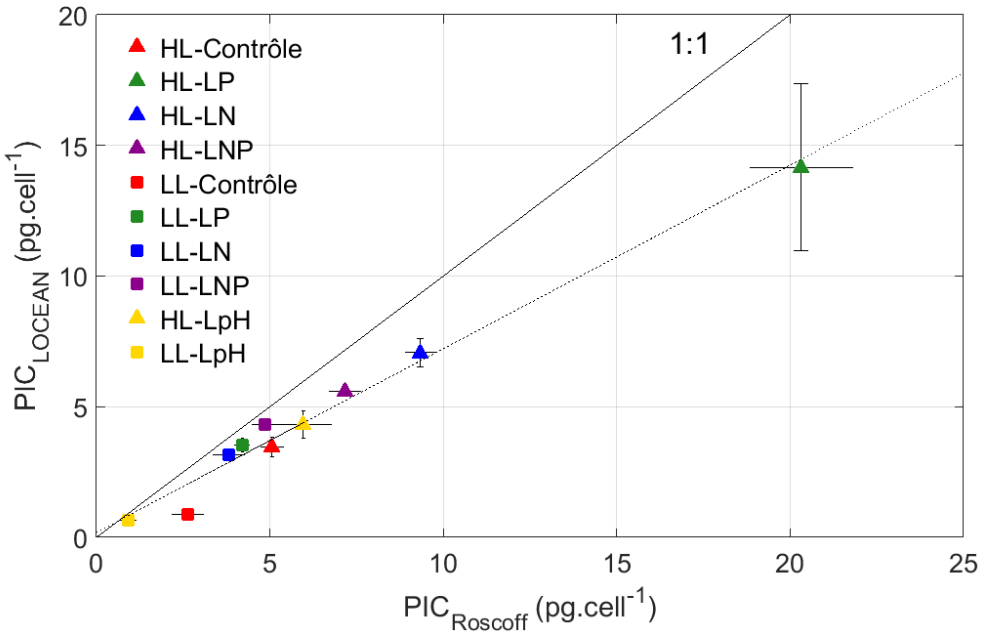


Figure III.11 : Résultats et comparaison des deux méthodes d'analyses du PIC. Le PIC mesuré au LOCEAN par analyse des ions calcium en fonction du PIC mesuré à Roscoff par différence du total et de l'organique. La ligne pleine est la droite 1 :1 et la droite en pointillés est la droite de régression de pente 0,7.

Cependant, en comparant les deux méthodes, nous pouvons noter des valeurs plus élevées pour l'ensemble des analyses de la méthode de PIC faite à Roscoff. Ceci est mis en avant par la droite 1:1 supérieure à la droite de régression de pente 0.7 pour une représentation du PIC_{LOCEAN} en fonction du $PIC_{Roscoff}$ (Figure III.11). Cette différence peut s'expliquer par la méthode utilisée : quasiment directe pour le PIC_{LOCEAN} analysé par ICP-MS alors qu'elle est indirecte pour le $PIC_{Roscoff}$ mesuré par soustraction du total et de l'organique. La méthode indirecte insère donc une incertitude supplémentaire sur l'analyse, qui par contre n'est pas ajoutée sur l'analyse par méthode directe.

La méthode d'analyse du PIC faite au LOCEAN a donc été retenue pour interpréter et utiliser les résultats des analyses du PIC de par une qualité analytique sûrement en faveur de la méthode par ICP-MS par rapport à celle par différence faite à Roscoff. Ainsi, si l'on considère les valeurs du PIC_{LOCEAN} étant de meilleure qualité et donc de meilleure précision, ceci signifie que les valeurs du $PIC_{Roscoff}$ sont surestimées, soit dû à une surestimation de la valeur du carbone total particulaire TPC, soit dû à une sous-estimation de la valeur du carbone organique particulaire POC ou soit dû aux deux. Par la suite, ces résultats seront nommés sous le simple acronyme « PIC ».

4.2 Quotas de carbone organique particulaire : POC

Comme pour le PIC, les résultats du POC sont présentés dans le Tableau III.5 et représentés par la Figure III.12B. De même, nous pouvons noter des valeurs maximales en HL et LL pour l'expérience LP : respectivement 27.49 ± 1.53 $pg.cell^{-1}$ et 16.25 ± 0.56 $pg.cell^{-1}$; et des valeurs minimales pour l'expérience contrôle en HL et LL-LpH : respectivement 10.80 ± 1.38 $pg.cell^{-1}$ et 9.13 ± 0.72 $pg.cell^{-1}$. Lorsque nous passons de la forte lumière HL à la faible lumière LL, le POC diminue excepté pour l'expérience LNP où le POC augmente et pour l'expérience contrôle où le POC reste constant. Encore une fois les expériences limitées en phosphate se démarquent par leurs POC élevés par rapport aux autres expériences.

4.3 Quotas d'azote organique particulaire : PON

Concernant le PON, les résultats les plus élevés sont ceux des expériences HL-LP et LL-LP, avec des valeurs de 2.66 ± 0.10 $pg.cell^{-1}$ et 2.08 ± 0.08 $pg.cell^{-1}$ respectivement (Tableau III.5 et Figure III.12C). Le PON se trouve être le plus faible pour les expériences LN et LNP que ce soit en HL ou en LL avec des valeurs entre 0.40 ± 0.04 $pg.cell^{-1}$ et 0.92 ± 0.11 $pg.cell^{-1}$. Ceci montre bien la limitation en nitrate dans les cellules qui ont été cultivées dans ces conditions et indique que les cellules cultivées en conditions non limitées en nitrate mais limitées en phosphate produisent un PON plus élevé que les autres expériences. De plus, le PON augmente avec une

diminution de lumière dans 3 expériences : contrôle, LN et LNP ; diminue dans l'expérience LP et reste constante dans l'expérience LpH.

4.4 Quotas de phosphore organique particulaire : POP

Pour finir avec la description des résultats des quotas cellulaires, le POP a été analysé comme la différence entre le phosphore particulaire total et le phosphore inorganique particulaire. Le POP se situe entre des valeurs minimales pour les expériences LL-LP à 0.06 ± 0.002 pg.cell^{-1} et HL-LNP 0.06 ± 0.001 pg.cell^{-1} et des valeurs maximales pour les expériences contrôles en HL et LL respectivement 0.16 ± 0.026 pg.cell^{-1} et 0.18 ± 0.003 pg.cell^{-1} (Tableau III.5 et Figure III.12D). Si l'on compare le POP entre les conditions HL et LL, nous observons une diminution du POP pour l'expérience LP, une augmentation pour les expériences LN et LNP, et des valeurs constantes pour les expériences contrôles et LpH.

Pour ce qui est des quotas de PON et POP, ces résultats sont à manier avec précaution car ils transparaissent de l'assimilation en nutriment (N ou P) et du changement en taille de la cellule. Pour s'affranchir de l'effet de ce changement de taille vis-à-vis de ces quotas cellulaires, il est nécessaire d'étudier le rapport en fonction du POC c'est à dire les rapports POC:PON et POC:POP décrits dans la partie suivante.

Tableau III.5 : Quotas cellulaires de matière particulaire et erreurs sur les mesures (n=6).

	PIC_{LOCEAN}		**$PIC_{Roscoff}$**		**POC**		**PON**		**POP**	
	pg.cell^{-1}	*std*	*pg.cell^{-1}*	*std*	*pg.cell^{-1}*	*std*	*pg.cell^{-1}*	*std*	*pg.cell^{-1}*	*std*
HL-Contrôle	3.46	*0.36*	5.07	*0.35*	10.80	*1.38*	1.45	*0.21*	0.16	*0.026*
HL-LP	14.16	*3.19*	20.32	*1.49*	27.49	*1.53*	2.66	*0.10*	0.11	*0.008*
HL-LN	7.06	*0.55*	9.33	*0.43*	15.77	*0.95*	0.40	*0.04*	0.07	*0.003*
HL-LNP	5.57	*0.06*	7.16	*0.46*	12.26	*0.14*	0.44	*0.04*	0.06	*0.001*
LL-Contrôle	0.89	*0.10*	2.64	*0.47*	10.98	*0.41*	1.98	*0.07*	0.18	*0.003*
LL-LP	3.53	*0.25*	4.20	*0.23*	16.25	*0.56*	2.08	*0.08*	0.06	*0.002*
LL-LN	3.15	*0.13*	3.82	*0.46*	9.67	*0.21*	0.79	*0.02*	0.11	*0.004*
LL-LNP	4.30	*0.22*	4.87	*0.40*	14.88	*0.66*	0.95	*0.11*	0.12	*0.011*
HL-LpH	4.31	*0.51*	5.96	*0.82*	11.56	*1.40*	1.48	*0.16*	0.12	*0.019*
LL-LpH	0.66	*0.06*	0.92	*0.25*	9.13	*0.72*	1.35	*0.12*	0.11	*0.008*

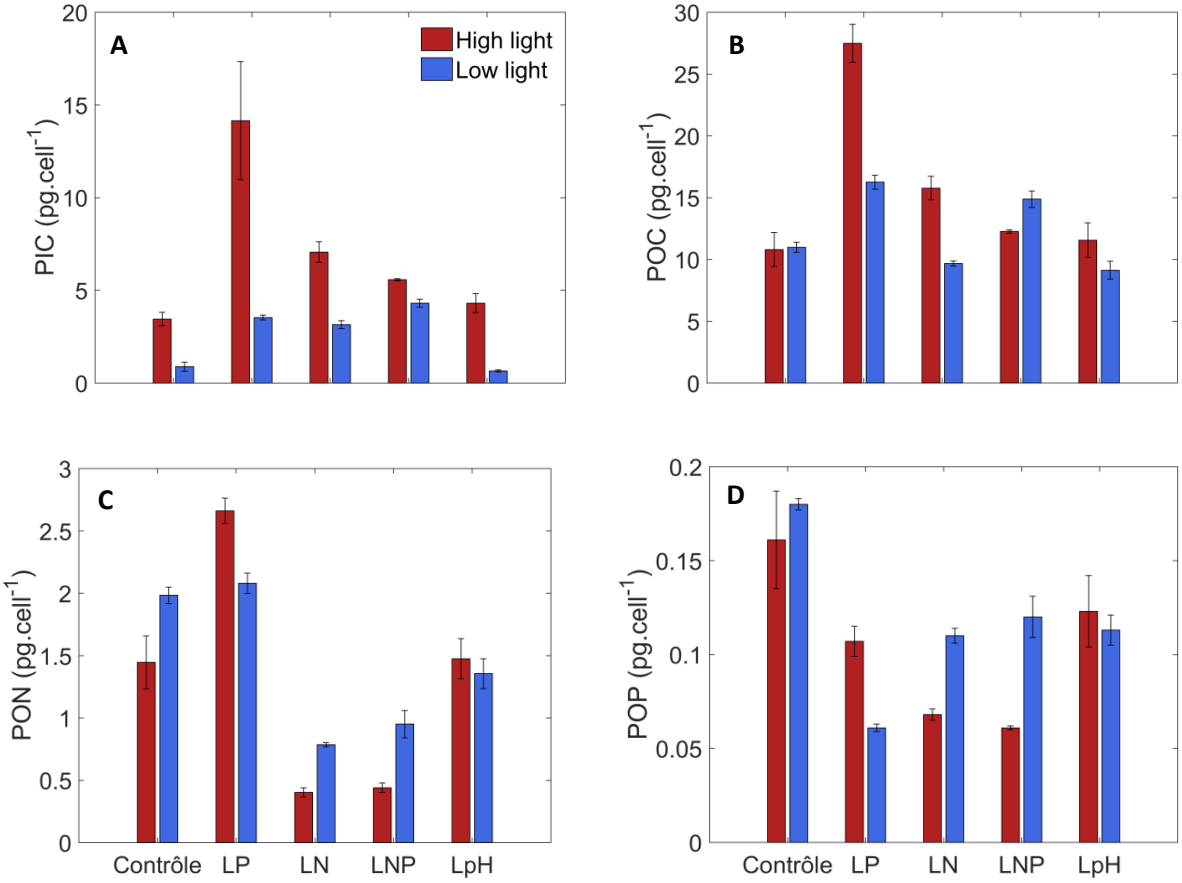


Figure III.12 : Quotas cellulaires de matière particulaire: PIC (A), POC (B), PON (C) et POP (D).

4.5 Rapports de matière particulaire

Dans la partie 1.2 de ce chapitre, il a été expliqué qu'il était impossible de calculer un taux de croissance et donc une production de calcification ou photosynthèse pour des expériences limitées en nutriments et faites en batch. Pour contourner ce problème, nous pouvons définir le rapport PIC:POC qui nous permet de s'affranchir du taux de croissance dans tous les cas, et d'étudier le rapport calcification et photosynthèse en conditions limitées en nutriment. De plus, les rapports du quota cellulaire de l'élément limitant sur le POC nous permettent de s'affranchir de la dépendance de ces quotas au changement en taille des cellules entre les expériences. Ces rapports sont largement utilisés par de nombreux scientifiques pour définir l'assimilation et la formation de matière particulaire dans une cellule de coccolithophoridés: Engel et al. (2014); Krug et al. (2011) et par exemple Oviedo et al. (2014).

Le rapport PIC:POC, représenté dans la Figure III.13A et reporté dans le Tableau III.6, montre des valeurs plus élevées pour les expériences en conditions HL que LL, peu importe les concentrations en nutriments. De plus, nous observons un PIC:POC plus élevé en HL pour

l'expérience LP, qui atteint une valeur de 0.515 ± 0.120 et en LL pour l'expérience LN, avec une valeur de 0.326 ± 0.015 ; et un PIC :POC plus faible pour les expériences contrôles et LpH pour les deux conditions de lumière, respectivement 0.320 ± 0.053 et 0.373 ± 0.063 en HL et 0.081 ± 0.010 et 0.072 ± 0.008 en LL.

Tableau III.6 : Rapports des quotas de matière particulaire.

	PIC:POC		**POC:PON**		**POC:POP**		**PON:POP**	
		std		*std*		*std*		*std*
HL-Contrôle	0.320	*0.053*	8.72	*1.45*	173.5	*13.95*	19.90	*1.98*
HL-LP	0.515	*0.120*	12.05	*0.70*	661.4	*24.35*	54.88	*2.13*
HL-LN	0.448	*0.044*	45.59	*4.12*	599.7	*16.69*	13.15	*0.57*
HL-LNP	0.455	*0.007*	32.60	*2.48*	523.0	*4.86*	16.04	*0.66*
LL-Contrôle	0.081	*0.010*	6.46	*0.28*	157.7	*2.51*	24.41	*0.41*
LL-LP	0.217	*0.017*	9.11	*0.41*	692.5	*13.42*	75.99	*1.84*
LL-LN	0.326	*0.015*	14.35	*0.37*	226.1	*3.38*	15.75	*0.27*
LL-LNP	0.289	*0.019*	18.27	*1.94*	319.8	*12.51*	17.51	*1.16*
HL-LpH	0.373	*0.063*	9.14	*1.28*	242.0	*18.35*	26.47	*2.25*
LL-LpH	0.072	*0.008*	7.86	*0.80*	208.8	*8.47*	26.56	*1.34*

En ce qui concerne les rapports POC:PON et POC:POP (Figure III.13B et C et Tableau III.6,), les expériences contrôles en nutriments ont les rapports les plus faibles (entre 6.46 ± 0.28 et 9.14 ± 1.28 pour le POC:PON et entre 157.7 ± 2.51 et 242.0 ± 18.35 pour le POC:POP) alors que les expériences LN et LNP ont le rapport POC:PON le plus élevé et l'expérience LP a le rapport POC:POP le plus élevé aux deux conditions de lumières.

Pour finir, le rapport PON:POP (Figure III.13D et Tableau III.6,) est maximal pour l'expérience LP (54.88 ± 2.13 en HL et 75.99 ± 1.84 en LL) et minimal pour les expériences LN et LNP : respectivement 13.15 ± 0.57 et 16.04 ± 0.66, et 15.75 ± 0.27 et 17.51 ± 1.16.

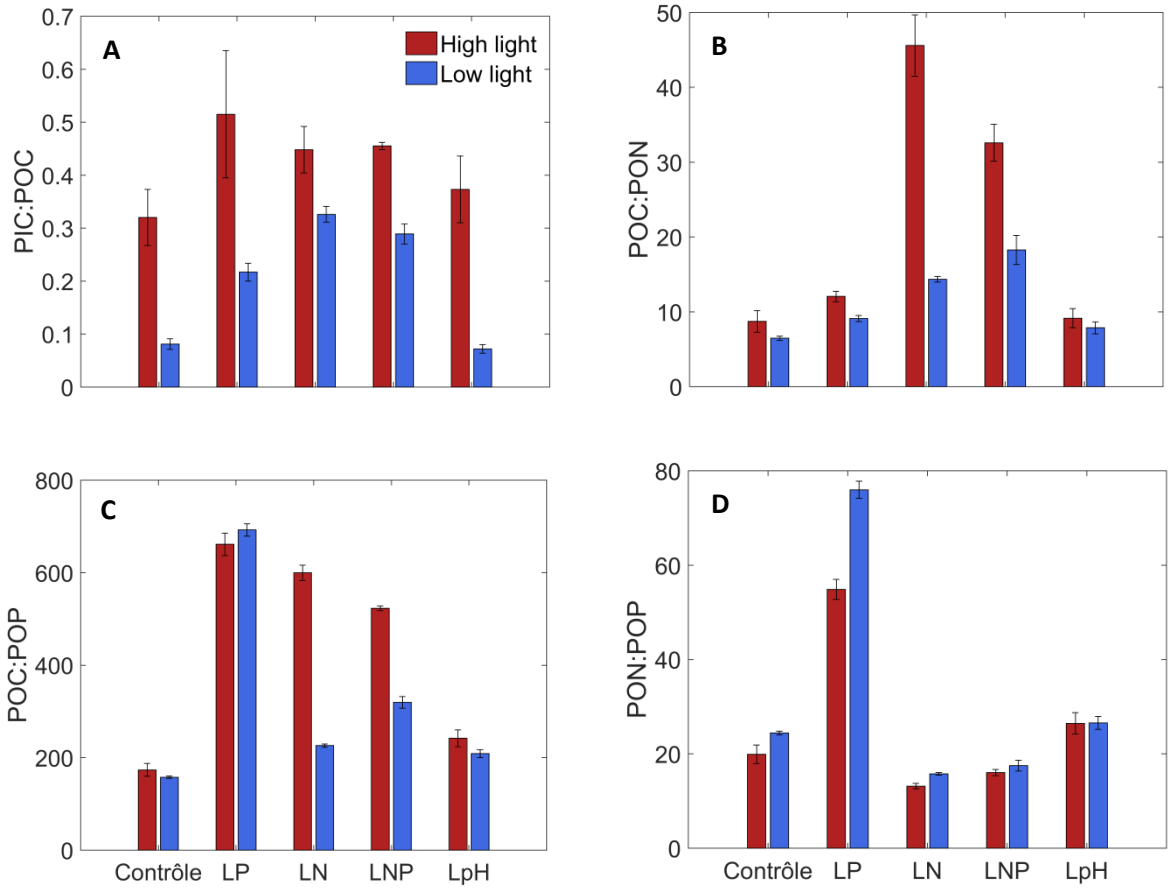


Figure III.13 : Rapports des quotas cellulaires : PIC:POC (A), POC:PON (B), POC:POP (C) et PON:POP (D).

4.6 Production de calcification et de photosynthèse pour les expériences contrôles

Les productions de PIC et de POC peuvent cependant être calculées pour les expériences non limitées en nutriments en multipliant les quotas de PIC et POC par le taux de croissance respectif des expériences (voir partie 1.2.2) comme ce qui suit :

Production de POC: $POC_{prod} = \mu * POC$ (III-3)

Production de PIC: $PIC_{prod} = \mu * PIC$ (III-4)

Les résultats reflètent la dépendance des deux processus de calcification et de photosynthèse à la lumière. Nous notons une forte diminution de la production de PIC avec une diminution de la lumière, de 3.14 ± 0.36 $pg.cell^{-1}.d^{-1}$ en HL et 4.14 ± 0.51 $pg.cell^{-1}.d^{-1}$ en HL-LpH à 0.25 ± 0.10 $pg.cell^{-1}.d^{-1}$ en LL et 0.15 ± 0.06 $pg.cell^{-1}.d^{-1}$ en LL-LpH. Une diminution aussi prononcée pour la production de POC est observée avec des valeurs de 9.81 ± 1.38 $pg.cell^{-1}.d^{-1}$ pour l'expérience

contrôle en HL et 11.11 ± 1.40 pg.cell^{-1}.d^{-1} en HL-LpH ; et des valeurs de 3.08 ± 0.41 pg.cell^{-1}.d^{-1} pour l'expérience contrôle en LL et 2.10 ± 0.72 pg.cell^{-1}.d^{-1} en LL-LpH (Tableau III.7).

Tableau III.7 : Production de PIC (calcification) et de POC (photosynthèse) pour les expériences contrôles.

	PIC production		POC production	
	pg.cell^{-1}.d^{-1}	*std*	*pg.cell^{-1}.d^{-1}*	*std*
HL-Contrôle	3.14	*0.36*	9.81	*1.38*
LL-Contrôle	0.25	*0.10*	3.08	*0.41*
HL-LpH	4.14	*0.51*	11.11	*1.40*
LL-LpH	0.15	*0.06*	2.10	*0.72*

5. Interprétation des résultats par type d'expérience

5.1 Expériences P-lim

Les expériences faites en limitation en phosphate sont clairement les expériences avec les variations les plus importantes que ce soit dans la biochimie du milieu de culture, des quotas cellulaires ou encore dans la morphologie des cellules (parties 2.2 ; 3 et 4.5). Pour commencer, si nous regardons les variations communes entre les expériences LP en HL et en LL nous pouvons tout d'abord noter que le pourcentage de consommation du phosphate atteint quasiment 100 % ce qui est cohérent avec une limitation en phosphate des cellules.

Comme reporté par Langer et al. (2013), le plus grand changement du DIC au cours de l'expérience est généré par une limitation en phosphate ce que nous observons aussi dans les expériences décrites dans ce chapitre. Nous pourrions expliquer ce changement par une augmentation de la densité cellulaire au cours de l'expérience, cependant la même densité cellulaire atteinte pour les autres expériences ne montre pas un changement aussi prononcé du DIC. Nous pouvons donc relier cette diminution du DIC (12-13 % du DIC initial) à un volume plus important des cellules et au quota cellulaire de POC plus élevé pour les expériences LP comparées avec les expériences contrôles en HL et LL. Ce POC par cellule plus élevé est témoin d'une augmentation du processus de photosynthèse qui conduit à une consommation du CO_2 dans le milieu et donc à une augmentation du pH extracellulaire. Il en résulte donc une diminution du DIC générée, quant à elle, par l'équilibre entre une consommation du CO_2 par le processus de photosynthèse, une consommation des ions bicarbonates par le processus de

calcification et une production de CO_2 par ce même processus. Ces deux processus sont mis en avant par le POC, plus élevé ; et le PIC, plus élevé en HL et constant en LL, dans les expériences.

Malgré la corrélation mise en avant par Mullin et al. (1966) et Aloisi (2015) entre une augmentation du POC et une augmentation en taille des cellules internes, la Figure III.14 nous montre qu'il n'existe pas, pour les expériences présentées dans ce manuscrit, de relation statistiquement significative entre le quota cellulaire POC et le volume des cellules internes (R^2 = 0.54, p-value < 0.13). Cette relation non observée ici est due à une trop grande dispersion des données et au nombre restreint de données disponibles.

Nous avons pu voir qu'une limitation en phosphate entraîne une augmentation de la taille des cellules et du POC, et de la taille des coccosphères pour les deux conditions de lumière. Cependant, alors qu'une augmentation du PIC a été observée pour l'expérience LP en HL, le PIC reste plutôt constant pour l'expérience LP en LL. Oviedo et al. (2014) ont fait des observations similaires avec une irradiance « non limitante »: augmentation du PIC et du POC, et augmentation du diamètre des coccosphères avec une limitation en phosphate par rapport à des conditions riches en nutriments. Ceci peut être expliqué par la théorie de Müller et al. (2008) qui dit que les cellules exposées à une limitation de phosphate seront exposées à une inhibition de leur phase de division cellulaire, par conséquent ceci entraine une augmentation de la taille des cellules, du POC et PIC par cellules. Les coccolithes n'ayant pas changé en taille, une augmentation de la taille des coccosphères et du PIC traduit d'une augmentation du nombre de coccolithes par cellules.

Comme attendu par la limitation en phosphate, le rapport POC:POP est bien plus grand pour les expériences LP que pour les expériences contrôles (dans les deux conditions de lumières) et le rapport PON:POP est plus grand de par la diminution du POP par cellule due à la limitation en phosphate. Le rapport qui varie différemment de la littérature avec une limitation en phosphate est le rapport PIC:POC : celui-ci diminue pour les expériences présentées dans ce manuscrit alors qu'il augmente pour les expériences faites par Langer et al. (2013) et Oviedo et al. (2014). Ceci est dû à la plus grande augmentation du POC par rapport au PIC observé dans leurs cultures et peut être expliqué par l'intensité lumineuse que tous deux utilisent pour leurs expériences, soit 400 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. En effet, nous verrons dans la partie 5.5 que le rapport PIC:POC est plus important pour une intensité lumineuse de l'ordre de 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} que 400 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} au-delà de la lumière de saturation du rapport PIC:POC. Ceci nous indique que l'effet positif de la lumière sur la photosynthèse est fortement inhibé par une intensité lumineuse moins forte et que les variations du rapport PIC:POC en

conditions de limitation en phosphate sont en partie explicable par l'intensité lumineuse de l'expérience. D'autres études seraient nécessaires pour appuyer ce point et mieux comprendre l'effet d'une limitation en phosphate sur ce rapport calcification: photosynthèse.

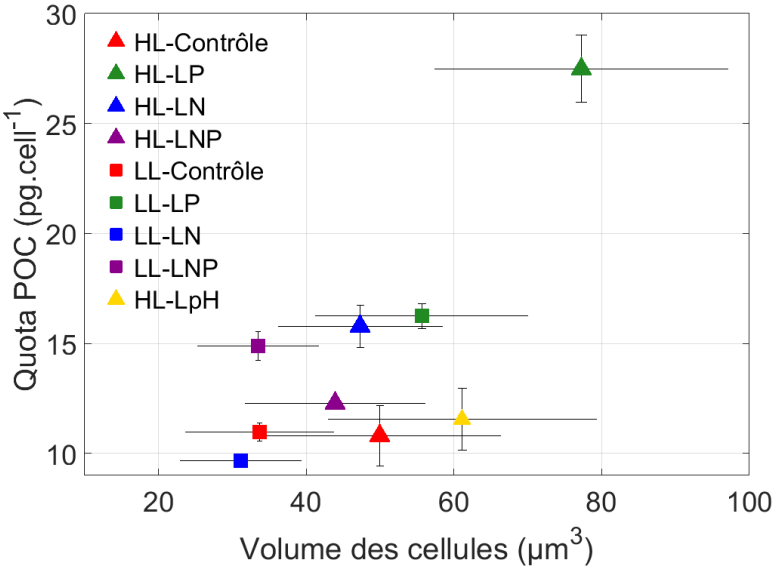


Figure III.14 : Quota cellulaire en POC en fonction du volume des cellules internes.

Expériences LL-LP

L'expérience LL-LP a montré une absence de phase stationnaire alors que tous les autres paramètres se comportent comme si cette expérience avait bien atteint la limitation en phosphate : diminution du taux de croissance instantané, consommation en PO_4, DIC, POC, rapports POC:POP et PON:POP. Le quota cellulaire de PIC se comporte un peu différemment c'est-à-dire qu'il est quasiment égal au quota des expériences LN et LNP en LL mais cependant bien plus élevé que celui de l'expérience LL. Cette petite différence est expliquée par un double effet : celui de la faible lumière qui fait diminuer drastiquement le quota PIC et celui de la limitation en phosphate qui engendre une augmentation du PIC. Cette augmentation du PIC est suivie par une tendance à l'augmentation de la taille des coccosphères caractéristique d'une limitation en phosphate (Müller et al., 2008; Oviedo et al., 2014). La faible valeur du POP par cellule pourrait indiquer que les cellules en LL-LP requierent moins de phosphore par cellule, cependant le rapport POC :POP nous montre que le besoin en phosphore correspond à celui des cellules en HL-LP.

Pour expliquer cette absence de phase stationnaire en contradiction malgré tous les signes d'une limitation en phosphate réussie, plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- ***Cette même expérience LP en HL atteint la phase stationnaire car sa concentration initiale en PO_4 est plus élevée ou car sa densité est plus élevée.***

Tout d'abord, la concentration initiale en PO_4 est plus faible pour l'expérience LL-LP que pour l'expérience HL-LP. De plus, la densité cellulaire à la fin des expériences est plus élevée pour l'expérience LL-LP que pour l'expérience HL-LP. Ces observations montrent que les conditions initiales ou la densité cellulaire n'explique pas le fait que cette expérience LL-LP n'est pas atteinte la phase stationnaire. Cette hypothèse est donc rejetée.

- ***Les cellules utilisent une source organique de phosphore et n'atteignent pas la phase stationnaire puisqu'elles ont suffisamment de phosphore inorganique et organique pour subvenir à leurs besoins.***

Aucune autre source de phosphore que ce soit organique ou inorganique n'a été rajoutée au milieu de culture donc la seule source de phosphore organique possible est celui présent dans l'eau de mer initiale. Si une source de phosphore organique est présente dans l'eau de mer initiale, les cellules de l'expérience HL-LP auraient aussi pu utiliser ce phosphore supplémentaire et n'auraient pas non plus de phase stationnaire sauf dans le cas où elles auraient consommé totalement le phosphore inorganique et le phosphore organique. Cette hypothèse semble donc être une raison peu probable.

- ***La phase stationnaire aurait été visible si l'expérience avait été continuée quelques jours de plus (au moins 1 ou 2 jours).***

Cette hypothèse n'est pas vérifiable car l'expérience a été arrêtée. Une solution serait de reproduire exactement les mêmes expériences et de les continuer plus longtemps ou encore de faire un milieu de culture artificiel sans aucun composé présent initialement.

Cette expérience arrivait donc peut être au tout début de sa limitation en phosphate mais ceci n'est pas encore visible sur sa courbe de croissance. La seule expérience du même type et qui auraient pu appuyer cette hypothèse est celle de Leonardos and Geider (2005). Malheureusement alors qu'ils ont fait des expériences en baissant la lumière et en testant la limitation en phosphate, ils ont utilisé une souche non calcifiante ce qui ne permet pas d'avoir des valeurs de PIC bien évidemment. Ce manque de littérature pour comparer ces observations nous pousse à constater qu'il reste encore de nombreuses expériences à mettre en place afin de mieux comprendre ces phénomènes de « co-limitation ».

5.2 Expériences N-lim

Les expériences LN se comportent différemment des expériences limitées en phosphate. Cependant que ce soit en HL ou LL, les variations de l'expérience LN par rapport à l'expérience contrôle respective sont très similaires. Les quelques différences sont apportées par la limitation en nitrate : consommation quasi-totale des nitrates et taille des coccosphères (seulement pour HL-LN) et des cellules qui ont tendance à diminuer. Cette dernière observation est en accord avec les conclusions de Müller et al. (2008) qui disent qu'une limitation en nitrate entraine une inhibition de synthèse de biomasse de la cellule qui continue malgré tout à se diviser. Cependant les barres d'erreur étant importantes, il faut manier ces résultats et ces conclusions avec précautions. A l'encontre des résultats de Müller et al. (2012) mais en cohérence avec ceux de Langer et al. (2013), le PIC et le POC augmente pour ces expériences limitées en nitrate. Le rapport PIC:POC augmente aussi ce qui indique que la calcification est plus favorisée par une limitation en nitrate que la photosynthèse, en tout cas, dans ces expériences car Langer et al. (2013) observent l'effet inverse. Cette réponse est donc sûrement spécifique à la souche utilisée d'*E. huxleyi*. Le rapport PON :POP diminue dû à la limitation en nitrate et pour la même raison le rapport POC :PON augmente. Le rapport POC :POP, quant à lui, augmente en HL-LN et en LL-LN ce qui montre que l'écart entre le POP et le POC est plus important en conditions limitées en nitrate comparés aux expériences contrôles. Langer et al. (2013) observent une variation similaire pour ce rapport qui augmente dans son expérience LN par rapport à son expérience contrôle.

5.3 Expériences N-P lim

En étudiant de près les expériences limitées en nitrate et phosphate simultanément, nous notons que les deux nutriments ont été consommées quasiment à 100% ce qui pourrait amener à penser à une co-limitation du nitrate et du phosphate. Cependant, le changement en DIC, entre 4.5 et 6.5 % est plus proche du changement en DIC des expériences LN que LP. De plus, les tailles en coccosphères, cellules ou DSL (même si aucune différence importante n'est observée entre les valeurs) varient exactement comme les expériences LN. Des observations similaires sont faites pour les quotas en PIC et POC plus proches en valeurs des expériences LN que des expériences LP, de même pour les rapports PIC:POC, POC:PON, POC:POP et PON:POP. Toutes ces observations nous montrent finalement que la réponse de ces expériences limitées simultanément par une faible concentration en nitrate et phosphate est celle d'une limitation en nitrate et non pas d'une limitation en phosphate malgré la consommation totale des deux nutriments à la fin de l'expérience.

5.4 Expériences LpH

Ces expériences LpH étaient des tests d'une diminution du pH_T et augmentation de la pCO_2. Cependant ces expériences ont montré une grande similarité avec les résultats des expériences contrôles pour: le taux de croissance, la consommation en NO_3 et PO_4, la taille des coccosphères et cellules, le PIC, le POC et par conséquent les rapports PIC:POC, et pour finir PON:POP (parties 1 ; 2 ; 3 et 4). Les petites divergences se trouvent au niveau du POC:PON un peu plus élevé en LL-LpH qu'en conditions contrôles en LL et le POC:POP plus élevé pour les expériences LpH qu'en conditions contrôles en HL et en LL. En conclusion, ces deux expériences LpH n'ont pas permis d'observer un effet de cette augmentation en pCO_2 sur les cultures que ce soit au niveau de la morphologie des cellules ou des taux métaboliques. De même que pour les expériences LN ou LNP, nous pouvons conclure à un comportement spécifique à la souche utilisée, en effet plusieurs études ont montré qu'une augmentation en pCO_2 de cette ordre générait une réponse différente selon les souches cultivées au sein d'une même espèce (Hoppe et al., 2011; Langer et al., 2009). La Figure III.15 confirme cette observation. Elle nous indique que pour différentes souches d'*E. huxleyi* la réponse du taux de calcification des cultures à une augmentation de pCO_2, du même ordre que pour les expériences présentées dans ce manuscrit, est variable selon la souche cultivée : diminution comme pour RCC1256 ou PLY M219 ou augmentation comme pour CMP371 et CAWP06 par exemple. De plus, la méthode utilisée pour atteindre une augmentation de la pCO_2 que ce soit par ajustement du pH ou par bullage de CO_2 peut donner des résultats contradictoires comme reportés dans Shi et al. (2009).

La réponse pour RCC911 étant insignifiante vis-à-vis des conditions de CO_2, soit celle-ci est reliée à la souche utilisée (RCC911) qui n'est pas affectée par ce changement de conditions de cultures, soit le changement en CO_2 est trop faible pour observer une réponse avec *E. huxleyi*. En effet, Zondervan (2007) reporte que la calcification de *E. huxleyi* n'est pas sensible à une augmentation en CO_2 à de faibles intensités lumineuses comprises entre 15 et 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, mais que malgré tout, ça entraine une augmentation du POC. Nous n'observons pas cette dernière variation ici et la forte lumière utilisée pour ces cultures est plus élevée donc nous pouvons conclure que cette « non-réponse » au changement de pCO_2 dans le milieu est dépendant de la souche utilisée. Cette observation rejoint celle de Langer et al. (2009) qui a étudié quatres souches d'*E. huxleyi* et qui a trouvé une réponse à un changement en CO_2 dépendante de la souche. D'autres expériences avec d'autres souches, dans les mêmes conditions que les expériences présentées ici, auraient permis de confirmer ces conclusions plus précisément et une meilleure gestion des échantillons de DIC auraient permis d'avantage de mesures afin de vérifier l'hypothèse d'un équilibre du milieu avec la pression atmosphérique avant le commencement des expériences.

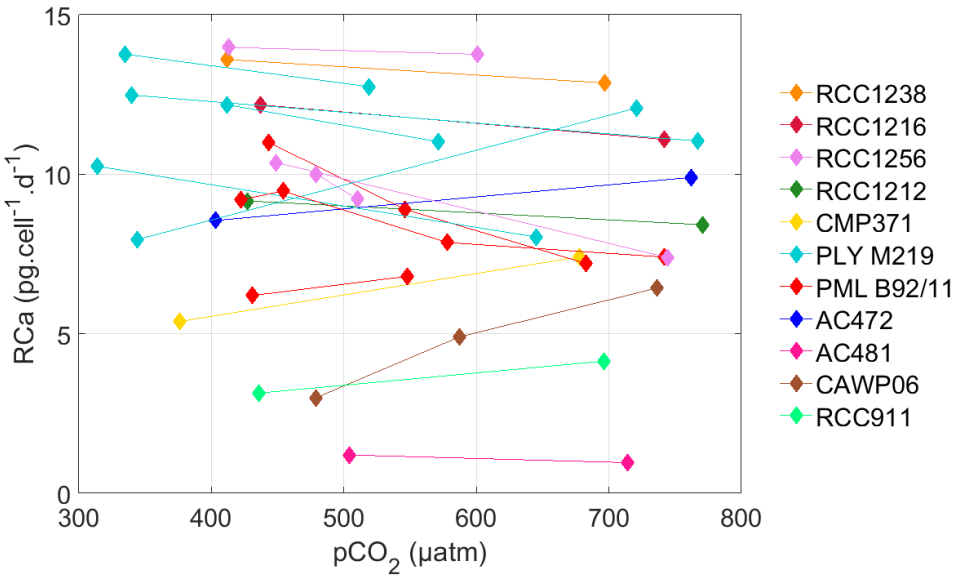


Figure III.15 : Production de calcification en fonction de la pCO_2 du milieu pour les différentes souches d'*E. huxleyi* cultivées dans des conditions normales de lumière, température et riches en nutriments.

Références : Langer et al. (2009) pour RCC1238, RCC1216, RCC1212 et Hoppe et al. (2011) et Langer et al. (2009) pour RCC1256, ; Benner et al. (2013) pour CMP371 ; Hoppe et al. (2011) et Shi et al. (2009) pour PLY M219 ; Bach et al. (2011) et Rost et al. (2002) pour PML B92/11 ; Fiorini et al. (2011) pour AC472 ; De Bodt et al. (2010) pour AC481 ; Iglesias-Rodriguez et al. (2008) pour CAWP06 et RCC911 pour les expériences décrites dans ce manuscrit.

5.5 Effet d'une diminution en lumière

Tout d'abord, nous ne considérerons dans cette partie que les expériences contrôles pour isoler le comportement des cellules vis-à-vis d'une diminution en lumière seulement. La co-limitation phosphate et lumière est discutée dans la partie 5.1 et l'expérience de co-limitation nitrate et lumière dans la partie 5.2.

Pour identifier correctement l'impact d'une diminution de l'intensité lumineuse de 140 à 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, nous avons étudié la différence entre l'expérience HL et LL. Dans le début de ce chapitre, nous avons pu voir que le taux de croissance diminue fortement et que cette diminution est mise en avant par une expérience plus longue en LL. Dans différentes expériences de cultures telles que celles faites par Feng et al. (2008), Müller et al. (2011) et Trimborn et al. (2007), le taux de croissance diminue également avec une intensité lumineuse plus faible. De plus, nous pouvons noter que la consommation en nutriment et le changement en DIC sont totalement indépendants de la lumière appliquée. En effet, la consommation en nutriments dans le milieu sera dépendante de la concentration cellulaire dans celui-ci et le

changement en DIC aussi (voir explication partie 2.2). La taille des cellules aurait, elle, tendance à être plus petite mais nous devons être vigilents avec ces conclusions car les erreurs sont très grandes. De plus, cette tendance n'est pas soutenue par le POC qui reste constant entre les expériences HL et LL ce qui irait plutôt dans le sens d'une taille constante des cellules. Nous rappelons qu'il n'y a pas de mesures pour les coccosphères et DSL pour l'expérience LL.

Le PIC et les taux de calcification et de photosynthèse diminuent tous avec une lumière plus faible. Le PIC est très faible pour les expériences LL et l'absence de coccosphères et de coccolithes sur les filtres ne permettent pas d'étudier morphologiquement la calcite présente dans ces cultures.

Par rapport à la réponse physiologique à des variations de lumière, la question posée dans la partie 4.1.1 était : est-ce une expérience témoignant de l'effet inhibiteur de la lumière sur la calcification? En effet, si nous regardons la diminution du rapport PIC:POC en abaissant l'intensité lumineuse, la calcification est fortement inhibée par cette faible lumière contrairement au quota de POC qui, lui, reste constant. Nous pouvons expliquer ce phénomène par une saturation de la calcification à une lumière plus élevée que celle de la photosynthèse. En effet, Zondervan (2007) a reporté que le rapport PIC:POC augmentait avec une diminution de la lumière due à une lumière de saturation plus faible pour la calcification que pour la photosynthèse. Cependant il a été montré aussi que le rapport augmente si l'on diminue la lumière jusqu'à la lumière de saturation de la calcification, observé entre autre par van Bleijswijk et al. (1994) (voir Figure III.16). Considérant une pCO_2 proche de celle utilisée pour les cultures présentées dans ce manuscrit (390 µatm), ce phénomène a été mis en avant par plusieurs études. Avec un cycle jour :nuit similaire à celui des expériences présentées dans ce manuscrit (12h :12h), Feng et al. (2008) (souche CCMP 371) décrit une diminution du rapport PIC:POC entre 400 and 50 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$. Des observations similaires ont été faites en laboratoire par Trimborn et al. (2007) et Rokitta and Rost (2012), respectivement avec les souches PML B92/11, et RCC1216 et RCC1217, utilisant cette fois un cycle jour :nuit 16h :8h, avec une diminution de la lumière de 300 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ jusqu'à un minimum de 30 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$. Avec un même cycle jour :nuit (16h :8h), Rost et al. (2002) ont observé une diminution du rapport PIC :POC avec une diminution de lumière de 30 à 150 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$. Ils ont de plus, avec un cycle jour continu, observé une augmentation du rapport en augmentant la lumière de 15 à 30 puis à 80 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ et une diminution de ce rapport PIC :POC de 80 à 150 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$. Ce que nous pouvons déduire de ces observations et des résultats des expériences présentées dans ce manuscrit est que la lumière de saturation de la calcification est sûrement spécifique à la souche cultivée. Cependant nous retrouvons un comportement commun à *E. huxleyi* comme représenté dans la Figure III.16:

diminution du rapport à partir d'une lumière de saturation de la calcification de par un effet inhibiteur plus fort pour la calcification à ces faibles intensités lumineuses ; et diminution du rapport lorsque la lumière augmente vers des lumières supérieures à la lumière de saturation de la calcification où la photosynthèse est plus favorisée par une augmentation en lumière que la calcification. Ceci nous montre que, comme décrit par Zondervan (2007), la calcification et la photosynthèse sont des processus dépendant de la lumière mais vont réagir de façon différente aux intensités lumineuses appliquées.

Le calcul de la production de PIC et POC diminuent avec une diminution de lumière. Etant donné que le quota de PIC diminue, que le quota de POC reste constant et que le taux de croissance diminue, nous pouvons avancer que la diminution du taux de calcification est due à un double effet négatif de la lumière sur le taux de croissance et sur le PIC par cellules. Contrairement à la calcification, le taux de photosynthèse dans ces expériences est conduit par le seul effet de la lumière sur le taux de croissance.

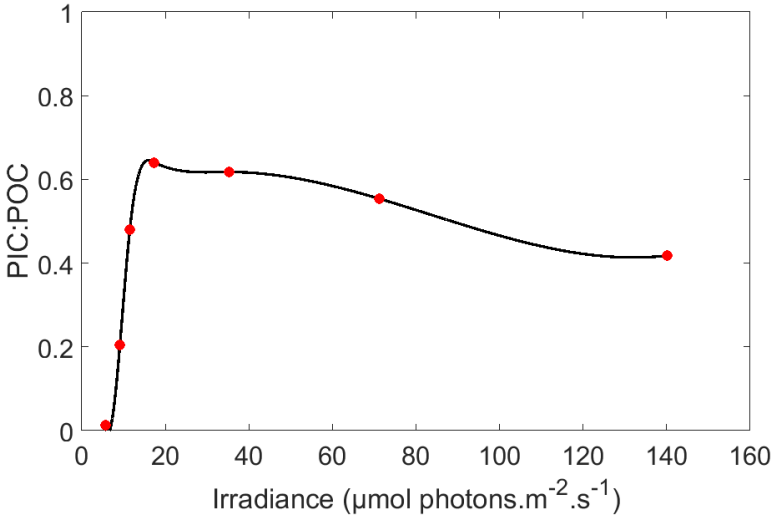


Figure III.16 : Rapport PIC:POC d'*E. huxleyi* en fonction de l'irradiance. Figure, modifiée, de van Bleijswijk et al. (1994).

5.6 Tableau récapitulatif des principaux effets sur les cultures d'*E.huxleyi* RCC911

Tableau III.8 : Récapitulatif des principaux effets et variations observées dans les expériences présentées dans ce manuscrit, référencées par différentes publications. Ø =diamètre ; × : pas d'observations spécifiques ; ↗ : augmentation ; ↘ : diminution ; ~ : constant ; ~↗ : double effet observé.

Effet environnemental	Variations observées (expériences présentées ici)	Publications références	Interprétations principales
Limitation en P	Changement en DIC ↗ Ø coccosphères ↗ Ø cellules ↗ Quota PIC ↗ Quota POC ↗ PIC:POC ↗ POC:PON et POC:POP↗ PON:POP ↘	Langer et al. (2013) Leonardos & Geider (2005) Müller et al. (2008) Oviedo et al. (2014)	La phase de division cellulaire est inhibée d'où le grossissement des cellules et leurs quotas plus élevés. La calcification semble favorisée par rapport à la photosynthèse.
Limitation en N	Changement en DIC ~ Ø coccosphères ~↘ Ø cellules ~↘ Quota PIC ↗ Quota POC ~↗ PIC:POC ↗ POC:PON et POC:POP↗ PON:POP ↘	Langer et al. (2013) Müller et al. (2008)	Variations probablement dépendantes de la souche utilisée. La calcification semble favorisée par rapport à la photosynthèse
Diminution de la lumière entre 140 et 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}	µ ↘ Changement en DIC × Ø coccosphères ~ Ø cellules ~ Quota PIC ~↗ Quota POC ~ PIC:POC ↘ POC:PON et POC:POP ~ PON:POP ~	Feng et al. (2008) Müller et al. (2011) Paasche (1999) Rost et al. (2002) Trimborn et al. (2007) Zondervan (2007) Zondervan et al. (2002)	La valeur de la lumière de saturation dépendra de la souche cultivée mais profil similaire pour *E. huxleyi* : augmentation du PIC:POC puis diminution avec augmentation de la lumière.

6. Conclusions

Le Tableau III.8 permet de résumer les principaux résultats et variations de la morphologie des cellules et des taux métaboliques sous l'effet d'une limitation en nutriment et d'une diminution en lumière. Ces expériences de cultures ont mis en évidence des réponses différentes des cellules aux différentes limitations ou changements appliqués.

Nous pouvons retenir quelques points essentiels de ces expériences :

- les taux de croissance calculés pour les expériences contrôles mettent en avant la limitation de la croissance cellulaire par la lumière
- la consommation en nutriments, les phases stationnaires et les rapports de l'élément limitant sur le POC témoignent de la réussite des limitations en nutriments
- il semble qu'il existe un comportement commun à *E. huxleyi* vis-à-vis de la limitation en phosphate : une augmentation des tailles des coccosphères et des cellules, et des quotas cellulaires/rapports, excepté le quota en POP et le rapport PON :POP (voir Tableau III.8)
- l'expérience LL-LP montre globalement le même comportement que celle faite en HL-LP malgré l'absence de phase stationnaire qui aurait pu être le signe d'une meilleure condition des cellules à la limitation en phosphate en LL pour ce qui est de la division cellulaire ; cependant tous les paramètres physiologiques autre que la croissance montre les caractéristiques de cellules limitées en phosphate
- les variations observées quant à la limitation en nitrate telles qu'une augmentation du PIC :POC et des quotas PIC et POC ne correspondent pas respectivement avec les variations définies par Langer et al. (2013) et Müller et al. (2012), et amènent à penser que ces variations dépendent en partie de la souche d'*E. huxleyi* cultivée
- les expériences avec une pCO_2 plus élevée confirment la réponse souche-spécifique du taux de calcification des cellules d'*E. huxleyi* vis-à-vis d'un changement de CO_2 dans le milieu (Langer et al., 2009)
- peu importe la souche utilisée, *E. huxleyi* aura un rapport calcification/photosynthèse qui augmentera avec une augmentation de la lumière jusqu'à une lumière de saturation de la calcification, et ensuite diminuera à partir de cette même lumière. Cependant la valeur de cette lumière de saturation sera, elle, dépendante de la souche étudiée et sa détermination devrait à l'avenir faire partie des priorités dans les études faites avec l'espèce *E. huxleyi* (Zondervan, 2007).

Les limitations des cultures faites en batch, quant à l'impossibilité de définir un taux de croissance (Langer et al., 2013) en conditions limitées en nutriments ou de suivre quotidiennement le quota cellulaire, peuvent être contournées en utilisant des modèles physiologiques simples tels que les modèles de Monod (Monod, 1949) et/ou de Droop (Droop, 1968). Cette notion sera abordée dans le prochain chapitre où les deux modèles sont développés sur le jeu de données des expériences de Langer et al. (2013) et celles présentées dans ce manuscrit. Cette approche nous permettra de simuler les expériences et d'estimer des paramètres physiologiques fondamentaux plus généralement estimés via des cultures faites en chemostat. La combinaison des résultats des expériences et des modèles physiologiques sera par la suite utilisée et développée dans le contexte de la campagne BIOSOPE dans le chapitre V.

Ce travail a été publié dans le journal *Biogeosciences* (Perrin et al., 2016): publication figurant en annexe 4 pour permettre une description plus détaillée de chaque partie dans ce manuscrit.

CHAPITRE IV

MODELISATION DE LA CROISSANCE DE CELLULES D'*E. HUXLEYI* EN SYSTEME BATCH

« De nombreuses heures devant l'ordinateur avec Vanni ont permis d'aboutir à ce travail de modélisation. Bien entendu sans déroger à une des règles de la modélisation : prendre son mal en patience! »

Dans ce chapitre, deux modèles physiologiques quantitatifs seront décrits et utilisés pour obtenir le maximum d'informations sur la physiologie des cellules lors des expériences de cultures faites en système batch. Pour ce faire, le logiciel Mathematica a été utilisé pour créer les modèles (travail réalisé initialement par Giovanni Aloisi) qui permettent d'estimer les informations physiologiques relatives à l'acquisition de ressources et propres à une expérience de culture. J'ai contribué en parallèle à l'amélioration des modèles et je me suis notamment chargée des tests de sensibilité, de l'affinement des paramètres, de la sortie et de l'interprétation des résultats.

1. Contexte général

La croissance d'*Emiliania huxleyi,* étant influencée par les conditions environnementales (lumière, nutriments, température…), a été modélisée par deux modèles physiologiques à l'échelle cellulaire : un modèle physiologique de type Monod (Monod, 1949) et un modèle de type Droop (Droop, 1968). Le modèle de Monod était à l'origine mis en place pour décrire la croissance bactérienne (Monod, 1949) alors que le modèle de Droop, quant à lui, a été initialement créé pour représenter l'effet du quota interne en vitamines B12 sur la croissance phytoplanctonique (Droop, 1968). Ils décrivent tous deux, mais de façon différente, le lien entre l'absorption de nutriments et la croissance de l'organisme.

Ces modèles à l'échelle cellulaire sont souvent intégrés dans des modèles biogéochimiques et écologiques qui simulent la croissance du phytoplancton dans l'océan. Les bases du modèle de Monod et de Droop sont utilisées par : Sommer (1991) qui compare les deux modèles en les appliquant à la croissance, limitée par plusieurs nutriments, de populations naturelles de phytoplanctons; et Legović and Cruzado (1997) qui étudient un modèle de croissance phytoplanctonique à plusieurs nutriments en utilisant l'assimilation de type Michaelis-Menten-Monod et la croissance de Droop. Les bases du modèle de Droop ont aussi été utilisées par exemple par : Benavides et al. (2015) qui identifient les paramètres de Droop grâce à l'élaboration d'expériences optimales ; Bernard (2011) qui détaille le modèle de Droop afin d'améliorer les processus de modélisation de cultures de microalgues pour la production de biofioul et mitigation de CO_2. Dans cette thèse, par contre, ces modèles sont intégrés dans un modèle simple du système batch dans le but de tirer le maximum d'informations physiologiques des expériences réalisées sur *E. huxleyi* et présentées dans les deux chapitres précédents. En particulier, cette modélisation sera utilisée pour estimer des paramètres physiologiques essentiels, relatifs à l'assimilation de ressources nutritives, tels que la constante de demi-

saturation pour l'absorption d'un nutriment (Eppley et al., 1969) ou le quota cellulaire minimum, subsistent, d'un nutriment donné (Shuter, 1979).

Ces deux modèles ont donc été appliqués aux expériences de cultures présentées dans le chapitre précédent, nommées les expériences « RCC911 » ; ainsi qu'aux expériences de Langer et al. (2013), appelées les expériences « PML B92/11 ». Tout d'abord, dans ce chapitre, une première partie décrira les méthodes utilisées pour créer et utiliser les deux modèles différents. Puis, une deuxième partie introduira les expériences de cultures réalisées par Langer et al. (2013). Suivra ensuite une troisième partie permettant la description des données utilisées pour la simulation des expériences de cultures. Puis, dans une quatrième partie, les résultats de modélisation seront présentés et analysés en détails. Enfin, avant de conclure ce travail de modélisation, il y aura une dernière partie explicative et descriptive des paramètres physiologiques estimés pour les expériences de cultures citées précédemment.

2. Méthodes de modélisation physiologique

2.1 Modèle physiologique de Monod

Le modèle physiologique de croissance cellulaire de Monod (Monod, 1949) définit le taux de croissance d'un organisme unicellulaire comme étant proportionnel à l'absorption des nutriments au sein de l'organisme. Comme reporté par Sommer (1991), l'avantage écologique de ce modèle est qu'il considère un lien direct entre la croissance d'une population de cellules phytoplanctoniques et la concentration externe en nutriments, et décrit quantitativement ce lien avec un paramètre conceptuellement simple (constante de Monod). Dans le modèle de Monod, le quota cellulaire de l'élément limitant est considéré fixe (voir Figure IV.1A). Ce modèle physiologique est représenté mathématiquement par la relation suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[R]}{[R] + K_R} \qquad \text{(IV-1)}$$

où μ_{max} (en jours^{-1}) est le taux de croissance maximal en conditions de nutriments non-limitants, K_R (en µmol.L^{-1}) est la constante de demi-saturation pour la croissance (la « constante de Monod ») et *[R]* (en µmol.L^{-1}) est la concentration du nutriment limitant R dans un fluide environnant.

Modéliser l'évolution dans le temps d'une population d'organismes unicellulaires de type Monod dans une expérience de batch est relativement simple. Outre l'équation de croissance, il

est nécessaire de définir le taux d'absorption du nutriment limitant par la cellule, R_{up}, en µmol.cell^{-1}.d^{-1} :

$$R_{up} = \mu \cdot Q_R \qquad \text{(IV-2)}$$

où Q_R est le quota du nutriment limitant R (en µmol$_R$.cell^{-1}) à la fin de l'expérience non limité en nutriment.

Tenant compte de ces deux définitions, deux équations différentielles sont nécessaires pour suivre la densité cellulaire et la concentration externe de l'élément limitant R en fonction du temps dans le réacteur batch :

$$\frac{dCells}{dt} = \mu \cdot Cells \qquad \text{(IV-3)}$$

$$\frac{d[R]}{dt} = \frac{-R_{up} \cdot Cells}{V} \qquad \text{(IV-4)}$$

où V (en litres, L) est le volume du réacteur du batch, *Cells* (en cell.mL^{-1}) est la densité cellulaire mesurée lors des expériences, et R_{up} le taux d'absorption de l'élément limitant R par la cellule (en µmol$_N$.cell^{-1}.jour^{-1}). Les conditions initiales des deux équations différentielles du modèle sont fixées par les données expérimentales de l'expérience simulée, tels que la concentration en nutriment et le nombre de cellules au début de l'expérience.

Les paramètres connus de ce modèle sont le volume du batch V et le quota cellulaire de l'élément limitant R, Q_R. Les deux inconnues qui permettront d'ajuster le modèle aux données sont le taux de croissance maximum : μ_{max} et la constante de demi-saturation (Michaelis-Menten) du nutriment R pour la croissance : K_R. Les données expérimentales utilisées pour ajuster ce modèle aux données sont : la densité cellulaire en fonction du jour de l'expérience et la concentration externe de l'élément limitant dans le milieu. Ce modèle de Monod sera appliqué aux expériences RCC911 et PML B92/11, dont les données utilisées pour ajuster le modèle sont présentées dans la partie 4.

2.2 Modèle physiologique de Droop

2.2.1 Méthode du modèle de Droop

Le modèle physiologique de Droop (Droop, 1968) définit une distinction claire entre les processus d'absorption des nutriments et de croissance cellulaire, considérant la capacité des micro-algues à stocker des nutriments intracellulairement (Benavides et al., 2015). Dans ce modèle, la croissance cellulaire dépend des réserves intracellulaires de l'élément limitant appelés les quotas Q (voir Figure IV.1B). Le taux d'absorption en nutriment dépendant du temps, R_{up} (en $\mu mol_R.cell^{-1}.jour^{-1}$), est simulé en utilisant une formulation de type Michaelis-Menten (Michaelis and Menten, 1913):

$$R_{up} = S_{cell} \cdot V_{\max} \cdot \frac{[R]}{[R] + K_R} \qquad \text{(IV-5)}$$

où S_{Cell} (en μm^3) est la surface de la cellule, V_{max} (en $\mu mol_R.\mu m^{-2}.j^{-1}$) est le taux d'absorption maximal du nutriment normalisé à la surface (obtenu en ajustant le modèle pour qu'il soit en accord avec les données) et K_R (en $\mu mol.L^{-1}$) est la constante (Michaelis-Menten) de demi-saturation pour l'absorption du nutriment limitant R. Le volume et la surface de la cellule ont été obtenus à partir des mesures de diamètre des cellules pour les expériences contrôlées (non limitées en nutriments) faites pour RCC911 en forte lumière « HL » et en faible lumière « LL ». Pour l'expérience PML B92/11, où la taille n'a pas été mesurée, celle-ci a été estimée d'après le quota de carbone organique particulaire cellulaire Q_C (en $pmol_C.cell^{-1}$), et la densité cellulaire des coccolithophoridés en terme de biomasse (approximativement égale à 0.015 $pmol_C.\mu m^{-3}$) (Aloisi, 2015).

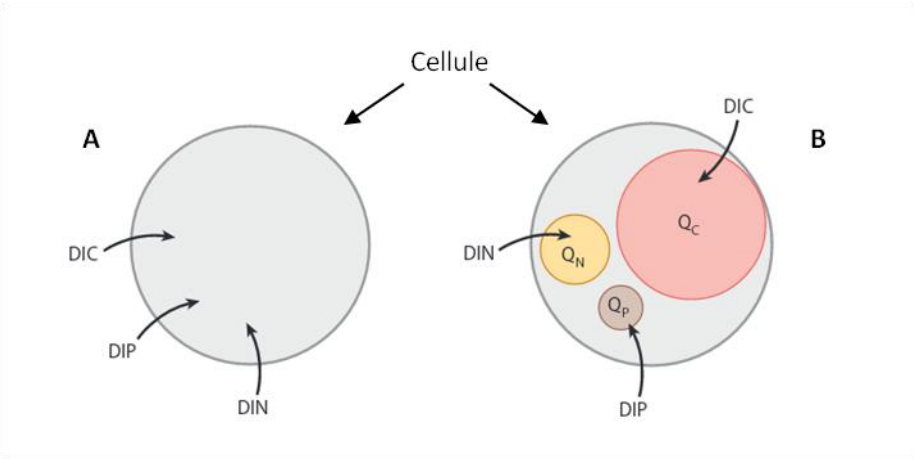


Figure IV.1 : Représentation schématique cellulaire des deux modèles physiologiques. A) Type Monod et B) Type Droop. Avec DIC, DIN et DIP respectivement le carbone inorganique dissous, l'azote inorganique dissous et le phosphore inorganique dissous ; et Q_C, Q_N et Q_P respectivement le quota cellulaire en carbone, azote et phosphore. Figure prise de Follows and Dutkiewicz (2011).

Le taux de croissance des cellules (en jour^{-1}) a été calculé en utilisant une équation de type Droop, dite ^{n}Quota, telle que reportée par Flynn (2008) et (2002):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{(1+KQ_R)\cdot(Q-Q_R^{\min})}{(Q-Q_R^{\min})+KQ_R\cdot(Q_R^{\max}-Q_R^{\min})} \qquad \text{(IV-6)}$$

où μ_{max} (en jours^{-1}) est le taux de croissance maximal atteint au quota cellulaire en nutriment maximal Q_R^{max} (en µmol.cell^{-1}) (Morel, 1987), Q_R^{min} (en µmol.cell^{-1}) est le quota cellulaire minimum (subsistent) du nutriment R en dessous duquel les cellules ne peuvent pas croître et KQ_R est un paramètre sans dimension qui dépend des valeurs de Q_{min} et Q_{max} et qui est comparable entre les différents types de nutriments et qui a typiquement différentes valeurs pour le nitrate et le phosphate (Flynn, 2002).

Ce paramètre KQ_R est définit par Flynn (2008b) comme étant représentatif de la relation entre le taux de croissance relatif (μ/μ_{max}) et le rapport des quotas Q/Q_{max} (voir Figure IV.2). Ce paramètre introduit une élasticité supplémentaire dans l'équation de croissance et permet de faire varier le taux de croissance avec les quotas cellulaires. Il s'agit d'un paramètre sans dimension se trouvant selon Flynn (2008a) au dessus de 3 pour le nitrate et inférieur à 0.3 pour le phosphate. Nous verrons par la suite que cette hypothèse n'a pas été vérifiée dans ce travail de thèse.

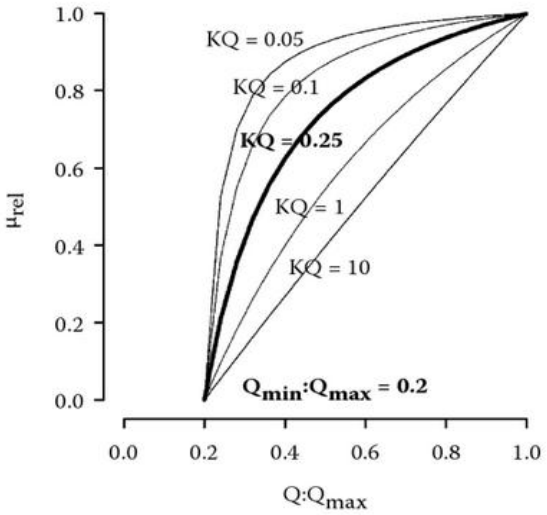


Figure IV.2 : Forme de la courbe de quota normalisé (^{n}Quota) (équation IV-6). Avec différentes valeurs de KQ et avec un Qmin :Qmax = 0.2. Figure prise de Flynn (2008b).

Le quota Q_R^{min} est obtenu par les analyses du quota cellulaire particulaire du nutriment R (NO_3 ou PO_4) à la fin des expériences limitées en nutriments, lorsque la croissance est égale à zéro alors que Q_R^{max} est égale au quota cellulaire particulaire du nutriment analysé pour les expériences contrôles, et donc à celui dans la phase de croissance exponentielle des expériences limitées en nutriment. Le paramètre KQ_R a été obtenu par l'ajustement entre le modèle et les données en tant que paramètre inconnu. De plus, dans le modèle de Droop le taux de croissance dépend du quota interne cellulaire en nutriment R (équation IV-6), plutôt que de la concentration externe en nutriment dissous comme pour le modèle de croissance phytoplanctonique de Monod.

Pour simuler la croissance d'un organisme de type Droop dans une expérience en batch, il faut considérer trois équations différentielles qui définissent la densité cellulaire totale dans le réacteur batch (*Cells*), la concentration en nutriment dans le milieu (*[R]*, en $\mu mol.L^{-1}$) et le quota cellulaire interne de l'élément limitant R (Q_R, en $\mu mol.\ cell^{-1}$) :

$$\frac{dCells}{dt} = \mu \cdot Cells \qquad \text{(IV-7)}$$

$$\frac{d[R]}{dt} = \frac{-R_{up} \cdot Cells}{V} \qquad \text{(IV-8)}$$

$$\frac{dQ_R}{dt} = R_{up} - \mu \cdot Q_R \qquad \text{(IV-9)}$$

Ces trois équations différentielles sont intégrées à travers le temps à partir de conditions initiales choisies en se basant sur les valeurs expérimentales du nombre de cellules initial dans la bouteille, la concentration initiale de l'élément dit limitant du milieu avant l'inoculation des cellules et le quota cellulaire en nutriment déterminé pendant la croissance de l'expérience en conditions riches en nutriments. Pour récapituler, les inconnues de ce modèle sont : le taux de croissance maximal μ_{max}, le taux d'absorption maximal V_{max}, la constante de demi-saturation pour l'absorption de l'élément limitant R K_R et le paramètre sans dimension KQ_R.

2.2.2 Stratégie du modèle de Droop

Ce modèle de Droop comporte 8 paramètres. Quatres d'entre eux sont considérés connus et constants pour une expérience donnée : le volume du réacteur (bouteille) batch V_R, le volume de la cellule (et la surface S_{Cell}), et les quotas cellulaires minimaux et maximaux de l'élément limitant respectivement, Q_{min} and Q_{max}. Les quatres autres sont inconnus et sont estimés par le

modèle, ce sont les paramètres physiologiques : la constante de demi-saturation pour l'absorption de nutriment R K_R, le taux d'absorption maximal du nutriment R normalisé à la surface V_{max}, le taux de croissance maximal μ_{max} et le paramètre sans dimension KQ_R (différent selon l'élément considéré).

Un point à noter est que le modèle de Droop présenté ici ne prend pas en compte les changements de taille des cellules entre les différentes expériences induits par une limitation en nutriments. Comme reporté dans la partie précédente, la taille de la cellule a été définie différemment pour les expériences RCC911 et PML B92/11. Pour l'expérience RCC911, les tailles ne correspondent donc pas aux tailles mesurées à la fin des expériences limitées en nutriments comme décrit dans le chapitre III mais à celles mesurées à la fin des expériences contrôlées en HL et LL. Celles-ci sont effectivement les tailles théoriques des cellules au début de chaque expérience et normalement jusqu'à la phase stationnaire.

Les données expérimentales qui ont permis d'ajuster le modèle aux données sont : la densité cellulaire en fonction du temps, la concentration de l'élément limitant dans le milieu et le quota cellulaire de l'élément limitant au début et à la fin de l'expérience. Pour les deux expériences simulées, le quota cellulaire et particulaire des expériences contrôlées a été utilisé comme quota au jour zéro et au deuxième jour (ou quatrième jour pour les expériences en faible lumière) (voir exception dans la partie 4.4), ce qui permet de garder un quota constant pendant la phase exponentielle. Cette hypothèse est correcte comme le quota cellulaire n'est affecté qu'à partir du moment où la limitation en nutriment commence. Au dernier jour de l'expérience, le quota cellulaire particulaire estimé à la fin de l'expérience limitée a été utilisé. Ce quota a été calculé en utilisant le nombre de cellules final dans le milieu et la concentration initiale de l'élément limitant dans le milieu (voir partie 4.4 pour les explications détaillées de cette démarche).

La qualité de la simulation du modèle et de son ajustement avec les données expérimentales a été estimée en utilisant une fonction de coût afin de comparer la précision de la simulation selon les « run » effectués (« run » : faire tourner le modèle). Cet outil statistique pour améliorer la fiabilité des simulations a été réalisé avec l'aide d'Anastase Charantonis au LOCEAN. Pour un « run » donné, le coût total a été calculé comme ce qui suit:

$$TotCost = \sum_{i=1}^{n} (\Delta X_i)^2 \qquad \text{(IV-10)}$$

où n est le nombre de données disponibles par paramètre et ΔX_i la différence entre la donnée et le modèle au même point i :

$$\Delta X_i = Data(X_i) - Model(X_i) \quad \text{(IV-11)}$$

où X_i est la donnée considérée, expérimentale ou issue du modèle (la densité cellulaire, la concentration de l'élément limitant ou le quota cellulaire de l'élément limitant).

Un poids plus important a été donné à la fonction de coût de densité cellulaire pour les deux types de cultures et de même pour la fonction de coût de la concentration en nutriments mais seulement pour la culture PML B92/11 de par son nombre important de données expérimentales par rapport aux cultures RCC911. Aucun poids n'a été mis pour la fonction de coût du quota cellulaire. Ce coût est donc comparable entre deux « runs » d'une même expérience et entre deux expériences utilisant la même souche (même type et nombre de données).

Dans cette analyse, un coût faible est témoin d'un meilleur ajustement entre le modèle et les données expérimentales et donc d'une meilleure qualité de la simulation. Pour une expérience donnée, le meilleur ajustement a été obtenu en faisant tourner le modèle de façon répétitive en imposant un nombre important de combinaisons possibles entre les différents paramètres inconnus (environ 500000 simulations ont tourné pour chaque expérience avant de trouver le meilleur ajustement). Pour ce faire, des intervalles assez larges ont été définis pour les paramètres inconnus de manière à ce qu''il y ait une cohérence d'un point de vue physiologique et que les valeurs ne soient pas absurdes scientifiquement, après avoir regardé la littérature. L'intervalle a été resserré plusieurs fois autour de la valeur simulée pour affiner la réponse du modèle et améliorer l'ajustement aux données expérimentales. Le « best-fit » a ensuite été trouvé en appliquant la méthode ci-dessus. Les résultats de ce modèle et les valeurs des paramètres physiologiques sont reportés dans les parties 5 et 5.2 de ce chapitre.

3. Description des expériences de cultures « PML B92/11 »

Les modèles physiologiques ont besoin de données de cultures afin de contraindre les paramètres physiologiques du modèle. Les modèles de Monod et Droop introduits dans la section 2 ont été contraints avec les résultats des expériences RCC911 (chapitre II et III) et avec les résultats de Langer et al. (2013).

La publication « *Coccolithophores do not increase particulate carbon production under nutrient limitation: A case study using Emiliania huxleyi (PML B92/11)»* publiée par Gerald Langer en 2013 dans le journal « *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* » (volume 443, pages 155-161) a en effet été choisie afin de contraindre les paramètres physiologiques relatifs à l'acquisition de nutriments via les modèles physiologiques décrits précédemment. Le choix de ces données expérimentales a été guidé par deux points importants : 1) la similarité de la méthode utilisée pour faire ses expériences de culture avec les expériences RCC911 ; et 2) la fréquence des analyses de concentrations en nutriments faites au long des expériences. En effet, la Figure IV.3 nous montre les résultats quotidiens de ces analyses pour le nitrate et le phosphate. On rappelle que les concentrations en nutriments pour les expériences RCC911 n'ont été faites que pour le milieu initial et à la fin des expériences (voir chapitre III).

Le but de leur travail a été de mettre en évidence ce qui a été introduit dans le chapitre III : le fait qu'il est impossible de calculer une production de calcification ou de photosynthèse dans des conditions de limitation en nutriments pour une culture faite en système batch. Ce papier s'appuie sur le cas d'une étude en laboratoire sur l'espèce de coccolithophoridés *E. huxleyi* et plus précisément sur la souche PML B92/11.

3.1 Expériences de limitation

La souche utilisée par Langer et al. (2013) a été cultivée dans de l'eau de mer enrichie avec des métaux traces et des vitamines f/2 selon Guillard and Ryther (1962) avec un mélange d'eau de mer naturelle de la mer du Nord et de l'eau de mer artificielle dont la composition est détaillée dans le tableau 2 de la publication de Langer et al. (2013). Le type de culture réalisé et les paramètres physico-chimiques fixés dans les milieux de cultures sont répertoriés dans le Tableau IV.1.

Langer et al. (2013) ont testé, pour le nitrate et le phosphate, une concentration amenée à limiter les cultures avec respectivement des expériences contrôles riches en nutriments pour permettre une comparaison. Ils ont donc mis en place 4 expériences différentes : deux expériences riches en nutriments différenciées par le mélange d'eau de mer effectué ; une expérience limitante en phosphate et une expérience limitante en nitrate.

Tableau IV.1 : Type de culture et paramètres physico-chimiques du milieu des expériences réalisées par Langer et al. (2013).

Paramètres	Pour PML B92/11
Type de culture	Batch
Température (°C)	15
Salinité	32
Irradiance (µmol photons.m^{-2}.s^{-1})	400
pH_T	8.057-8.189
NO_3 riche et limitant (µmol.L^{-1})	780-680 et 3
PO_4 riche et limitant (µmol.L^{-1})	32-35 et 0.29

3.2 Résultats principaux

Langer et al. (2013) ont échantillonné tous les jours sauf le premier jour d'expérience pour faire des analyses en nutriments (Figure IV.3). Les quotas en matière particulaire ont été analysés à la fin des expériences et la production de calcification et de photosynthèse calculée à l'aide du taux de croissance via les relations de production définies dans le chapitre III section 4.6. Les résultats pour la densité cellulaire et les valeurs en nutriments pour les expériences limitées en nitrate et phosphate à la fin de l'expérience sont représentés par la Figure IV.3 prise dans la publication de Langer et al. (2013). Les résultats de quotas cellulaires et de taux de production sont disponibles dans cette même publication (tableau 3 et figure 2 de l'article).

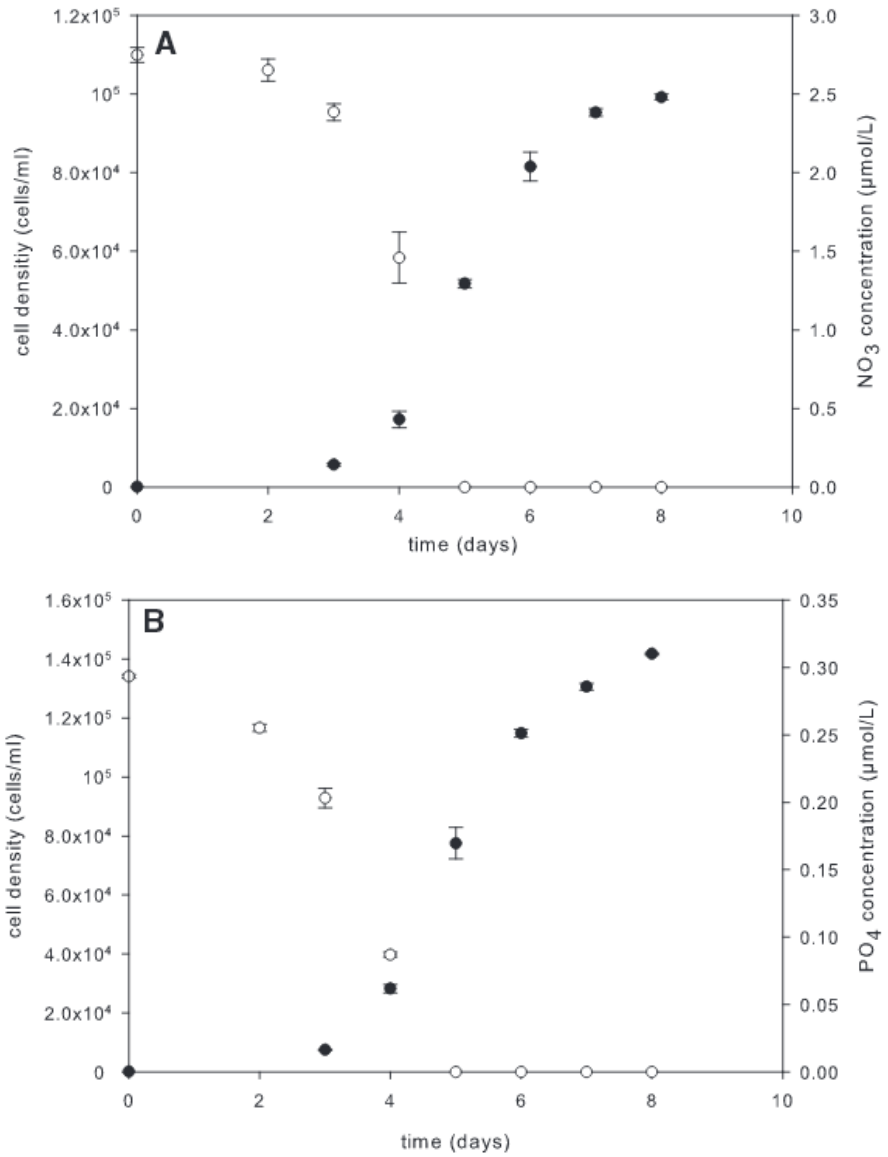


Figure IV.3 : Figures de Langer et al. (2013). Densité cellulaire (symboles pleins) et concentration dans le milieu de cultures en nitrate (A) et en phosphate (B) dans le milieu de culture (symboles ouverts).

3.3 Conclusions majeures

La comparaison des résultats de Langer et al. (2013) avec ceux de Borchard et al. (2011), qui ont fait des expériences en chemostat avec la même souche, leur permettent de montrer que la réponse du taux de production de POC de l'expérience limitée en phosphate est qualitativement différente pour une culture en batch. Ils confirment le fait que le taux de production ne peut pas être calculé avec une expérience faite en batch d'après Langer et al. (2012). Ils concluent malgré tout sur l'utilité des cultures en batch pour mieux comprendre le

comportement d'une souche ou bien comparer le comportement de deux souches différentes vis-à-vis d'une limitation en phosphate et/ou nitrate. Dans ce cas, il est possible d'utiliser les quotas cellulaires et les ratios pour ce genre d'étude. Cependant, si le but est d'étudier les taux de production d'une souche, des cultures en chemostat ou semi-continues doivent être utilisées.

4. Données simulées issues des expériences avec les souches RCC911 et PML B92/11

Pour chacune des deux expériences en laboratoire simulées, les expériences RCC911 et PML B92/11, le même type de données a été utilisé pour modéliser les expériences en batch et définir les conditions initiales du modèle. Ci-dessous des tableaux de valeurs pour répertorier les constantes indépendantes du temps et les données de densité cellulaire, de concentration du nutriment limitant et du quota cellulaire de l'élément limitant.

4.1 Choix des constantes indépendantes du temps

Des constantes ont été utilisées pour fixer le modèle : le temps maximal de l'expérience, le volume et la surface des cellules, et le volume du batch utilisé. Ces constantes sont reportées dans le Tableau IV.2 ci-dessous.

Tableau IV.2 : Constantes indépendantes du temps. Données définies au début du modèle de Monod (t_{max} et V_R) et Droop (t_{max}, V_R et R_o). t_{max} est le temps maximal de l'expérience en jours, V_R est le volume du batch et R_o est le rayon de la cellule interne.

Cultures	**RCC911**				**PML B92/11**	
Expériences	**HL-LP**	**HL-LN**	**LL-LP**	**LL-LN**	**LP**	**LN**
t_{max} (jours)	8	8	19	13	8	8
V_R (L)	2.7	2.7	2.7	2.7	2	2
R_o (µm)	2.257	2.257	1.985	1.985	2.23	2.23

4.2 Données des densités cellulaires

Les densités cellulaires (Tableau IV.3) ont permis de suivre la croissance cellulaire de l'expérience pendant la durée de l'expérience correspondant au temps maximal reporté dans le Tableau IV.2. Les comptages n'ont pas forcément été réalisés tous les jours, surtout pour l'expérience RCC 911 LL et pendant la phase de latence de l'expérience PML B92/11.

Tableau IV.3 : Densité cellulaire en fonction du jour de l'expérience. Données pour les différentes expériences de limitation en nutriment réalisées pour les cultures RCC911 et PML B92/11.

Cultures	**RCC911**				**PML B92/11**	
Expériences	**HL-LP**	**HL-LN**	**LL-LP**	**LL-LN**	**LP**	**LN**
Densité cellulaire	*cell.mL^{-1}*	*cell.mL^{-1}*	*cell.mL^{-1}*	*cell.mL^{-1}*	*cell.mL^{-1}*	*cell.mL^{-1}*
Jour 0	500	500	5000	5000	100	100
1	1445	379	7578	6003	/	/
2	/	/	/	/	/	/
3	7550	3050	17757	9337	7472	5752
4	23041	8151	/	/	28229	17172
5	57072	22205	25129	/	77568	51760
6	80858	46864	/	18502	114877	81542
7	88518	68048	/	23333	130651	95322
8	90862	72598	37427	/	141765	99254
9	/	74162	/	39703	/	/
10	/	/	46183	/	/	/
11	/	/	57559	62482	/	/
12	/	/	68412	64137	/	/
13	/	/	76236	62921	/	/
14	/	/	90562	/	/	/
15	/	/	/	/	/	/
16	/	/	103933	/	/	/
17	/	/	124549	/	/	/
18	/	/	135956	/	/	/
19	/	/	153681	/	/	/

4.3 Données de concentration du nutriment limitant

Les données de concentration du nutriment limitant (nitrate ou phosphate selon les expériences) sont présentes dans le Tableau IV.4. Nous pouvons remarquer qu'il n'y a que deux données disponibles pour les cultures RCC911 : une au début et une à la fin de l'expérience ; alors qu'il y a des données quasiment journalières pour les cultures PML B92/11, d'où l'intérêt majeur de modéliser ces cultures pour améliorer la précision du modèle et ajuster celui-ci à un nombre de données de concentration du nutriment limitant plus important que pour les cultures RCC911.

Tableau IV.4 : Données de concentrations en nutriments (NO_3 ou PO_4) pour les cultures RCC911 (A) et les cultures PML B92/11 (B). Les abréviations HL, LL, LP et LN sont définies dans le chapitre II. Exp. : expériences. La concentration indiquée est celle de l'élément limitant : LN = nitrate et LP = phosphate.

A)

Culture	**RCC911**			
Expériences	**HL-LP**	**HL-LN**	**LL-LP**	**LL-LN**
NO_3 ou PO_4	*µmol.L^{-1}*	*µmol.L^{-1}*	*µmol.L^{-1}*	*µmol.L^{-1}*
Début exp.	0.55	2.5	0.45	5.1
Fin exp.	0.011	0.18	0.0081	0.13

B)

Culture	**PML B92/11**	
Expériences	**LP**	**LN**
NO_3 ou PO_4	*µmol.L^{-1}*	*µmol.L^{-1}*
Jour 0	0.29	2.75
2	0.26	2.65
3	0.2	2.39
4	0.09	1.46
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0

4.4 Données du quota cellulaire de l'élément limitant

Les données du quota cellulaire Q_R de l'élément limitant R (nitrate ou phosphate) sont reportées dans le Tableau IV.5. Les valeurs de quotas sont les valeurs des analyses faites d'azote organique particulaire (PON) ou de phosphore organique particulaire (POP). Le quota cellulaire des expériences contrôles est utilisé comme quota initial maximal pour les expériences limitées (Q_{max}) sauf exception détaillée ci-dessous.

Les valeurs de Q_{min} devaient initialement être celles des analyses réalisées à la fin des expériences limitées en nutriments. Cependant la valeur de PON donnée par Langer et al. (2013) est très faible (et sûrement erronée; communication personnelle de Gerald Langer) (0.08 pg.cell^{-1} ou 5.71 fmol.cell^{-1}) et dégrade totalement l'ajustement du modèle aux données. Ainsi cette valeur a été recalculée en considérant que le nombre final de cellules dans le batch ait consommé tout le nitrate présent au début de l'expérience. Ce calcul a donné une valeur de 27.7 fmol.cell^{-1} qui a été utilisée dans le modèle (voir Tableau IV.5). Pour d'autres souches d'*E. huxleyi,* mais le même genre de cultures avec des conditions assez similaires et en conditions de limitation en nitrate, Sciandra et al. (2003) ont mesuré un PON de 38.9-39.3 fmol.cell^{-1} et Rouco et al. (2013) de 51.4 fmol.cell^{-1}, ce qui justifie la démarche de calculer un PON théorique pour ajuster au mieux le modèle.

Par un souci de cohérence, le calcul réalisé pour la valeur de PON a été appliqué aux autres expériences qui ont été modélisées. Pour ce faire, le quota a été calculé en soustrayant la concentration de nutriment finale à celle initiale dans le milieu. Les valeurs théoriques de PON et POP (ou l'équivalent Q_N et Q_P) obtenues sont assez similaires aux valeurs issues des analyses en laboratoire et ceci ne change quasiment rien à l'ajustement du modèle sur les données expérimentales malgré une plus grande différence pour certaines expériences comme LL-LN, HL-LP et LP (voir Tableau IV.5). Ces résultats sont présentés dans le Tableau IV.5. Pour une cohérence dans la méthodologie, il a été décidé d'utiliser les valeurs de Q_N^{min} and Q_P^{min} théoriques et calculées plutôt que celles venant des analyses pour ajuster le modèle aux données de la même manière pour toutes les expériences.

Cependant ce calcul a montré deux incohérences :

1) le Q_{minP} calculé pour l'expérience LP PML B92/11 et LP-HL RCC911 est devenu supérieur à son Q_{maxP}

2) l'écart réduit entre le Q_{minP} calculé de l'expérience LP PML B92/11 et son Q_{maxP} a empêché le modèle de reproduire les données.

Pour ce qui est de l'incohérence (2), une réponse assez similaire entre les expériences simulées étaient attendues. En effet, cette réponse « normale » attendue s'identifiait par deux points essentiels : 1) le quota cellulaire lors de la phase exponentielle de l'expérience devait être constant et égal au quota maximal cellulaire, et 2) le quota cellulaire ne pouvait descendre à des valeurs inférieures au quota cellulaire minimum.

Pour résoudre ce problème, les valeurs mesurées auraient pu être maintenues pour reproduire les données. Cependant la reproduction des données par le modèle ne marchant

pas, il a été décidé de trouver une solution alternative. De nouvelles valeurs de Q_{maxP} ont ainsi été déduites en reportant la diminution en POP par cellule initiale au cours de l'expérience, soit le POP de l'expérience contrôle moins le POP de l'expérience limitée en PO_4, sur la valeur de Q_{minP} calculée comme expliqué précédemment. Les valeurs sont indiquées dans le Tableau IV.5 (7.651 fmol.cell^{-1} et 4.675 fmol.cell^{-1}, respectivement pour les expériences HL-LP et LP). Alors que cette valeur a permis de parfaitement reproduire les données pour l'expérience HL-LP (voir Figure IV.9), la reproduction des données par le modèle n'a pas marché pour l'expérience PML B92/11 LP (voir Figure IV.6). Le rapport initial C/P étant de 214 pour l'expérience contrôle et donc très élevé par rapport à Redfield, plusieurs valeurs de Q_{maxP} ont été testées afin de diminuer ce rapport C/P jusqu'à trouver la valeur de Q_{maxP} reproduisant le mieux les données (voir Figure IV.7 et de plus amples explications dans la partie 5.2.1).

Tableau IV.5 : Données du quota cellulaire maximal et minimal particulaire de l'élément limitant. Valeurs analysées et calculées pour Q_{min}.

Cultures	**RCC911**				**PML B92/11**	
Expériences	**HL-LP**	**HL-LN**	**LL-LP**	**LL-LN**	**LP**	**LN**
	fmol.cell-1	*fmol.cell-1*	*fmol.cell-1*	*fmol.cell-1*	*fmol.cell-1*	*fmol.cell-1*
Q_{Rmax} **Jour 0 et 2 (ou 4)**	7.651 [a]	103.3	8.704	141.643	4.675[a] 8.22[b]	103.6
Q_{Rmin} **Dernier jour**						
Analysé	3.46	28.8	1.96	56.13	0.645	5.71
Calculé	5.93	31.28	2.88	78.99	2.04	27.7

[a] = valeurs déduites de la diminution en POP par cellule initialement dans l'expérience

[b] = valeur déduite des tests afin de reproduire les données

5. Evolution des paramètres expérimentaux au cours du temps

5.1 Résultats préliminaires et comparaison des deux modèles

Les premiers résultats présentés dans cette partie (Figure IV.4) mettent en avant les particularités distinctes du modèle de Monod et de celui de Droop. Les deux modèles calculent la concentration en NO_3 et la densité cellulaire en fonction du jour de l'expérience. Si nous regardons avec attention la Figure IV.4B, nous pouvons noter que le nitrate est entièrement consommé entre les jours 4 et 5 que ce soit pour le modèle de Monod ou de Droop. Parallèlement, la Figure IV.4A nous montre que la densité cellulaire simulée se stabilise au jour 4 pour le modèle de Monod et reste constante jusqu'à la fin de l'expérience. Cependant, pour le modèle de Droop, celle-ci commence doucement à diminuer à partir du jour 6 pour quasiment se stabiliser au jour 8.

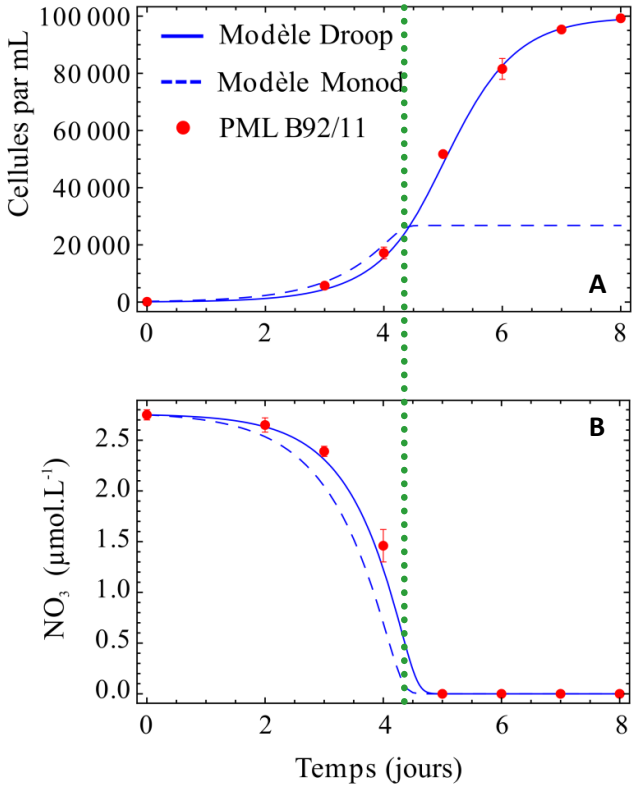


Figure IV.4 : Comparaison du modèle de Monod et Droop. Densité cellulaire (A) et concentration de nitrate dissous dans le milieu (B) en fonction du temps pour l'expérience limitée en nitrate et pour la culture PML B92/11. Les données expérimentales sont les points rouges, la simulation avec le modèle de Monod est la ligne en pointillés, celle avec le modèle de Droop est la ligne continue bleue et la ligne verticale verte en pointillés représente à peu près l'épuisement en nitrate dans le milieu.

Ces résultats nous montrent trois choses importantes :

- il y a un petit décalage entre les données expérimentales de nitrate et la simulation de cette concentration par le modèle de Monod. Ceci est dû à l'infime surestimation du nombre de cellules par le modèle qui conduit à une baisse un peu plus rapide de la concentration en nitrate dans le milieu
- le modèle de Monod ne reproduit pas l'augmentation du nombre de cellules après la consommation totale de nitrate dissous
- le modèle de Droop reproduit parfaitement les données expérimentales et par conséquent, reproduit parfaitement l'augmentation du nombre de cellules une fois le nitrate dissous, présent dans le milieu, entièrement consommé

Des observations similaires sont faites en modélisant l'expérience limitée en phosphate de Langer et al. (2013) ou encore les expériences faites avec la souche RCC911 présentées dans le chapitre précédent, limitées en nitrate ou en phosphate. Les résultats pour le modèle de Droop sont présentés dans la partie 5.2.2.

Après la description de la juxtaposition des deux modèles appliqués à une expérience de limitation en nutriments, comme représenté dans la Figure IV.4, nous pouvons nous poser la question suivante : pourquoi le modèle de Monod ne reproduit pas l'augmentation de densité cellulaire après l'épuisement total des nutriments dans le milieu?

De par sa définition, le modèle de Monod relie étroitement la croissance cellulaire à la concentration externe du nutriment limitant dissous. Or cette définition et les équations associées présentées dans la partie 2.1 de ce chapitre nous indiquent que dans un modèle de type Monod la densité cellulaire s'arrêtera de croître avec l'épuisement des nutriments dans le milieu. Ces deux processus sont simultanés et ne peuvent en aucun cas être découplé dans un modèle comme celui-ci.

La deuxième question que nous pouvons alors nous poser est : A quoi sert le modèle de Monod ?

Ce modèle est utile dans le cas de cultures à l'état stationnaire type cultures en chemostat (Sommer, 1991) ou pour décrire l'activité enzymatique (qui ne comportent pas de « quota » cellulaire en nutriment). Il est inutile, par conséquent, de l'utiliser pour simuler ou étudier une expérience de limitation en nutriment dans un batch, qui est une expérience à l'état non-stationnaire. En effet, il est impossible de reproduire l'augmentation du nombre de cellules lorsque le nutriment limitant dans le milieu est entièrement consommé.

Au contraire, le modèle de Droop se prête tout à fait à la reproduction d'une expérience de limitation tel que montré dans cette partie, que ce soit une limitation en nitrate ou en phosphate dans ce cas, ou une limitation par un autre nutriment. Ce modèle reproduit bien l'augmentation du nombre de cellules après épuisement de l'élément limitant. Dans le cas de la Figure IV.4, cet élément limitant est le nitrate mais nous observons la même reproduction des données avec une limitation par le phosphate à la fin de l'expérience. Cette particularité des coccolithophoridés à se diviser même lorsque le nutriment limitant est épuisé est mise en avant par les données de densité cellulaire et de concentrations en nutriment de Langer et al. (2013). Ce comportement est aussi décrit par la Figure IV.5 qui est issue du papier de Bernard (2011) et qui représente la courbe de croissance typique pour les microalgues avec le profil de la consommation de l'élément limitant. Cette figure montre bien que la croissance cellulaire des microalgues est en accord avec la définition du modèle de Droop et non pas celui de Monod, ce qui rejoint nos observations précédentes.

Pour conclure cette partie, le modèle de Monod n'étant pas adapté pour reproduire les données expérimentales des expériences de limitation, le modèle de Droop a été étudié plus intensément afin de simuler ces expériences et d'en déduire plusieurs paramètres non mesurés pendant les expériences. La suite de ce chapitre est donc dédiée aux résultats du modèle de Droop et à l'interprétation de ces résultats.

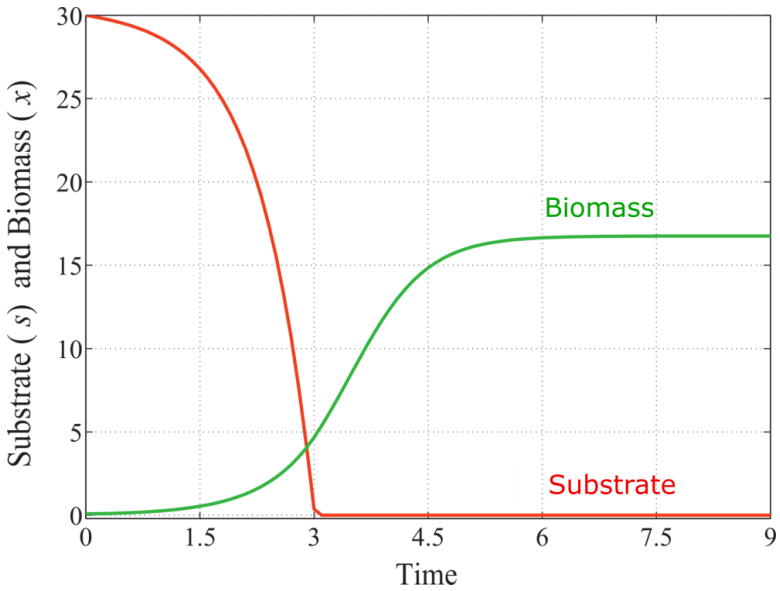


Figure IV.5 : Courbe de croissance typique pour les microalgues. La biomasse continue de croître après l'épuisement des nutriments dans le milieu ; figure prise dans Bernard (2011).

5.2 Résultats du modèle Droop

5.2.1 Modèle appliqué aux cultures avec PML B92/11

Le modèle de Droop a été appliqué aux cultures batch « PML B92/11 » dont les données expérimentales utilisées pour ajuster le modèle sont répertoriées dans la partie 4.

Tout d'abord, il est important de revenir au problème rencontré et abordé lors du choix des données de quotas cellulaires pour l'expérience LP de ces cultures PML B92/11. La Figure IV.6 et la Figure IV.7 nous montrent les deux modèles avec les deux valeurs de Q_{maxP} différentes : l'une déduite de la diminution en POP par cellule au cours de l'expérience (Figure IV.6) et l'autre déduite de tests pour reproduire les données expérimentales de densité cellulaire et concentration en nutriments. La Figure IV.6 nous montre en effet que la valeur de Q_{maxP} déduite de la diminution de POP par cellule ne permet pas du tout de reproduire les données expérimentales. Ceci est dû à une valeur trop basse de Q_{maxP} qui limite le quota POP par cellule et ne leur permet pas de se diviser aussi vite que dans l'expérience, ni de consommer le PO_4 aussi rapidement. Ainsi la valeur expérimentale du quota cellulaire POP maximum est peut être sous-estimée par rapport à ce dont ont besoin les cellules pour suivre cette croissance.

L'ajustement qui a permis de trouver la valeur de Q_{maxP} et qui permet la reproduction des données expérimentales (Figure IV.7) n'est pas forcément très robuste puisque le but de cette partie modélisation était de reproduire les données expérimentales et non de les modifier pour que le modèle les reproduise. Cependant, afin d'estimer les paramètres physiologiques présentés dans la partie 6 de ce chapitre, il était nécessaire de trouver une reproduction des données fiables pour obtenir des paramètres valables.

La description de l'évolution dans le temps du modèle physiologique lors d'une expérience de culture se fera en s'appuyant sur les résultats représentés par la Figure IV.7 et la Figure IV.8. Ces deux figures montrent bien que le modèle de Droop permet une très bonne reproduction des données expérimentales. Cette approche de modélisation permet de plus la détermination et l'évaluation de certains paramètres compliqués à déterminer de façon analytique : 1) le taux de croissance instantané; 2) le taux d'absorption des nutriments et 3) le ratio du carbone sur l'élément limitant. Ils se comportent de la même manière que ce soit pour l'expérience limitée en nitrate ou celle limitée en phosphate.

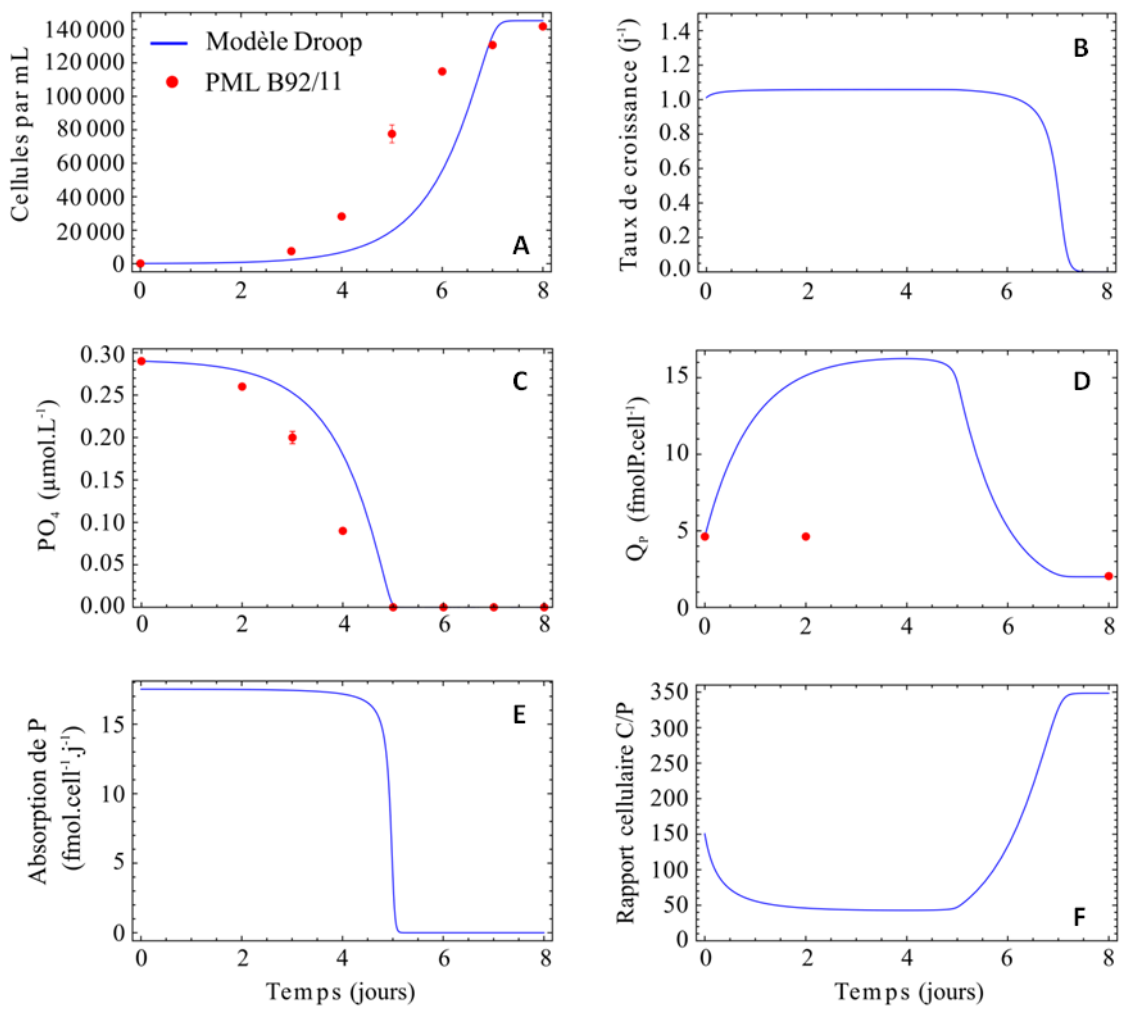


Figure IV.6 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate pour PML B92/11. Valeur Q_{maxP} déduite de la diminution en POP par cellule (voir Tableau IV.5).

Le taux de croissance instantané (Figure IV.7B et Figure IV.8B), de par sa relation avec le quota cellulaire (équation IV-6), suit le profil de la courbe du quota cellulaire particulaire de l'élément limitant (Figure IV.7D et Figure IV.8D). Tout comme le quota cellulaire, celui-ci décroît fortement au moment où le nutriment limitant se retrouve épuisé dans le milieu, entre les jours 4 et 5 pour les deux limitations : nitrate et phosphate. Il atteint ensuite une valeur de zéro vers le jour 6 lorsque la culture atteint elle-même la phase stationnaire (Figure IV.7A et Figure IV.8A), et où le quota se stabilise. Le taux d'absorption du nitrate ou du phosphate (Figure IV.7E et Figure IV.8E), relié à la concentration externe de l'élément limitant par l'équation IV-5, suit parfaitement le profil de cette concentration (Figure IV.7C et Figure IV.8C). Nous pouvons en effet observer une chute drastique de ce taux au jour 4 pour atteindre un taux d'absorption nul entre le jour 4 et 5 lorsque l'élément limitant est totalement épuisé. Les rapports C/N et C/P

(Figure IV.7F et Figure IV.8F), qui selon Redfield (1963) devrait se trouver à 6.625 et 106 respectivement dans un état non limité, sont initialement entre 6 et 7 pour C/N et entre 80 et 90 pour C/P. Ces rapports sont constants pendant la phase de latence de l'expérience et augmentent progressivement à partir du jour 4. Cette augmentation est contrôlée par la diminution simultanée du quota de l'élément limitant dans la cellule qui commence à se stabiliser au jour 6 et qui par conséquent amène les rapports à se stabiliser à la fin de l'expérience à des valeurs de 25 pour le rapport C/N et environ 350 pour le rapport C/P.

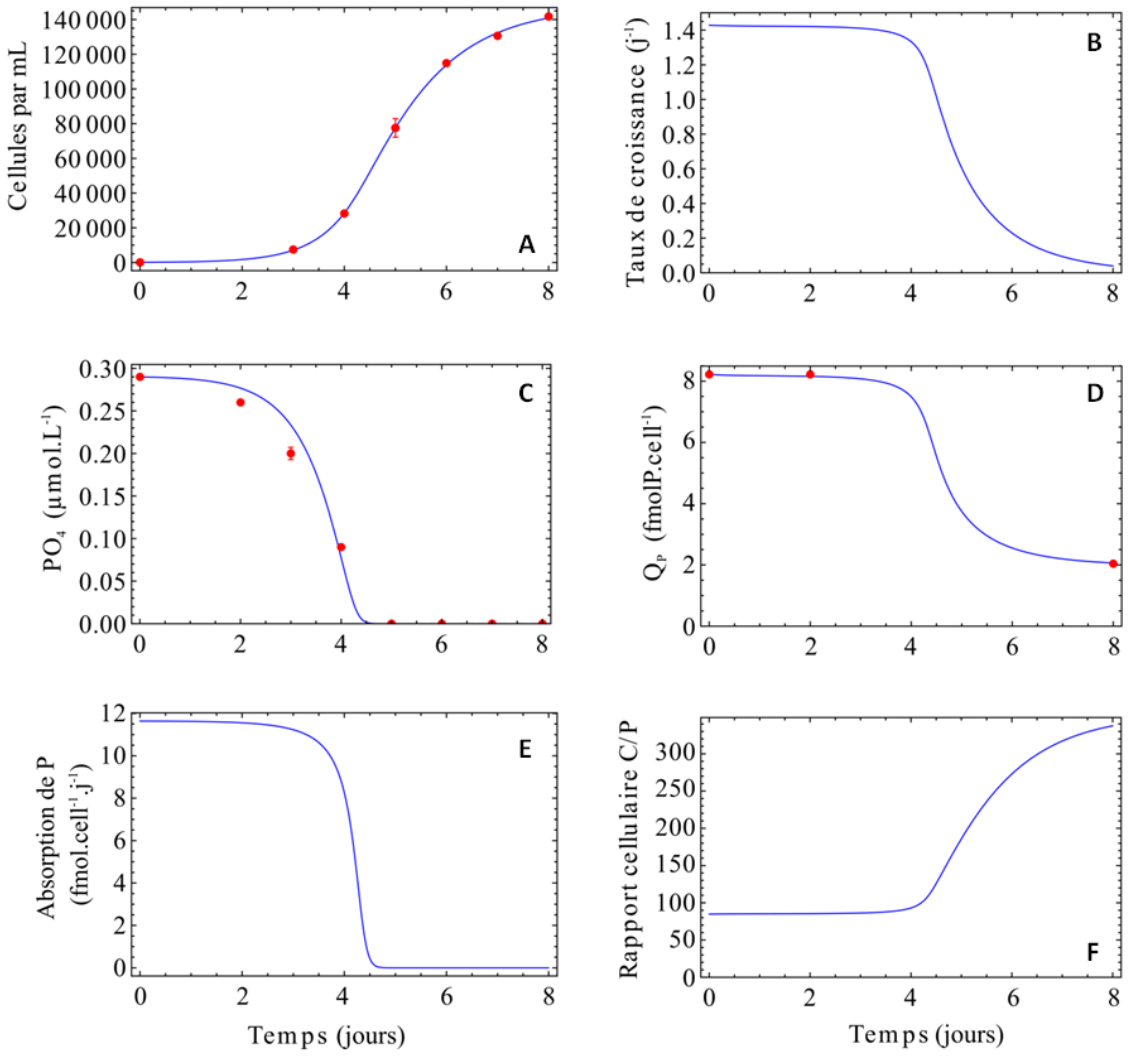


Figure IV.7 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate pour PML B92/11. Valeur Q_{maxP} fixée avec les tests pour reproduire les données (voir Tableau IV.5).

De plus, nous pouvons remarquer que la valeur initiale du taux de croissance avant la limitation (et donc dans la phase exponentielle de croissance), qui est d'environ 1.3 j^{-1} pour l'expérience limitée en nitrate et 1.4 j^{-1} pour celle limitée en phosphate, se rapproche des valeurs connues expérimentalement des expériences contrôlées : 1.34 j^{-1} pour l'expérience dite « contrôle en PO_4 » et 1.19 j^{-1} pour celle dite « contrôle en NO_3 ». Cependant il est important de noter que, dans ce modèle, c'est le taux de croissance instantané qui varie dans le temps et qui diminue lorsque la culture devient limitée en nutriments.

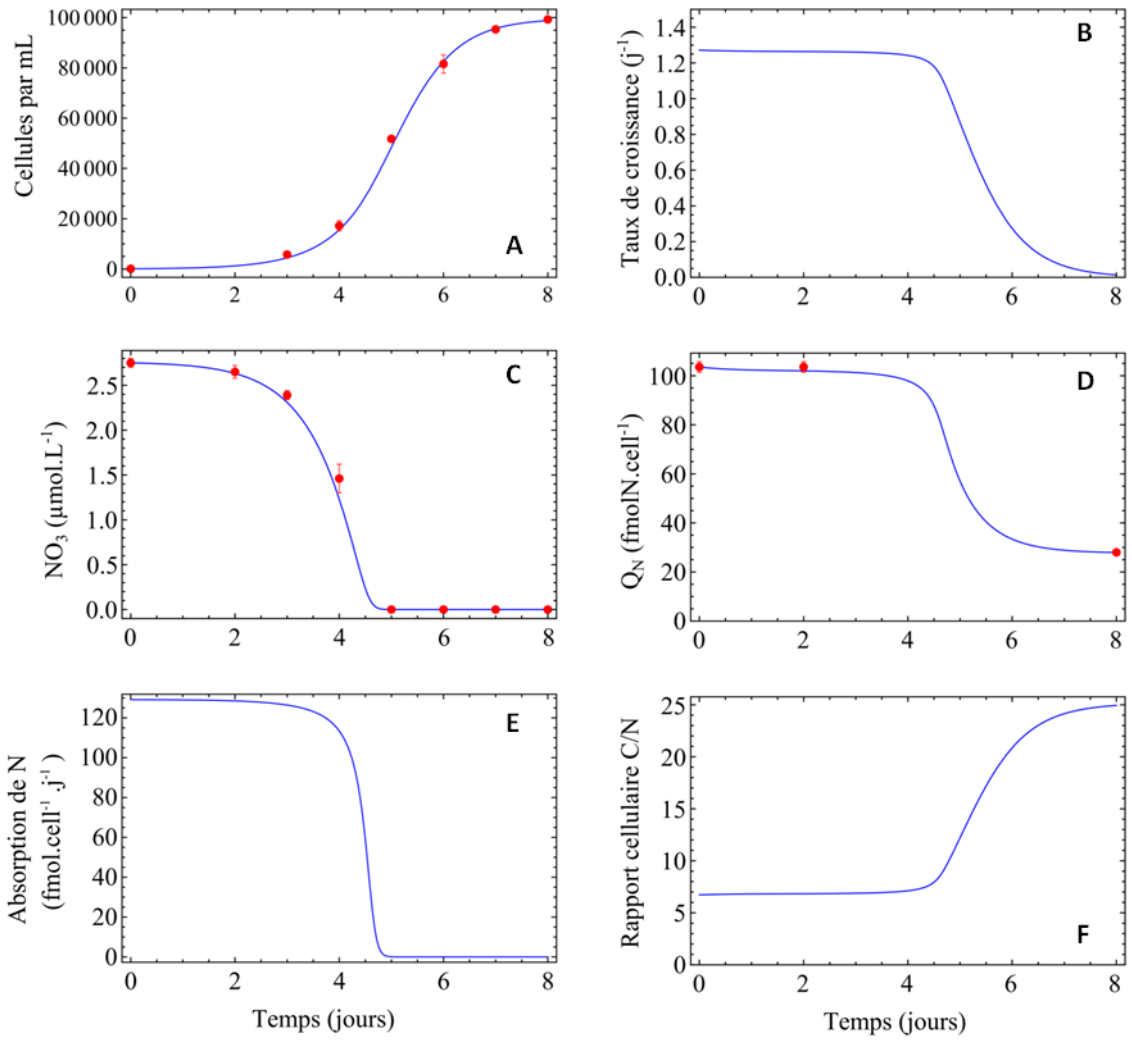


Figure IV.8 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en nitrate pour PML B92/11.

5.2.2 Modèle appliqué aux cultures RCC911

Les simulations avec les données expérimentales des cultures RCC911 donnent des résultats assez similaires que ceux reportés pour PML B92/11 et cette similitude est plus évidente pour les profils des différentes variables en fonction du temps des expériences faites en conditions de forte lumière. Nous pouvons rappeler qu'il n'y a que deux points de mesures pour la concentration externe et dissoute de l'élément limitant ce qui laisse le modèle un peu plus libre entre ces deux points que pour les cultures PML B92/11. Cependant les données de densité cellulaire régulières permettent de garder un certain contrôle sur le profil de la courbe entre le début et la fin de l'expérience.

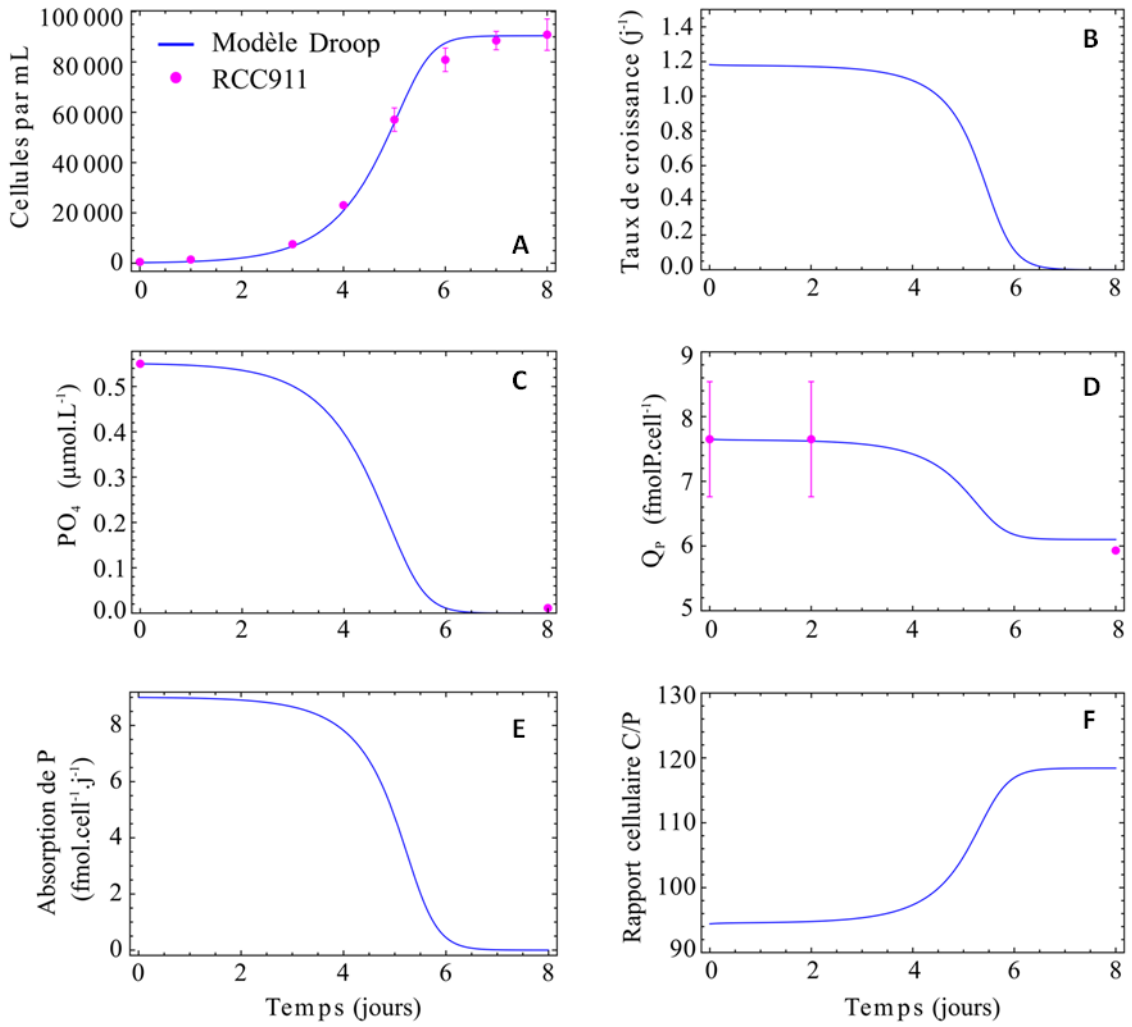


Figure IV.9 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate et en conditions de forte lumière pour RCC911 : HL-LP.

Si nous regardons tout d'abord les résultats des expériences en conditions de forte lumière et simulés par le modèle de Droop (Figure IV.9 et Figure IV.10), les mêmes observations que

pour PML B92/11 peuvent être faites. Pour résumer, le taux de croissance (Figure IV.9A et Figure IV.10A) suit l'évolution du quota cellulaire (Figure IV.9D et Figure IV.10D) dont il dépend alors que ce dernier contrôle l'évolution du rapport C/N ou C/P selon l'élément limitant (Figure IV.9F et Figure IV.10F). Ces trois variables quittent leur état constant initial au moment de l'épuisement du nutriment limitant dans le milieu : ici, un peu avant le jour 6. Elles atteignent ensuite une valeur nulle pour le taux de croissance, un minimum pour le quota cellulaire et un maximum pour le rapport cellulaire environ au jour 8 lorsque la croissance cellulaire atteint la phase stationnaire. Le taux d'absorption de l'élément limitant (Figure IV.9E et Figure IV.10E), par ailleurs, est nul lorsque ce dernier est épuisé dans le milieu. Comme pour les cultures PML B92/11, nous pouvons remarquer que la valeur du taux de croissance instantané initial (Figure IV.9 et Figure IV.10B) aux alentours de 0.95 et 1.2 j^{-1} pour l'expérience limitée en nitrate et celle limitée en phosphate respectivement, qui reste constante jusqu'à l'épuisement du nitrate dans le milieu, coïncide assez bien avec la valeur du taux de croissance de l'expérience en forte lumière et non limitée : 0.91 j^{-1}.

Les expériences en faible lumière ont, notamment pour l'expérience limitée en nitrate (Figure IV.12), un comportement similaire. L'expérience limitée en phosphate (Figure IV.11) a été plus compliquée à reproduire de par sa courbe de croissance non commune n'atteignant pas de phase stationnaire malgré une limitation des cellules réelle par le phosphate, mise en évidence dans le chapitre III.

Pour ce qui est du résultat du modèle sur les données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate en conditions de faible lumière (Figure IV.11), comme rappelé précédemment, la phase stationnaire de l'expérience n'a pas été atteinte par les cellules alors que celles-ci ont montré les signes d'une limitation en phosphate. Grâce aux analyses de PO_4 dissous dans le milieu, aux analyses de POP à la fin de l'expérience et à la taille des cellules ou coccosphères, il a été montré dans le chapitre III que les cellules répondent aux caractéristiques d'une limitation en phosphate. Celles-ci ont un quota cellulaire de POP plus faible et par déduction, une acquisition du phosphate certainement plus efficace comparé aux cellules en conditions de forte lumière et limitée en phosphate. Si nous nous concentrons sur l'approche de modélisation réalisée sur cette expérience dont les résultats sont présentés dans la Figure IV.11, nous notons qu'il a été difficile de reproduire les données de concentration en phosphate (Figure IV.11C) à la fin de l'expérience et la phase constante du quota cellulaire normalement observée et forcée par le point de donnée au jour 4 (Figure IV.11D).

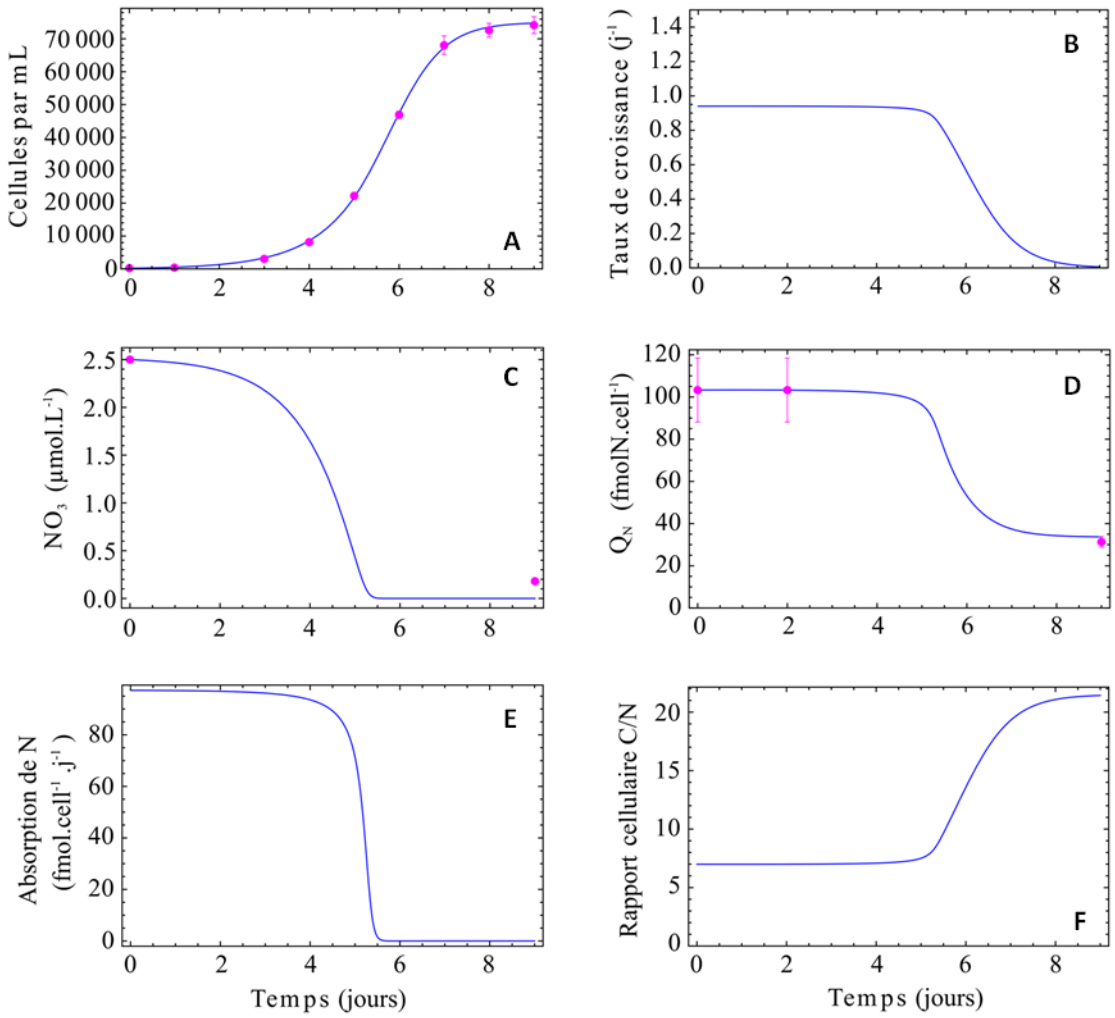


Figure IV.10 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en nitrate et en conditions de forte lumière pour RCC911 : HL-LN.

Ce que nous pouvons remarquer est que le taux de croissance chute directement (Figure IV.11B) tout comme le quota cellulaire de phosphate (Figure IV.11D) et le taux d'absorption du phosphate (Figure IV.11E), alors que le rapport cellulaire C/P augmente sans la phase constante initiale observée dans les expériences précédentes (Figure IV.11F). Comme la densité cellulaire semble rester dans la phase exponentielle (Figure IV.11A), ces quatres variables auraient dû rester stables tout au long de l'expérience. Cependant la valeur du quota cellulaire minimum semble forcer le modèle à diminuer le quota cellulaire aussi drastiquement dès le début de l'expérience, par conséquent à diminuer l'absorption de phosphate par la cellule et à augmenter le rapport C/P. La concentration externe en phosphate dissous dans le milieu (Figure IV.11C) n'atteint pas la faible valeur de phosphate mesurée à la fin de l'expérience mais arrive à une valeur minimale d'environ 0.14 µmol.L^{-1}. De même, nous pouvons noter que le taux

d'absorption de phosphate n'atteint pas zéro comme pour les autres expériences de limitation (Figure IV.11E). Ces deux dernières observations sont expliquées par le lien étroit qu'à la concentration de l'élément limitant avec la densité cellulaire (équation IV-8), qui reste exponentielle et qui ne se stabilise pas comme généralement, et par le lien entre l'absorption du nutriment limitant et sa concentration externe dans le milieu (équation IV-5). Le modèle suggère donc que, s'il y a encore une augmentation du nombre de cellules dans le milieu, c'est car le phosphate dissous n'a pas encore entièrement été consommé. D'un point de vue analytique, il est impossible de reproduire cette augmentation du nombre de cellules tout en atteignant une concentration en phosphate externe finale et une absorption de phosphate quasiment nulle.

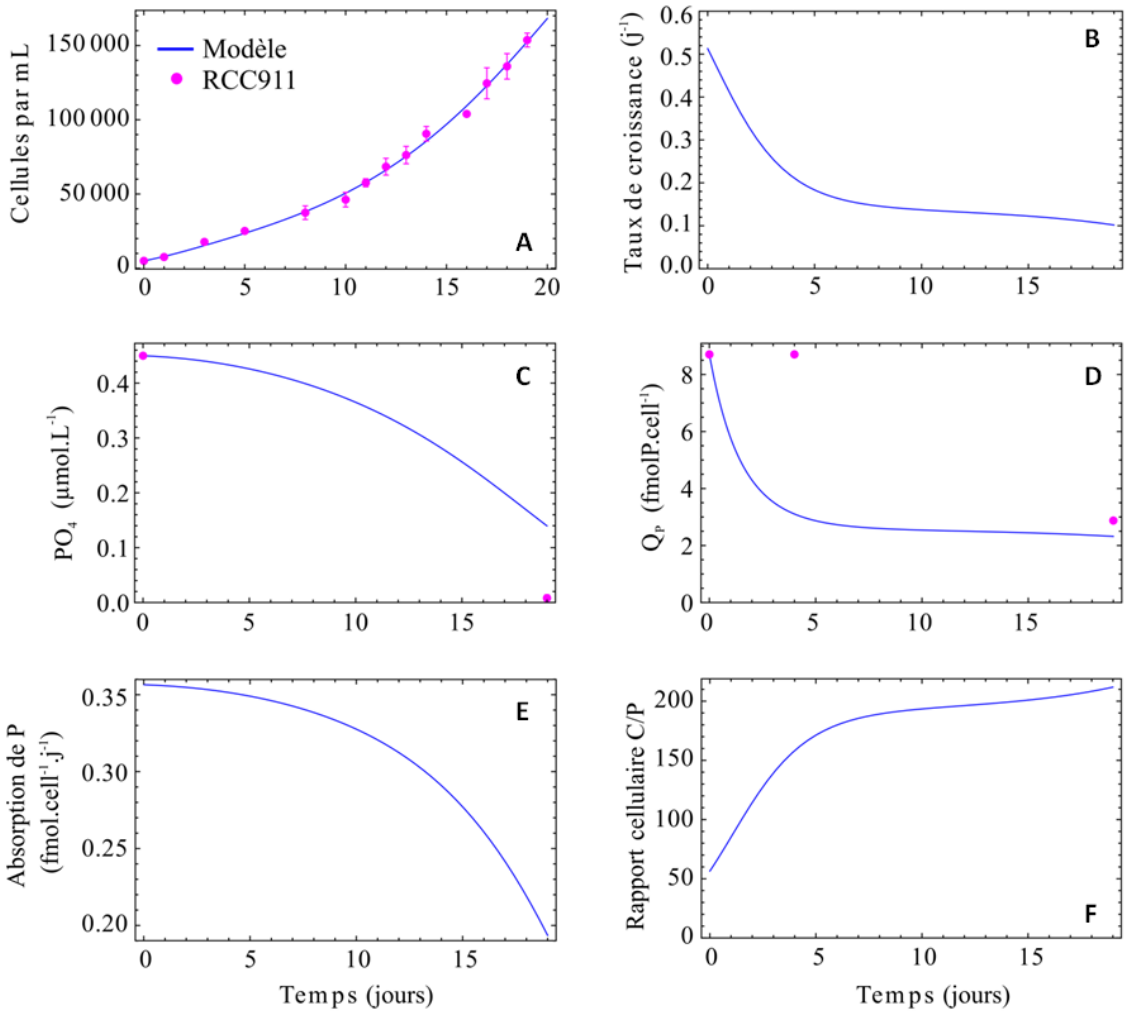


Figure IV.11 : Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en phosphate et en conditions de faible lumière pour RCC911 : LL-LP.

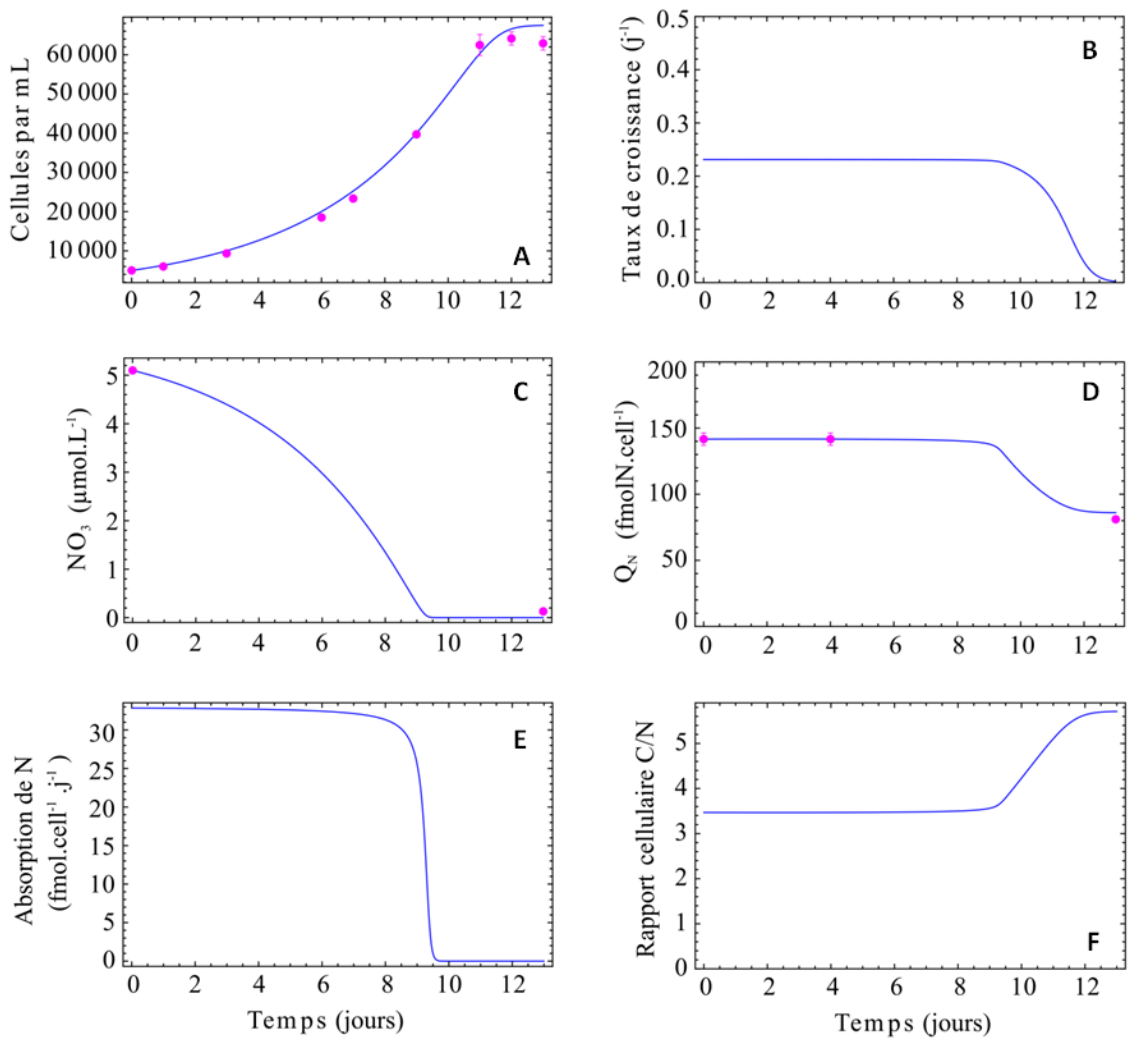


Figure IV.12: Résultats du modèle de Droop ajusté aux données expérimentales de l'expérience limitée en nitrate et en conditions de faible lumière pour RCC911 : LL-LN.

En ce qui concerne l'expérience limitée en nitrate et en conditions de faible lumière (Figure IV.12), nous pouvons voir les mêmes variations que pour les expériences précédentes (excepté l'expérience LL-LP): le taux de croissance (Figure IV.12B) et le quota cellulaire en azote (Figure IV.12D) commencent à diminuer un peu avant le jour 10 ce qui correspond à l'épuisement total du nitrate externe dissous dans le milieu (Figure IV.12C). Ces deux variables se stabilisent environ au jour 12 à une valeur nulle pour le taux de croissance et à un minium Q_{min} pour le quota cellulaire, lorsque les cellules arrêtent de se diviser et atteignent la phase stationnaire (Figure IV.12A) et lorsque le taux d'absorption du nitrate devient nul (Figure IV.12E). Le rapport C/N (Figure IV.12F) varie à l'inverse de ces deux variables et augmente à partir du jour 10 pour atteindre une valeur maximale aux alentours de 6 au jour 12. Le taux de croissance instantané et constant en début d'expérience se trouve à une valeur de 0.24 j^{-1} et peut être comparé au

taux de croissance global de l'expérience non limitée et en conditions de faible lumière définit expérimentalement à une valeur de 0.28 j^{-1}.

5.2.3 Résumé du comportement des cellules en conditions limitées

Grâce à ce modèle de Droop et aux données expérimentales qui permettent d'ajuster les paramètres physiologiques clés du modèle, nous pouvons ressortir un comportement global des cellules vis-à-vis d'une limitation en nutriment en combinant les différentes résultats des expériences décrites précédemment. Tout d'abord, nous notons que le taux de croissance dépend du quota cellulaire qui lui-même dépend de l'absorption en nutriment et du taux de croissance. L'absorption de l'élément limitant, reliée à la concentration externe de cet élément dans le milieu, contrôle le rapport du carbone sur l'élément limitant.

Globalement, le taux de croissance, le quota cellulaire et le rapport du carbone sur l'élément limitant sont constants pendant la phase de latence de l'expérience et au début de la phase exponentielle. Leurs diminutions ou augmentations respectives seront engendrées par l'épuisement de l'élément limitant dans le milieu : diminution pour le taux de croissance et le quota cellulaire ; et augmentation du rapport carbone/élément limitant. Malgré l'épuisement de l'élément limitant et comme décrit par le modèle de Droop, les cellules continuent de croître car elles utilisent leurs réserves internes, ce qui justifie d'autant plus cette diminution du quota cellulaire et en parallèle une diminution du taux de croissance qui dépend directement de ce quota. Ces diminutions, ou augmentation pour le rapport carbone/élément limitant, seront stoppées par l'arrivée des cellules dans la phase stationnaire et conduit ces différentes variables à se stabiliser et à rester constantes jusqu'à la fin de l'expérience. Le taux de croissance atteint une valeur nulle, alors que le quota et le rapport cellulaire atteignent tous deux une valeur minimale et maximale respectivement. Dans le cas de l'absorption de l'élément limitant, celle-ci diminue en parallèle de la consommation de cet élément dans le milieu et atteint une valeur nulle qui restera constante jusqu'à la fin de l'expérience lorsque cet élément est totalement épuisé.

6. Paramètres physiologiques contraints par le modèle

Ce travail de modèlisation réalisé grâce à la réalisation d'un modèle de Droop appliqué à différentes expériences en laboratoire testant la limitation en nutriment avait aussi pour but d'estimer des paramètres physiologiques relatifs à l'assimilation en nutriments. Ces paramètres ou traits physiologiques ont donc été contraints par le modèle de Droop pour l'espèce *Emiliania huxleyi* dans les conditions de cultures testées.

6.1 Définition des traits et paramètres physiologiques

Les traits peuvent être morphologiques, physiologiques, comportementaux et vitaux et définissent une fonction écologique particulière. Les fonctions écologiques étudiées avec ce type de traits sont : la reproduction, l'acquisition de ressources et l'évitement des prédateurs (Litchman and Klausmeier 2008). Les approches écologiques basées sur les traits permettent d'améliorer notre capacité à expliquer l'organisation des communautés phytoplanctoniques et des niches écologiques et à prédire leur réorganisation lors de changements globaux. Ecologiquement, les traits sont utilisés pour prédire la composition de communauté le long d'un gradient environnemental (Litchman and Klausmeier 2008). Les traits sont témoins d'aspects physiologiques, morphologiques et vitaux qui influencent le succès des espèces et leur bien-être. Lavorel and Garnier 2002 distinguent les traits qui déterminent comment l'abondance d'un groupe va réagir à des conditions variables (traits de réponse) comme la température optimale de croissance et ceux qui affectent les cycles biogéochimiques « effect traits » comme par exemple l'efficacité d'export de carbone (qui n'est pas relié à un trait de réponse particulier) (Litchman et al., 2015) (Figure IV.13).

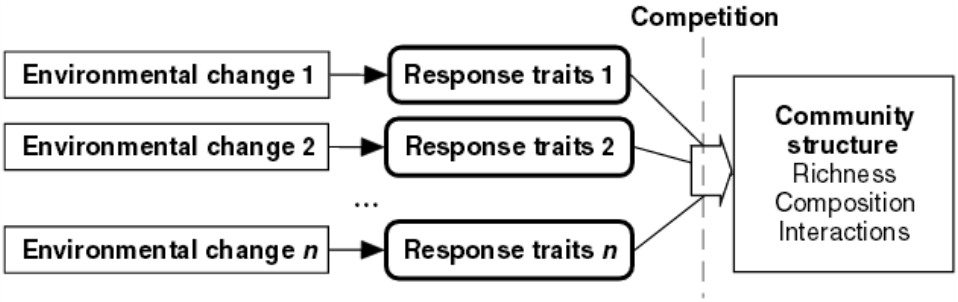


Figure IV.13 **: Cadre conceptuel de l'effet de changements environnementaux sur la structure de communauté des plantes (ou biodiversité) et fonctionnement de l'écosystème.** Figure prise dans Lavorel and Garnier (2002) où la réponse de structure de la communauté à des conditions environnementales est le résultat des traits de réponse des espèces.

Dans le présent travail d'étude sur les coccolithophoridés, seuls les traits physiologiques qui permettent de s'intéresser à l'acquisition des nutriments (besoin et assimilation des nutriments) sont étudiés.

D'après Litchman and Klausmeier (2008), les traits physiologiques pour l'acquisition et l'utilisation des nutriments sont le taux d'absorption maximal V_{max}, la constante de demi-saturation pour l'absorption en nutriment K_R, le taux de croissance maximal μ_{max} et le quota cellulaire minimal Q_{min}.

Dans cette étude, Q_{min} est définit expérimentalement et peut être estimé par le modèle parallèlement. Cependant si l'ajustement du modèle sur les données est correct alors la valeur du Q_{min} déterminée expérimentalement et celle estimée par le modèle seront quasiment similaires. Ce paramètre définit la capacité de stockage minimal en nutriments par la cellule lorsque le taux de croissance est égal à zéro (Litchman and Klausmeier 2008). Le paramètre V_{max} est le taux d'efficacité maximale d'une cellule à absorber des nutriments (Litchman et al., 2007) et la constante de demi-saturation K_R est la concentration en nutriment à la moitié du taux d'absorption maximum (voir Figure IV.14A) ou l'affinité de la cellule pour le nutriment limitant. Le taux de croissance maximal μ_{max} comme sa définition l'indique est le taux de croissance maximal pouvant être atteint par l'espèce ou le groupe phytoplanctonique. La capacité d'un organisme à croître rapidement sera d'autant plus importante si ce taux est élevé. Sommer (1984) propose trois stratégies majeures d'acquisition des nutriments pour le phytoplancton :

- les espèces « velocity-adapted » avec un V_{max} et un μ_{max} élevés qui utilisent des arrivées momentanées de nutriments et qui croîent rapidement.
- les espèces « storage-adapted » avec un V_{max} élevé mais un μ_{max} faible
- les espèces « affinity-adapted » avec un faible K_R qui sont avantagées en conditions de limitation en nutriments.

Contrairement à Litchman and Klausmeier (2008) (équation IV-12), l'équation du taux de croissance du modèle de Droop utilisée dans ce manuscrit (équation IV-6) est celle définie par Flynn (2008a) qui implique un paramètre inconnu supplémentaire KQ_R.

Equation du taux de croissance de Litchman and Klausmeier (2008) :

$$\mu = \mu_{\infty} \cdot \left(1 - \frac{Q_{\min}}{Q}\right) \qquad \text{(IV-12)}$$

Avec μ_{∞} le taux de croissance à un quota infini.

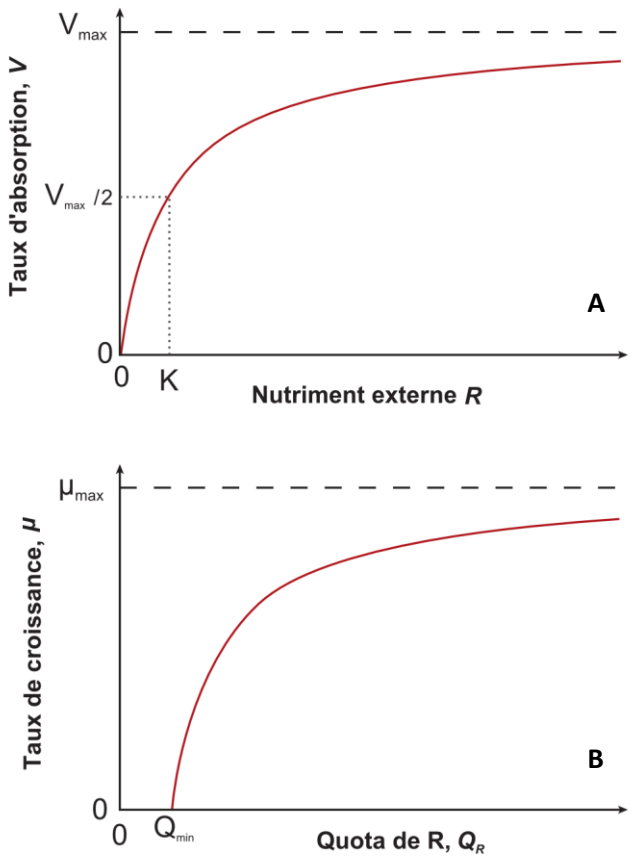


Figure IV.14 : Schéma de la relation existante entre le taux d'absorption et la concentration externe en nutriment (A) ; et le taux de croissance et le quota cellulaire en nutriment (B). Figure prise de Litchman and Klausmeier (2008).

6.2 Paramètres estimés par le modèle de Droop

Les meilleurs ajustements entre le modèle et les données expérimentales ont permis de définir les valeurs des inconnues, les paramètres physiologiques : le taux de croissance maximum μ_{max}, la constante de demi-saturation pour l'absorption du nutriment $K_{N/P}$, le taux d'absorption maximal normalisé à la surface de la cellule V_{max} et le paramètre sans dimension $KQ_{N/P}$. Les valeurs obtenues pour les différentes expériences réalisées avec les souches d'*E. huxleyi* RCC911 et PML B92/11 sont présentées dans le Tableau IV.6.

Les valeurs des paramètres obtenues sont assez similaires entre les deux types de cultures : RCC911 et PML B92/11 ; notamment pour le nitrate en HL. Ceci suggère une bonne cohérence du modèle appliqué aux données expérimentales. Cependant des différences pour le phosphate seront relevées. Si nous regardons les différentes valeurs obtenues pour les expériences limitées en nitrate tout d'abord, nous pouvons constater que V_{maxN} est quasiment équivalent

pour les deux types de cultures RCC911 et PML B92/11. Ce paramètre étant indicateur de l'efficacité d'une espèce à absorber un nutriment dans certaines conditions (Litchman et al., 2007), il est cohérent de trouver des valeurs similaires pour des expériences réalisées avec des conditions de cultures assez proches (voir partie 3.1).

Concernant les expériences RCC911 HL-LP et celles PML B92/11 LP, les valeurs de V_{maxP} et KQ_P sont quasiment les mêmes alors que la valeur de K_P est très différente : 0.051 pour HL-LP et 0.35. La valeur de K_P est donc plus grande que la valeur de K_N pour les expériences RCC911 HL et RCC911 LL mais est plus petite que K_N pour les expériences PML B92/11. Ceci suggèrerait que *E. huxleyi* aurait une plus grande affinité pour le nitrate plutôt que pour le phosphate pour RCC911 et l'inverse pour PML B92/11, ce qui semblerait contradictoire pour une même espèce. Etant donnée l'ajustement des données de quota pour l'expérience PML B92/11 LP, l'estimation de ce paramètre peu étudié est plus robuste pour les expériences RCC911. Par conséquent, *E. huxleyi* aurait une meilleure affinité pour le nitrate plutôt que pour le phosphate.

La valeur du paramètre KQ_R varie d'environ 1 pour les expériences en forte lumière et limitées en phosphate à 0.25 pour l'expérience HL-LN. Comme mentionné précédemment ceci ne correspond pas à la théorie de Flynn (2008a) comme quoi KQ_R se trouve au dessus de 3 pour le nitrate et inférieur à 0.3 pour le phosphate. Par le manque de littérature, il est difficile de dire si c'est un souci d'estimation du paramètre fait par Flynn (2008a) lui-même ou si une mauvaise estimation du paramètre par le modèle présenté ici.

Tableau IV.6 : Résultats du meilleur ajustement entre le modèle et les données. Valeurs des quatres paramètres physiologiques estimées par le modèle et valeurs de la fonction de coût estimée quant à l'ajustement du modèle sur les données. R est le nutriment limitant (NO_3 ou PO_4). Résultats pour l'expérience LP, PML B92/11, correspondant à la Figure IV.7.

Cultures	Expériences	V_{maxR}	K_R	μ_{max}	KQ_R	Coût
		$\mu mol.cell^{-1}.j^{-1}$	$\mu mol.L^{-1}$	j^{-1}		
PML B92/11	***LN***	$1.456.10^{-7}$	0.35	1.3	0.39	43
PML B92/11	***LP***	$1.362.10^{-8}$	0.051	1.57	0.98	5.47
RCC911	***HL-LN***	$1.052.10^{-7}$	0.205	1.01	0.25	8.5
RCC911	***HL-LP***	$1.47.10^{-8}$	0.35	1.2	0.9	55
RCC911	***LL-LN***	$3.34.10^{-8}$	0.09	0.2	0.3	63
RCC911	***LL-LP***	$5.74.10^{-10}$	0.275	0.52	0.47	126

En regardant attentivement les valeurs trouvées entre les deux conditions de lumière pour les cultures RCC911, nous pouvons noter premièrement que bien évidemment le taux de croissance maximal est plus faible en conditions de faible lumière. Ceci est cohérent avec les résultats des taux de croissance des expériences contrôles décrites dans le chapitre III (0.91 j^{-1} et 0.28 j^{-1} pour l'expérience en forte lumière et en faible lumière respectivement). De plus, nous pouvons relever les valeurs plus faibles pour V_{maxR} en conditions de faible lumière pour les deux nutriments limitants, ce qui montre que les cellules ont une efficacité d'absorption maximale de l'élément limitant moindre vis-à-vis d'une intensité lumineuse plus faible. Les valeurs de K_R suggèrent qu'*E. huxleyi* à une plus grande affinité vis-à-vis du nitrate par rapport au phosphate. Cependant, l'estimation de ce paramètre ne semble pas avoir de variations dépendantes de la lumière. Ainsi l'efficacité d'absorption du nutriment limitant V_{maxR} est variable selon le nutriment considéré et selon la lumière appliquée alors que le paramètre témoin de l'affinité d'une espèce pour un nutriment K_R ne varie pas avec la lumière mais seulement selon le nutriment limitant. Il sera important, par la suite, de conduire d'autres expériences pour étoffer ces premiers résultats, puisque qu'un simple modèle peut être utilisé pour estimer les paramètres physiologiques relatifs à l'assimilation des nutriments à partir de cultures en batch, plus rapides et moins coûteuses que les cultures en chemostat.

6.3 Test de sensibilité des paramètres physiologiques

Afin de tester la précision dans l'estimation des paramètres physiologiques, la sensibilité de chaque paramètre a été testée en étudiant son effet sur le coût total calculé avec l'équation IV-10. Pour ce faire, le modèle a été fait tourner plusieurs dizaines de milliers de fois, en forçant la valeur d'un paramètre inconnu et en laissant les autres paramètres libres s'ajuster pour atteindre le meilleur coût. Cette procédure a été répétée pour une gamme de valeurs du paramètre inconnu, à des pas constants, et a permis d'obtenir des relations entre la valeur du paramètre inconnu et le meilleur coût. Ces relations, dans le cas le plus favorable, définissent des courbes caractérisées par un minimum du coût total et une dégradation (augmentation) du coût, lorsque la valeur du paramètre inconnu s'éloigne de la valeur optimale (Figure IV.15). Ces simulations ont été faites pour les quatres paramètres physiologiques. La Figure IV.15 nous montre les résultats obtenus avec l'expérience limitée en nitrate pour la culture avec la souche PML B92/11. Le même type de résultat a été observé pour les autres expériences mais ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

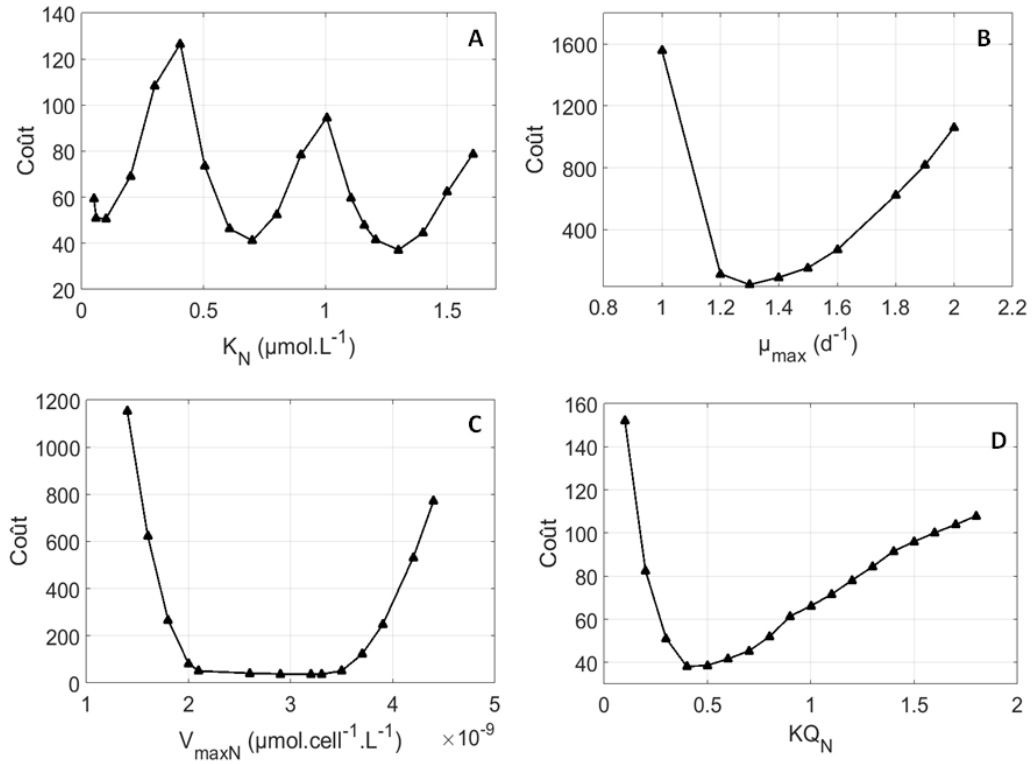


Figure IV.15 : Tests de sensibilité des paramètres physiologiques pour l'expérience limitée en nitrate PML B92/11. Coût simulé en fonction de la constante de demi-saturation pour l'absorption de nitrate K_N (A), du taux de croissance maximal μ_{max} (B), du taux d'absorption pour le nitrate V_{maxN} (C) et du paramètre pour le nitrate KQ_N (D).

Pour tous les paramètres sauf K_R, cet exercice a donné un profil de la variabilité des paramètres en forme de U ou en tout cas avec un seul minimum (Figure IV.15B, C et D) correspondant à la valeur du paramètre au meilleur ajustement (Tableau IV.6). Ceci confirme que le modèle est disposé à trouver le meilleur coût total et donc les meilleurs paramètres physiologiques correspondant. Pour ce qui est du paramètre K_R, le test de sensibilité du paramètre montre trois minimaux (Figure IV.15A) ce qui a quelque peu compliqué la procédure d'ajustement car trois résultats de K_R différents donnaient des coûts très bas. Il a été alors décidé de comparer avec la littérature et de choisir lequel des trois minima se rapprochaient le plus de la réalité et de la littérature. Si nous nous intéressons au travail fait par Riegman et al. (2000), où des expériences en chemostats sur *E. huxleyi* ont permis de trouver une constante de demi-saturation pour l'absorption du nitrate entre 0.18 et 0.24 µmol.L^{-1}, nous pouvons justifier le choix de rejeter directement le plus grand K_N et d'utiliser préférentiellement le plus petit minimum de K_N pour finalement obtenir les valeurs reportées dans le Tableau IV.6. Pour le phosphate, le même choix a été fait car Riegman et al. (2000) trouva des valeurs de K_P assez

petites entre 0.10 and 0.47 µmol.L^{-1}. Ce test de sensibilité montre que l'estimation des valeurs du taux d'absorption maximale, du taux de croissance maximal et du paramètre KQ est assez robuste comparée à celle des valeurs de K_R. En effet, il existe une plus grande variabilité pour la constante de demi-saturation pour l'absorption des nutriments et par conséquent un choix réfléchit a du être fait afin d'utiliser la bonne estimation et de finaliser la procédure d'ajustement du modèle sur les données expérimentales. La partie suivante appuie notre choix et les résultats obtenus pour les différents paramètres en comparant avec la littérature.

6.4 Comparaison des paramètres physiologiques avec la littérature

De nombreuses études ont estimé le taux d'absorption maximal V_{maxR} et la constante de demi-saturation pour l'absorption du nutriment K_R, spécialement pour l'absorption du nitrate, pour une variété d'espèces phytoplanctoniques. Les valeurs obtenues dans notre travail pour K_N pour l'expérience HL-LN et les cultures PML B92/11 LN (Tableau IV.6) sont comparables avec celles reportées dans la littérature comme présentée dans la Figure IV.16. Dans les expériences faites en chemostat avec *E. huxleyi* par Riegman et al., (2000), des valeurs de K_N ont été trouvées entre 0.18 and 0.24 µmol.L^{-1} et des valeurs de K_P entre 0.10 and 0.47 µmol.L^{-1}, alors que les valeurs estimées dans ce chapitre sont comprises entre 0.09 et 0.35 µmol.L^{-1} pour le nitrate et 0.051 et 0.275 µmol.L^{-1} pour le phosphate. De plus, ils ont relevé des valeurs de V_{maxN} de $7.4.10^{-6}$ µmol.$cell^{-1}$.d^{-1} qui se trouvent assez proches des valeurs estimées de V_{maxN} pour PML B92/11 et pour RCC911 (Tableau IV.6).

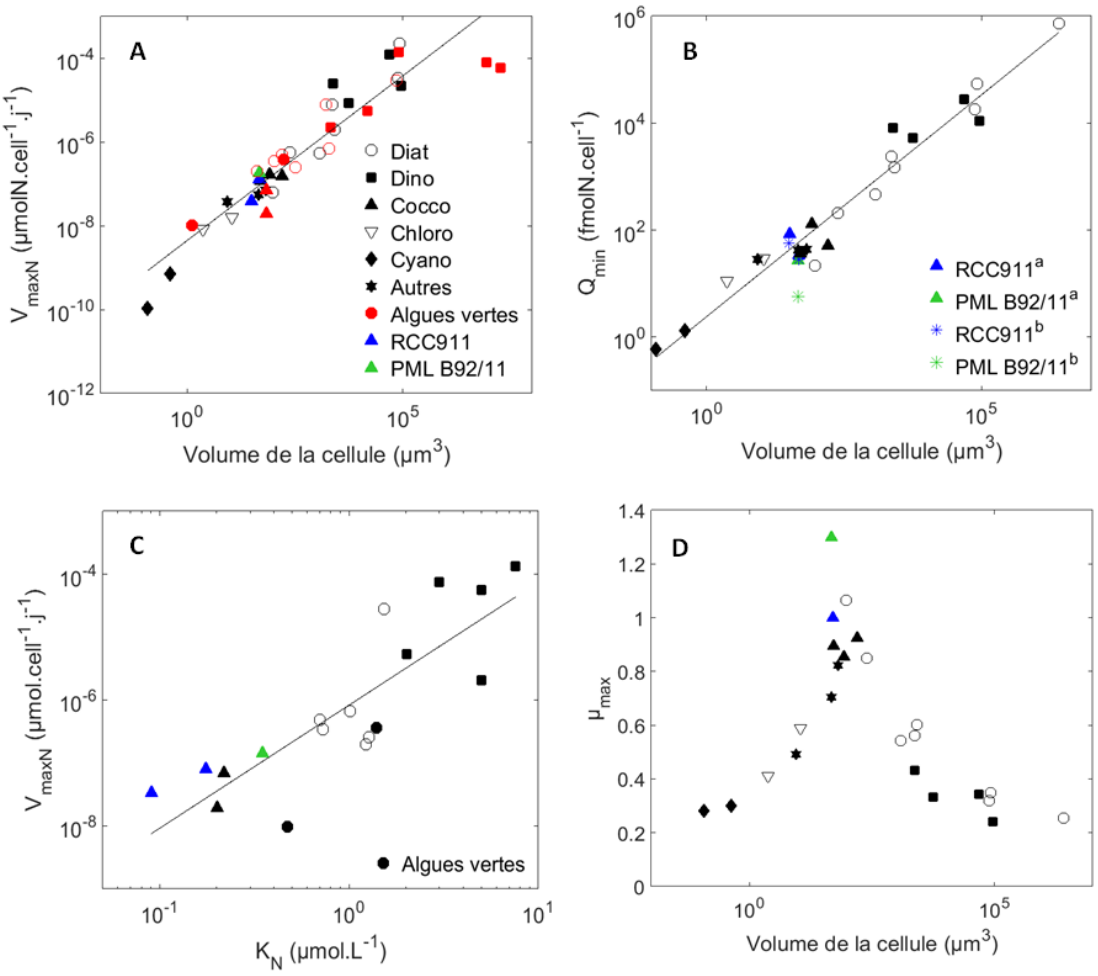
En comparant les paramètres physiologiques entre les organismes phytoplanctoniques, il est intéressant de regarder la relation entre ces paramètres et la taille de la cellule (Marañón et al., 2013) (voir Figure IV.16A et B). Marañón et al. (2013) a représenté Q_{min} et μ_{max} en fonction de la taille de la cellule (voir Figure IV.16B pour Q_{min} en fonction du volume cellulaire ; R^2=0.98 et p-value < 10^{-5}) pour différentes espèces de phytoplancton. Cette figure met en avant une capacité de stockage des nutriments plus élevée (Q_{min} plus élevé) pour les grandes diatomées et les dinoflagellés alors que les coccolithophoridés se retrouvent à avoir une capacité de stockage en nutriment intermédiaire parmi le groupe des petites diatomées (Marañón et al. (2013). La Figure IV.16 met en avant la relation entre V_{maxN} et la taille des cellules pour différents groupes phytoplanctoniques (R^2=0.94 et p-value < 10^{-4}) et est basée sur : les résultats de Litchman et al. (2007), qui ont utilisé une compilation d'une base de données ; ceux de Marañón et al. (2013), qui ont cultivé 22 espèces différentes ; et pour finir les résultats obtenus avec le modèle de Droop. Malgré les différentes procédures de détermination de V_{maxN} (simulée avec un modèle

ou déterminée expérimentalement), toutes les valeurs pour les coccolithophoridés se retrouvent dans le même ordre de grandeur de valeurs. Les diatomées et les dinoflagellés dominent les valeurs élevées de V_{maxN} ce qui témoignent d'une capacité d'efficacité d'absorption du nitrate plus élevée que pour les autres groupes phytoplanctoniques. Les cyanobactéries dominent les valeurs les plus faibles de V_{maxN} et Q_{min} et démontrent ainsi que de par leurs petites tailles, elles ont une capacité faible à absorber le nitrate et à le stocker. Nous pouvons noter que les coccolithophoridés ont une capacité à absorber le nitrate et à le stocker intermédiaire considérant des groupes phytoplanctoniques allant des diatomées aux cyanobactéries en passant par les dinoflagellés et les chlorophytes ou autres algues vertes.

Litchman et al. (2007) ont trouvé une corrélation linéaire entre le taux d'absorption maximal et la constante de demi-saturation pour l'absorption du nitrate comme observé dans Collos et al. (2005) et mise en avant dans la Figure IV.16C (R^2=0.84 et p-value < 10^{-4}). Nous pouvons voir dans cette figure que les coccolithophoridés et notamment *E. huxleyi* (espèce étudiée dans les expériences RCC911 et PML B92/11) ont un taux d'absorption V_{maxN} et une constante de demi-saturation K_N pour l'absorption du nitrate assez faible par rapport aux autres groupes de phytoplancton. Cette corrélation montre que les groupes qui ont une forte capacité à absorber du nitrate efficacement (fort V_{maxN}) et donc de croître rapidement, ont par ailleurs une affinité faible vis-à-vis de ce nitrate (fort K_N). Cette figure montre donc que les espèces phytoplanctoniques de grande taille comme les diatomées et les dinoflagellés ont des taux d'absorption du nitrate et une constante de demi-saturation pour l'absorption du nitrate plus élevés en comparaison avec le petit phytoplancton tels que les cyanobactéries ou les coccolithophoridés. Comme reporté par Cavender-Bares et al. (2001), les petites cellules phytoplanctoniques tels que les coccolithophoridés, les algues vertes ou les petites diatomées avec un K_N assez faibles sont principalement trouvées dans les environnements moins riches en nutriments alors que les cellules plus grandes sont généralement plus abondantes dans les eaux riches en nutriments. Ceci rejoint le concept d'espèces « affinity-adapted » introduit par Sommer (1984) avantagées dans des environnement limitées en nutriments.

De plus, selon Marañón et al. (2013) les coccolithophoridés ont le taux de croissance maximum le plus élevé parmi les groupes de phytoplancton (voir Figure IV.16D) et une taille cellulaire intermédiaire. Les valeurs des paramètres physiologiques contraints avec le modèle de Droop sont cohérentes avec ces observations. Il est important de noter que Marañón et al. (2013) ont cultivé différentes espèces phytoplanctoniques et leur taux de croissance maximal correspond à celui calculé par la régression linéaire de la phase exponentielle de l'expérience non limitée ni en lumière ni en nutriments. Marañón et al. (2013) avance que cette

caractéristique d'avoir un taux de croissance élevé est liée à une conversion plus efficace des nutriments en biomasse. Ceci rejoint encore l'hypothèse que les coccolithophoridés peuvent vivre dans des environnements moins riches en nitrate comparés aux diatomées ou aux dinoflagellés, de par leur meilleure efficacité d'utilisation des nutriments.



[a]= résultats du modèle ; [b]=analyses du laboratoire

Figure IV.16 : Comparaison des paramètres physiologiques avec la littérature. A) Taux d'absorption maximal pour le nitrate normalisé à la surface V_{maxN} en fonction du volume cellulaire. Données de Marañón et al. (2013) en noir, celles de Litchman et al. (2007) en rouge et les résultats du modèle de Droop pour les expériences limitées en nitrate des cultures RCC911 et PML B92/11 ; B) Quota cellulaire minimum Q_{min} pour le nitrate en fonction du volume cellulaire. Données de Marañón et al. (2013) et résultats du modèle de Droop et des analyses pour les deux souches présentées dans ce travail ; C) V_{maxN} en fonction de la constante de demi-saturation pour l'absorption du nitrate K_N. Données de Litchman et al. (2007) et les résultats du modèle de Droop. D) Taux de croissance maximal µmax en fonction du volume de la cellule. Données de Marañón et al. (2013) et résultats du modèle de Droop. La ligne solide est la régression linéaire.

7. Conclusion

Le but de ce chapitre a été, après avoir comparé les deux modèles de Monod et Droop, d'utiliser le modèle de Droop pour simuler les expériences de cultures batch avec la souche d'*E. huxleyi* RCC911 et les expériences avec la souche d'*E. huxleyi* PML B92/11 et tirer le maximum d'informations physiologiques d'une culture faite en batch.

Contrairement au modèle de Monod, le modèle de Droop a clairement montré qu'il était apte à reproduire de façon très satisfaisante les données expérimentales d'une croissance de cellules en système batch, en limitation en nutriments. Cette particularité physiologique des microalgues à utiliser leurs réserves internes en nutriments est, en effet, reproduite avec un modèle physiologique de Droop et est décrite par Bernard (2011) et Lomas and Glibert (2000). Il est important de préciser que cette approche de modélisation permet d'avoir accès aux variations de variables physiologiques telles que le taux de croissance instantanée, le quota cellulaire ou encore l'absorption de l'élément limitant, au cours de l'expérience, seulement à partir de quelques données expérimentales. Ces variables sont quantifiables à partir des cultures mais nécessiteraient un nombre d'échantillons beaucoup plus important pour le quota cellulaire et des comptages beaucoup plus nombreux (plusieurs fois par jour) pour avoir un taux de croissance instantané avec une telle précision.

Un des objectifs de ce travail a été de faire une estimation des paramètres physiologiques décrits par le modèle de Droop et de les comparer avec le peu de littérature existante à ce jour dans ce domaine pour les microalgues. Litchman and Klausmeier (2008) reportent un intérêt récent pour cette approche des traits en écologie car ils permettent une meilleure compréhension de l'organisation des communautés écologiques et une meilleure prédiction de leur réorganisation contrainte par le changement global. En cultures, ces paramètres physiologiques relatifs à l'acquisition de ressources sont peu estimés pour les coccolithophoridés, et donc peu pour *E. huxleyi* malgré quelques exceptions comme le travail de Marañón et al. (2013) ou le travail de Riegman et al. (2000). Ces travaux nous ont, en grande partie, permis une étude comparative des valeurs estimées par le modèle dans cette thèse. Cependant aucune de ces deux études n'a mesuré la globalité des paramètres physiologiques que nous décrivons dans ce chapitre, c'est pourquoi une approche par un modèle très simple de Droop permet de tous les définir pour une espèce donnée comme réalisé par Litchman et al. (2007) ou bien évidemment dans le travail présenté dans ce chapitre malgré les améliorations à apporter à l'estimation des paramètres K_R et KQ_R.

L'étude des paramètres physiologiques des coccolithophoridés les placent dans un groupe intermédiaire, entre les diatomées et les dinoflagellés d'un côté et les cyanobactéries de l'autre, qui peut aussi croître dans un environnement limité en nutriments. Gregg and Casey (2007) suggère que, parmi les conditions idéales pour la croissance des coccolithophoridés, un environnement pauvre en nutriments avec, en parallèle, une inhibition de la croissance des diatomées et des chlorophycées est un environnement avantageux. Cependant il précise que cela nécessite un mélange vertical suffisant pour éviter la sédimentation des cellules de coccolithophoridés qui ont un taux de sédimentation plus élevé que les autres groupes de phytoplancton. Malgré cette suggestion, l'espèce *E. huxleyi* est souvent décrite comme étant de stratégie-r et observée faisant de larges efflorescences dans des régions eutrophiques de l'océan.

Une question importante que nous pouvons alors nous poser est : dans quel contexte pouvons-nous observer *E. huxleyi* dans ces conditions oligotrophes et comment les cellules se comportent physiologiquement dans cet environnement?

Cette question nous a ainsi amené à étudier la niche profonde de coccolithophoridés observée entre autre à 170 m de profondeur au milieu du gyre du Pacifique-Sud décrit pendant la campagne BIOSOPE. Cette étude exploratoire, combinant des relations entre paramètres physiologiques, base de données et données *in situ*, est exposée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE V

EMILIANIA HUXLEYI DANS LE GYRE PACIFIQUE-SUD

« Voguant entre le monde des cultures et de la modélisation, un petit tour exploratoire dans le Pacifique-Sud s'imposa »

Un des objectifs les plus importants dans l'étude des coccolithophoridés est d'améliorer la compréhension de la réponse physiologique de ce groupe primordial aux changements environnementaux, et donc de contribuer à une meilleure connaissance des niveaux trophiques supérieurs. Dans ce contexte, les études faites en laboratoire et/ou par l'outil de modélisation permettent de mieux comprendre les phénomènes biologiques observés en milieu naturel.

Ce chapitre permet de s'intéresser à un cas d'étude *in situ* précis et contribue ainsi, dans le cadre de cette thèse, à la compréhension de la croissance d'*Emiliania huxleyi* en conditions oligotrophes et à faible intensité lumineuse. Pour ce faire et comme mentionné dans les deux premiers chapitres de ce manuscrit, le gyre Pacifique-Sud, où la campagne BIOSOPE a été réalisée, est un cas d'étude idéal de par la présence d'une niche profonde de coccolithophoridés à des profondeurs faiblement illuminées et caractérisées par des eaux pauvres en nutriments.

Le modèle introduit dans le chapitre précédent ne considère pas l'influence de la lumière ni celle de la température sur le taux de croissance mais ne prend en compte que le quota cellulaire de l'élément limitant. Dans ce chapitre est ainsi considéré, en plus de l'effet des nutriments (plus précisément des nitrates), l'effet de l'irradiance et de la température sur le taux de croissance.

Une première partie introduira succinctement les objectifs de la campagne BIOSOPE et fera un résumé des conditions physico-chimiques et biologiques le long du transect. Dans une deuxième partie, le potentiel de croissance d'*E. huxleyi* sera estimé à la station GYR du transect BIOSOPE, grâce à la combinaison de données *in situ* et des paramètres physiologiques définis dans le chapitre précédent. Ce travail fait parti de l'article publié dans le journal *Biogeosciences* et se trouvant en annexe 4. Une troisième partie s'intéressera au transect BIOSOPE dans sa totalité afin d'estimer ce même taux de croissance *in situ* et le taux de calcification potentiel qui en découle. Cette dernière partie sera présentée sous la forme d'un article en préparation.

1. Qu'est ce que BIOSOPE?

1.1 Objectifs de la campagne et caractéristiques du Gyre Pacifique-Sud

La campagne BIOSOPE - *BIogeochemistry and Optics SOuth Pacific Experiment* - a été réalisée pendant l'été austral 2004 le long d'un transect traversant le Gyre Pacifique-Sud d'ouest en est sur environ 8000 km, des îles Marquises à la zone d'upwelling du Pérou-Chili (Figure V.1A).

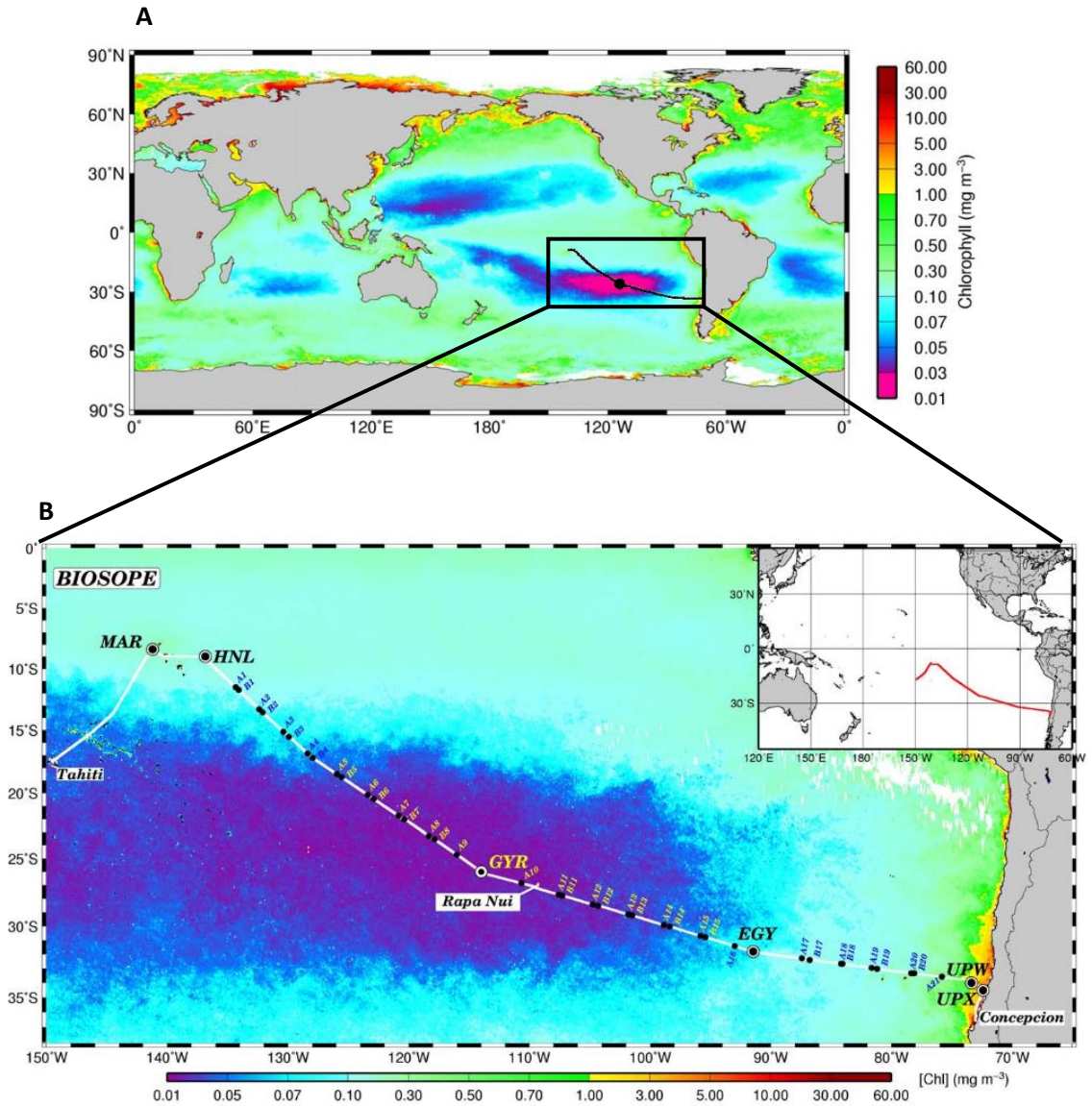


Figure V.1 : Transect de la campagne BIOSOPE à travers le gyre Pacifique-Sud. (A) Image annuelle composite de chlorophylle-a dérivée de SeaWiFS pour l'année 2000. (B) Transect de la campagne BIOSOPE superposé à une image composite SeaWiFS de chlorophylle-a dans la couche supérieure de Novembre à Décembre 2004. Les six stations « longues » (plus de 2 jours) sont indiquées en lettres et les 21 stations courtes sont indiquées par la lettre A (tôt le matin) ou B (vers midi) et leurs numéros. Figures prises de Claustre et al. (2008).

Le but de cette expédition était d'étudier les propriétés biologiques, biogéochimiques et bio-optiques de différents régimes trophiques : la zone eutrophique associée à l'upwelling de la côte Chilienne, la zone mésotrophique associée aux îles Marquises dans les eaux HNLC (High Nutrient Low Chlorophyll) de la région subéquatoriale et la zone oligotrophe se trouvant au centre du Gyre Pacifique-Sud (Figure V.1). Cette campagne a eu lieu entre octobre et décembre 2004. Des prélèvements biologiques et des mesures physico-chimiques ont été effectuées dans six stations de longue durée (plus de 2 jours sur place) et 21 stations courtes (tôt le matin ou vers le midi), comme présenté sur la Figure V.1B. Les résultats de cette campagne sont présentés dans une issue spéciale[9] du journal *Biogeosciences* publiée en 2008 où pas moins de 31 articles ont été dédiés à cette expédition et classés selon trois grands domaines d'étude : la biologie et biodiversité ; la biogéochimie ; et l'optique et bio-optique.

D'après Claustre et al. (2008), cette région était, avant la campagne BIOSOPE, la région océanique la moins échantillonnée de l'océan global d'un point de vue hydrodynamique (Leth et al., 2004) et biogéochimique (Daneri and Quinones, 2001). Ce gyre étant le plus oligotrophe de tous les gyres subtropicaux de l'océan mondial (Claustre et al., 2008b; Claustre and Maritorena, 2003) son étude en est d'autant plus importante pour la compréhension de tels écosystèmes. Au centre de ce gyre, plus précisément à la station GYR, la concentration en chlorophylle a de surface atteint les valeurs les plus faibles de l'océan ouvert (Figure V.1A) avec une moyenne annuelle de 0.019 mg Chl-a.m^{-3} (Claustre et al., 2008b). Ceci confirme le fait que cette région de l'océan soit caractérisée par des eaux très claires avec une pénétration profonde des radiations dans le visible et l'ultraviolet (Morel et al., 2007). Au même endroit, la pycnocline se situe à une profondeur supérieure à 200 m, valeur la plus élevée encore jamais relevée avant cette expédition (Claustre et al., 2008b). Cette couche d'eau, étant définie comme la couche d'eau où il y a un fort gradient vertical de densité, est notamment à l'origine de la stratification des eaux de ce gyre Pacifique-Sud (Claustre et al., 2008a). A la station GYR, à une profondeur similaire, entre 160 et 200 m, la nitracline et la phosphacline (voir Figure V.2A et B) ont été observées, tout comme le maximum de chlorophylle a (appelé ensuite DCM pour « Deep Chlorophyll Maximum ») (voir Figure V.2C). Dans ces eaux extrêmement claires et stratifiées, une faible diffusion verticale en nutriments ne permet de soutenir qu'une très faible production phototrophe dans les couches de surface. En plus de ce faible flux en nutriments par les eaux profondes, l'apport atmosphérique en fer est très limité de par le manque de source de poussières riches en fer dans l'hémisphère sud. Le Gyre Pacifique-Sud est décrit par Claustre et al. (2008b) comme étant la région océanique recevant les plus faibles flux verticaux en

[9] Site web : http://www.obs-vlfr.fr/proof/php/bio/bg_BIOSOPE_final.pdf

nutriments (voir la Figure V.2A et la Figure V.2B pour la concentration en nitrate et phosphate) ainsi que les flux les plus faibles en fer provenant de l'atmosphère.

1.2 Intérêt de la campagne BIOSOPE dans le cadre de cette thèse

Lors de la campagne BIOSOPE, et parmi les nombreuses études sur les populations phytoplanctoniques faites le long du transect, les coccolithophoridés ont été étudiés par Beaufort et al. (2008). Les caractéristiques particulières en nutriments et lumière associées à cette niche profonde de coccolithophoridés au centre de ce gyre en font un cas d'étude idéal pour mieux comprendre comment l'espèce *E. huxleyi* croît dans de telles conditions environnementales. Les assemblages de coccolithophoridés au centre de ce gyre Pacifique-Sud sont caractérisés par la présence d'espèces appartenant à la famille des Noëlaerhabdaceae ; c'est-à-dire *E. huxleyi* en co-dominance avec *Gephyrocapsa* sp. et *Reticulofenestra* sp. à la limite inférieure de la zone photique, à environ 150-200 m au milieu du gyre Pacifique-Sud (Beaufort et al. 2008).

Comme visible sur la Figure V.2C, le maximum d'abondance de coccosphères (en cellules par mL) se trouve au sein de la DCM et juste au dessus des isoclines du nitrate et du phosphate. Au centre du gyre Pacifique-Sud et au sein de cette niche profonde de coccolithophoridés, l'intensité lumineuse est très faible et avoisine des valeurs inférieures à 20 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (Claustre et al., 2008b), calculée avec les coefficients d'atténuation disponibles dans la base de données BIOSOPE (voir détail du calcul dans la section 2.1.3). Claustre et al. (2008b) reportent qu'aucune source d'azote inorganique n'est à priori disponible dans les 150 premiers mètres de la colonne d'eau, avec des concentrations en nitrate inférieure à 3 nmol.L^{-1}, mais que le phosphate est, quant à lui, toujours présent à des concentrations significatives, environ 0.1 µmol.L^{-1} (Raimbault and Garcia, 2008). Moutin et al. (2008) avancent donc que le phosphate n'est apparemment pas le nutriment limitant pour le phytoplancton le long du transect BIOSOPE. De plus, l'azote régénéré (nitrite et ammonium) est détecté seulement en quantités traces (<20 nmol.L^{-1}) au milieu de cette zone oligotrophe, même dans le maximum de subsurface (Raimbault et al., 2008). Un maximum très faible et étroit avec des concentrations traces d'ammonium (0.010 µmol.L^{-1}) a été détecté autour de 180 m à la station GYR, plus ou moins associé avec le faible maximum de concentration en nitrite (Raimbault et al., 2008). La distribution de l'azote inorganique, mesuré pendant la campagne, a été reportée uniforme par Raimbault et al. (2008) dans la zone photique sur la colonne d'eau à la station GYR et aucun maxima de subsurface n'a été observé.

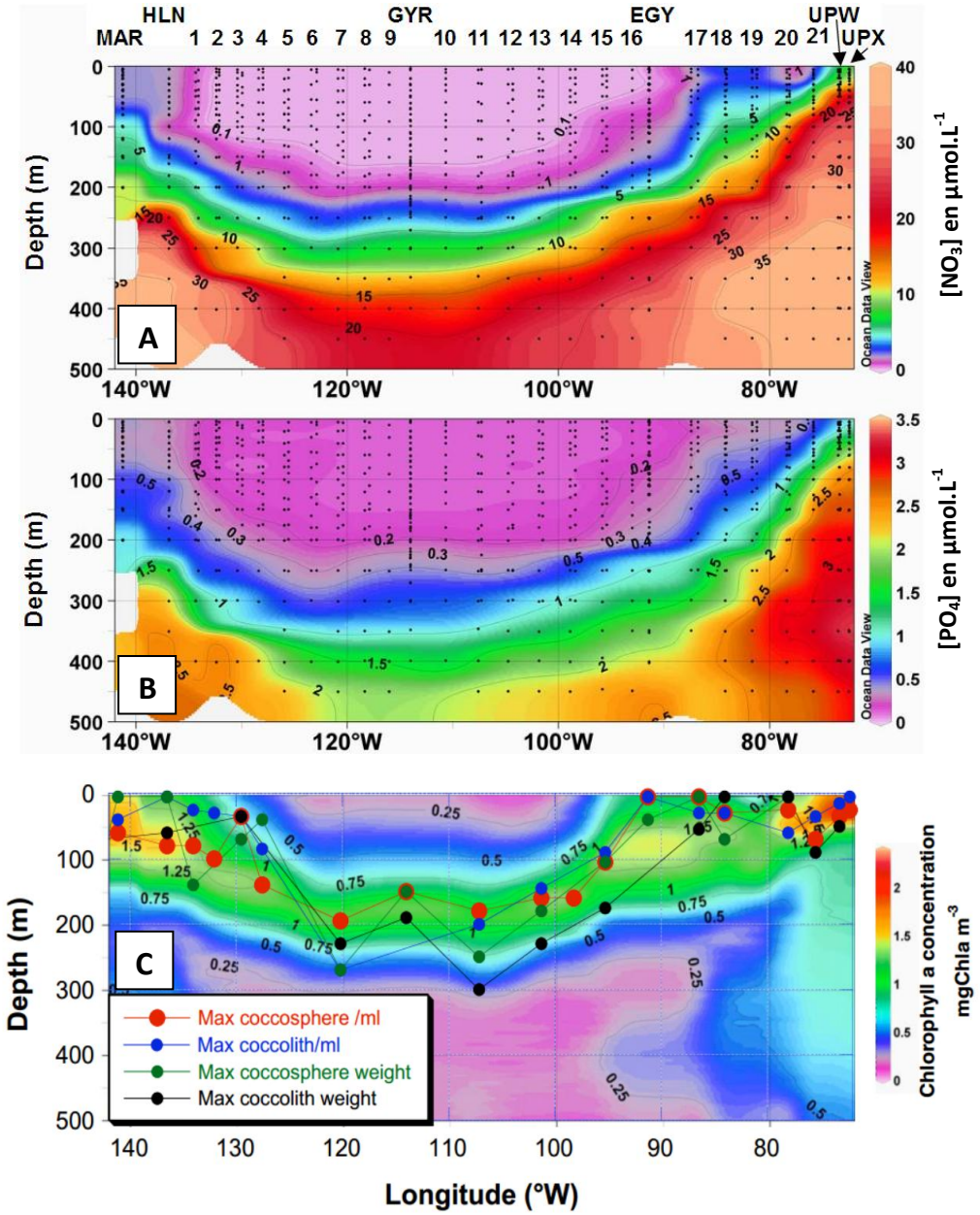


Figure V.2 : Caractéristiques nutritives et d'abondance en coccolithophoridés le long du transect BIOSOPE. (A) Concentration en nitrate, (B) en phosphate en µmol.L^{-1} et (C) concentration en chlorophylle a et maximum en biomasse et en abondance de coccosphères et coccolithes. Figures A et B prises de Claustre et al. (2008b) et figure C prise de Beaufort et al. (2008).

A la suite de cette description et concernant les nutriments étudiés dans la campagne BIOSOPE, notamment au centre de ce gyre, les parties suivantes s'intéresseront exclusivement à l'étude de l'effet du nitrate sur *E. huxleyi* dans ce transect BIOSOPE. L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier le comportement métabolique d'*E. huxleyi* dans ce gyre Pacifique-Sud en focalisant notre intérêt, dans une première partie, sur les conditions en nitrate et les conditions

d'intensité lumineuse, puis dans une deuxième partie en ajoutant les conditions en température et du système du carbone inorganique dissous.

2. Croissance potentielle d'*E. huxleyi* à la station GYR

L'objectif de cette partie est d'estimer le taux de croissance potentiel de l'espèce *E. huxleyi* sur un profil vertical à la station GYR (114.01° W, 26.06° S) du transect BIOSOPE, qui correspond à la position centrale du gyre, ou les conditions d'oligotrophie et de stratification sont les plus extrêmes (Claustre et al., 2008b). Pour parvenir à cet objectif, nous avons utilisé les paramètres physiologiques de l'expérience HL « forte lumière » et LN « limitée en nitrate » obtenus via le modèle de Droop (chapitre IV) appliqué aux expériences de cultures réalisées avec la souche RCC911 (chapitres I et III). De plus, la base de données de la campagne BIOSOPE[10] a été utilisée pour fournir les données nécessaires telles que la concentration en nitrate ou encore le coefficient d'atténuation de la lumière lié à la profondeur. Le modèle de calcul du taux de croissance physiologique d'*E. huxleyi* présenté ci-dessous a donc été forcé avec les données *in situ* des trois facteurs environnementaux considérés comme affectant le taux de croissance : le nitrate, l'irradiance et la température. Nous parlerons, dans la suite de cette partie, de taux de croissance *potentiel* car plusieurs processus ne seront pas considérés : les processus de broutage par le zooplancton, de mortalité et de sédimentation verticale des cellules dans la colonne d'eau qui ont l'effet de diminuer le taux de croissance *in situ* ; les processus de transport océanique qui redistribuent les cellules dans l'espace et contribuent à définir, avec les processus biologiques cités ci-dessus, la distribution spatio-temporelle du phytoplancton.

2.1 Méthode appliquée

2.1.1 Base de données utilisée pour la paramétrisation

Une base de données listant les données expérimentales de plusieurs expériences de cultures en laboratoire sur les coccolithophoridés a été initialement réalisée par Aloisi (2015). De cette base de données, seules les expériences conduites avec l'espèce *E. huxleyi* ont été utilisées dans ce chapitre. De plus, des filtres sur les conditions expérimentales ont été appliqués (voir Tableau V.1) et uniquement les expériences où les résultats tels que le taux de croissance et les taux métaboliques étaient disponibles ont été sélectionnées (voir annexe 3). Les filtres ont donc été appliqués aux différentes conditions expérimentales, exception faite pour le paramètre étudié et utile pour la paramétrisation. En effet, dans cette partie, cette base

[10] Site web de la base de données: http://www.obs-vlfr.fr/proof/vt/op/ec/biosope/bio.htm

de données a été utilisée afin de paramétrer les relations mathématiques reliant le taux de croissance aux trois variables environnementales citées précédemment, l'irradiance, la température et la concentration en nitrate. Le tableau en annexe 3 liste les expériences utilisées dans ce chapitre et permet de retrouver les références et les données expérimentales.

Tableau V.1 : Filtres appliqués à la base de données des expériences de cultures sur *E. huxleyi* de Aloisi (2015).

Catégories	Filtres	Application du filtre
Organisme	*Emiliania huxleyi*	Sur toutes les données
Type de cultures	Chemostat ou Batch (seulement dans le cas de non-limitation en nutriment)	
Salinité	29.7-35	
Ca^{2+}	9-10 $mmol.kg^{-1}$	
pCO_2	300-500 µatm	
Irradiance	150-300 µmol $photons.m^{-2}.s^{-1}$	Filtres définissant les conditions optimales de croissance[a]
Température	15°C	
NO_3/PO_4	optimales (NO_3 > 60 µM et PO_4 > 5µM)	

[a]= deux de ces filtres sont appliqués pour isoler un jeu de données qui permet d'étudier l'effet de la troisième condition environnementale sur la croissance d'*E. huxleyi.*

2.1.2 Calcul du taux de croissance potentiel

Le modèle de Droop, introduit dans le chapitre IV, calcule le taux de croissance en fonction du quota cellulaire de l'élément limitant, il n'est donc pas directement fonction de la concentration de cet élément. Pour adapter ce calcul du taux de croissance potentiel au profil de la station GYR où les données de nitrate sont disponibles, il a fallu exprimer le quota cellulaire Q_N en équilibre avec la concentration de NO_3. Pour ce faire, un système à trois équations de la théorie de Droop a été résolu. Les équations utilisées sont présentées dans la méthode du chapitre IV: l'équation de l'absorption en nutriment dépendant du temps R_{up} (équation IV-5), l'équation du taux de croissance µ dite ^{n}Quota (équation IV-6) et l'équation de la dérivée dans le temps du quota cellulaire interne de l'élément limitant Q_R (équation IV-9).

En considérant un état stationnaire où l'absorption de nitrate ambiant par la cellule est en d'équilibre avec son utilisation dans la cellule, et donc où la dérivée dans le temps du quota cellulaire d'azote est égale à zéro, le système peut être résolu pour exprimer le quota cellulaire Q_N en fonction de la concentration ambiante en nitrate:

$$Q_N = A \cdot (B + C) \tag{V-1}$$

$$A = \frac{1}{2 \cdot (1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot (K_N + [N])} \cdot \left(K_N \cdot (1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot Q_N^{\min}\right) \tag{V-2}$$

$$B = \left((1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot [N] \cdot Q_N^{\min}\right) + \left([N] \cdot S_{cell} \cdot V_{\max N}\right) \tag{V-3}$$

$$C = \sqrt{\begin{array}{l} 4(1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot [N] \cdot (K_N + [N]) \cdot \left(KQ_N \cdot Q_N^{\max} - (1 + KQ_N) \cdot Q_N^{\min}\right) \cdot S_{cell} \cdot V_{\max N} \\ + \left((1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot (K_N + [N]) \cdot Q_N^{\min} + [N] \cdot S_{cell} \cdot V_{\max N}\right)^2 \end{array}} \tag{V-4}$$

Le modèle introduit dans le chapitre précédent ne considère pas l'influence de la lumière sur le taux de croissance mais ne prend en compte que l'effet du quota cellulaire de l'élément limitant et donc indirectement de la concentration de cet élément. De par le gradient vertical d'irradiance à la station GYR, et sur tout le transect, la dépendance du taux de croissance (μ) vis-à-vis doit être définie. Celle-ci a été déterminée en utilisant des données de taux de croissance et d'irradiances des expériences de Langer et al. (2013); Rokitta and Rost (2012); Rost et al. (2002); Trimborn et al. (2007) et de celles présentées dans le chapitre III (voir annexe 3). Ces expériences ont étés conduites à des cycles jour : nuit différents. Du moment que la durée de la période éclairée des expériences influence le taux de croissance sur les 24h, une correction a du être faite pour pouvoir comparer les taux de croissances obtenues avec des cycles jours : nuits différents. Pour ce faire, les taux de croissance ont été corrigés au cycle jour : nuit des expériences avec l'équation de Rost et al. (2002) et pour un cycle jour de 12h :

$$\mu_i = \frac{\mu \cdot (L + D)}{(L - (D \cdot r))} \cdot 0.5 \tag{V-5}$$

Avec μ le taux de croissance en j^{-1}, L et D le nombre d'heures en jour et en nuit respectivement et r la perte de carbone dû à la respiration pendant la nuit (Laws and Bannister, 1980).

La relation entre le taux de croissance et l'irradiance a été représentée suivant l'équation de MacIntyre et al. (2002) (voir Figure V.3); et l'ajustement entre cette équation et les données a permis de définir le paramètre de saturation de la lumière pour la croissance K_{Irr} en µmol photons.m^{-2}.s^{-1} :

$$\mu = \mu_{\max}\left(1 - e^{\left(-Irr/K_{Irr}\right)}\right) \qquad \text{(V-6)}$$

Où K_{Irr} a été estimé ici à 154.7 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} avec un μ_{max} de 1.27 j^{-1} comme étant le taux de croissance maximal pour *E. huxleyi* trouvé avec l'estimation des paramètres physiologiques de Langer et al. (2013) et corrigé au cycle jour:nuit 16:8h pour le ramener à un cycle jour de 12h.

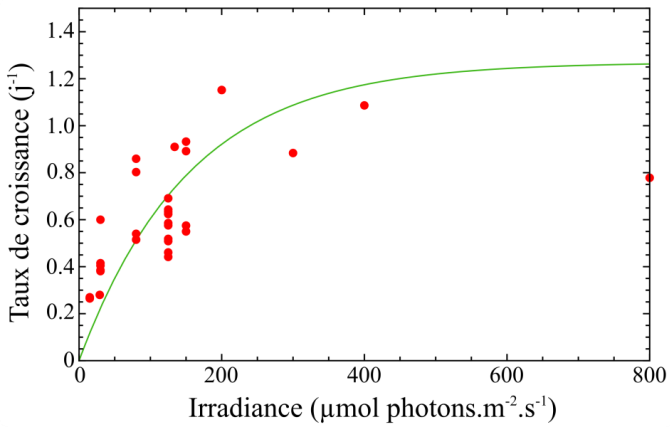


Figure V.3 : Taux de croissance instantané en fonction de l'irradiance pour l'espèce *E. huxleyi*. Les points rouges représentent les données. La ligne verte est le résultat de l'équation IV-6 paramétrée comme expliqué dans le texte.

Ainsi le taux de croissance peut être exprimé comme le taux de croissance maximal multiplié par deux termes (compris entre 0 et 1) : celui dépendant de la lumière et celui dépendant du quota cellulaire Q_N, qui correspond au terme de Droop (équation IV-6) paramétré avec l'expérience RCC911 en LL et LN (Tableau V.2):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{(1 + KQ_N)\cdot(Q_N - Q_N^{\min})}{(Q_N - Q_N^{\min}) + KQ_N \cdot (Q_N^{\max} - Q_N^{\min})} \cdot \left(1 - e^{\left(-Irr/K_{Irr}\right)}\right) \qquad \text{(V-7)}$$

Tableau V.2 : Valeurs des paramètres physiologiques estimés pour l'expérience RCC911 HL-LN.

RCC911 HL-LN	
V_{maxN} ($\mu mol.cell^{-1}.j^{-1}$)	1.05 x 10^{-7}
K_N ($\mu mol.L^{-1}$)	0.205
KQ_N	0.25
Q_N^{min} ($fmol.cell^{-1}$)	33.6
Q_N^{max} ($fmol.cell^{-1}$)	129.1

2.1.3 Données physico-chimiques utilisées pour le calcul du taux de croissance potentielle

Les données de concentration en nitrate ont été utilisées et récupérées sur la base de données BIOSOPE auquel un accès nous a été fourni. Elles ont donc permis le calcul du quota Q_N sur la colonne d'eau 0 à 250 m avec l'équation V-1.

Pour ce qui est de l'irradiance sur la verticale, les valeurs d'irradiance mesurées sont exprimées comme le PAR (« Photosynthetically active radiation ») normalisé à l'irradiance de surface. En utilisant le modèle présenté dans le chapitre II pour définir le cycle jour : nuit sur le transect, l'irradiance de surface a pu être calculée en intégrant le PAR sur une journée et en le moyennant sur 13h (nombre d'heures dans le cycle jour à la station GYR). Considérant une irradiance de surface d'environ 1274 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ correspondant à 100% du PAR, calculée en moyennant l'irradiance sur le cycle jour de BIOSOPE en utilisant le modèle permettant de définir le cycle jour:nuit présenté dans le chapitre II, l'irradiance absolue a été recalculée à chaque station. La base de données, fournissant le coefficient d'atténuation seulement à quelques profondeurs sur les 117 premiers mètres de la colonne d'eau, il a fallu interpoler les valeurs d'irradiance en utilisant la loi de Beer-Lambert (équation V-8), jusqu'à la dernière donnée disponible. Après la profondeur de 117 m, l'irradiance a été extrapolée en considérant un coefficient d'atténuation constant de 0.025 m^{-1} jusqu'à 250 m (Claustre et al., 2008). Pour ce faire, la loi de Beer-Lambert a été aussi utilisée :

$$I(z) = I_0 \cdot e^{(-K_d \cdot (z - z_o))} \qquad \text{(V-8)}$$

Avec I_0 la lumière incidente à la surface en µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$, z la profondeur en mètre où la valeur de la lumière est désirée, z_0 la profondeur d'arrivée de la lumière incidente et K_d le coefficient d'atténuation de la lumière en m^{-1}. Cette loi relie l'atténuation de la lumière aux

propriétés du milieu qu'elle traverse et à l'épaisseur traversée. Dans ce cas, l'eau de mer est le milieu en question et la colonne d'eau $z-z_0$ est l'épaisseur traversée par la lumière.
Les valeurs d'irradiance sur tout le transect ont ensuite été interpolées sur Ocean Data View et ont été exportées tous les 20 mètres.

Comme énoncé dans la partie précédente, le taux de croissance maximal utilisé est celui déterminé par l'estimation des paramètres physiologiques pour *E. huxleyi* dans le chapitre IV. Ce paramètre définissant les conditions de croissance optimale d'une espèce dans des conditions environnementales optimales (lumière optimale, nutriments non-limitants), le taux maximal estimé dans le chapitre précédent (en conditions de forte lumière) est le plus proche de la réalité. Ainsi ce paramètre a été fixé à 1.27 j^{-1} en le ramenant à un cycle jour de 12h.
Les données de NO_3 et d'irradiance ont été injectées dans le calcul de Q_N puis dans celui du taux de croissance potentiel d'*E. huxleyi* (équation V-7) sur la section verticale à la station GYR de la surface à 250 m de profondeur.

2.2 Taux de croissance potentiel estimé pour *E. huxleyi* à la station GYR

Les données de concentration en chlorophylle a et en nitrate, et d'irradiance sont représentées sur la Figure V.4A. Sur cette figure, nous pouvons observer que l'irradiance atteint des valeurs inférieures à 30 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ à partir de 150 m de profondeur, profondeur correspondant au début de la zone de DCM et de maximum de coccosphère par mL (représenté par la zone verte sur la Figure V.4). La concentration en chlorophylle a se trouve entre 0.023 mg Chl-a.m^{-3} à 5 m de profondeur, 0.21 mg Chl a.m^{-3} à 180 m et 0.08 mg Chl a.m^{-3} à 230 m. La concentration en chlorophylle de surface rejoint la concentration annuelle extrêmement faible reportée dans la partie 1.1 de ce chapitre de 0.019 mg Chl a.m^{-3} (Claustre et al., 2008b). En ce qui concerne la concentration en nitrate à la station GYR entre la surface et 250 m de profondeur, les concentrations restent nulles sur les 130 premiers mètres de la colonne d'eau puis commencent à augmenter pour atteindre une valeur détectable et mesurée à 160 m de 0.049 µmol.L^{-1} qui augmente au moins jusqu'à 3.59 µmol.L^{-1} à 240 m (dernier point de mesures visible sur la Figure V.4). Concernant le maximum de coccosphère par mL, après avoir fait l'hypothèse que la présence de ces coccosphères à une telle profondeur pouvaient être le résultat de la sédimentation de cellules vivant dans la couche supérieure, Beaufort et al. (2008) avancent que cette hypothèse n'est pas valable sachant, entre autre, que : 1) le maximum de coccosphère et la DCM se trouvent au même endroit et 2) la production dans la couche supérieure est trop faible pour soutenir une telle quantité de coccosphères à la profondeur de la DCM.

Le taux de croissance potentiel estimé à partir des calculs réalisés comme décrits ci-dessus, est représenté sur la Figure V.4B et les valeurs calculées varient de 0 à la surface, à un maximum de 0.056 j^{-1} à 172m et de 0.012 j^{-1} à 250 m. Ce maximum de croissance correspond à un temps de génération de 12 jours, suggérant un taux de division extrêmement faible (0.08 division par jour) associé aux variations en irradiance et concentration de nitrate. Il est important de préciser que ce taux de croissance estimé n'est pas totalement exhaustif car il ne dépend ici que de la lumière et de la concentration en nitrate et ne prend pas en compte le broutage de la part du zooplancton et la mortalité cellulaire. Cependant l'ajout de ces deux processus importants diminuerait le taux de croissance global d'*E. huxleyi* ce qui le rendrait d'autant plus faible. Le maximum de taux de croissance potentiel et la concentration en nitrate correspondant à la constante de demi-saturation pour l'assimilation du nitrate, estimée pour l'expérience en culture HL-LN et contraint avec le modèle de Droop, tombe au sein de cette DCM. Ceci suggère que notre approche combinée de culture en laboratoire, de modélisation physiologique à l'échelle cellulaire et de forçage avec des données *in situ* fournit un outil cohérent et performant pour étudier les facteurs qui contrôlent la distribution d'*E. huxleyi* dans cette zone clé de l'océan global.

La distribution verticale du nitrate dissous, de l'intensité lumineuse, de la concentration en chlorophylle a et du taux de croissance potentiel (sans mortalité) modélisé pour *E. huxleyi* supporte l'hypothèse d'une co-limitation nitrate et lumière dans cette niche profonde de coccolithophoridés (Figure V.4). Les cellules d'*E. huxleyi* seraient donc limitées par l'apport en nitrate en surface et limitées par la disponibilité en lumière en dessous de la DCM malgré une concentration en nitrate significative. Cependant il est important de noter que d'autres ressources nutritives inorganiques ou organiques pour *E. huxleyi* peuvent être disponibles pour les cellules et expliquer leur présence dans cette DCM. Si tel était le cas alors les profils verticaux des nutriments permettant la croissance d'*E. huxleyi* dans cet environnement suivraient exactement le même profil que celui des nitrates. *E. huxleyi* assimilera préférentiellement l'ammonium parmi les formes d'azote régénéré disponibles dans la colonne d'eau mais sa concentration, comme reportée dans la partie 1.2, est mesurée très faible par Raimbault et al. (2008) et donc ne semble pas être à l'origine de cette niche profonde.

Les résultats montrés dans la Figure V.4 sont en accord avec la théorie de Klausmeier and Litchman (2001), qui présentent un modèle numérique de compétition pour les nutriments et la lumière dans des eaux peu mélangées. Le but de leur étude est de mieux comprendre le dilemme souvent rencontré par le phytoplancton qui est de vivre dans des eaux où les gradients

de deux ressources essentielles sont contrastés: la lumière et les nutriments. Pour ce faire, ils ont élaboré un modèle dont les équations mathématiques décrivent les profils verticaux de la biomasse phytoplanctonique, des nutriments et de la lumière. Les variations de biomasse ont été définies par trois processus : la croissance, la perte et le mouvement ; et le taux de croissance du phytoplancton comme une fonction de la ressource limitante, de forme Michaelis-Menten. Leur travail prédit de façon théorique trois scénarios possibles de répartition verticale de la biomasse phytoplanctonique selon les conditions en lumière et en nutriments (Figure V.5). Dans ce contexte, il est important de rappeler que le gyre Pacifique-Sud a été étudié en détail pour ces eaux extrêmement claires et stratifiés (Claustre et al., 2008a).

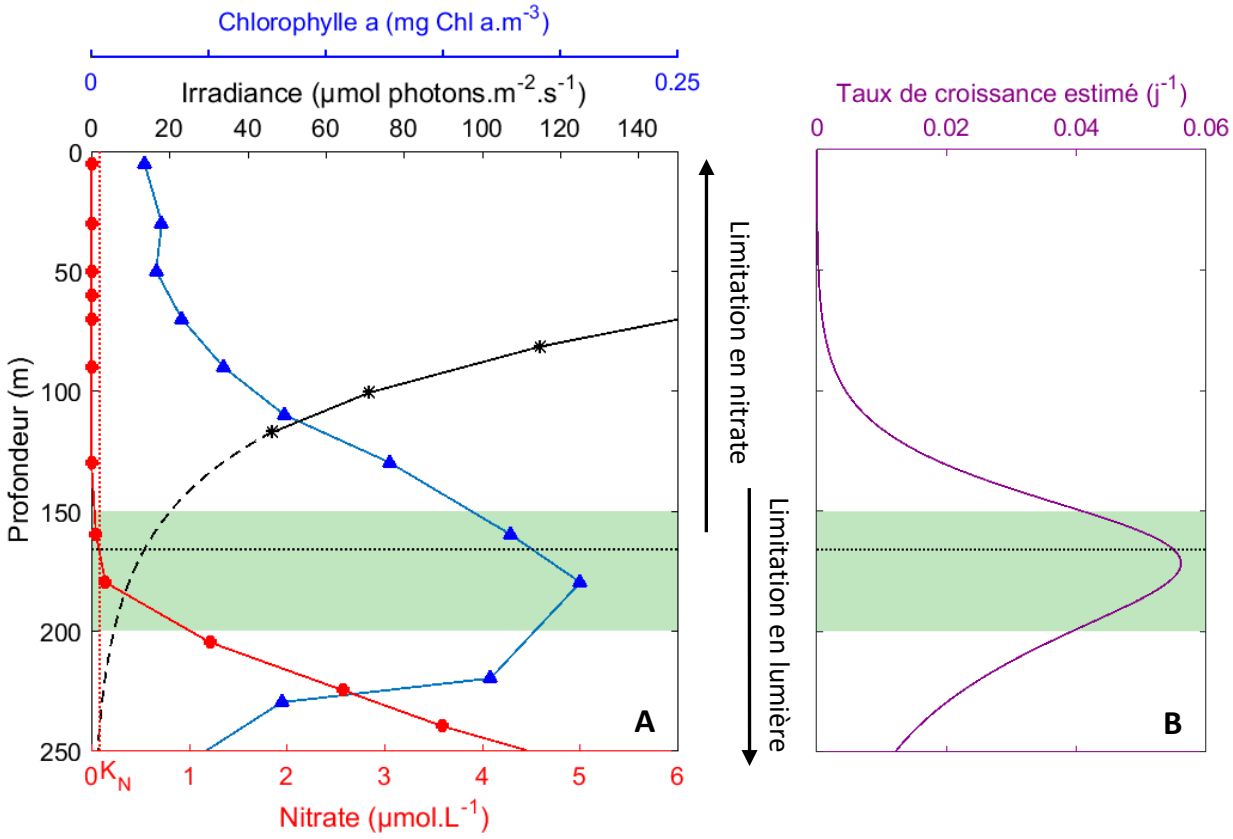


Figure V.4 : Taux de croissance d'*E. huxleyi* simulé à la station GYR. La zone verte correspond au maximum d'abondance de coccosphères relevé par Beaufort et al. (2008) entre 120° W et 107° W. (A) Profil vertical de la concentration en nitrate et en chlorophylle a et de l'irradiance issue des données (étoiles noires) et extrapolée entre 117 m et 250 m en considérant un coefficient d'atténuation constant K_d (K_d=0.025 m^{-1} de Claustre et al., 2008). La droite rouge en pointillés correspond à la valeur de K_N estimée à partir du modèle de Droop et la ligne noire en pointillés est la profondeur à laquelle on observe cette concentration. (B) Profil vertical du taux de croissance simulé pour *E. huxleyi* en considérant seulement les variations en nitrate et lumière dans la colonne d'eau de la surface à 250 m.

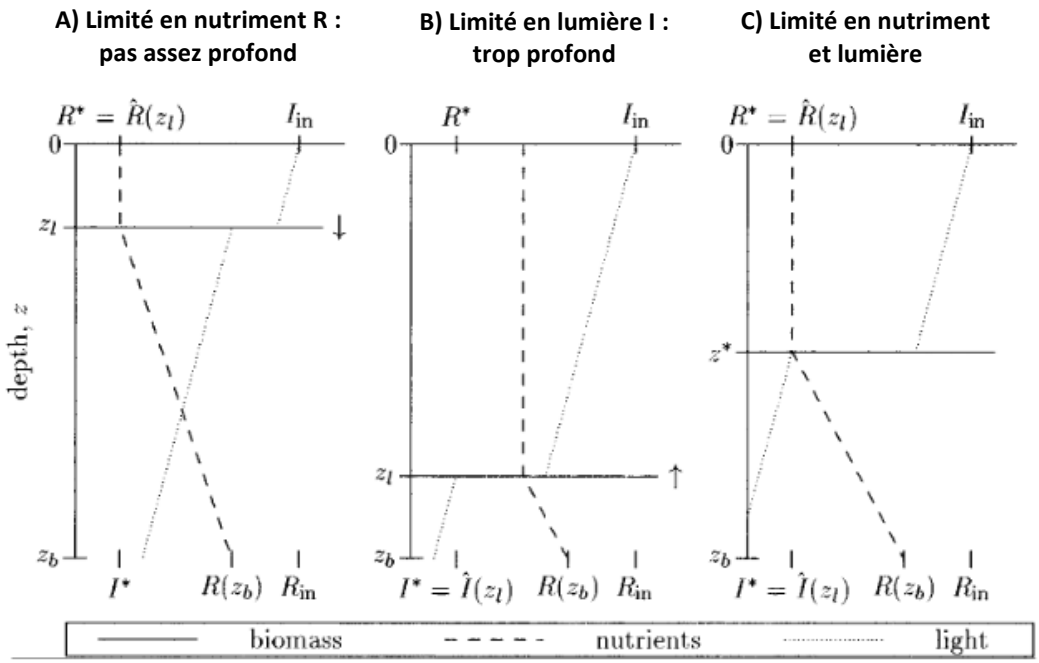


Figure V.5 : Equilibre de distribution des nutriments et lumière, donné à trois profondeurs z_l. (A) Croissance possible sous la couche limitée en nutriments car I > I*. (B) Croissance possible au-dessus de la couche limitée en lumière car R > R*. (C) Une couche limitée de façon équivalente pour les nutriments et la lumière empêchera la croissance dans le reste de la colonne d'eau, cette profondeur est nommée la profondeur de stratégie évolutive stable. R* : minimum de concentration pour le nutriment R, I* : niveau minimum de lumière, z_b : profondeur de la colonne d'eau, I_{in} : lumière atteignant la surface de l'eau, R_{in} : concentration du nutriment sur les sédiments. Figure prise dans Klausmeier and Litchman (2001).

Ces trois scénarios sont représentés par la Figure V.5 qui est issue de la publication citée précédemment : (1) un bloom de biomasse phytoplanctonique en surface si les nutriments remontent assez haut dans la colonne d'eau, (2) une communauté benthique si la lumière pénètrent assez profondément et (3) une fine couche de biomasse phytoplanctonique si les nutriments sont en quantité suffisante dans des eaux profondes de la colonne d'eau, cette profondeur correspond à la DCM. Ils définissent une profondeur de stratégie d'évolution stable qui se trouve être une profondeur à laquelle la biomasse est limitée de façon équivalente par la lumière et les nutriments et qui restreint la croissance phytoplanctonique dans le reste de la colonne d'eau. De nombreux processus affectant la distribution verticale de la biomasse n'ont pas été pris en compte dans ce modèle comme la distribution en oxygène, la photoinhibition, les turbulences verticales ou encore les apports en nutriments autres que verticaux. De plus, ce modèle considère une lumière incidente constante à la surface de l'océan et ne prend en

compte que la lumière et les nutriments comme limitation potentielle de la croissance phytoplanctonique. Malgré ces limitations évidentes du modèle réalisé par Klausmeier and Litchman (2001), notre travail montre que leur théorie explique bien les observations *in situ* dans le transect BIOSOPE et permet de mieux comprendre la formation de la DCM dans l'océan. Nous avons donc pu, avec notre approche, valider de façon indépendante le modèle de Klausmeier and Litchman (2001), avec des données biologiques et un fort lien avec une situation réelle.

La détermination des taux de croissance *in situ* du phytoplancton dans les eaux naturelles n'est pas vraiment répandue et semble complètement inconnue pour l'espèce *Emiliania huxleyi.* Ce manque de données peut être due, en partie, à la complexité inhérente aux mesures de taux de croissance *in situ* (Laws, 2013). En effet, ces mesures nécessitent l'échantillonnage d'eau de mer dans du matériel propre et exempt de tous métaux traces (mis en évidence dans les années 1980 ; Laws, 2013), présentant un stress toxique pour le phytoplancton notamment dans des eaux oligotrophes. De plus, la détermination du taux de croissance *in situ* se fait par le biais d'incubations à bord, parfois en utilisant un marquage au carbone 14 comme méthode de marquage des pigments et nécessite la détermination du taux de mortalité du au broutage (Laws, 2013; Marañón et al., 2000). Selph et al. (2011) ont estimé des taux de croissance pour la communauté phytoplanctonique dans le Pacifique équatorial entre 110° and 140°W. Ils ont estimé des taux de croissance aux alentours de 0.3 j^{-1} pour la communauté vivant en dessous de 1% de l'irradiance de surface et des taux de croissance nets (en prenant en compte la mortalité) similaires.

Pour conclure, la station GYR du transect BIOSOPE unique pour son minimum de chlorophylle en surface, ses nutriclines profondes et ses eaux extrêmement claires, est caractérisée de plus par une limitation en nitrate jusqu'à une profondeur de 150-160 m et par une limitation intense de la disponibilité en lumière à partir de 150 m où la lumière est déjà inférieure à 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. En parallèle des profils verticaux de ces deux ressources essentielles, le taux de croissance potentiel (sans terme de mortalité) estimé à cette station pour *E. huxleyi* montre un maximum cohérent avec la DCM, où le nitrate se trouve en concentration détectable et où la lumière est aux alentours de 1 % de l'irradiance de surface. Ces résultats sont tout à fait en accord avec la théorie de Klausmeier and Litchman (2001).

3. *E. huxleyi* le long du transect BIOSOPE (article en préparation)

Simulation of the potential growth and calcification rates of Emiliania huxleyi in the South Pacific Gyre: combining physiological modeling at the cellular scale with in situ biogeochemical data

L. Perrin[1] and G. Aloisi[2]

[1]Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06 -CNRS-IRD-MNHN, LOCEAN-IPSL, 75252 Paris, France.
[2]LOCEAN, UMR 7159, CNRS-UPMC-IRD-MNHN, 75252 Paris, France.

Résumé en français

L'étude des niches profondes de coccolithophoridés et de leur contribution à la biogéographie de ce groupe phytoplanctonique dans l'océan global est encore mal comprise. La profondeur optique des satellites ne permettant pas de détecter ces niches profondes et de fournir des informations sur le profil vertical de distribution de coccolithophoridés, l'étude de ces niches requiert des observations *in situ*. De plus, en tant que groupe majeur dans l'exportation de carbonate vers l'océan profond, la compréhension de l'effet des conditions environnementales sur les taux métaboliques de cet organisme est primordiale afin d'en améliorer notre connaissance globale. Le gyre Pacifique-Sud est l'un des plus oligotrophes des gyres subtropicaux mondiaux et a été largement étudié par la campagne BIOSOPE en 2004. Ce travail fournit une estimation qualitative du taux de croissance et de calcification de l'espèce *E. huxleyi* dans la niche profonde et le long du transect BIOSOPE, comme ils sont affectés par la disponibilité en lumière et nitrate, et par la température et le système du carbone inorganique dissous. Ces estimations ont été obtenues en combinant les résultats d'un modèle physiologique à l'échelle cellulaire, contraints par des expériences de cultures avec *E. huxleyi*, des relations empiriques entre les taux métaboliques et les variables environnementales, et les données biogéochimiques *in situ* de la campagne BIOSOPE. Nous avons donc obtenu une vision générale du contrôle potentiel exercé par les conditions environnementales, considérées dans ce travail, sur le taux de croissance et de calcification d'*E. huxleyi* le long du transect BIOSOPE.

Abstract

The investigation of deep-dwelling coccolithophore communities and of their contribution to coccolithophores biogeography in the global ocean is poorly understood. These studies need *in situ* observations because the optical depth of satellite prevents to obtain vertical information on coccolithophores below this depth. Furthermore, as coccolithophores are one of

the most important exporters of carbonate to deep ocean, understanding how their metabolic rates depend on environmental conditions is primordial to improve the global knowledge of this phytoplanktonic group. The South Pacific Gyre is the most oligotrophic gyre of the world ocean and was extensively investigated during the BIOSOPE cruise in 2004. This work gives a qualitative estimation of the growth and calcification rates of the species *Emiliania huxleyi* in this deep niche and along the BIOSOPE transect, as they are affected by availability of nitrate and light, by temperature and by the dissolved inorganic carbon system. These estimates were obtained combining physiological modelling at the cellular level, constrained by *E. huxleyi* culture experiments, empirical relations between metabolic rates and environmental variables and *in situ* biogeochemical data from the BIOSOPE cruise. We obtain an overall picture of how growth and calcification rates of *E. huxleyi* are potentially controlled by environmental conditions that we considered in this work along the whole BIOSOPE transect.

A. Introduction

Coccolithophores are unicellular, calcifying marine algae that are major contributors to the oceanic carbon cycle via their cellular processes of photosynthesis (a CO_2 sink) and calcification (a CO_2 source). Coccolithophores are known for their capacity to form large blooms visible by satellites (Holligan et al., 1993; Loisel et al., 2006) and frequently placed in subarctic regions (Holligan et al., 1993b; Winter et al., 1994). Coccolithophore communities have been reported many times in the different oligotrophic gyres in global ocean (Beaufort et al., 2008; Haidar and Thierstein, 2001; Okada and McIntyre, 1979). These communities have been reported in significant abundance in deep waters where the concentration of nutrients is sufficient to support growth and where the light is still available to allow photosynthesis (Brand, 1994). These deep-dwelling coccolithophore communities are not detected by satellite imagery (Henderiks et al., 2012; Winter et al., 2014) and the factors that control their development are seldom investigated (Poulton et al. 2016). Nevertheless, they could represent a non-negligible portion of the coccolithophore stock in portions of the ocean, as reported in the Bermuda (North Atlantic) and in the coast of Puerto Rico (North Atlantic) by Haidar and Thierstein (2001) or Jordan and Winter (2000), respectively.

Deep-dwelling coccolithophores are present in the global ocean especially in subtropical gyres where oligotrophic conditions prevent the growth of phytoplankton and are characterized by really low chlorophyll-a surface concentrations (McClain et al., 2004). Okada and McIntyre (1979) observed deep-dwelling coccolithophores in the North Atlantic Ocean down to a depth of 100 m with coccolithophore assemblages dominated by the species *Florisphaera profunda* in

summer and by the species *E. huxleyi* for the rest of the year. Cortés et al. (2001) and Haidar and Thierstein (2001) observed coccolithophore deep populations, respectively in the subtropical gyres in the Central North Pacific Gyre (station ALOHA) and in the Sargasso Sea (North Atlantic Ocean), dominated by *F. profunda* in the lower photic zone (LPZ > 100 m). In the north-east Caribbean, Jordan and Winter (2000) reported deep dwelling coccolithophores dominated by *F. profunda* in the LPZ but also reported a high abundance and co-dominance of *E. huxleyi* and *G. oceanica* through the water column down to the top of the LPZ. The coccolithophore assemblage in this deep niche is dominated by coccolithophore species belonging the Noëlaerhabdaceae family: *Emiliania huxleyi*, and several species of G*ephyrocapsa* and *Reticulofenestra* (Beaufort et al., 2008).

The South Pacific-Gyre is the most oligotrophic gyre of the world ocean (Claustre and Maritorena, 2003) and remained poorly explored before the BIOSOPE cruise (Claustre et al., 2008b). This cruise took place in 2004 from the Chilean upwelling zone, crossing the middle of the gyre, to the Marquesas Island (Claustre et al., 2008b). The main goal of this cruise was to study the bio-optical properties of the gyre and the biogeochemistry of this oligotrophic ecosystem (Claustre et al., 2008b). A deep niche of coccolithophores has been reported at about 200 m depth at the center of this South-Pacific Gyre by Beaufort et al. (2008), which corresponds to the depth of the isoline of nitrate and phosphate concentrations. According to Claustre et al. (2008b), this coccolithophore community was observed at very low irradiance levels (<20 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) with dissolved nitrate (NO_3) and phosphate (PO_4) concentrations of about 1 µM and 0.2 µM, respectively.

Investigating environmental controls on growth rates (e.g. Buitenhuis et al., 2008; Daniels et al., 2014; Lecourt et al., 1996) and calcification rates (e.g. Langer et al., 2007; Nimer and Merrett, 1993; Poulton et al., 2014) of *E. huxleyi* is key in better understanding the physiology and distribution of this species. The study of these metabolic rates is also important for building scenarios of how coccolithophores will be affected by environmental change. Therefore, the *in situ* determination of growth and calcification rates of this species is scarce and the generalization of laboratory cultures to field ocean need to be apply with caution.

In this work, we propose an empirical relation between growth and calcification rates, and temperature, irradiance and nitrate concentration. The inorganic carbon system (DIC) was also considered for the calcification rate estimation. Several studies (e.g. Aloisi, 2015; Langer et al., 2009 and Buitenhuis et al., 1999) reported that the growth rate of *E. huxleyi* for numerous strains will not be affected significantly with an elevation of CO_2 within a range expected for future climate change. Instead of the DIC system, the growth rate of *E. huxleyi* is affected by

other environmental factors such as temperature (Buitenhuis et al., 2008; Fielding, 2013), light (Trimborn et al., 2007) and nutrients concentrations (Riegman et al., 2000). Previous studies (Hoppe et al., 2011; Langer et al., 2009; Raven and Crawfurd, 2012) highlight the different responses of *E. huxleyi* to the dissolved inorganic carbon system to the calcification. However, numerous studies showed that changes in carbonate chemistry can generate malformations of coccoliths (De Bodt et al., 2010; Langer et al., 2006; Riebesell et al., 2000). Numerous culture works also show the effect of light, temperature and nutrients on metabolic rates of coccolithophores which includes calcification rates. These calcification and growth metabolic rates are controlled by environmental conditions and their estimation via a numerical approach is still not widely studied because the intra species-specific response observed in several studies for calcification rate is a non-negligible limit to this estimation.

In the present work we couple laboratory experiment, physiological modeling at the cellular level and field biogeochemical data to investigate the controls on growth and calcification rates of *E. huxleyi* in the South Pacific gyre. We use results of laboratory experiments with an *E. huxleyi* BIOSOPE strain (Perrin et al., 2016), and with other strains (Buitenhuis et al., 1999; Fritz, 1999; Rokitta and Rost, 2012; Rosas-Navarro et al., 2016; Sett et al., 2014), to parameterize (1) a growth-environment and (2) a calcification-environment mathematical relation. These models are forced with *in situ* data of irradiance, temperature, nitrate concentration and DIC system providing vertical transects of modeled potential growth rate and calcification rate.

B. Materials and methods

In this section we describe the growth and calcification models that were applied along the whole BIOSOPE transect. The variables needed to run this model are the nitrate concentration, the irradiance, the temperature and the DIC system. These data were obtained by interpolating nitrate, temperature, irradiance and DIC data downloaded from the BIOSOPE database (http://www.obs-vlfr.fr/proof/vt/op/ec/biosope/bio.htm) and manipulated with the software Ocean Data View (ODV) to obtain data on a spaced grid (Longitude-Latitude-Depth). The longitude and latitude comes from the BIOSOPE database and the variables were exported every 20 m between the surface and a depth of 300 m.

The relationships between each variable and the growth and calcification rates were defined by parametrizing simple growth and calcification models using a database of experimentally determined growth and calcifications rates measured under a range of environmental conditions relevant to our field situation. This parameterization was needed to

fix the constants of each equation. To achieve this task, a database of results of cultures experiments carried out on *E. huxleyi* was used. This database is composed of a subset of the experiments reported in the database presented in Aloisi (2015) which includes a large part of laboratory culture experiments carried out on coccolithophores physiology. In order to parametrize the relationships between the growth rate with irradiance and temperature and between calcification rate with irradiance, temperature and nitrate, some filters to the *E. huxleyi* database were applied to select comparable data and isolate changes of one parameter at a time (see Table 1). These filters are referenced in the Table 1. Obviously, the studied parameter had no filter for his own parameterization and only chemostat cultures were used for nitrate dependence study to avoid problems mentioned in Langer et al. (2013). The data are presented in the appendix 3.

Table 1 : Filters applied to the database of coccolithophores cultures.

Categories	Filters	Filters application
Type of cultures	Chemostat or Batch (only for nutrient non-limited conditions)	All data
Salinity	29.7-35	
Ca^{2+}	9-10 mmol.kg^{-1}	
pCO_2	300-500 µatm	
Irradiance	150-300 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}	Filters definig the optimal conditions of growth[a]
Temperature	15°C	
NO_3/PO_4	optimal (NO_3 > 60 µM et PO_4 > 5µM)	

[a]= two of these filters were applied to isolate data in order to study the effect of the third environmental condition on the growth of *E. huxleyi.*

Because of the diversity of the light:dark (L:D) cycle conditions used in the experiments included in the dataset (appendix 3), growth rate for the determination of K_{Irr} and calcification rate taken from the database were corrected to their own light:dark cycle using the equation of Rost et al. (2002) (Eq. 1) and normalized to a 12:12 L:D cycle:

$$\mu_i = \frac{\mu \cdot (L + D)}{(L - (D \cdot r))} \cdot 0.5$$

(1)

Where µ is the growth rate (or calcification rate) used in a given experiment, L the light cycle in hours, D the dark cycle in hours and r is the loss carbon by respiration during the dark cycle.

The parameterized growth and calcification models were then forced using *in situ* data of irradiance, temperature and nitrate concentration obtained along the BIOSOPE transect, exported and interpolated along the grid.

A.1 Environmental variables from the BIOSOPE transect

Irradiance

The BIOSOPE database provided us attenuation coefficient values (C_p) and irradiance values for approximately the first 100 m of the water column. The *in situ* irradiance was directly measured and given as a photosynthetically active radiation (PAR) normalized underwater irradiance. The surface irradiance was estimated via an irradiation model presented in Aloisi (2008) which used fundamental equations described by Campbell and Norman (1998). This model allows calculating the daily cycle of the Photosynthetic Active Radiation (PAR) at every date and geographic position on earth as a function of the astronomic and atmospheric parameters. Then, the irradiance was integrated on one entirely day and averaged by the number of hours in the light cycle. The determined surface irradiance was 1274 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} and is therefore matching with the 100% of PAR normalized underwater irradiance; the absolute *in situ* irradiance was estimated.

The irradiance was interpolated along the first 100 m of the water column and then was extrapolated on the deeper waters using a constant attenuation coefficient of 0.025 m^{-1} and using the Beer-Lambert law for the irradiance:

$$\mathrm{I(z)} = \mathrm{I}_0 \cdot e^{(-K_d \cdot (z - z_o))} \quad (2)$$

This process was repeated for each station where measurements of PAR were done, interpolated on ODV (Figure V.6A) and exported to the grid cited above (Longitude-Latitude-Depth).

Temperature, nitrate and DIC system

The temperature data and nitrate concentration data were obtained from the BIOSOPE database and were interpolating using ODV (Figure V.6B and C) and exported on the grid.

To calculate the calcification rate with the equation of Bach et al. (2015) (see Eq. 15), the concentration of HCO_3^-, CO_2 and H^+ are necessary. These three variables were calculated from total alkalinity (TA), total carbon (TC), temperature, pressure and salinity (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001) as explained in the Supplementary material (Table S1). Concentrations of HCO_3^-, CO_2 and H^+ were determined by this model, interpolated in ODV and exported on the grid as

other variables. Pressure of carbon dioxide (see Figure V.6) was also calculated by the model and exported on the grid after the ODV interpolation.

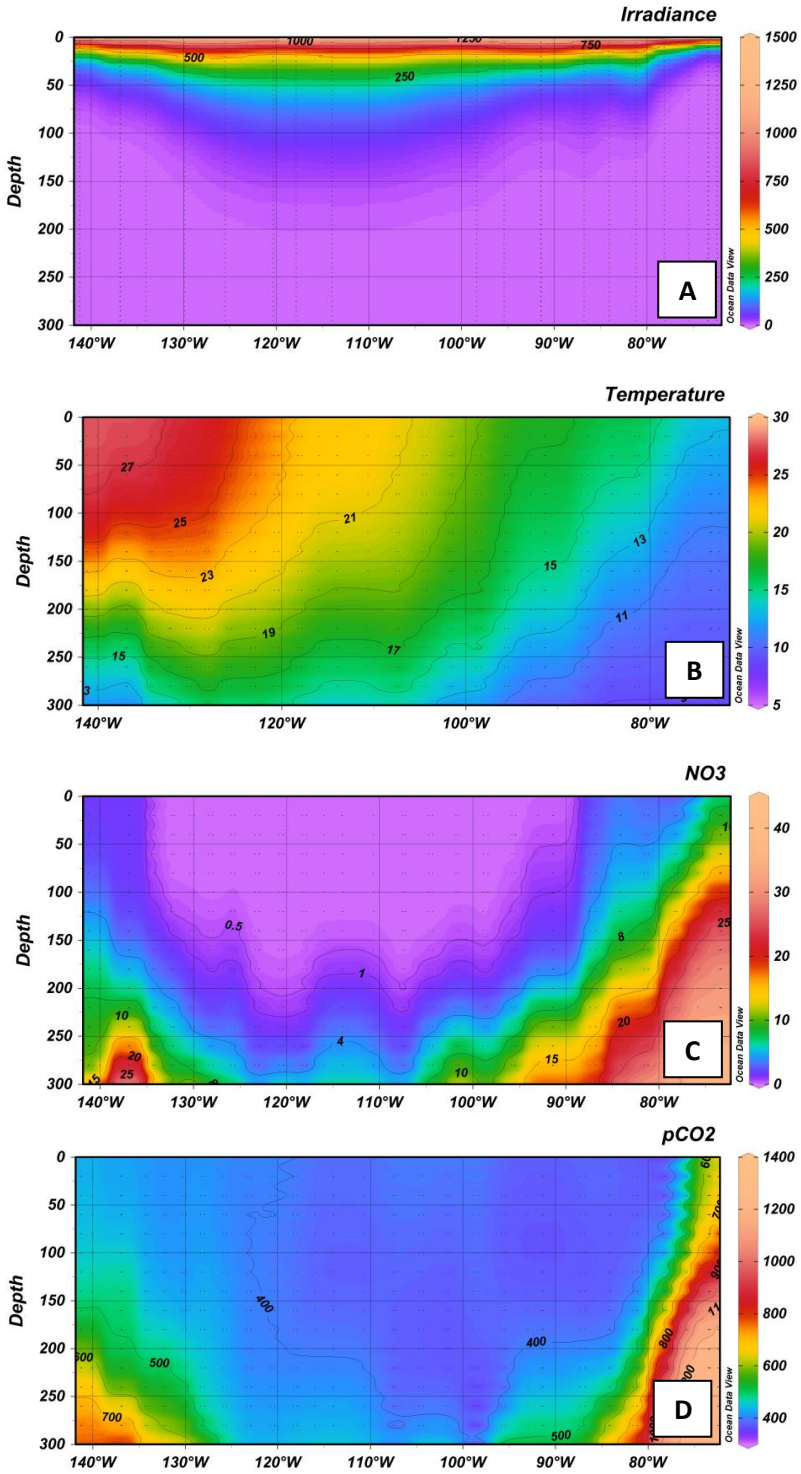


Figure V.6: Environmental variables along the BIOSOPE transect. (A) Irradiance in µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, (B) Temperature in °C, (C) Nitrate concentration in µmol.L^{-1} and (D) Carbon dioxide pressure in µatm.

A.2 Empirical relationships for the dependence of metabolic rates on environmental conditions

a) Dependence of the growth rate on irradiance, temperature and nitrate

To estimate the potential *in situ* growth rate of *E. huxleyi* along the BIOSOPE transect, it was necessary to obtain a quantitative description of how the growth rate depends on environmental variables (nitrate, irradiance and temperature).

Concerning the light dependence of the growth rate, the light saturation (K_{Irr}) was determined by fitting the growth rate, determined in several experiments of Langer et al. (2013); Rokitta and Rost (2012); Rost et al. (2002); Trimborn et al. (2007) et Perrin et al. (2016) to the following equation from MacIntyre et al. (2002). The data were previously corrected to the Rost et al. (2002) (Eq. 1). This equation describes the empirical relation between growth rate and irradiance for microalgae and cyanobacteria (Figure V.7):

$$\mu = \mu_{\max}\left(1 - e^{\left(-Irr/K_{Irr}\right)}\right) \tag{3}$$

The estimated value of K_{Irr} was 154.7 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} with a μ_{max} of 1.27 d^{-1}.

To obtain the growth rate as a function (ranged between 0 and 1), the growth rate was normalized to the μ_{max} obtained by the fitting of the data to the equation 3. The function was therefore:

$$f\mu_{Irr} = \left(1 - e^{\left(-Irr/K_{Irr}\right)}\right) \tag{4}$$

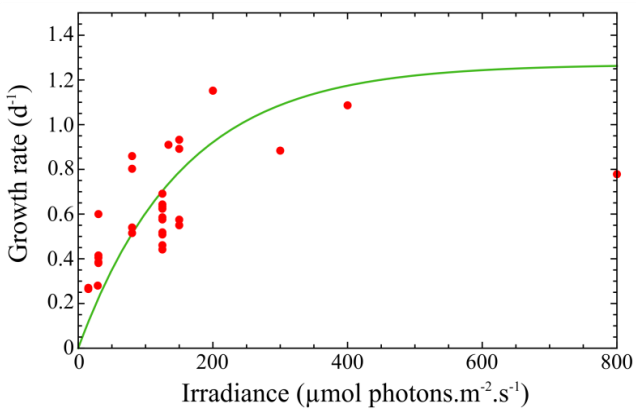


Figure V.7 : Dependence of the growth rate to the irradiance for *E. huxleyi*.

The temperature and growth rate of the experiments of Buitenhuis et al. (2008), Langer et al. (2013) and Perrin et al. (2016) were used to find the optimal temperature for *E. huxleyi* using the data of the non limited experiment. This data were corrected to their own L:D cycle using Eq. 2. Schoemann et al. (2005) defined the growth rate as a function of temperature using an optimal temperature (Eq. 5):

$$\mu = \mu_{opt} \cdot e^{\left(-(T-Topt)^2 / dT^2 \right)} \tag{5}$$

By fitting this equation to the data (see Figure V.8), the optimal temperature (T_{opt}) was estimated to 19.2°C, the optimal growth rate (μ_{opt}) was estimated to 1.26 d^{-1} and the interval temperature dT was estimated to 8.69 °C.

As for the irradiance, the dependence of the growth rate to the temperature was expressed as a normalized function to the μ_{opt} determined previously (Eq. 6):

$$f\mu_T = e^{\left(-(T-Topt)^2 / dT^2 \right)} \tag{6}$$

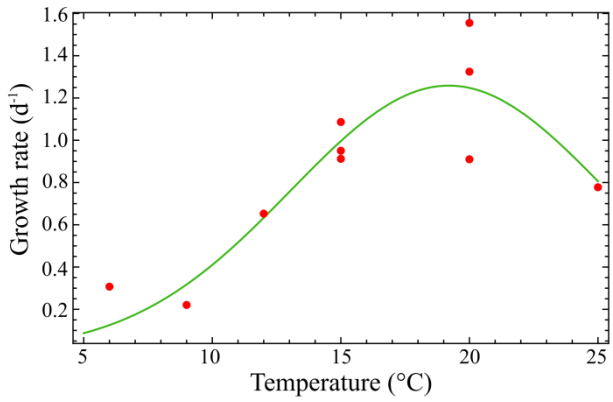


Figure V.8 : Dependence of the growth rate to the temperature for *E. huxleyi*.

The Droop model linked the growth rate to the cellular quota of nutrient which means that growth rate is not directly a function of the nitrate concentration. To obtain this cellular quota of nitrogen along the whole transect, the dependence of the cellular quota of nitrogen to the nitrate concentration was needed. This relation was found resolving a system of three equations from the Droop theory: the derivation of the cellular quota Q_N through the time (Eq. 7), the nitrate uptake rate N_{up} (Eq. 8) and the growth rate μ (Eq. 9) which was calculated based on the normalized ^{n}Quota equation reported in Flynn (2008):

$$\frac{dQ_N}{dt} = N_{up} - \mu \cdot Q_N \tag{7}$$

$$N_{up} = S_{cell} \cdot V_{\max N} \cdot \frac{[N]}{[N] + K_N} \tag{8}$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{(1 + KQ_N) \cdot (Q_N - Q_N^{\min})}{(Q_N - Q_N^{\min}) + KQ_N \cdot (Q_N^{\max} - Q_N^{\min})} \tag{9}$$

where S_{Cell} (in µm^2) is the surface area of the cell, V_{maxN} (in µmol$_N$.µm^{-2}.d^{-1}) is the maximum surface-normalized nutrient uptake rate, *[N]* is the nitrate concentration (in µmol.L^{-1}), K_N (in µmol.L^{-1}) is the (Michaelis-Menten) half-saturation constant for uptake of nitrate, μ_{max} (in d^{-1}) is the maximum growth rate attained at the maximum nitrogen cell quota Q_N^{max} (in µmol.cell^{-1}), Q_N^{min} (in µmol.cell^{-1}) is the minimum (subsistence) cellular quota of nitrogen N below which growth stops and KQ_N is a dimensionless parameter that can be readily compared between nutrient types (Flynn, 2008a).

Considering a stationary state with equilibrium between uptake and assimilation of nitrogen and thus assuming the equation 7 equal to zero, the three equations system was resolved and the relation between the cellular quota Q_N and the nitrate concentration was expressed as follow:

$$Q_N = A \cdot (B + C) \tag{10}$$

$$A = \frac{1}{2 \cdot (1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot (K_N + [N])} \cdot \left(K_N \cdot (1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot Q_N^{\min}\right) \tag{11}$$

$$B = \left((1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot [N] \cdot Q_N^{\min}\right) + \left([N] \cdot S_{cell} \cdot V_{\max N}\right) \tag{12}$$

$$C = \sqrt{\begin{array}{l} 4(1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot [N] \cdot (K_N + [N]) \cdot \left(KQ_N \cdot Q_N^{\max} - (1 + KQ_N) \cdot Q_N^{\min}\right) \cdot S_{cell} \cdot V_{\max N} \\ + \left((1 + KQ_N) \cdot \mu_{\max} \cdot (K_N + [N]) \cdot Q_N^{\min} + [N] \cdot S_{cell} \cdot V_{\max N}\right)^2 \end{array}} \tag{13}$$

As for the irradiance and temperature, the dependence of the growth rate to the nitrate concentration (Figure V.9) was expressed as a normalized function between 0 and 1 using the μ_{max}:

$$f\mu_{NO3} = \frac{(1 + KQ) \cdot (Q_N - Q_N^{\min})}{(Q_N - Q_N^{\min}) + KQ \cdot (Q_N^{\max} - Q_N^{\min})} \tag{14}$$

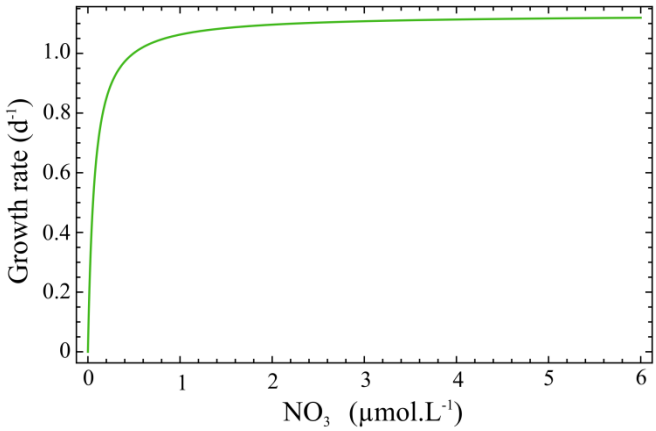


Figure V.9 : Dependence of the growth rate to the nitrate concentration for *E. huxleyi*.

In final calculation, physiological parameters were needed and were determined for *E. huxleyi* in high light and low nitrate conditions in the paper of Perrin et al. (2016) using a simple Droop model and reported in the Table 2.

Table 2 : Physiological parameters for the *E. huxleyi* experiments carried out by Perrin et al. (2016) in high light and low nitrate conditions.

RCC911 HL-LN	
V_{maxN} ($\mu mol.\mu m^{-2}.j^{-1}$)	1.64×10^{-9}
K_N ($\mu mol.L^{-1}$)	0.205
KQ_N	0.25
Q_N^{min} ($\mu mol.cell^{-1}$)	33.6×10^{-9}
Q_N^{max} ($\mu mol.cell^{-1}$)	129.1×10^{-9}

b) Dependence of the calcification rate on DIC, irradiance, temperature and nitrate

As described in the introduction of this paper, changes in the inorganic carbon system have an intra-species-specific response for *E. huxleyi* and numerous studies investigated these responses in laboratory cultures. The review of Raven and Crawfurd (2012) gives a wide view of the effect of inorganic carbon system changes on calcification rates of *E. huxleyi.* Globally, numerous studies showed that changes in carbonate chemistry can generate malformations of coccoliths (De Bodt et al., 2010; Langer et al., 2006; Riebesell et al., 2000). The goal, here, was to determine a calcification estimation through the BIOSOPE transect using an equation defining the DIC, light, temperature and nitrate dependence on calcification rates of *E. huxleyi*. The

database of culture experiments presented previously was used to study the dependence of calcification rate on light, temperature and nitrate. The data used from the database were selected in studies of Müller et al. (2011); Rost et al. (2002) and Trimborn et al. (2007) for the irradiance; in Sett et al. (2014) and Rosas-Navarro et al. (2016) for the temperature and we used only data from Fritz (1999) for nitrate.

The equation of Bach et al. (2015) was used to define the dependence of the calcification rate to the DIC system: three variables as bicarbonate ion HCO_3^-, carbon dioxide CO_2 and protons H^+ support respectively the direct dependence of calcification rate to the kinetic reaction of HCO_3^-, the minimum requirement of CO_2 to influence the calcification rate and the linear relation between the inhibition of calcification rate and the increase in protons H^+ concentration in seawater. This concept is called by Bach et al. (2015) "substrate-inhibitor concept" and gives a relative calcification rate depending of the carbon system:

$$fRCa_{DIC} = \frac{a\left[HCO_3^-\right]}{b+\left[HCO_3^-\right]} - e^{-c[CO_2]} - d\left[H^+\right] \tag{15}$$

According to Dodds et al. (1999), the photosynthesis–irradiance (P-I) curve is typically increasing and then decreasing by a photoinhibition effect at high irradiance after reaching an optimum photosynthesis rate. Zondervan (2007) and van Bleijswijk et al. (1994) reported the same pattern for the PIC/POC-irradiance curve. As the photosynthesis, the energy dependence of the calcification could also bring the calcification rate to have the same behavior with different light intensity. Therefore the equation of photosynthesis defined by Platt et al. (1980) and used by Dodds et al. (1999) can be applied to the calcification rate estimation through the BIOSOPE transect. The equation used for the calcification rate is therefore:

$$RCa_{Irr} = Ca_s \cdot \left(1 - e^{\left(\frac{-\alpha Irr}{Ca_s}\right)}\right) \cdot e^{\left(\frac{-\beta Irr}{Ca_s}\right)} \tag{16}$$

Where Ca_s is the maximum calcification in the absence of photoinhibition under optimal light in Dodds et al. (1999), α is the slope of the line at low light and β is the photoinhibition constant.
The data were obtained from cultures experiments of Müller et al. (2011); Rost et al. (2002) and Trimborn et al. (2007), and were corrected to their own L:D cycle using Eq. 1. The parameterization allows determining the value of p_s, α and β by fitting the equation 7 to the data (Figure V.10). This parameterization fixed C_s to 12 $pg.cell^{-1}.d^{-1}$, α to 0.152 $pg.cell^{-1}.d^{-1}.[\mu mol.m^{-2}.s^{-1}]^{-1}$ and β to 0.0286 $pg.cell^{-1}.d^{-1}.[\mu mol.m^{-2}.s^{-1}]^{-1}$. Then the calcification rate was

normalized to the maximum of calcification rate given by the fit of the equation to the data (7.14 pg.cell^{-1}.d^{-1}) and was used to express the calcification rate depending of the irradiance of the BIOSOPE transect as a relative calcification:

$$fRCa_{Irr} = RCa_{Irr} / RCa_{\max} \quad (17)$$

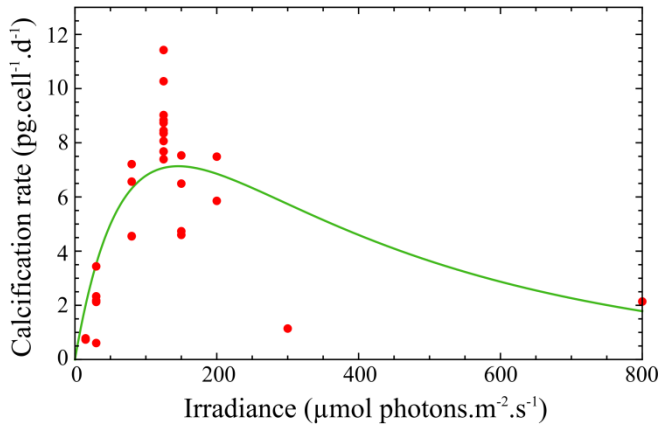


Figure V.10 : Dependence of the calcification rate to the irradiance for *E. huxleyi*.

The temperature affects as well the calcification and gets an optimum where the calcification is maximum as for the growth rate-temperature curve (Buitenhuis et al., 2008). Because of the effect of the temperature on growth rate and the dependence of calcification rate on growth rate, we assume that the calcification-temperature curve will have the same pattern and for this reason we used the same equation as the one used for the growth rate calculation from Schoemann et al. (2005) (see Figure V.11):

$$RCa_T = RCa_{\max} \cdot e^{\left(-(T-Topt)^2 / dT^2\right)} \quad (18)$$

Where RCa_{max} is the maximum of calcification, T is the temperature, T_{opt} is the optimum temperature where we get the maximum calcification and dT is the interval temperature. This equation was applied to fit to the data of Sett et al. (2014) and Rosas-Navarro et al. (2016) to estimate a T_{opt}, RCa_{max} and dT. Then the calcification rate was normalized to the maximum of modeled calcification with the data (10.5325 pg.cell^{-1}.d^{-1}) in order to express the calcification rate depending of the temperature as a relative calcification:

$$fRCa_T = e^{\left(-(T-Topt)^2 / dT^2\right)} \quad (19)$$

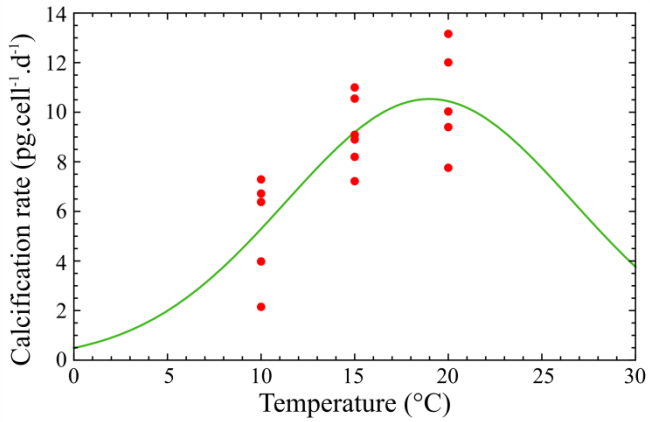


Figure V.11 : Dependence of the calcification rate to the temperature for *E. huxleyi*.

The calcification rate dependence with the nitrate concentration is more complicated to estimate because of the lack of experiments testing different concentration of nitrate in chemostat cultures in order to get a calcification rate (see paper of Langer et al., 2013). We decide to use a Michaelis-Menten equation because the only experiments data we had on *E. huxleyi* to do this parameterization (data from Fritz 1999 and Perrin et al. 2016) seems to show a Michaelis-Menten pattern with a maximum calcification rate for high nitrate concentration. Then this following equation (Eq. 20) can be applied to the calcification rate as a function of the nitrate concentration.

$$RCa_{NO3} = RCa_{\max} \cdot \frac{[NO_3]}{[NO_3] + K_{NO3}} \tag{20}$$

The data of Fritz (1999) were used to do this parameterization. The maximum of calcification rate was taken from the control experiment in high light conditions of Perrin et al. (2016) because of the lack of control experiment carried out by Fritz (1999) (see Figure V.12). This maximum was corrected to the irradiance, temperature and carbon system of Fritz (1999) using the different relative calcification rate equation defined previously, so RCa_{max} 2.97 pg.cell^{-1}.d^{-1}. The parameterization gives a value of K_{NO3} of 0.0803 µM. This equation was normalized to the maximum defined above:

$$fRCa_{NO3} = \frac{[NO_3]}{[NO_3] + K_{NO3}} \tag{21}$$

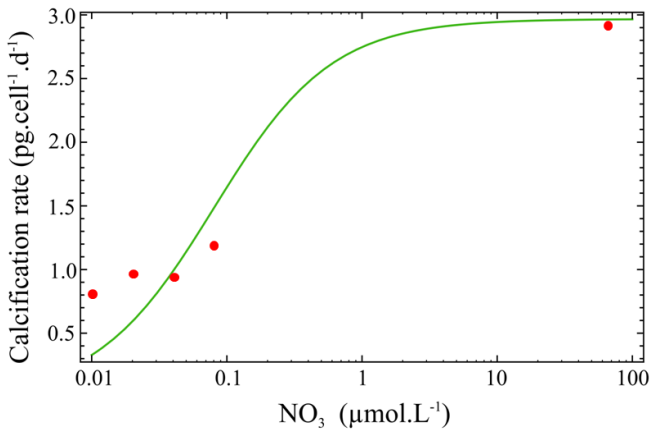


Figure V.12 : Dependence of the calcification rate to the nitrate concentration for *E. huxleyi*.

A. 3 Estimation of growth and calcification rates on the BIOSOPE transect

The growth rate of *E. huxleyi* along the BIOSOPE transect is calculated as a maximum growth rate multiplied by three limiting terms that account for the effect of irradiance, temperature and NO_3 concentration. The three terms of the equation comes from the three studies cited above: the temperature term (Schoemann et al., 2005); the irradiance term from MacIntyre et al. (2002) and the term of cellular quota for nitrogen from Flynn (2008) described above.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f\mu_{Irr} \cdot f\mu_{T} \cdot f\mu_{NO3} \tag{22}$$

To calculate this growth rate on the entire BIOSOPE transect, we needed data of temperature, irradiance and nitrate concentration described in the section A.1.

The calcification rates (in $pg.cell^{-1}.d^{-1}$) along the BIOSOPE transect was calculated based on the maximum calcification multiplied by four terms that account for the effect of irradiance, temperature, nitrate concentration and inorganic carbon system on the calcification rate as introduced above. These treatments yield:

$$RCa_{T} = RCa_{MAX} \cdot fRCa_{DIC} \cdot fRCa_{Irr} \cdot fRCa_{T} \cdot fRCa_{NO3} \tag{23}$$

where RCa_{MAX} was taken from the control experiment in high light of Perrin et al. (2016) on the BIOSOPE *E. huxleyi* strain RCC911 and is equal to 3.14 $pg.cell^{-1}.d^{-1}$.

For a better understanding of the contribution of each parameter on the growth and calcification rate estimations, sensitivity tests were carried out using the Eq. 22 and 23. For this purpose, the contribution of each parameter to the modeled growth and calcification rate is

expressed as the difference between the modeled growth rate and the growth rate calculated omitting the term in Eq. 22 and 23 for the parameter in question. The results of this analysis are plotted using ODV along the BIOSOPE transect.

B. Results

B.1 Estimate of the potential growth rate of *E. huxleyi* along the BIOSOPE transect

In this section, the distribution of the modeled growth rates along the BIOSOPE transect will be discussed in relation to the lateral and depth distribution of the forcing (environmental) parameters and the *in situ* distribution of coccolithophores observed by cell counts (Beaufort et al., 2008). The data of the depth of the euphotic layer (black dots on the Figure V.13) were taken from Ras et al. (2008) and reported in the transect with the results of the modeled growth rate (Figure V.13). The maximum abundance of coccosphere per mL observed and described by Beaufort et al. (2008) was also plotted in this figure (red dots on the Figure V.13) in order to be related with the modeled growth rate.

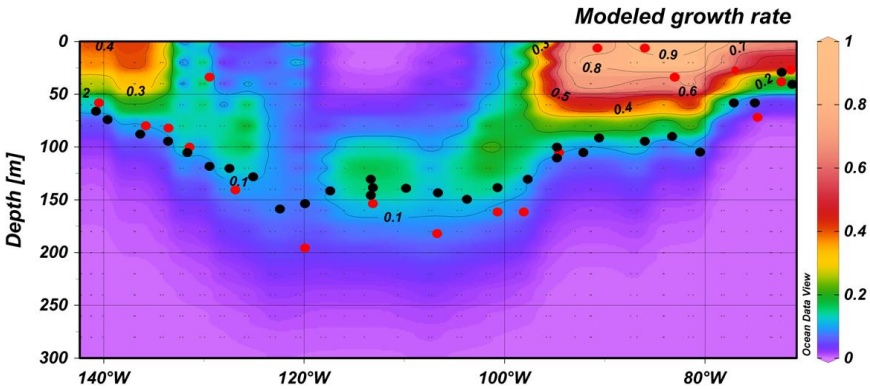


Figure V.13: Modeled growth (in days^{-1}) for *E. huxleyi* along the BIOSOPE transect. Red dots represent the maximum of coccosphere per mL taken from Beaufort et al. (2008) and black dots represents the depth of the euphotic layer taken from Ras et al. (2008).

The modeled growth rates estimated along the transect varies between 0 and 1 d^{-1}. Maximum modeled growth rates are observed in the surface waters of the subequatorial zone of the Marquesas Island and between 100°W and the Chilean coast (Figure V.13). In the center of the South Pacific Gyre, highest values of the estimated growth rate are observed between 100 and 160 m with a minimum value of 0.11 d^{-1} at 160 m and maximum value of 0.17 d^{-1} at 120 m depth. As shown by the Figure V.13, maximum growth rates match perfectly with the bottom of the photic zone and are consistent as well with the maximum of coccosphere per mL. Under the photic layer, the growth rates estimated is near to zero.

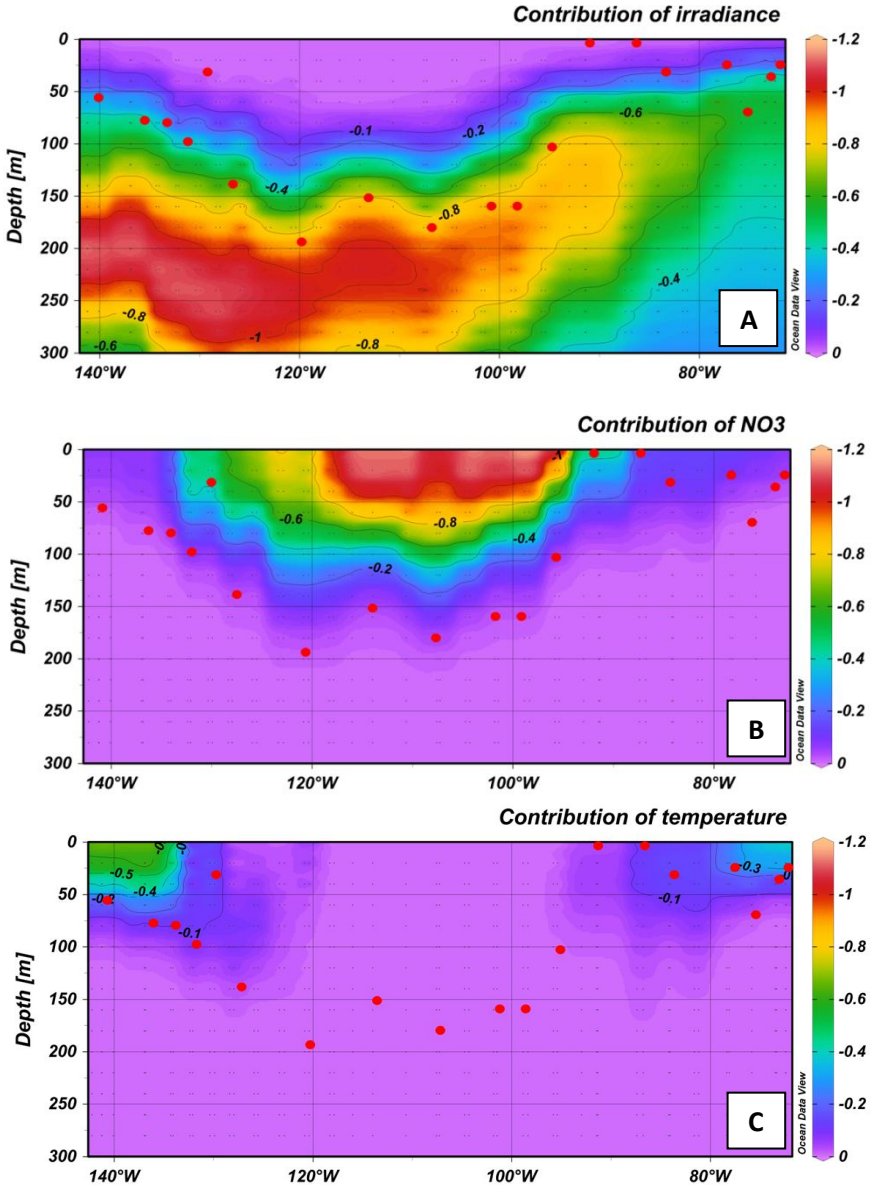


Figure V.14 : Contribution of each term of the growth rate calculation. (A) Contribution of irradiance, (B) contribution of nitrate and (C) contribution of temperature to the growth rate. Red dots are the maximum abundance of coccospheres per mL taken from Beaufort et al. (2008).

The contribution of each environmental parameter to the modeled growth rate is tested in a series of sensitivity tests. Thus, this difference is always smaller than 0 and the more negative the difference is, the greater the influence of a given parameter on the modeled growth rate. Figure V.14A shows the low contribution of irradiance to the total growth rate at the surface and the subsurface through the whole transect, which is between -0.1 and zero, matching in the center of the gyre with the high contribution of the nitrate concentration, which is between -0.4 and -1.2 (Figure V.14B). In deeper waters the contribution of the irradiance to the total growth

rate becomes significant and corresponds to a decrease of the contribution of the nitrate. Concerning the temperature, its contribution to the total growth rate (Figure V.14C) is really low, between -0.2 and zero, in the whole transect except in the surface waters near the Marquesas Island and near the Chilean upwelling where the contribution of the temperature is slightly higher between -0.2 and -0.6. It follows that the two environmental parameters controlling the growth rate in this transect are irradiance and nitrate except in the strong extremities of the transect near the Chilean coast and the Marquesas Island: while low nitrate limits growth above the coccosphere niche (Figure V.14B), low irradiance limits growth below it (Figure V.14A).

B.2 Relation between the number of spheres and the modeled growth rate

Figure V.15 shows the distribution of the number of sphere of coccolithophores per mL along the BIOSOPE transect. As represented in this figure, the maximum of sphere per mL is highlighted especially in surface waters at the extremities of the transect, corresponding to the upwelling (east) and to the boarder of the Marquesas Island (west). A correlation between the number of spheres per mL and the modeled growth rate exists (Figure V.16). This correlation is shown by the Figure V.16: the regression coefficient is 0.64 and p-value < 10^{-5}; so the modeled growth rate and the number of spheres per mL are significantly correlated. However, this correlation needs to be taken with caution because the number of spheres per mL includes all the coccosphere present in seawater. The percentage of Isochrysidales on coccolithophores and of *E. huxleyi* on Isochrysidales are actually not constant (Beaufort et al., 2008) along the BIOSOPE transect, so this relation is not completely exhaustive. However, it is important to specify that Beaufort et al. (2008) reported that this niche is characterized by a strong community of Isochrysidales such as *E. huxleyi*, *Gephyrocapsa* sp. and *Reticulofenestra* sp..

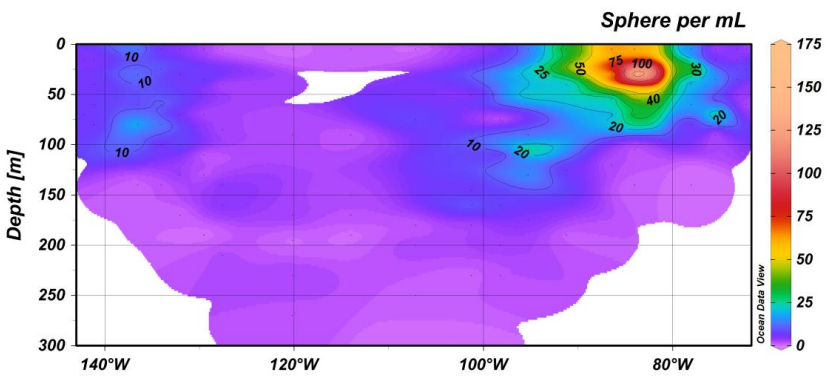


Figure V.15 : Spheres per mL along the BIOSOPE transect. Data were taken from the BIOSOPE database.

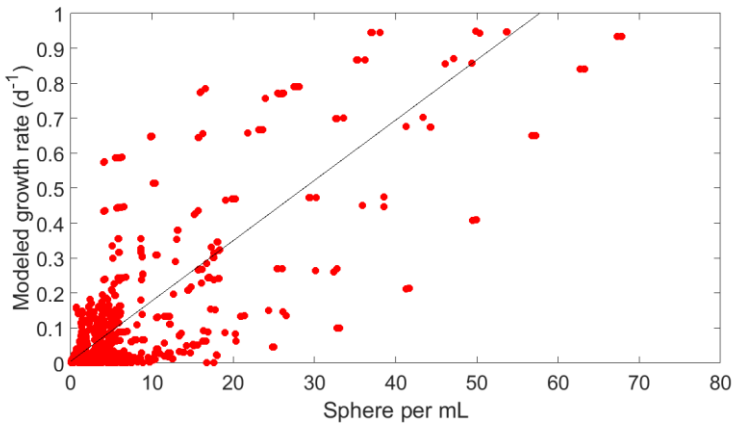


Figure V.16 : Correlation between the modeled growth rate and the number of sphere per mL. Black line represents the regression line between the data. Coefficient of correlation is R^2=0.64, p-value < 10^{-5} and n = 5487.

B.3 Calcification potential of *E. huxleyi* along the BIOSOPE transect

The calculation of the potential calcification of *E. huxleyi* was applied along the BIOSOPE transect between the surface and 300 m depth. This calcification estimation depends on the temperature, the irradiance, the nitrate concentration and the DIC carbon system. Figure V.17 shows how this calcification is distributed along the transect. The values are included between 0 and 1.75 pg.cell^{-1}.d^{-1}. A maximum of calcification (around 1.5 pg.cell^{-1}.d^{-1}) is estimated between 80°W and the Chilean coast in surface waters and between 80°W and almost 100°W in subsurface waters. Through the rest of the transect, maximum of the potential calcification ranges between 0.25 and 0.75 pg.cell^{-1}.d^{-1} in deeper waters (100 and 200 m depth) in the center of the South Pacific Gyre and in subsurface and surface waters between 120°W and the Marquesas Island.

A sensitivity analysis was carried out to understand the contribution of the four environmental parameters that contribute in defining the calcification rate of *E. huxleyi* in this study. Each term of the calculation of the calcification have been investigated as described in the Method and allow understanding the contribution of each term to the calcification rate estimation. Figure V.18 shows the results of the contribution for the four terms of the calcification rate equation. The contribution of DIC system to the calcification rate represented in the Figure V.18A reaches a maximum of contribution of -1 between 100° and 80°W. Almost similar values (between -0.7 and -0.8) were also observed in surface waters near the Chilean upwelling (72°W). Through the rest of the transect, the contribution of the DIC system reaches

maximum values between 100 and 150 m depth at the center of the gyre and goes up to the surface at the west part of the transect. Concerning the irradiance (Figure V.18B), its contribution to the calcification rate reaches maximum around -2 in the deep waters, under 150 m, between the Marquesas Island and 120°W. Irradiance also contributes strongly in deep waters in the center of the gyre and in subsurface waters in the west part of the transect. A high contribution of the irradiance is also observed in surface waters (less than 50 m depth) near the Chilean coast. Through the rest of the transect, the irradiance contribution is less than -0.25. The temperature contribution (Figure V.18C) is higher at the nearly extremities of the transect with a maximum contribution of about -1 near the Marquesas Island and a maximum of about -0.4 near the Chilean coast.

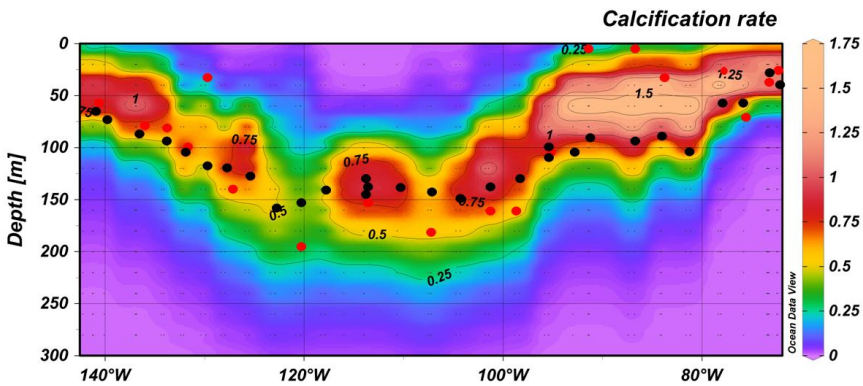


Figure V.17: Potential cellular calcification rate (in pg.cell^{-1}.d^{-1}) of *E. huxleyi* estimated along **the BIOSOPE transect.** Red dots represent the maximum of coccosphere per mL taken from Beaufort et al. (2008) and black dots represents the depth of the euphotic layer taken from Ras et al. (2008).

Through the other part of the transect, temperature contribution is less than -0.1 which means a really weak contribution. The nitrate concentration contribution represented in the Figure V.18D reaches a maximum value (near -1.5) in subsurface waters (between 50 m and 100 m depth) in the center of gyre. A wider patch around this maximum shows significant nitrate concentration contribution until -0.5, whereas the contribution is less than -0.25 in the rest of the transect.

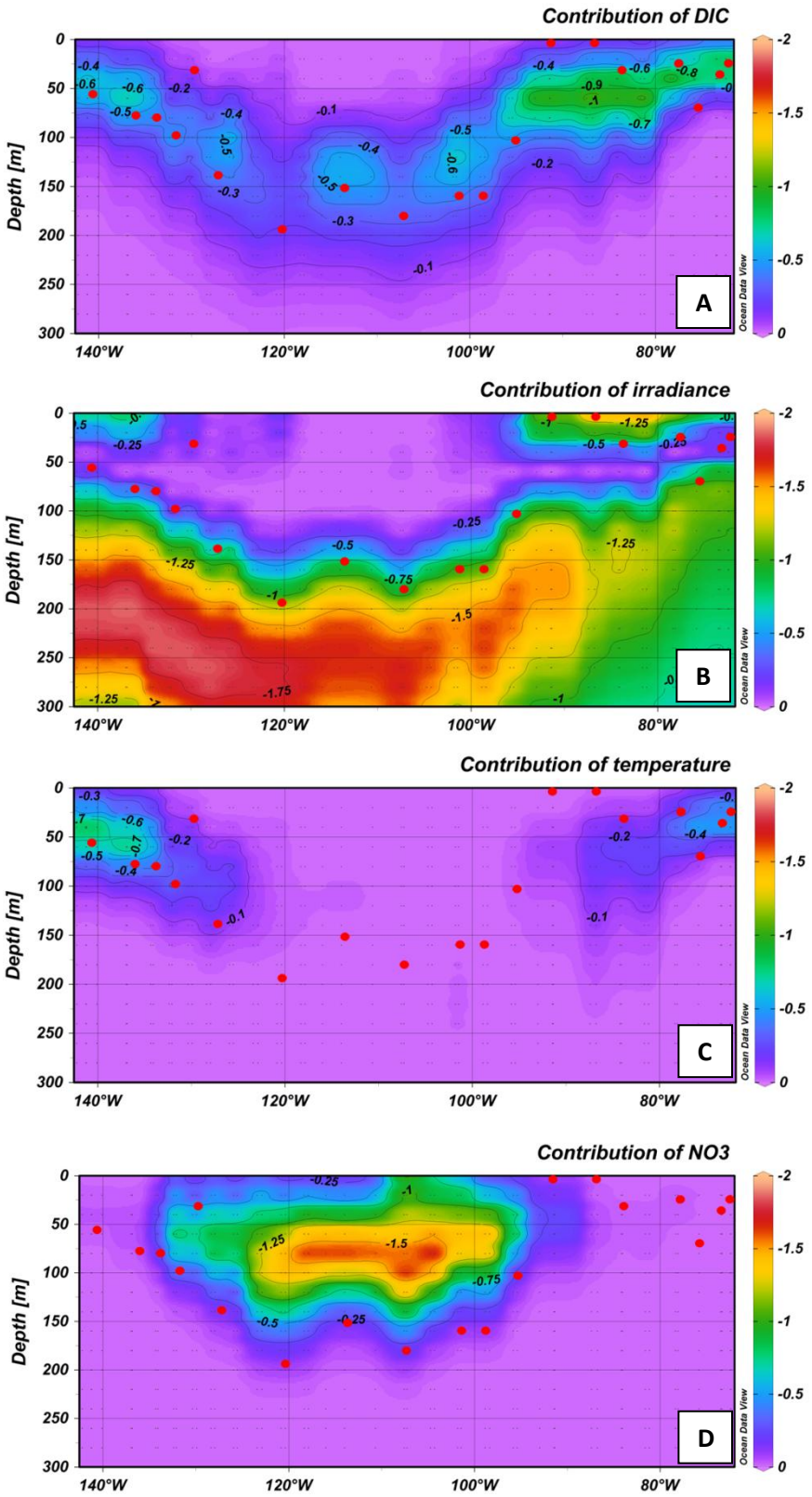


Figure V.18 : Contribution of each term of the calcification rate calculation. (A) Relative calcification depending of the inorganic carbon system, (B) of the irradiance, (C) of the temperature and (D) of the nitrate concentration. Red dots are the maximum abundance of coccospheres per mL taken from Beaufort et al. (2008).

C. Discussion

The South Pacific Gyre is a zone where environmental conditions define a specific ecosystem for coccolithophores. This work was specifically designed to investigate how irradiance, temperature, nitrate concentration and inorganic carbon system conditions control the potential growth and calcification rates.

The modeled growth rate is maximum where the equilibrium between light, nitrate and temperature is the best to support growth of *E. huxleyi*. Because of the limited contribution of temperature, the growth of *E. huxleyi* in the South Pacific Gyre is controlled by conditions of irradiance and nitrate concentration. This behavior is similar to that predicted by Klausmeier and Litchman (2001), which reported that a DCM occurs when there is an equilibrium between nitrate supply and light availability in deeper waters. This observation supports the fact that limitation of light and nitrate will have a high control on the estimation of the potential growth rate of *E. huxleyi,* at least in these clear and stratified waters of the center of this South Pacific Gyre. Furthermore, the Figure V.14 highlights the high contribution of the irradiance in deeper waters compared with nitrate contribution where light is actually the limiting factor for growth, less than 1% of the surface irradiance, and nitrate becomes to be in significant concentration. In surface and subsurface waters, the contribution of light is really small whereas the contribution of nitrate concentration is really high because of the limiting role of the nitrate for the cells in these waters.

If the theory of Klausmeier and Litchman (2001) is sustainable at the center of the gyre, this is not applicable in the boarder of the gyre where pycnocline and maximum of chlorophyll a are shallower. The potential growth rate are maximum at the extremities of the transect because of the optimal conditions present in these zones. Near the Chilean coast, the upwelling generates an important supply of nutrients from deeper waters with the highest nitrate concentration (up 15 µM to the surface) (Claustre et al., 2008b); which, together with a high light in surface waters, allow a maximum growth rate for *E. huxleyi*. This is correlated as well with the highest chlorophyll a concentration recorded from the transect (3 mg Chl-a m^{-3}; Claustre et al., 2008b). In the subequatorial area, near the Marquesas Islands, the waters are very warm (up to 27°C) and nitrate concentrations are around 1.8 µM in surface waters. These conditions support the second maximum of potential growth rate of *E. huxleyi* in surface waters and are also related to a high concentration of chlorophyll a (or in vivo fluorescence) (Claustre et al., 2008b). The maximum of potential growth rates along the BIOSOPE transect are observed following the depth of the euphotic layer and the Deep Chlorophyll Maximum (DCM) observed by Claustre et

al. (2008b) which is consistent with previous conclusions that light is a key factor for the phytoplanktonic growth.

The values of the estimated growth rates ranged between 0 and 1 d^{-1} which corresponds respectively to an absence of growth and to a generation time of approximately 0.69 days. However, it is really important to specify that the mortality and the vertical export of cells which are both inducing a decrease of the net growth rate (Laws, 2013) are not considered in this estimation. *In situ* growth rate estimation of phytoplankton and specifically of coccolithophores is still not widespread in the scientific literature. We compare the values obtained here to those presented in Selph et al. (2011) who estimated the growth rate of phytoplankton community, using incubation method, in equatorial Pacific between 110° an 140°W. They found values of net growth rates between 0.12 ± 0.40 d^{-1} and 0.25 ± 0.57 d^{-1} respectively at 100% and at 1% of the surface irradiance. As the uncertainties are really high, the values stay in a wide range of potential value of net growth rates where our values could be found for *E. huxleyi*. Our potential value estimated at a depth of 1 % of surface irradiance is ranged between 0.1 and 0.2 at the centre of the gyre and will be lesser taking into account mortality and vertical export. Further investigations to estimate *in situ* growth rate of *E. huxleyi* need to be made to have a wider sampling of comparable studies.

The modeled growth rate, which is obtained independent of the measured abundance of coccosphere in the transect, shows a strong correlation with the number of sphere per mL (Figure V.15). Results show that the maximum of coccosphere per mL along the transect related to the DCM and to the maximum of modeled growth rate and the correlation of the modeled growth rate and the number of sphere per mL. This correlation is explained again by the nitrate and light dependence of the growth of the cell of *E. huxleyi* in this transect which control a part of this abundance of coccosphere per mL and the maximum of growth rate. It is, however, necessary to specify that the number and the abundance of coccosphere per mL take into account the whole coccolithophores assemblages of the transect. As described in the introduction, the coccolithophore assemblages were dominated by coccolithophore species belonging the family Noëlaerhabdaceae: *Emiliania huxleyi*, and several species of G*ephyrocapsa* and *Reticulofenestra* (Beaufort et al., 2008) but their abundance in coccolithophores assemblages are not distributed constantly along the transect. So, the correlation between the modeled growth rate and the number of sphere per mL could be an approximately good estimate of the relation valuable for *E. huxleyi* in the South Pacific Gyre although the results of the number of sphere per mL are not exclusive for this species.

Furthermore, the physiological parameters used for the growth rate estimation are those obtained in the experiments in high light and low nitrate conditions published in Perrin et al. (2016) using the BIOSOPE strain RCC911 of *E. huxleyi*. Whereas the half-saturation constant for nitrate uptake and the maximum of growth rate are valuable in the whole transect whatever the environmental conditions, the maximum uptake rate normalized to the surface and maximum and minimum quotas, in reality, could vary depending of this environmental conditions. Then, these physiological parameters describe the behavior of *E. huxleyi* for a nitrate resource limited environment. They are at least strongly representative of the conditions above the nitracline and then, above and inside the deep niche of coccolithophores observed by Beaufort et al. (2008) in the center of the gyre and in nitrate depleted and shallower waters in the boarder of the gyre (Claustre et al., 2008b).

There are similarities in the patterns of the modeled growth and calcification rates (Figure V.13 and Figure V.17). Although the calcification rate calculation is independent of the growth rate, their own dependence for environmental factors gives them the same pattern through the transect. Irradiance and nitrate are the both factors controlling in majority the growth rate and calcification rate in this transect. Irradiance, as for the modeled growth rate, is the limiting environmental factor for the calcification rate in deeper waters of the South Pacific Gyre as indicated by these environmental contribution studies. Nitrate concentration is clearly the limiting factor in the center of the gyre in surface and subsurface waters. Temperature and inorganic carbon system have a slightly role in the estimation of the calcification rate as their respective contribution do not reach the maximum of contribution observed for nitrate and irradiance. Temperature seems to play a limiting role in the surface waters of both extremities of the transect and is correlated at least in the west of the transect to the maximum of temperature (Figure V.6B). Higher contribution of the inorganic carbon system, which is lower than the one of the irradiance and nitrate concentration, seems to follow the pattern of the maximum calcification rate distribution (Figure V.18A). However, the pCO_2 profiles (Figure V.6D) through the transect show the low correlation between the distribution of the pCO_2 in water column and potential calcification rates for *E. huxleyi*. Again, nitrate and irradiance conditions compared to the temperature and inorganic carbon system (here only HCO_3^-, H^+ and CO_2) seems to play a higher control on calcification rates estimation through the BIOSOPE transect. However, Beaufort et al. (2008) reports the high correlation between calcification and alkalinity and calcification saturation state through the BIOSOPE transect. The potential calcification rate and growth rate are correlated and their maximum value are almost in the same zone of the

transect. In this context, the cellular calcification in pg.cell^{-1} could be estimated and will have the same pattern than the two metabolic rates mentioned above. This trend to increase the cellular calcification for *E. huxleyi* following the DCM was verified by Beaufort et al. (2008), at least in the center of the gyre, where they found the heaviest coccoliths and coccospheres. These last conclusions bring the hypothesis that even if the potential growth rate is clearly controlled by light and nitrate availability, the study of calcification rates needs further investigations to bring a correct identification of the factor controlling these metabolic rates.

By comparing the potential growth rate (Figure V.13) and the potential calcification rate (Figure V.17), it appears that the PIC/POC ratio will be potentially higher in the niche at the center of the gyre compared with the extremities of the gyre. Between these two zones, the calcification rate only decreases of 40-50 % (Figure V.17) whereas the modeled growth rate decreases of 90% of its maximum value observed in the surface waters of the upwelling zone (Figure V.13). This is mainly because the sensitivity of growth and calcification rate to nitrate is different, leading to a greater decrease in growth rate, compared to calcification, in the deep niche. This predicted change in the PIC/POC ratio occurs in the deepest part of the niche; therefore it will affect a relatively small part of the *E. huxleyi* population. Nevertheless, it will be important to verify this observation with laboratory experiments and on-board incubation experiments.

D. Conclusion

Estimation of *in situ* growth and calcification rates via experimental (Laws, 2013; Poulton et al., 2014; Selph et al., 2011) and modelling approaches are both necessary to study these two metabolic rates in the ocean for coccolithophores and specifically for the most common and cosmopolitan coccolithophores, *E. huxleyi*. The wide number of laboratory studies carried out on *E. huxleyi* and the wide diversity of available data allow investigating the dependence of growth and calcification rates to four key environmental factors using a database and *in situ* data. Both estimates defined in this work highlight the maximum of growth and calcification rates following the nitracline, the DCM, the bottom of the euphotic layer and the maximum of coccosphere per mL which supports the conclusion that there is a strong light and nitrate control on these estimations in this transect. Further investigations are needed to better estimate the *in situ* growth and calcification rates of *E. huxleyi* in oligotrophic environment and in global ocean and then, contribute widely to the understanding of the rain ratio of this species to deep ocean.

References

Aloisi, G.: The calcium carbonate saturation state in cyanobacterial mats throughout Earth's history, Geochim. Cosmochim. Acta, 72(24), 6037–6060, doi:10.1016/j.gca.2008.10.007, 2008.

Aloisi, G.: Covariation of metabolic rates and cell size in coccolithophores, Biogeosciences, 12(15), 6215–6284, doi:10.5194/bg-12-4665-2015, 2015.

Bach, L. T., Riebesell, U., Gutowska, M. A., Federwisch, L. and Schulz, K. G.: A unifying concept of coccolithophore sensitivity to changing carbonate chemistry embedded in an ecological framework, Prog. Oceanogr., 135, 125–138, doi:10.1016/j.pocean.2015.04.012, 2015.

Barcelos, R., Müller, M. N. and Riesebell, U.: Short-term response of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* to an abrupt change in seawater carbon dioxide concentrations, Biogeosciences, 7, 177–186, 2010.

Beaufort, L., Couapel, M., Buchet, N., Claustre, H. and Goyet, C.: Calcite production by coccolithophores in the south east Pacific Ocean, Biogeosciences, 5, 1101–1117, 2008.

van Bleijswijk, J. D. L., Kempers, R. S., Veldhuis, M. J. and Westbroek, P.: Cell and growth characteristics of types A and B of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) as determined by flow cytometry and chemical Analyses, J. Phycol., 30(2), 230–241, doi:10.1111/j.0022-3646.1994.00230.x, 1994.

Brand, L. E.: Physiological ecology of marine coccolithophores, in Coccolithophores, pp. 39–49, Cambridge., 1994.

Buitenhuis, E. T., De Baar, H. J. W. and Veldhuis, M. J. W.: Photosynthesis and calcification by *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) as a function of inorganic carbon species, J. Phycol., 35(5), 949–959, doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3550949.x, 1999.

Buitenhuis, E. T., Pangere, T., Franklin, D. J., Le Quéré, C. and Malin, G.: Growth rates of six coccolithophorid strains as a function of temperature, Limnol. Oceanogr., 53(3), 1181–1185, doi:10.4319/lo.2008.53.3.1181, 2008.

Campbell, G. S. and Norman, J. M.: An introduction to environmental biophysics, Springer Science & Business Media., 1998.

Claustre, H. and Maritorena, S.: The Many Shades of Ocean Blue, Science, 302(5650), 1514–1515, doi:10.1126/science.1092704, 2003.

Claustre, H., Sciandra, A. and Vaulot, D.: Introduction to the special section bio-optical and biogeochemical conditions in the South East Pacific in late 2004: the BIOSOPE program, Biogeosciences, 5(3), 679–691, doi:10.5194/bg-5-679-2008, 2008.

Daniels, C. J., Sheward, R. M. and Poulton, A. J.: Biogeochemical implications of comparative growth rates of *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus* species, Biogeosciences, 11(23), 6915–6925, doi:10.5194/bg-11-6915-2014, 2014.

De Bodt, C., Van Oostende, N., Harlay, J., Sabbe, K. and Chou, L.: Individual and interacting effects of pCO_2 and temperature on *Emiliania huxleyi* calcification: study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size, Biogeosciences, 7(5), 1401–1412, doi:10.5194/bg-7-1401-2010, 2010.

Dodds, W. K., Biggs, B. J. F. and Lowe, R. L.: Photosynthesis-Irradiance Patterns in Benthic Microalgae: Variations as a Function of Assemblage Thickness and Community Structure, J. Phycol., 35(1), 42–53, doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3510042.x, 1999.

Fielding, S. R.: *Emiliania huxleyi* specific growth rate dependence on temperature, Limnol. Oceanogr., 58(2), 663–666, doi:10.4319/lo.2013.58.2.0663, 2013.

Flynn, K.: The importance of the form of the quota curve and control of non-limiting nutrient transport in phytoplankton models, J. Plankton Res., 30(4), 423–438, doi:10.1093/plankt/fbn007, 2008.

Fritz, J. J.: Carbon fixation and coccolith detachment in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* in nitrate-limited cyclostats, Mar. Biol., 133(3), 509–518, doi:10.1007/s002270050491, 1999.

Haidar, A. T. and Thierstein, H. R.: Coccolithophore dynamics off Bermuda (N. Atlantic), Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 48(8–9), 1925–1956, doi:10.1016/S0967-0645(00)00169-7, 2001.

Henderiks, J., Winter, A., Elbrchter, M., Feistel, R., Plas, A. van der, Nausch, G. and Barlow, R.: Environmental controls on *Emiliania huxleyi* morphotypes in the Benguela coastal upwelling system (SE Atlantic), Mar. Ecol. Prog. Ser., 448, 51–66, doi:10.3354/meps09535, 2012.

Holligan, P. M., Groom, S. B. and Harbour, D. S.: What controls the distribution of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi*, in the North Sea?, Fish. Oceanogr., 2(3–4), 175–183, doi:10.1111/j.1365-2419.1993.tb00133.x, 1993.

Hoppe, C. J. M., Langer, G. and Rost, B.: *Emiliania huxleyi* shows identical responses to elevated pCO_2 in TA and DIC manipulations, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 406, 54–62, doi:: 10.1016/j.jembe.2011.06.008, 2011.

Jordan, R. W. and Winter, A.: Assemblages of coccolithophorids and other living microplankton off the coast of Puerto Rico during January–May 1995, Mar. Micropaleontol., 39(1–4), 113–130, doi:10.1016/S0377-8398(00)00017-7, 2000.

Klausmeier, C. A. and Litchman, E.: Algal games: The vertical distribution of phytoplankton in poorly mixed water columns, Limnol Ocean., 46(8), 1998–2007, 2001.

Langer, G., Geisen, M., Baumann, K.-H., Kläs, J., Riebesell, U., Thoms, S. and Young, J. R.: Species-specific responses of calcifying algae to changing seawater carbonate chemistry, Geochem. Geophys. Geosystems, 7(9), 155–161, doi:10.1029/2005GC001227, 2006.

Langer, G., Gussone, N., Nehrke, G., Riebesell, U., Eisenhauer, A. and Thoms, S.: Calcium isotope fractionation during coccolith formation in *Emiliania huxleyi*: Independence of growth and calcification rate, Geochem. Geophys. Geosystems, 8(5), Q05007, doi:10.1029/2006GC001422, 2007.

Langer, G., Nehrke, G., Probert, I., Ly, J. and Ziveri, P.: Strain-specific responses of *Emiliania huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry, Biogeosciences, 6(11), 2637–2646, 2009.

Langer, G., Oetjen, K. and Brenneis, T.: Coccolithophores do not increase particulate carbon production under nutrient limitation: A case study using *Emiliania huxleyi* (PML B92/11), J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 443, 155–161, doi:10.1016/j.jembe.2013.02.040, 2013.

Laws, E. A.: Evaluation of *In situ* Phytoplankton Growth Rates: A Synthesis of Data from Varied Approaches, Annu. Rev. Mar. Sci., 5(1), 247–268, doi:10.1146/annurev-marine-121211-172258, 2013.

Lecourt, M., Muggli, D. L. and Harrison, P. J.: Comparison of Growth and Sinking Rates of Non-Coccolith- and Coccolith-Forming Strains of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) Grown Under Different Irradiances and Nitrogen Sources, J. Phycol., 32(1), 17–21, doi:10.1111/j.0022-3646.1996.00017.x, 1996.

MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T. and Geider, R. J.: Photoacclimation of Photosynthesis Irradiance Response Curves and Photosynthetic Pigments in Microalgae and Cyanobacteria, J. Phycol., 38(1), 17–38, doi:10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x, 2002.

McClain, C. R., Signorini, S. R. and Christian, J. R.: Subtropical gyre variability observed by ocean-color satellites, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 51(1), 281–301, 2004.

Müller, M. N., Kısakürek, B., Buhl, D., Gutperlet, R., Kolevica, A., Riebesell, U., Stoll, H. and Eisenhauer, A.: Response of the coccolithophores *Emiliania huxleyi* and Coccolithus braarudii to changing seawater Mg^{2+} and Ca^{2+} concentrations: Mg/Ca, Sr/Ca ratios and $d^{44/40}Ca$, $d^{26/24}Mg$ of coccolith calcite, Geochim. Cosmochim. Acta, 75, 2088–2102, doi:10.1016/j.gca.2011.01.035, 2011.

Nimer, N. A. and Merrett, M. J.: Calcification rate in *Emiliania huxleyi* Lohmann in response to light, nitrate and availability of inorganic carbon, New Phytol., 123(4), 673–677, doi:10.1111/j.1469-8137.1993.tb03776.x, 1993.

Okada, H. and McIntyre, A.: Seasonal distribution of modern coccolithophores in the western North Atlantic Ocean, Mar. Biol., 54(4), 319–328, doi:10.1007/BF00395438, 1979.

Platt, T. C., Gallegos, L. and Harrison, W. G.: Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton, J. Mar. Res., 38, 687–701, 1980.

Poulton, A. J., Stinchcombe, M. C., Achterberg, E. P., Bakker, D. C. E., Dumousseaud, C., Lawson, H. E., Lee, G. A., Richier, S., Suggett, D. J. and Young, J. R.: Coccolithophores on the north-west European shelf: calcification rates and environmental controls, Biogeosciences, 11(14), 3919–3940, doi:10.5194/bg-11-3919-2014, 2014.

Ras, J., Claustre, H. and Uitz, J.: Spatial variability of phytoplankton pigment distributions in the Subtropical South Pacific Ocean: comparison between *in situ* and predicted data, Biogeosciences, 5(2), 353–369, 2008.

Raven, J. A. and Crawfurd, K.: Environmental controls on coccolithophore calcification, Mar Ecol Prog Ser, 470, 137–166, doi:10.3354/meps09993, 2012.

Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P. D., Zeebe, R. E. and Morel, F. M. M.: Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO_2, Nature, 407(6802), 364–367, doi:10.1038/35030078, 2000.

Riegman, R., Stolte, W., Noordeloos, A. A. M. and Slezak, D.: Nutrient uptake and alkaline phosphatase (ec 3:1:3:1) activity of *Emiliania huxleyi* (PRYMNESIOPHYCEAE) during growth under N and P limitation in continuous cultures, J. Phycol., 36(1), 87–96, doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99023.x, 2000.

Rokitta, S. D. and Rost, B.: Effects of CO_2 and their modulation by light in the life-cycle stages of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 57(2), 607–618, doi:10.4319/lo.2012.57.2.0607, 2012.

Rosas-Navarro, A., Langer, G. and Ziveri, P.: Temperature affects the morphology and calcification of *Emiliania huxleyi* strains, Biogeosciences, 13, 2913–2926, doi:10.5194/bg-13-2913-2016, 2016.

Rost, B., Zondervan, I. and Riebesell, U.: Light-dependent carbon isotope fractionation in the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 47(1), 120–128, doi:10.4319/lo.2002.47.1.0120, 2002.

Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J., Rousseau, V. and Lancelot, C.: *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review, J. Sea Res., 53(1–2), 43–66, doi:10.1016/j.seares.2004.01.008, 2005.

Selph, K. E., Landry, M. R., Taylor, A. G., Yang, E.-J., Measures, C. I., Yang, J., Stukel, M. R., Christensen, S. and Bidigare, R. R.: Spatially-resolved taxon-specific phytoplankton production and grazing dynamics in relation to iron distributions in the Equatorial Pacific between 110 and 140°W, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 58(3–4), 358–377, doi:10.1016/j.dsr2.2010.08.014, 2011.

Sett, S., Bach, L. T., Schulz, K. G. and Koch-Klavsen, S.: Temperature Modulates Coccolithophorid Sensitivity of Growth, Photosynthesis and Calcification to Increasing Seawater pCO_2, PLOS ONE, 9, doi:10.1371/journal.pone.0088308, 2014.

Trimborn, S., Langer, G. and Rost, B.: Effect of varying calcium concentrations and light intensities on calcification and photosynthesis in *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 52(5), 2285–2293, doi:10.4319/lo.2007.52.5.2285, 2007.

Winter, A., Jordan, R. W. and Roth, P. H.: Biogeography of living coccolithophore ocean waters, in Coccolithophores, pp. 161–177, Cambridge., 1994.

Winter, A., Henderiks, J., Beaufort, L., Rickaby, R. E. M. and Brown, C. W.: Poleward expansion

of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, J. Plankton Res., 36(2), 316–325, doi:10.1093/plankt/fbt110, 2014.

Zeebe, R. E. and Wolf-Gladrow, D. A.: CO_2 in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes, Gulf Professional Publishing., 2001.

Zondervan, I.: The effects of light, macronutrients, trace metals and CO_2 on the production of calcium carbonate and organic carbon in coccolithophores—A review, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 54(5–7), 521–537, doi:10.1016/j.dsr2.2006.12.004, 2007.

Supplementary material

Mass action laws used to find the concentration of H^+, CO_2 and HCO_3^-

These relations can be found in the book of Zeebe and Wolf-Gladrow (2001):

$$K_1 = \frac{HCO^-_{3eq} \cdot Hi^+}{CO^*_{2eq}} ; \qquad K_2 = \frac{CO^{2-}_{3\ eq} \cdot Hi^+}{HCO^-_{3eq}} ; \qquad K_w = OH^-_{eq} \cdot Hi^+$$

Table S1. Lists of the 13 unknown parameters used in the mass balances equations and the known variables through the transect ([a] = calculation taken from Zeebe and Wolf-Gladrow (2001) with a salinity taken from the database varying along the transect).

List of unknown parameters	CO_3^{2-}, HCO_3^-, CO_2 BOH_4^-, BOH_3 PO_4^{3-}, H_3PO_4, $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} $H_4SiO_4^{4-}$, $H_3SiO_4^{3-}$ H^+, OH^-
List of known variables	Temperature *Temp* (°C) Pression *P* = depth +1/10 (bar) Salinity *Sd* Total alkalinity *TA* (*mol.kg-^{1}*) Total carbon *TC* (*mol.kg-^{1}*) Total silica *TSi* (*mol.kg-^{1}*) Total phosphorus TPO_4 (*mol.kg-^{1}*) [a]Total boron *TB* (*mol.kg-^{1}*) = 416*(*Sd*/35)*10^{-6}

4. Conclusion du chapitre

La présence de coccolithophoridés dans le gyre le plus oligotrophe des gyres subtropicaux et le fait qu'un nombre limité d'études ont été faites jusqu'à maintenant sur les assemblages de ce groupe phytoplanctonique majeur à des profondeurs aussi élevées en font une priorité pour mieux comprendre la distribution des coccolithophoridés dans l'océan global. Le taux de croissance potentiel d'*E. huxleyi* est estimé comme étant maximal au sein de la DCM alors qu'il n'est dépendant que de la lumière et de la concentration en nitrate. Par conséquent les estimations qualitatives faites dans ce travail à la station GYR au centre du gyre Pacifique-Sud sont tout à fait cohérentes avec la théorie de Klausmeier and Litchman (2001) qui prend en compte les mêmes variables environnementales. Cependant, la mortalité et l'export vertical des cellules ne doivent pas être négligés pour obtenir un taux de croissance réel. De plus amples études de terrain et analytiques devraient permettre de meilleures estimations du taux de croissance *in situ* ainsi que du taux de calcification de l'espèce *E. huxleyi*. L'étude de ces deux taux métaboliques devra par la suite être accompagnée par l'estimation *in situ* du taux de photosynthèse. Ce taux métabolique est en effet primordial pour la compréhension de la physiologie des cellules *d'E. huxleyi*, et permettrait alors d'estimer le rapport calcification/ photosynthèse dans l'océan et donc d'envisager une possible étude de l'export vertical de carbone par l'espèce *E. huxleyi* vers l'océan profond au sein des gyres oligotrophes. Ceci reste encore à explorer de par les nombreuses limitations dans la reproduction de la réalité par cette approche analytique et dans le fait de considérer que certains facteurs environnementaux pour réaliser les estimations des taux métaboliques.

CHAPITRE VI

DISCUSSION & PERSPECTIVES

« THAT'S IT! »

Preservation Hall Jazz Band

Ce travail de thèse, via plusieurs approches, de l'expérience de laboratoire à l'étude de données *in situ* en passant par la modélisation, a permis des avancées importantes quant à la compréhension de l'effet d'une co-limitation lumière et nutriments sur la physiologie du coccolithophoridé *Emiliania huxleyi*. Cette étude, bien que restreinte à une espèce d'un des grands groupes phytoplanctoniques, étoffe les connaissances déjà acquises sur le groupe des coccolithophoridés et soulève de nouvelles hypothèses sur le comportement physiologique d'*E. huxleyi* qui devront être élucidées dans les années à venir.

Effets d'une co-limitation lumière-nutriments sur la physiologie d'E. huxleyi en laboratoire

Les deuxième et troisième chapitres de cette thèse visent à mieux comprendre la physiologie du coccolithophoridé *E. huxleyi in vivo*, tout d'abord en limitation en nutriments puis en diminuant la lumière ; et ensuite, en co-limitation de nutriments et lumière. De manière générale, le terme de limitation que ce soit pour la lumière ou pour les nutriments désigne, en culture, un effet inhibiteur du taux de croissance instantané comme décrit par les expériences de laboratoire présentées dans ce manuscrit (chapitres II et III). Cependant, si une limitation en nutriment en batch signifie une consommation totale du nutriment, une limitation en lumière ne désigne pas nécessairement une absence de lumière mais plutôt une diminution de cette intensité lumineuse. En réalité, une « limitation en lumière » tend à limiter la synthèse du carbone organique, comme décrit dans l'équation de la photosynthèse (voir équation I-1), et donc la quantité d'énergie disponible pour la cellule ce qui affectera le métabolisme cellulaire. Rares sont les expériences de cultures sur *E. huxleyi* ayant combiné ces deux effets environnementaux simultanément. Une des exceptions est le travail réalisé par Leonardos and Geider (2005) qui ont cultivé en chemostat une souche non calcifiante dans le but d'étudier les effets de la lumière et d'une augmentation de la pCO_2 sur la production de carbone organique de cellules limitées en nitrate et phosphate. La comparaison avec les expériences présentées dans ce manuscrit est donc restreinte par le nombre limité d'expériences de culture ayant testé ces conditions et par le choix d'utiliser une souche non-calcifiante fait par Leonardos and Geider (2005).

Les expériences de culture réalisées dans le cadre de cette thèse nous ont montré que les réponses de la souche RCC911 d'*E. huxleyi* à une limitation en nitrate, en phosphate ou à une limitation en lumière sont différentes. Ces réponses sont, par ailleurs, souvent en accord avec les effets déjà reportés dans de précédents travaux sur le comportement d'*E. huxleyi* dans ces

conditions de limitation (ex : Langer et al., 2013; Müller et al., 2008 ou encore Oviedo et al., 2014). Pour mieux comprendre la co-limitation en nutriments et en lumière, il est important, en plus des conditions contrôles, d'étudier les deux effets indépendamment l'un de l'autre.

Tout d'abord, la réponse morphologique des cellules à une limitation en phosphate est bien plus visible que celle due à une limitation en nitrate. En effet alors que la taille des cellules et coccosphères augmentent de façon importante pour les expériences limitées en phosphate, elles restent équivalente à l'expérience contrôle pour les expériences limitées en nitrate (voir Figure VI.1). Ces mêmes observations ont été aussi faites par exemple par Langer et al. (2013); Müller et al. (2008); Oviedo et al. (2014); Paasche (1998) et Riegman et al. (2000) qui montrent à chaque fois cette même réponse d'*E. huxleyi* à des conditions de limitation en phosphate par rapport à l'expérience contrôle et celle limitée en nitrate. Cette réponse commune de plusieurs souches d'*E. huxleyi* confirme d'une part que l'effet physiologique observé lors d'une limitation en phosphate n'est pas spécifique à la souche et supporte d'autre part la conclusion faite par Müller et al. (2008) selon laquelle une limitation en phosphate inhibe la réplication d'ADN, ralentit par conséquent la division cellulaire et génère donc des cellules plus grosses.

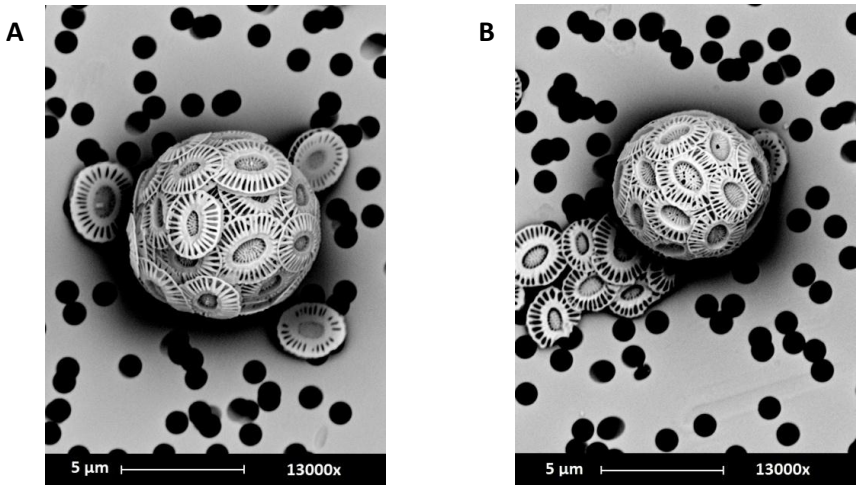


Figure VI.1 : Images en MEB d'une cellule limitée en phosphate (A) et limitée en nitrate (B). Images à la même échelle prises des expériences RCC911 en forte lumière.

Si la réponse de la souche RCC911 aux limitations en nutriments s'avère différente concernant la morphologie des cellules, celles-ci ont des effets similaires sur les quotas cellulaires en carbone inorganique particulaire (PIC) et en carbone organique particulaire (POC). Cependant encore une fois l'effet est bien plus important pour les cellules limitées en phosphate, alors que la réponse des cellules vis-à-vis d'une limitation en nitrate est bien plus

modérée. Les quotas cellulaires en PIC et POC dans les expériences limitées en phosphate et en nitrate sont supérieurs à ceux des expériences contrôles, et les cultures ont des temps de génération plus longs du fait de la limitation en nutriment. Les différences de taille observées lors de la limitation sont donc en accord avec le fait que la taille de la cellule est dépendante du temps de génération et de la biomasse de la cellule (Aloisi, 2015). Les deux limitations en nutriments, nitrate et phosphate, induisent une augmentation du rapport PIC :POC par rapport aux expériences contrôles. Cette dernière observation indique donc par ailleurs que le processus de calcification est favorisé par une limitation en nutriments par rapport au processus de photosynthèse. Ceci est en accord avec la revue réalisée par Raven and Crawfurd (2012) et les précédentes conclusions issues des résultats obtenus sur des cultures en laboratoire (Linschooten et al., 1991; Paasche, 1998 et Riegman et al., 2000).

Fritz (1999) et Paasche (1998) expliquent cette augmentation de la calcification des cellules limitées en nitrate ou en phosphate par un nombre plus important de coccolithes autour de la cellule. L'augmentation modérée en PIC des cellules limitées en nitrate observée dans cette thèse et dans de nombreuses expériences de cultures sur *E. huxleyi* pourrait donc être due à deux effets : 1) les cellules limitées en nitrate ont un nombre moins élevé de coccolithes autour de la cellule que les cellules limitées en phosphate (Fritz, 1999; Paasche, 1998) et 2) les coccolithes seraient sous-calcifiés en limitation en nitrate et sur-calcifiés en limitation en phosphate (Paasche, 1998). Ces hypothèses peuvent être validées pour les expériences réalisées dans cette thèse et sont en effet confirmées en partie par la Figure VI.1 : la cellule limitée en phosphate semble avoir plus d'une couche de coccolithes (2 ou 3) et les coccolithes semblent plus calcifiés que ceux de la cellule limitée en nitrate. De plus, l'épaisseur de la couche calcifiante des cellules peut être calculée par soustraction de la taille des cellules à celle des coccosphères et permet de confirmer nos observations : l'épaisseur calculée est de 1.29 µm (1.02 µm) pour les cellules limitées en phosphate, et de 0.96 µm (0.80 µm) pour les cellules limitées en nitrate en « forte » lumière (« faible » lumière). Sachant que la taille des coccolithes n'augmente que très peu pour l'expérience limitée en phosphate et en nitrate (voir Figure III.8 du chapitre III), un nombre plus important de coccolithes est confirmé pour les deux limitations en nutriments. Ainsi l'augmentation plus importante en PIC pour les cellules limitées en phosphate est bien due à ce nombre plus élevé plutôt qu'à une augmentation en longueur des coccolithes.

L'hypothèse concernant la sur-ou sous-calcification des coccolithes aurait pu être vérifiée en utilisant la méthode de reconnaissance des coccolithes (SYRACO pour « Système de

Reconnaissance Automatique de Coccolithes) développée par Beaufort and Dollfus (2004) qui permet de déterminer leur contenu en calcite. Si des échantillons ont, en effet, été pris à la fin des expériences afin de faire ces analyses, la qualité de ceux-ci n'a pas permis de les mener à bien.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation significative entre la taille des coccosphères et celle des coccolithes dans nos expériences sur *E. huxleyi* (Figure III.10B du chapitre III) alors qu'elle a été mise en avant dans des fossiles de *Coccolithus pelagicus* par Gibbs et al. (2013). Cette relation varie cependant de manière intra et interspécifique selon l'espèce étudiée. En effet, *Coccolithus pelagicus* est connu pour ne pas pouvoir former plusieurs couches de coccolithes contrairement à *E. huxleyi* (Gibbs et al., 2013; Hoffmann et al., 2015) ce qui implique une relation plus plausible pour *Coccolithus pelagicus* et souche-spécifique pour *E. huxleyi*. La taille des coccosphères va dépendre du nombre de coccolithes autour de la cellule donc par conséquent une augmentation de la longueur des coccolithes n'induit pas forcément une augmentation de la taille des coccosphères si le nombre de coccolithes diminue. Il en est de même pour la relation entre le quota en PIC par coccolithe et la taille des coccosphères qui n'est pas vérifiée pour l'espèce *E. huxleyi* car le nombre de coccolithes peut varier de façon importante.

Par ailleurs, il existe une corrélation entre le quota cellulaire de POC et la taille des cellules internes, qui n'a pas été observée dans le chapitre III de par un nombre restreint d'expériences et des barres d'erreur importantes sur les valeurs mesurées, mais qui a été clairement définie dans l'étude de Aloisi (2015) chez différentes espèces de coccolithophoridés. Cette tendance est aussi mise en avant dans la Figure VI.2 et montre ainsi que cette relation, quoique non significative dans mes expériences, est commune aux espèces de coccolithophoridés. Cette corrélation entre le POC et le volume des cellules peut être utilisée comme un moyen de vérification du POC pour les analyses *in situ* ou en laboratoire si la taille des cellules est définie. Dans un contexte plus large, si des changements environnementaux induisent une variation de la taille des cellules (comme par exemple la limitation en phosphate mentionnée plus haut), cette relation permettra de déduire facilement le quota cellulaire en POC.

La relation entre le POC et le volume de la cellule, déjà élaborée par Menden-Deuer and Lessard (2000) pour plusieurs groupes de phytoplancton, a été utilisée par Hoffmann et al. (2015). Grâce à plusieurs méthodes de microscopie, d'imagerie et de sections des coccosphères, ces auteurs utilisent cette relation pour déterminer le quota cellulaire en POC et la relation définie par Langer et al. (2009) et Young and Ziveri (2000) pour déterminer le quota cellulaire en

PIC. Ainsi ils peuvent étudier la densité et la vitesse de sédimentation des coccosphères individuelles.

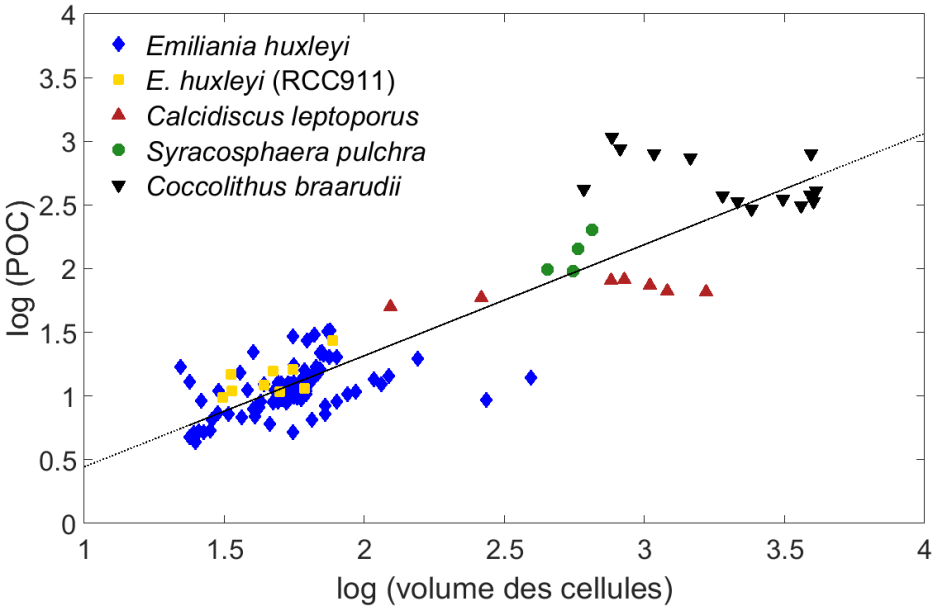


Figure VI.2 : Relation entre le quota cellulaire de POC et le volume des cellules. Données prises dans la littérature et reportées dans la base de données réalisée par Aloisi (2015). Pour *Emiliania huxleyi* : Bach et al. (2011); Borchard et al. (2011); De Bodt et al. (2010); Fiorini et al. (2011); Iglesias-Rodriguez et al. (2008); Kaffes (2010); Lefebvre et al. (2012); Matthiessen et al. (2012); Müller et al. (2012); Riegman et al. (2000); Sciandra et al. (2003). Pour *E. huxleyi* (RCC911) : expériences présentées dans ce manuscrit. Pour *Calcidiscus leptoporus* : Fiorini et al. (2011); Langer et al. (2006). Pour *Syracosphaera pulchra* : Fiorini et al. (2011). Pour *Coccolithus braarudii* : Krug et al. (2011).

Ces relations présentent aussi un intérêt pour d'autres domaines comme la paléoocéanographie. En effet, comme décrit dans Bolton et al. (2016), la masse des coccolithes est utilisée comme un indicateur de la calcification cellulaire dans le Pléistocène[11] et les sédiments récents, et est induite par des changements de taille de cellule aussi bien que du degré de calcification. Ces relations morphologiques avec les taux métaboliques sont donc des atouts majeurs pour l'étude des sédiments et pour permettre de reconstruire la calcification des coccolithophoridés sur des échelles de temps très longues où des changements importants en taille de cellules et de coccolithes ont été observés.

La compréhension de la co-limitation nutriment-lumière sur la physiologie d'*E. huxleyi* se trouve au centre de cette thèse et reste un aspect peu compris et peu étudié pour les

[11] Première époque géologique du Quaternaire qui s'étend de 2.6 millions d'années à 12000 ans avant JC.

coccolithophoridés. Les expériences décrites dans ce manuscrit permettent d'établir de nouvelles hypothèses quant à la réponse physiologique d'*E. huxleyi* à une co-limitation nutriment-lumière. Ces expériences ont notamment montré que les cellules ont un quota cellulaire de POP plus faible en conditions de diminution en lumière et limitation en phosphate. Nous pouvons donc en conclure qu'avec une même concentration de phosphate inorganique initiale, les cellules limitées en phosphate et en lumière ont un besoin plus faible en phosphore (et en azote) que celles cultivées à plus forte lumière, ce qui leur permet d'atteindre des densités cellulaires plus élevées avant la phase stationnaire (non observées ici ; voir chapitre III) (Gerecht et al., 2014). Des observations similaires ont été faites par Leonardos and Geider (2005) pour leur souche non-calcifiante. En effet, leurs cultures, en condition normale de pCO_2, ont un quota de POP plus faible lorsqu'une diminution de lumière est appliquée à des cellules limitées en phosphate. Cette réponse physiologique des cellules d'*E. huxleyi* à une co-limitation lumière-phosphate pourrait s'expliquer par le fait qu'une diminution en lumière engendre une diminution de l'activité photosynthétique qui entraine une baisse de l'apport énergétique et de la synthèse de molécules organiques (carbone organique dissous). Ainsi les besoins nutritifs des cellules seraient diminués car leur métabolisme est ralenti. Cette hypothèse amène à penser que la diminution des besoins nutritifs des cellules en conditions de co-limitation lumière-nutriments serait similaire pour les cellules limitées en nitrate et exposées à une faible lumière. Cependant, cette réponse n'est pas observée dans les expériences de cultures présentées dans ce manuscrit, les besoins en azote et en phosphore étant plus élevés (quotas de PON et de POP plus élevés) pour les cellules co-limitées en nitrate et lumière que lorsque l'intensité lumineuse est plus importante. Nos expériences révèlent donc des réponses physiologiques différentes des cellules à une co-limitation phosphate-lumière et nitrate-lumière, ce qui mérite d'être approfondi dans les années à venir.

Alors que Müller et al. (2008) décrivent les processus intracellulaires inhibés par une limitation en phosphate (réplication d'ADN) ou en nitrate (inhibition de la synthèse de protéines et donc de biomasse), ce travail amène à se demander quel est l'effet d'une diminution en lumière sur ces deux processus et suggère donc de futures études pour élucider cet effet sur la physiologie d'*E. huxleyi.*

Ce travail en laboratoire ouvre donc la voie à de futures expériences de cultures qui seront primordiales pour explorer plus amplement les réponses physiologiques d'*E. huxleyi* et d'autres coccolithophoridés à des conditions de co-limitation en nutriments et en lumière. Pour ce faire, il serait nécessaire d'étendre la gamme de valeurs d'intensité lumineuses à tester en cultures et déterminer de façon plus précise la lumière de saturation pour la croissance, la calcification et la

photosynthèse. De plus, et pour finir cette partie, les futures expériences doivent, dans la mesure du possible, tester plusieurs souches pour s'affranchir ou pour déceler une réponse physiologique spécifique de la souche étudiée (Langer et al., 2006, 2009).

Apports de la modélisation pour l'obtention de paramètres physiologiques d'E. huxleyi liés aux ressources nutritives

La modélisation, approche décrite dans le chapitre IV de ce manuscrit, est un outil analytique ingénieux qui permet, dans le contexte de l'océanographie biologique, de simuler le métabolisme d'organismes planctoniques et d'étudier leur rôle dans les écosystèmes. Le parallèle avec les données récoltées lors d'expériences réalisées en laboratoire permet de calibrer ces modèles ou d'en extraire les informations requises par une autre approche que celle purement expérimentale.

Dans cette thèse, la modélisation a été utilisée pour simuler des expériences de croissance de cellules d'*Emiliania huxleyi* en conditions de limitation en nutriment, et en « forte » et « faible » lumière. Un modèle simple de Monod (Monod, 1949) et de Droop (Droop, 1968) ont été présentés, mais seul le modèle de Droop a permis de reproduire les expériences de cultures simulées. Il a, par conséquent, été utilisé afin d'obtenir des informations physiologiques fondamentales quant à l'assimilation de nutriments. Dans un premier temps, comme décrit dans le chapitre IV, le modèle de Droop a permis l'obtention de variables physiologiques au cours du temps, difficilement accessibles de façon si régulière avec des cultures faites en batch. Ces variables sont par exemple le rapport de quotas cellulaires du carbone sur l'élément limitant, le taux de croissance instantané ou encore le quota cellulaire de l'élément limitant au cours du temps. Dans un second temps, la simulation de la croissance cellulaire d'*E. huxleyi* avec les équations de Droop a fourni des paramètres physiologiques tels que le taux de croissance maximal, la constante de demi-saturation pour l'absorption d'un nutriment ou encore le taux maximal d'absorption d'un nutriment. Ces paramètres physiologiques servent notamment à décrire l'affinité et la capacité d'absorption d'un nutriment par un groupe d'organisme ou une espèce, d'en déduire un comportement compétitif vis-à-vis d'autres groupes phytoplanctoniques et ainsi de mieux comprendre leur distribution biogéographique (Litchman et al., 2007).

Les résultats de la modélisation des expériences de cultures nous montrent avec évidence que les cellules d'*E. huxleyi* peuvent continuer à produire de la biomasse et à se diviser pendant quelques cycles cellulaires lorsque le nutriment limitant est entièrement consommé dans le

milieu. Ce phénomène est possible par l'existence de réserves internes de nutriment qui supportent la croissance et la division cellulaire pendant ces quelques jours (2-3 jours) (Bernard, 2011). Ces réserves internes non considérées dans la théorie de Monod, où tout élément nutritif absorbé par la cellule est directement transformé en biomasse, explique pourquoi le modèle de Monod ne reproduit pas les données expérimentales. Par conséquent, le modèle de Monod ne se prête pas à la simulation de croissance de microalgues en conditions de limitation en nutriments (Bernard, 2011), contrairement au modèle (ou théorie) de Droop utilisé plus largement (Benavides et al., 2015, 2015; Bougaran et al., 2010; Flynn, 2008a, 2008b; Litchman et al., 2004; Sommer, 1991). Ce travail de thèse de modélisation a confirmé que la théorie de Monod n'est pas adaptée à la reproduction de la croissance cellulaire d'*E huxleyi*, ce qui est aussi valable pour la croissance cellulaire de tous les coccolithophoridés.

Les paramètres physiologiques estimés pour l'espèce *E. huxleyi* dans ce travail sont cohérents avec la littérature. Cependant, ces paramètres restent encore trop peu estimés et le peu d'études s'intéressant à ceux des coccolithophoridés estiment majoritairement les paramètres physiologiques relatifs à l'assimilation du nitrate et à l'espèce *E. huxleyi* (Eppley et al., 1969; Litchman et al., 2007; Marañón et al., 2013; Riegman et al., 2000; Terry, 1982). Ceci nous a donc amené à comparer les caractéristiques physiologiques vis-à-vis de l'assimilation du nitrate entre *E. huxleyi* et les autres groupes phytoplanctoniques tels que les diatomées, les dinoflagellés, les chlorophytes et les cyanobactéries (voir Figure IV.16 du chapitre IV).

Alors que la capacité de stockage de l'azote par les coccolithophoridés, et plus spécifiquement par *E. huxleyi*, est intermédiaire ($Q_{minN,}$ quota minimum ou subsistant en azote intermédiaire), leur taux maximal d'absorption du nitrate (V_{maxN}) est plutôt faible par rapport aux autres groupes phytoplanctoniques étudiés. Ces deux paramètres sont corrélées linéairement avec la taille des cellules du groupe considéré (Litchman et al., 2007; Marañón et al., 2013) ce qui signifie que plus la taille de la cellule sera grande plus elle pourra stocker un quota minimum d'azote et plus sa capacité d'absorption du nitrate sera importante. Dans le cas d'*E. huxleyi*, les cellules font partie du moyen (voire petit) phytoplancton ce qui est cohérent avec les conclusions précédentes. L'affinité d'*E. huxleyi* pour le nitrate est assez forte (K_N intermédiaire) par rapport aux autres groupes étudiés (Litchman et al., 2007) ce qui rejoint les observations faites dans la littérature comme quoi *E. huxleyi* est une espèce « affinity-adapted » (Sommer, 1984) qui peut vivre dans des environnements oligotrophes. De plus, cette espèce a une forte capacité de conversion des nutriments en biomasse mise en avant par son taux de croissance maximum supérieur à celui des autres groupes phytoplanctoniques étudiés (voir Figure IV.16D du chapitre IV) (Marañón et al., 2013). Cependant, il est important de préciser que

les coccolithophoridés, et notamment *E. huxleyi*, occupent une place intermédiaire entre les groupes phytoplanctoniques s'ils sont tous considérés (cyanobactéries non considérés dans l'étude du K_N par Marañón et al., 2013 ; voir Figure IV.16C du chapitre IV). Ceci témoigne de leur capacité à croître dans des environnements divers et donc de leur répartition cosmopolite dans l'océan. En effet, alors qu'*E. huxleyi* est connue pour former de larges efflorescences dans l'Atlantique Nord (Holligan et al., 1993a), cette espèce est aussi fortement distribuée dans les upwellings côtiers (ex: Henderiks et al., 2012) et a été observée régulièrement dans les assemblages issus des gyres oligotrophes (Beaufort et al., 2008; Okada and McIntyre, 1979).

Nous avons pu voir que la détermination de la constante de demi-saturation pour l'absorption de l'élément limitant, K_R, via le modèle de Droop s'est avéré la plus délicate parmi les paramètres estimés. Si nos estimations de la constante relative à l'absorption du nitrate K_N semblent bien correspondre aux précédentes études, il est plus compliqué de comparer la constante K_P qui a été très peu déterminée pour *E. huxleyi*. Une exception est le travail expérimental de Riegman et al. (2000) qui détermine une affinité d'*E. huxleyi* bien plus forte pour le phosphate que pour le nitrate. Cette conclusion, reprise par les revues de Paasche (2002) et Zondervan (2007) en s'appuyant uniquement sur le travail de Riegman et al. (2000), serait une explication quant à la capacité d'*E. huxleyi* à former des efflorescences dans des eaux limitées en phosphate comme décrit dans Tyrrell and Merico (2004). Cette affinité importante pour le phosphate par rapport au nitrate n'a pas été mise en avant dans ce travail de thèse où les valeurs des constantes K_N et K_P se trouvent dans le même intervalle de valeurs. De futures déterminations de ce paramètre essentiel sont nécessaires pour confirmer les conclusions quant à l'affinité d'*E. huxleyi* pour le nitrate et le phosphate et ainsi en déduire des relations avec sa distribution biogéographique dans l'océan.

Un autre paramètre, le paramètre KQ sans dimension utilisé dans l'équation du ^{n}Quota de Flynn (2008a) (équation IV-6), nécessiterait davantage d'intérêt afin d'en comprendre les bases physiologiques et définir plus précisément son intervalle de valeur pour *E. huxleyi*.

Ce travail offre, malgré tout, une avancée significative dans l'estimation des paramètres physiologiques de l'espèce *E. huxleyi* quant à l'assimilation d'un nutriment (nitrate ou phosphate). Cependant, le manque d'étude à ce sujet reste un frein à la discussion et à l'élaboration de conclusions. De futurs travaux pourraient aider à diminuer ces incertitudes sur les estimations réalisées via le modèle de croissance cellulaire de Droop. Pour ceci, il serait intéressant de simuler les données expérimentales de Marañón et al. (2013), mentionnées dans

le chapitre IV, qui ont cultivé 22 espèces différentes de 6 grands groupes phytoplanctoniques en batch et ont déterminé expérimentalement les quotas cellulaires en azote minimaux et maximaux, les taux d'absorption en nitrate et les taux de croissance maximaux. Cette simulation permettrait de vérifier que les valeurs des paramètres simulés correspondent correctement aux paramètres définis expérimentalement et permettrait donc de confirmer la validité du modèle.

Le modèle de Droop est un outil utile d'étude de l'abondance des éléments nutritifs limitants par rapport au carbone dans la cellule (Flynn, 2008a). Alors que l'absorption du nutriment limitant par la cellule est bien évidemment affecté par la limitation de ce nutriment dans le milieu, l'absorption des ou du nutriment non limitant sera aussi impactée par cette limitation et peut être étudiée en analysant les quotas cellulaires et les rapports cellulaires par rapport au carbone (Zonneveld, 1996). Cette observation a été, de plus, mise en avant dans la première partie de cette discussion où les quotas POP et PON varient de façons différentes selon la limitation appliquée dans les expériences de cultures avec *E. huxleyi*.

Cet intérêt pour mieux comprendre la variation de l'élément non limitant en limitation d'un autre nutriment nous a, par conséquent, amené à utiliser la base de données de Aloisi (2015) sur les expériences de cultures réalisées sur les coccolithophoridés. Cette base de données a été filtrée afin de sélectionner uniquement les expériences réalisées avec l'espèce *E. huxleyi* en conditions de limitation en nitrate ou phosphate et en conditions de culture spécifiques telles que: une pCO_2 entre 250 et 550 µatm, une température entre 14 et 20°C et une irradiance entre 120 et 400 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. La Figure VI.3 a donc été réalisée dans le but d'obtenir un profil de l'effet d'une limitation en nitrate ou en phosphate sur la relation entre le taux de croissance et le rapport entre l'élément limitant et le carbone.

Alors que les expériences en chemostat fournissent des taux de croissance stables même en limitation en nutriment, les expériences en batch en conditions de limitation en nutriment ne permettent pas de déterminer un taux de croissance pour la totalité de l'expérience (voir chapitre III et Langer et al., 2013). Par conséquent, les expériences en batch sont représentées par les données avec un taux de croissance de zéro et les expériences en chemostat ont, quant à elles, un taux de croissance supérieur à zéro. Comme discuté dans la première partie de cette discussion, les quotas cellulaires donnent une information sur les besoins nutritifs des cellules dans des conditions environnementales définies. Par conséquent, il en sera de même pour les rapports PON :POC et POP :POC (ou POC :PON et POC :POP). Ceux-ci, en conditions de limitation en nutriments, se retrouvent toujours inférieurs au rapport de Redfield : 0.151 pour N/C et 0.0094 pour P/C et diminuent avec le taux de croissance de l'expérience (voir Figure VI.3). Ceci

est cohérent avec le principe de limitation en nutriments mais nous pouvons noter que cette figure montre la même réponse pour l'élément non limitant, ce qui révèle un des effets indirects de la limitation en nutriments sur les rapports des quotas cellulaires avec le carbone.

Cette figure est inspirée du travail de Flynn (2008a) qui, lui, définit la valeur de KQ de l'élément limitant en ajustant l'équation du ^{n}Quota (équation IV-6) à la courbe obtenue en représentant le taux de croissance en fonction du rapport de cet élément avec le carbone pour les données de cultures de diatomées. Cette méthode pourrait apporter de nouveaux éléments quant à la détermination du paramètre assez mystérieux KQ et pour l'étude des rapports élémentaires d'*E. huxleyi* en conditions de limitation en nutriments. La base de données réalisée par Giovanni Aloisi, présentée dans Aloisi (2015) et mentionnée plusieurs fois dans ce manuscrit pourrait être un outil primordial pour effectuer ces futures études.

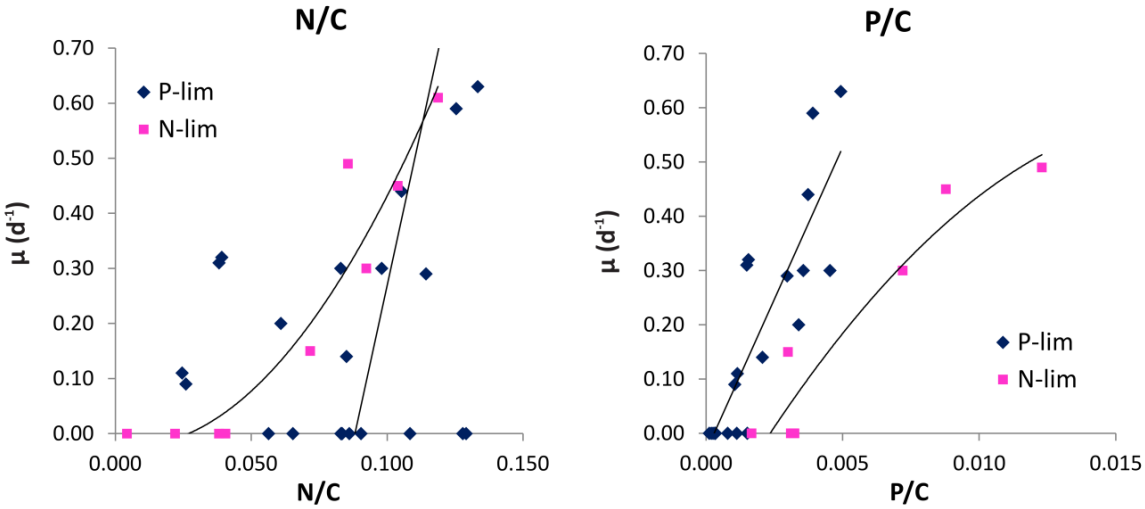


Figure VI.3 : Rapport de l'élément limitant sur le carbone et de l'élément non limitant sur le carbone pour l'azote et le phosphore, pour *E. huxleyi*. Figure réalisée avec les données prises dans la base de données de Aloisi (2015) et filtrée. Les références sont : Borchard et al. (2011); Engel et al. (2014); Langer et al. (2013); Leonardos and Geider (2005); Müller et al. (2012); Oviedo et al. (2014); Riegman et al. (2000); Rouco et al. (2013) et les expériences présentées dans ce manuscrit avec RCC911.

Dans un contexte plus large, l'étude de la relation entre les taux de croissance des cellules d'*E. huxleyi* et leur rapport élément limitant/C ainsi que l'étude de l'effet d'une limitation en nutriment sur le quota de l'élément non limitant sont des approches nécessaires afin de mieux comprendre, dans les années à venir, le comportement d'*E. huxleyi* dans des régions limitées en nutriments. En effet, Tyrrell and Merico (2004) reportent que certaines efflorescences de cette

microalgue ont lieu dans des eaux limitées en phosphate et que d'autres sont plutôt observées dans des eaux limitées en nitrate. De plus, les niches profondes de coccolithophoridés, observées dans les gyres subtropicaux océaniques, sont des écosystèmes spécifiques où l'apport vertical en nutriments est faible, générant une limitation en nutriment en surface jusqu'à la limite de la DCM et où *E. huxleyi* peut vivre (Beaufort et al., 2008; Haidar and Thierstein, 2001; Okada and Honjo, 1973).

Les niches profondes, environnements potentiellement importants pour la croissance d'E. huxleyi

L'étude de la présence d'*E. huxleyi* et des conditions environnementales qui permettent sa croissance dans le gyre du Pacifique-Sud a été réalisée grâce à la combinaison de la littérature, de la base de données, filtrée, de Aloisi (2015) et des paramètres physiologiques estimés pour *E. huxleyi* suite au travail de modélisation fait dans le cadre de cette thèse. Une méthode exploratoire a été proposée dans le chapitre V pour estimer le taux de croissance et le taux de calcification potentiels d'*E. huxleyi* le long du transect BIOSOPE. Ces paramètres, contrôlés en grande partie par les gradients horizontaux et verticaux de nitrate et d'irradiance, ont montré des maxima à une profondeur où les nutriments sont détectables et où la disponibilité en lumière est suffisante pour permettre la croissance des cellules. Cette zone correspond par ailleurs à l'emplacement de la concentration maximale en coccosphères rapportée par Beaufort et al. (2008) et à la DCM observée par Claustre et al. (2008). Comme le concluent Beaufort et al. (2008), cette présence d'*E. huxleyi* à plus de 100 m de profondeur met en évidence une niche distincte de celle de forte irradiance proposée par Nanninga and Tyrrell (1996).

L'espèce *E. huxleyi* est connue en effet pour ne montrer aucun signe de photoinhibition même à des irradiances très élevées (Nanninga and Tyrrell, 1996; Nielsen, 1997). Il a été proposé que cette caractéristique d'*E. huxleyi* pourrait être expliquée par la dissipation de l'énergie en excès grâce à la calcification (Nanninga and Tyrrell, 1996; Paasche, 2002; Trimborn et al., 2007), qui permettrait ainsi à cette espèce de croitre dans des environnements très lumineux comme dans les eaux de surfaces. De plus, alors que la calcification pourrait protéger les cellules des irradiances trop élevées, elle pourrait aussi permettre de rediriger la lumière dans la cellule lorsque celle-ci est trop faible et lui permettre d'être privilégiée dans des environnements limités en lumière (Paasche, 2002). Ceci pourrait donc être une explication à la présence de cette espèce à de telles profondeurs dans les gyres subtropicaux.

Les niches profondes de coccolithophoridés ont été étudiées dans le Pacifique-Nord, par exemple, par Cortés et al. (2001) et Okada and Honjo (1973) mais aucun d'eux ne reportent des Isochrysidales à des profondeurs aussi élevées (entre 150 et 200 m). Ils trouvent de leur côté des abondances maximales d'*E. huxleyi* aux alentours de 100 m de profondeur avec 9.10^3 cell.L^{-1} pour l'étude *in situ* de Cortés et al. (2001) ou des assemblages dominés par *E. huxleyi* entre 75 et 100 m de profondeur pour Okada and Honjo (1973). Tous deux soulignent, malgré tout, la dominance de l'espèce d'eaux profondes, *Florisphaera profunda*, dans les assemblages de coccolithophoridés, entre 125 et 200 m de profondeur. Le gyre du Pacifique-Sud est donc propice à un écosystème bien particulier et différent des autres gyres où la croissance des coccolithophoridés est possible puisque les Isochrysidales y dominent les assemblages même dans les eaux profondes autour de 150 m de profondeur (Beaufort et al., 2008).

L'étendue des valeurs d'abondance de l'espèce *E. huxleyi* dans les environnements où elle a été étudiée est assez impressionnante et montre d'une part les propriétés d'adaptation de cette espèce à des environnements variés, tant eutrophes qu'oligotrophes et d'autre part, une réponse différente en terme d'abondance cellulaire par unité de volume selon l'environnement considéré. Le Tableau VI.1 rapporte quelques valeurs d'abondances cellulaires caractéristiques et permet de comparer avec l'abondance cellulaire faible d'une niche profonde. Comme attendu, les zones d'efflorescence permettent une abondance cellulaire d'*E. huxleyi* bien plus élevée que les autres environnements, ensuite viennent les upwellings et enfin les niches profondes. L'efflorescence de l'Atlantique Nord est une des plus importantes observées dans l'océan pour *E. huxleyi* (Holligan et al., 1993a; Tyrrell and Merico, 2004; Winter et al., 1994). L'upwelling du Benguela, pris en référence, fait parti des principaux upwellings côtiers d'Afrique de l'ouest (Henderiks et al., 2012; Mitchell-Innes and Winter, 1987). Nous pouvons remarquer que l'abondance cellulaire dans une niche profonde telle que le gyre Pacifique-Sud est plus faible que celles atteintes à la fin des expériences réalisées en batch. Bien évidemment, ces valeurs ne sont pas directement comparables puisque dans une culture en batch, le broutage, la turbulence et l'export vertical des cellules ne rentrent pas en compte et que la phase exponentielle permet d'obtenir des abondances élevées avant que la limitation en nutriments ne soit atteinte. De plus, alors que dans l'environnement l'apport nutritif est relativement régulier selon le mélange vertical, la disponibilité en nutriments diminue progressivement jusqu'à être quasiment nulle dans les cultures en batch. Ceci amène aussi à un autre point important comme quoi les cellules cultivées en batch atteignent leurs limites d'adaptation, alors que des expériences en chemostat permettent d'acclimater les cellules à une faible concentration en nutriments et ainsi observer leur adaptation à cette limitation (LaRoche et al.,

2010). Bien évidemment, le type de culture réalisé dépend notamment de la question scientifique posée et du matériel à disposition pour effectuer les expériences en laboratoire.

Tableau VI.1 : Abondance cellulaire d'*E. huxleyi* dans une zone d'efflorescence, un upwelling, une niche profonde et des cultures en laboratoire, avec la référence correspondante.

Environnement	Abondance cellulaire (*cells L^{-1}*)	Références
Bloom Atlantique-Nord	max 10. 10^6	Holligan et al. (1993)
Upwelling du Benguela	max 1,8.10^6	Mitchell-Innes and Winter (1987)
Niche profonde Pacifique-Sud	2,2.10^3 (station GYR ; 150m)	Beaufort et al. (2008)
Cultures en laboratoire	~ 50.10^3 -150.10^3	Perrin et al. (2016), ce travail de thèse

En terme de biomasse, O'Brien et al. (2013) décrivent et estiment la distribution des coccolithophoridés dans l'océan global avec les données récoltées et disponibles. Le maximum de biomasse dans l'océan global se trouve le long des côtes islandaises (Atlantique Nord) et atteint des valeurs de 127.2 µgC.L^{-1} alors que les valeurs d'environ 20.0 µgC.L^{-1} sont rapportées dans l'océan Pacifique où l'étendue relativement restreinte des observations spatio-temporelles contribue en partie à cette faible biomasse. Nous pouvons alors nous demander quelle est la contribution en biomasse des niches profondes d'*E. huxleyi,* ou plus largement des Isochrysidales, dans l'océan global. Celle-ci est évidemment bien inférieure à la contribution des efflorescences et upwellings. Cependant comme le soulignent McClain et al. (2004), la taille immense de ces gyres subtropicaux amène à penser que leur contribution dans la productivité biologique phytoplanctonique en général, et plus spécifiquement des coccolithophoridés, est sûrement significative.

Emiliania huxleyi, une espèce cosmopolite et passionnante, dont la physiologie n'est que partiellement comprise

Ce travail de thèse a pu mettre en avant différentes approches complémentaires pour enquêter sur les caractéristiques physiologiques d'*E. huxleyi* et son adaptation à une large gamme de conditions environnementales, qui explique sa distribution cosmopolite. L'interprétation de la réponse physiologique d'*E. huxleyi* vis-à-vis d'une co-limitation en nutriments et en lumière n'est pas simple et nécessite donc de continuer son étude par le biais d'expériences de cultures en laboratoire que ce soit sur l'espèce elle-même, ou sur différentes souches. La rareté de ces expériences de culture en co-limitation lumière et nutriments et le manque de littérature pour l'estimation des paramètres physiologiques relatifs à l'assimilation de nutriments pour *E. huxleyi*, rendent ce travail de thèse d'autant plus bénéfique pour la communauté scientifique étudiant le phytoplancton et plus spécifiquement, les coccolithophoridés. Ce travail et les résultats obtenus pendant cette thèse viennent donc alimenter l'objectif commun de mieux comprendre la réponse physiologique d'*E. huxleyi* à des gradients environnementaux, gradients qui sont amenés à changer dans l'océan futur.

REFERENCES

A

Aloisi, G.: The calcium carbonate saturation state in cyanobacterial mats throughout Earth's history, Geochim. Cosmochim. Acta, 72(24), 6037–6060, doi:10.1016/j.gca.2008.10.007, 2008.

Aloisi, G.: Covariation of metabolic rates and cell size in coccolithophores, Biogeosciences, 12(15), 6215–6284, doi:10.5194/bg-12-4665-2015, 2015.

Angel, M. V.: Biodiversity of the pelagic ocean, Conserv. Biol., 7(4), 760–772, 1993.

B

Bach, L. T., Riebesell, U. and Schulz, K. G.: Distinguishing between the effects of ocean acidification and ocean carbonation in the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 56(6), 2040–2050, doi:10.4319/lo.2011.56.6.2040, 2011.

Bach, L. T., Riebesell, U., Gutowska, M. A., Federwisch, L. and Schulz, K. G.: A unifying concept of coccolithophore sensitivity to changing carbonate chemistry embedded in an ecological framework, Prog. Oceanogr., 135, 125–138, doi:10.1016/j.pocean.2015.04.012, 2015.

Balch, W. M.: Re-evaluation of the physiological ecology of coccolithophores, in Coccolithophores, edited by P. D. H. R. Thierstein and D. J. R. Young, pp. 165–190, Springer Berlin Heidelberg., 2004.

Balch, W. M., Holligan, P. M., Ackleson, S. G. and Voss, K. J.: Biological and optical properties of mesoscale coccolithophore blooms in the Gulf of Maine, Limnol. Oceanogr., 36(4), 629–643, doi:10.4319/lo.1991.36.4.0629, 1991.

Balch, W. M., Drapeau, D. T., Cucci, T. L., Vaillancourt, R. D., Kilpatrick, K. A. and Fritz, J. J.: Optical backscattering by calcifying algae: Separating the contribution of particulate inorganic and organic carbon fractions, J. Geophys. Res. Oceans, 104(C1), 1541–1558, doi:10.1029/1998JC900035, 1999.

Balch, W. M., Gordon, H. R., Bowler, B. C., Drapeau, D. T. and Booth, E. S.: Calcium carbonate measurements in the surface global ocean based on Moderate-Resolution Imaging Spectroradiometer data, J. Geophys. Res. Oceans, 110(C7), 2005.

Baumann, K.-H.: Importance of size measurements for coccolith carbonate flux estimates, Micropaleontology, 50(Suppl 1), 35–43, doi:10.2113/50.Suppl_1.35, 2004.

Beaufort, L. and Dollfus, D.: Automatic recognition of coccoliths by dynamical neural networks, Mar. Micropaleontol., 51(1–2), 57–73, doi:10.1016/j.marmicro.2003.09.003, 2004.

Beaufort, L., Couapel, M., Buchet, N., Claustre, H. and Goyet, C.: Calcite production by coccolithophores in the South East Pacific Ocean, Biogeosciences, 5, 1101–1117, doi:10.5194/bg-5-1101- 2008, 2008.

Benavides, M., Telen, D., Lauwers, J., Logist, F., Van Impe, J. and Wouwer, A. V.: Parameter identification of the Droop model using optimal experiment design, IFAC-Pap., 48(1), 586–591, doi:10.1016/j.ifacol.2015.05.094, 2015.

Bendif, E. M.: De la macroévolution à la microévolution chez le phytoplancton: le cas des Isochrysidales, Thèse, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI., 2011.

Benner, I., Diner, R. E., Lefebvre, S. C., Li, D., Komada, T., Carpenter, E. J. and Stillman, J. H.: *Emiliania huxleyi* increases calcification but not expression of calcification-related genes in long-term exposure to elevated temperature and pCO_2, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 368(1627), 20130049, doi:10.1098/rstb.2013.0049, 2013.

Bernard, O.: Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO_2 mitigation and biofuel production, J. Process Control, 21(10), 1378–1389, doi:10.1016/j.jprocont.2011.07.012, 2011.

Biard, T.: Diversité, biogéographie et écologie des Collodaires (Radiolaires) dans l'océan mondial, Thèse, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI., 2015.

Bichon, S. and Savoye, N.: Détermination de la concentration en Carbone et Azote Organiques Particulaires (COP et NOP), Protocole national SOMLIT., 2013.

Billard, C. and Inouye, I.: What is new in coccolithophore biology?, in Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact, pp. 1–29, Springer., 2004.

van Bleijswijk, J. D. L., Kempers, R. S., Veldhuis, M. J. and Westbroek, P.: Cell and growth characteristics of types A and B of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) as determined by flow cytometry and chemical Analyses, J. Phycol., 30(2), 230–241, doi:10.1111/j.0022-3646.1994.00230.x, 1994.

Bollmann, J. and Herrle, J. O.: Morphological variation of *Emiliania huxleyi* and sea surface salinity, Earth Planet. Sci. Lett., 255(3), 273–288, doi:10.1016/j.epsl.2006.12.029, 2007.

Bolton, C. T. and Stoll, H. M.: Late Miocene threshold response of marine algae to carbon dioxide limitation, Nature, 500(7464), 558–562, doi:10.1038/nature12448, 2013.

Bolton, C. T., Hernández-Sánchez, M. T., Fuertes, M.-Á., González-Lemos, S., Abrevaya, L., Mendez-Vicente, A., Flores, J.-A., Probert, I., Giosan, L., Johnson, J. and Stoll, H. M.: Decrease in coccolithophore calcification and CO_2 since the middle Miocene, Nat. Commun., 7, 10284, doi:10.1038/ncomms10284, 2016.

Borchard, C., Borges, A. V., Händel, N. and Engel, A.: Biogeochemical response of *Emiliania huxleyi* (PML B92/11) to elevated CO_2 and temperature under phosphorous limitation: A chemostat study, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 410, 61–71, doi:10.1016/j.jembe.2011.10.004, 2011.

Bougaran, G., Bernard, O. and Sciandra, A.: Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus, J. Theor. Biol., 265(3), 443–454, doi:10.1016/j.jtbi.2010.04.018, 2010.

Bown, P. R.: Calcareous nannoplankton evolution: a tale of two oceans, Micropaleontology, 51(4), 299–308, doi:10.2113/gsmicropal.51.4.299, 2005.

Brand, L. E.: Genetic variability and spatial patterns of genetic differentiation in the reproductive rates of the marine coccolithophores *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*, Limnol. Oceanogr., 27(2), 236–245, doi:10.4319/lo.1982.27.2.0236, 1982.

Brand, L. E.: Minimum iron requirements of marine phytoplankton and the implications for the biogeochemical control of new production, Limnol. Oceanogr., 36(8), 1756–1771, doi:10.4319/lo.1991.36.8.1756, 1991.

Brand, L. E.: Physiological ecology of marine coccolithophores, in Coccolithophores, pp. 39–49, Cambridge., 1994.

Brand, L. E., Sunda, W. G. and Guillard, R. R. L.: Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese, and iron, Limnol. Oceanogr., 28(6), 1182–1198, doi:10.4319/lo.1983.28.6.1182, 1983.

Broecker, W. and Clark, E.: Ratio of coccolith $CaCO_3$ to foraminifera $CaCO_3$ in late Holocene deep sea sediments, Paleoceanography, 24(3), PA3205, doi:10.1029/2009PA001731, 2009.

Broerse, A. T., Ziveri, P., Van Hinte, J. E. and Honjo, S.: Coccolithophore export production, species composition, and coccolith-$CaCO_3$ fluxes in the NE Atlantic (34° N21° W and 48° N21° W), Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 47(9), 1877–1905, 2000.

Brown, C. W. and Yoder, J. A.: Coccolithophorid blooms in the global ocean, J. Geophys. Res. Oceans, 99(C4), 7467–7482, doi:10.1029/93JC02156, 1994.

Buitenhuis, E. T., De Baar, H. J. W. and Veldhuis, M. J. W.: Photosynthesis and calcification by *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) as a function of inorganic carbon species, J. Phycol., 35(5), 949–959, doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3550949.x, 1999.

Buitenhuis, E. T., Pangere, T., Franklin, D. J., Le Quéré, C. and Malin, G.: Growth rates of six coccolithophorid strains as a function of temperature, Limnol. Oceanogr., 53(3), 1181–1185, doi:10.4319/lo.2008.53.3.1181, 2008.

C

Campbell, G. S. and Norman, J. M.: An Introduction to environmental biophysics, Springer Science & Business Media., 1998.

Caron, D. A., Countway, P. D., Jones, A. C., Kim, D. Y. and Schnetzer, A.: Marine protistan diversity, Annu. Rev. Mar. Sci., 4(1), 467–493, doi:10.1146/annurev-marine-120709-142802, 2012.

Cavender-Bares, K. K., Karl, D. M. and Chisholm, S. W.: Nutrient gradients in the western North Atlantic Ocean: Relationship to microbial community structure and comparison to patterns in the Pacific Ocean, Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap., 48(11), 2373–2395, doi:10.1016/S0967-0637(01)00027-9, 2001.

Charalampopoulou, A., Poulton, A. J., Tyrrell, T. and Lucas, M. I.: Irradiance and pH affect coccolithophore community composition on a transect between the North Sea and the Arctic Ocean, Mar. Ecol. Prog. Ser., 431, 25–43, doi:10.3354/meps09140, 2011.

Claustre, H. and Maritorena, S.: The many shades of Ocean blue, Science, 302(5650), 1514–1515, doi:10.1126/science.1092704, 2003.

Claustre, H., Huot, Y., Obernosterer, I., Gentili, B., Tailliez, D. and Lewis, M.: Gross community production and metabolic balance in the South Pacific Gyre, using a non intrusive bio-optical method, Biogeosciences, 5(2), 463–474, 2008a.

Claustre, H., Sciandra, A. and Vaulot, D.: Introduction to the special section bio-optical and biogeochemical conditions in the South East Pacific in late 2004: the BIOSOPE program, Biogeosciences, 5(3), 679–691, doi:10.5194/bg-5-679-2008, 2008b.

Collos, Y., Vaquer, A. and Souchu, P.: Acclimation of nitrate uptake by phytoplankton to high substrate levels, J. Phycol., 41(3), 466–478, doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00067.x, 2005.

Conte, M. H., Thompson, A., Lesley, D. and Harris, R. P.: Genetic and physiological influences on the alkenone/alkenoate versus growth temperature relationship in *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*, Geochim. Cosmochim. Acta, 62(1), 51–68, doi:10.1016/S0016-7037(97)00327-X, 1998.

Cortés, M. Y., Bollmann, J. and Thierstein, H. R.: Coccolithophore ecology at the HOT station ALOHA, Hawaii, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 48(8–9), 1957–1981, doi:10.1016/S0967-0645(00)00165-X, 2001.

Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. and Smith, A. G.: Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria, Nature, 438(7064), 90–93, doi:10.1038/nature04056, 2005.

D

Daneri, G. and Quinones, R. A.: Undersampled ocean systems: A plea for an international study of biogeochemical cycles in the southern Pacific gyre and its boundaries, US JGOFS Newsl., 11(9), 2001.

Daniels, C. J., Tyrrell, T., Poulton, A. J. and Pettit, L.: The influence of lithogenic material on particulate inorganic carbon measurements of coccolithophores in the Bay of Biscay, Limnol. Oceanogr., 57(1), 145–153, doi:10.4319/lo.2012.57.1.0145, 2012.

Daniels, C. J., Sheward, R. M. and Poulton, A. J.: Biogeochemical implications of comparative growth rates of *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus* species, Biogeosciences, 11(23), 6915–6925, doi:10.5194/bg-11-6915-2014, 2014.

De Bodt, C., Van Oostende, N., Harlay, J., Sabbe, K. and Chou, L.: Individual and interacting effects of pCO_2 and temperature on *Emiliania huxleyi* calcification: study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size, Biogeosciences, 7(5), 1401–1412, doi:10.5194/bg-7-1401-2010, 2010.

Dodds, W. K., Biggs, B. J. F. and Lowe, R. L.: Photosynthesis-irradiance patterns in benthic microalgae: variations as a function of assemblage thickness and community structure, J. Phycol., 35(1), 42–53, doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3510042.x, 1999.

Droop, M. R.: Vitamin B12 and marine ecology. IV. the kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*, J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 48(3), 689–733, doi:10.1017/S0025315400019238, 1968.

E

Edvardsen, B., Eikrem, W., Green, J. C., Andersen, R. A., Moon-van der Staay, S. Y. and Medlin, L. K.: Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data, Phycologia, 39(1), 19–35, 2000.

Ehrenberg, C. G.: Ueber mikroskopische neue Charaktere der erdigen und derben Mineralien, Ann. Phys., 115(9), 101–106, doi:10.1002/andp.18361150907, 1836.

Engel, A., Zondervan, I., Aerts, K., Beaufort, L., Benthien, A., Chou, L., Delille, B., Gattuso, J.-P., Harlay, J., Heemann, C., Hoffmann, L., Jacquet, S., Nejstgaard, J., Pizay, M.-D., Rochelle-Newall, E., Schneider, U., Terbrueggen, A. and Riebesell, U.: Testing the direct effect of CO_2 concentration on a bloom of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* in mesocosm experiments, Limnol. Oceanogr., 50(2), 493–507, doi:10.4319/lo.2005.50.2.0493, 2005.

Engel, A., Cisternas Novoa, C., Wurst, M., Endres, S., Tang, T., Schartau, M. and Lee, C.: No detectable effect of CO_2 on elemental stoichiometry of *Emiliania huxleyi* in nutrient-limited, acclimated continuous cultures, Mar. Ecol. Prog. Ser., 507, 15–30, doi:10.3354/meps10824, 2014.

Eppley, R. W., Rogers, J. N. and McCarthy, J. J.: Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton, Limnol. Oceanogr., 14(6), 912–920, doi:10.4319/lo.1969.14.6.0912, 1969.

F

Fagerbakke, K. M., Heldal, M., Norland, S., Heimdal, B. R. and Båtvik, H.: *Emiliania huxleyi*. Chemical composition and size of coccoliths from enclosure experiments and a Norwegian fjord, Sarsia, 79(4), 349–355, doi:10.1080/00364827.1994.10413566, 1994.

Falkowski, P., Scholes, R. J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Högberg, P., Linder, S., Mackenzie, F. T., Iii, B. M., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V. and Steffen, W.: The global carbon cycle: a test of our knowledge of Earth as a system, Science, 290(5490), 291–296, doi:10.1126/science.290.5490.291, 2000.

Feng, Y., Warner, M. E., Zhang, Y., Sun, J., Fu, F.-X., Rose, J. M. and Hutchins, D. A.: Interactive effects of increased pCO_2, temperature and irradiance on the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), Eur. J. Phycol., 43(1), 87–98, doi:10.1080/09670260701664674, 2008.

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. and Falkowski, P.: Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components, Science, 281(5374), 237–240, 1998.

Fielding, S. R.: *Emiliania huxleyi* specific growth rate dependence on temperature, Limnol. Oceanogr., 58(2), 663–666, doi:10.4319/lo.2013.58.2.0663, 2013.

Fiorini, S., Middelburg, J. J. and Gattuso, J.-P.: Testing the effects of elevated pCO_2 on coccolithophores (Prymnesiophyceae): Comparison between haploid and diploid life stages, J. Phycol., 47(6), 1281–1291, doi:10.1111/j.1529-8817.2011.01080.x, 2011.

Flynn, K.: The importance of the form of the quota curve and control of non-limiting nutrient transport in phytoplankton models, J. Plankton Res., 30(4), 423–438, doi:10.1093/plankt/fbn007, 2008a.

Flynn, K. J.: How critical is the critical N : P ratio, J. Phycol., 38(5), 961–970, doi:10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-01235.x, 2002.

Flynn, K. J.: Use, abuse, misconceptions and insights from quota models—the droop cell quota model 40 years on, Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev., 46, 1–23, 2008b.

Follows, M. J. and Dutkiewicz, S.: Modeling diverse communities of marine microbes, Annu. Rev. Mar. Sci., 3(1), 427–451, doi:10.1146/annurev-marine-120709-142848, 2011.

Fritz, J. J.: Carbon fixation and coccolith detachment in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* in nitrate-limited cyclostats, Mar. Biol., 133(3), 509–518, doi:10.1007/s002270050491, 1999.

Fritz, J. J. and Balch, W. M.: A light-limited continuous culture study of *Emiliania huxleyi*:

determination of coccolith detachment and its relevance to cell sinking, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 207(1), 127–147, 1996.

G

Gangstø, R., Gehlen, M., Schneider, B., Bopp, L., Aumont, O. and Joos, F.: Modeling the marine aragonite cycle: changes under rising carbon dioxide and its role in shallow water $CaCO_3$ dissolution, Biogeosciences, 5(4), 1057–1072, doi:10.5194/bg-5-1057-2008, 2008.

Gattuso, J.-P. and Hansson, L.: Ocean Acidification, Oxford University Press., Oxford., 2011.

Gerecht, A. C., Šupraha, L., Edvardsen, B., Probert, I. and Henderiks, J.: High temperature decreases the PIC/POC ratio and increases phosphorus requirements in *Coccolithus pelagicus* (Haptophyta), Biogeosciences, 11(13), 3531–3545, doi:10.5194/bg-11-3531-2014, 2014.

Gibbs, S. J., Poulton, A. J., Brown, P. R., Daniels, C. J., Hopkins, J., Young, J. R., Jones, H. L., Thiemann, G. J., O'Dea, S. A. and Newsam, C.: Species-specific growth response of coccolithophores to Palaeocene–Eocene environmental change, Nat. Geosci., 6, 218–222, doi:10.1038/NGEO1719, 2013.

Gregg, W. W. and Casey, N. W.: Modeling coccolithophores in the global oceans, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 54(5–7), 447–477, doi:10.1016/j.dsr2.2006.12.007, 2007.

Guerreiro, C. A. V.: (Paleo)ecology of coccolithophores in the submarine canyons of the central portuguese continental margin: Environmental, sedimentary and oceanographic implications, Thèse, Universidade de Lisboa., 2013.

Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H.: Studies of marine planktonic diatoms — I. *Cyclotella nanna* (Hustedt) and *Detonula convervacea* (Cleve), Can. J. Microbiol., 8(2), 229–239, doi:10.1139/m62-029, 1962.

H

Haidar, A. T. and Thierstein, H. R.: Coccolithophore dynamics off Bermuda (N. Atlantic), Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 48(8–9), 1925–1956, doi:10.1016/S0967-0645(00)00169-7, 2001.

Harris, G. N., Scanlan, D. J. and Geider, R. J.: Acclimation of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) to photon flux density, J. Phycol., 41(4), 851–862, doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00109.x, 2005.

Hay, W. W., Mohler, H. P., Roth, P. H., Schmidt, R. R. and (5), J. E. B.: Calcareous nannoplankton zonation of the Cenozoic of the Gulf Coast and Caribbean-Antillean area, and transoceanic correlation, , 17, 1967.

Henderiks, J.: Coccolithophore size rules — Reconstructing ancient cell geometry and cellular calcite quota from fossil coccoliths, Mar. Micropaleontol., 67(1–2), 143–154, doi:10.1016/j.marmicro.2008.01.005, 2008.

Henderiks, J., Winter, A., Elbrchter, M., Feistel, R., Plas, A. van der, Nausch, G. and Barlow, R.: Environmental controls on *Emiliania huxleyi* morphotypes in the Benguela coastal upwelling system (SE Atlantic), Mar. Ecol. Prog. Ser., 448, 51–66, doi:10.3354/meps09535, 2012.

Hibberd, D. J.: The ultrastructure and taxonomy of the Chrysophyceae and Prymnesiophyceae (Haptophyceae): A survey with some new observations on the ultrastructure of the Chrysophyceae, Bot. J. Linn. Soc., 72(2), 55–80, doi:10.1111/j.1095-8339.1976.tb01352.x, 1976.

Hoffmann, R., Kirchlechner, C., Langer, G., Wochnik, A. S., Griesshaber, E., Schmahl, W. W. and Scheu, C.: Insight into *Emiliania huxleyi* coccospheres by focused ion beam sectioning, Biogeosciences, 12(3), 825–834, doi:10.5194/bg-12-825-2015, 2015.

Holligan, P. M., Fernández, E., Aiken, J., Balch, W. M., Boyd, P., Burkill, P. H., Finch, M., Groom, S. B., Malin, G., Muller, K., Purdie, D. A., Robinson, C., Trees, C. C., Turner, S. M. and van der Wal, P.: A biogeochemical study of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi*, in the North Atlantic, Glob. Biogeochem. Cycles, 7(4), 879–900, doi:10.1029/93GB01731, 1993a.

Holligan, P. M., Groom, S. B. and Harbour, D. S.: What controls the distribution of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi*, in the North Sea?, Fish. Oceanogr., 2(3–4), 175–183, doi:10.1111/j.1365-2419.1993.tb00133.x, 1993b.

Holtz, L.-M., Wolf-Gladrow, D. and Thoms, S.: Simulating the effects of light intensity and carbonate system composition on particulate organic and inorganic carbon production in *Emiliania huxleyi*, J. Theor. Biol., 372, 192–204, doi:10.1016/j.jtbi.2015.02.024, 2015.

Hoppe, C. J. M., Langer, G. and Rost, B.: *Emiliania huxleyi* shows identical responses to elevated pCO_2 in TA and DIC manipulations, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 406, 54–62, doi:: 10.1016/j.jembe.2011.06.008, 2011.

Houdan, A., Billard, C., Marie, D., Not, F., Sáez, A. G., Young, J. R. and Probert, I.: Flow cytometric analysis of relative ploidy levels in holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles., Syst. Biodivers., 1(4), 453–465, 2003.

I

Iglesias-Rodríguez, M. D., Brown, C. W., Doney, S. C., Kleypas, J., Kolber, D., Kolber, Z., Hayes, P. K. and Falkowski, P. G.: Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: Coccolithophorids, Glob. Biogeochem. Cycles, 16(4), 1100, doi:10.1029/2001GB001454, 2002.

Iglesias-Rodriguez, M. D., Halloran, P. R., Rickaby, R. E. M., Hall, I. R., Colmenero-Hidalgo, E., Gittins, J. R., Green, D. R. H., Tyrrell, T., Gibbs, S. J., Dassow, P. von, Rehm, E., Armbrust, E. V. and Boessenkool, K. P.: Phytoplankton calcification in a high-CO_2 world, Science, 320(5874), 336–340, doi:10.1126/science.1154122, 2008.

IPCC: The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press., Cambridge., 2007.

J

Jackson, G. A. and Morgan, J. J.: Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: Theoretical analysis and comparison with reported observations, Limnol. Oceanogr., 23(2), 268–282, doi:10.4319/lo.1978.23.2.0268, 1978.

Jerkovic, L.: *Noelaerhabdus* nov. gen. Type d'une nouvelle famille de coccolithophoridés fossiles: Noëlaerhabdaceae du Miocène supérieur de Yougoslavie, CR Acad Sci Paris, 270, 468–470, 1970.

Jordan, R. W.: Coccolithophorid communities in the North-East Atlantic, Ph.D., University of Surrey., 1988.

Jordan, R. W. and Chamberlain, A. H. L.: Biodiversity among haptophyte algae, Biodivers. Conserv., 6(1), 131–152, doi:10.1023/A:1018383817777, 1997.

Jordan, R. W. and Winter, A.: Assemblages of coccolithophorids and other living microplankton off the coast of Puerto Rico during January–May 1995, Mar. Micropaleontol., 39(1–4), 113–130, doi:10.1016/S0377-8398(00)00017-7, 2000.

K

Kaffes, A.: Carbon and nitrogen fluxes in the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* grown under different nitrate concentrations, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 393, 1–8, doi:10.1016/j.jembe.2010.06.004, 2010.

Keller, M., Selvin, R., Claus, W. and Guillard, R.: Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton, J. Phycol., 23, 633–638, 1987.

Klausmeier, C. A. and Litchman, E.: Algal games: The vertical distribution of phytoplankton in poorly mixed water columns, Limnol Ocean., 46(8), 1998–2007, 2001.

Krug, S. A., Schulz, K. G. and Riebesell, U.: Effects of changes in carbonate chemistry speciation on *Coccolithus braarudii*: a discussion of coccolithophorid sensitivities, Biogeosciences, 8(3), 771–777, doi:10.5194/bg-8-771-2011, 2011.

L

Labry, C., Youenou, A., Delmas, D. and Michelon, P.: Addressing the measurement of particulate organic and inorganic phosphorus in estuarine and coastal waters, Cont. Shelf Res., 60, 28–37, doi:10.1016/j.csr.2013.04.019, 2013.

Langer, G., Geisen, M., Baumann, K.-H., Kläs, J., Riebesell, U., Thoms, S. and Young, J. R.: Species-specific responses of calcifying algae to changing

seawater carbonate chemistry, Geochem. Geophys. Geosystems, 7(9), 155–161, doi:10.1029/2005GC001227, 2006.

Langer, G., Gussone, N., Nehrke, G., Riebesell, U., Eisenhauer, A. and Thoms, S.: Calcium isotope fractionation during coccolith formation in *Emiliania huxleyi*: Independence of growth and calcification rate, Geochem. Geophys. Geosystems, 8(5), Q05007, doi:10.1029/2006GC001422, 2007.

Langer, G., Nehrke, G., Probert, I., Ly, J. and Ziveri, P.: Strain-specific responses of *Emiliania huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry, Biogeosciences, 6(11), 2637–2646, 2009.

Langer, G., Oetjen, K. and Brenneis, T.: Calcification of *Calcidiscus leptoporus* under nitrogen and phosphorus limitation, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 413, 131–137, doi:10.1016/j.jembe.2011.11.028, 2012.

Langer, G., Oetjen, K. and Brenneis, T.: Coccolithophores do not increase particulate carbon production under nutrient limitation: A case study using *Emiliania huxleyi* (PML B92/11), J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 443, 155–161, doi:10.1016/j.jembe.2013.02.040, 2013.

LaRoche, J., Rost, B. and Engel, A.: Bioassays, batch culture and chemostat experimentation, Riebesell, U., Fabry, V.J., Hansson, L., Gattuso, J.-P. (Eds.), Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting. Publications Office of the European Union., 2010.

Lavorel, S. and Garnier, E.: Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail, Funct. Ecol., 16(5), 545–556, doi:10.1046/j.1365-2435.2002.00664.x, 2002.

Laws, E. A.: Evaluation of *in situ* phytoplankton growth rates: a synthesis of data from varied approaches, Annu. Rev. Mar. Sci., 5(1), 247–268, doi:10.1146/annurev-marine-121211-172258, 2013.

Laws, E. A. and Bannister, T. T.: Nutrient-and light-limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean, Limnol. Oceanogr., 25(3), 457–473, 1980.

Le Quéré, C., Harrison, S. P., Colin Prentice, I., Buitenhuis, E. T., Aumont, O., Bopp, L., Claustre, H., Cotrim Da Cunha, L., Geider, R., Giraud, X., Klaas, C., Kohfeld, K. E., Legendre, L., Manizza, M., Platt, T., Rivkin, R. B., Sathyendranath, S., Uitz, J., Watson, A. J. and Wolf-Gladrow, D.: Ecosystem dynamics based on plankton functional types for global ocean biogeochemistry models, Glob. Change Biol., 11(11), 2016–2040, doi:10.1111/j.1365-2486.2005.1004.x, 2005.

Le Quéré, C., Moriarty, R., Andrew, R. M., Peters, G. P., Ciais, P., Friedlingstein, P., Jones, S. D., Sitch, S., Tans, P., Arneth, A., Boden, T. A., Bopp, L., Bozec, Y., Canadell, J. G., Chini, L. P., Chevallier, F., Cosca, C. E., Harris, I., Hoppema, M., Houghton, R. A., House, J. I., Jain, A. K., Johannessen, T., Kato, E., Keeling, R. F., Kitidis, V., Klein Goldewijk, K., Koven, C., Landa, C. S., Landschützer, P., Lenton, A., Lima, I. D., Marland, G., Mathis, J. T., Metzl, N., Nojiri, Y., Olsen, A., Ono, T., Peng, S., Peters, W., Pfeil, B., Poulter, B., Raupach, M. R., Regnier, P., Rödenbeck, C., Saito, S., Salisbury, J. E., Schuster, U., Schwinger, J., Séférian, R., Segschneider, J., Steinhoff, T., Stocker, B. D., Sutton, A. J., Takahashi, T., Tilbrook, B., van der Werf, G. R., Viovy, N., Wang, Y.-P., Wanninkhof, R., Wiltshire, A. and Zeng, N.: Global carbon budget 2014, Earth Syst. Sci. Data, 7(1), 47–85, doi:10.5194/essd-7-47-2015, 2015.

Lecourt, M., Muggli, D. L. and Harrison, P. J.: Comparison of growth and sinking rates of non-coccolith- and coccolith-forming strains of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) grown under different irradiances and nitrogen sources, J. Phycol., 32(1), 17–21, doi:10.1111/j.0022-3646.1996.00017.x, 1996.

Lefebvre, S. C., Benner, I., Stillman, J. H., Parker, A. E., Drake, M. K., Rossignol, P. E., Okimura, K. M., Komada, T. and Carpenter, E. J.: Nitrogen source and pCO_2 synergistically affect carbon allocation, growth and morphology of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*: potential implications of ocean acidification for the carbon cycle, Glob. Change Biol., 18(2), 493–503, doi:10.1111/j.1365-2486.2011.02575.x, 2012.

Legović, T. and Cruzado, A.: A model of phytoplankton growth on multiple nutrients based on the Michaelis-Menten-Monod uptake, Droop's growth and Liebig's law, Ecol. Model., 99(1), 19–31, doi:10.1016/S0304-3800(96)01919-9, 1997.

Leonardos, N. and Geider, R. J.: Elevated atmospheric carbon dioxide increases organic carbon fixation by *Emiliania huxleyi* (Haptophyta),

under nutrient-limited high-light conditions., J. Phycol., 41(6), 1196–1203, doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00152.x, 2005.

Leth, O., Shaffer, G. and Ulloa, O.: Hydrography of the eastern South Pacific Ocean: results from the Sonne 102 cruise, May–June 1995, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 51(20), 2349–2369, doi:10.1016/j.dsr2.2004.08.009, 2004.

Linschooten, C., van Bleijswijk, J. D. L., van Emburg, P. R., de Vrind, J. P. M., Kempers, E. S., Westbroek, P. and de Vrind-de Jong, E. W.: Role of the light-dark cycle and medium composition on the production of coccoliths by *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae), J. Phycol., 27(1), 82–86, doi:10.1111/j.0022-3646.1991.00082.x, 1991.

Litchman, E. and Klausmeier, C. A.: Trait-based community ecology of phytoplankton, Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 39(1), 615–639, doi:10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173549, 2008.

Litchman, E., Klausmeier, C. A. and Bossard, P.: Phytoplankton nutrient competition under dynamic light regimes, Limnol. Oceanogr., 49(4part2), 1457–1462, doi:10.4319/lo.2004.49.4_part_2.1457, 2004.

Litchman, E., Klausmeier, C. A., Schofield, O. M. and Falkowski, P. G.: The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level, Ecol. Lett., 10(12), 1170–1181, doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01117.x, 2007.

Litchman, E., de Tezanos Pinto, P., Edwards, K. F., Klausmeier, C. A., Kremer, C. T. and Thomas, M. K.: Global biogeochemical impacts of phytoplankton: a trait-based perspective, J. Ecol., 103(6), 1384–1396, doi:10.1111/1365-2745.12438, 2015.

Lohman, H.: Die Coccolithophoridea eine Monographie der coccolithen bildenden Flagellaten, zugleich eine Beitrag zur Kenntnis des Mittelmeerauftreibs, Arch. Für Protistenkd., 1, 89–165, 1902.

Lomas, M. W. and Glibert, P. M.: Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates, J. Phycol., 36(5), 903–913, doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99029.x, 2000.

M

MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T. and Geider, R. J.: Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria, J. Phycol., 38(1), 17–38, doi:10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x, 2002.

Malin, G. and Erst, G. O.: Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role, J. Phycol., 33(6), 889–896, doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00889.x, 1997.

Malin, G. and Steinke, M.: Dimethyl sulfide production: what is the contribution of the coccolithophores?, in Coccolithophores, edited by P. D. H. R. Thierstein and D. J. R. Young, pp. 127–164, Springer Berlin Heidelberg., 2004.

Manton, I.: Functional parallels between calcified and uncalcified periplasts, in Biomineralization in lower plants and animals, vol. 30, pp. 157–172., 1986.

Marañón, E., Holligan, P. M., Varela, M., Mouriño, B. and Bale, A. J.: Basin-scale variability of phytoplankton biomass, production and growth in the Atlantic Ocean, Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap., 47(5), 825–857, 2000.

Marañón, E., Cermeño, P., López-Sandoval, D. C., Rodríguez-Ramos, T., Sobrino, C., Huete-Ortega, M., Blanco, J. M. and Rodríguez, J.: Unimodal size scaling of phytoplankton growth and the size dependence of nutrient uptake and use, Ecol. Lett., 16(3), 371–379, doi:10.1111/ele.12052, 2013.

Margalef, R.: Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment, Oceanol. Acta, 1(4), 493–509, 1978.

Martin, J. H., Gordon, R. M., Fitzwater, S. and Broenkow, W. W.: Vertex: phytoplankton/iron studies in the Gulf of Alaska, Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap., 36(5), 649–680, doi:10.1016/0198-0149(89)90144-1, 1989.

Matthiessen, B., Eggers, S. L. and Krug, S. A.: High nitrate to phosphorus regime attenuates negative effects of rising pCO_2 on total population carbon accumulation, Biogeosciences, 9(3), 1195–1203, doi:10.5194/bg-9-1195-2012, 2012.

McClain, C. R., Signorini, S. R. and Christian, J. R.: Subtropical gyre variability observed by ocean-color satellites, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 51(1), 281–301, 2004.

McIntyre, A. and Bé, A. W. H.: Modern Coccolithophoridae of the Atlantic Ocean—I. Placoliths and cyrtoliths, Deep Sea Res., 14(5), 561–597, doi:10.1016/0011-7471(67)90065-4, 1967.

Menden-Deuer, S. and Lessard, E. J.: Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton, Limnol. Oceanogr., 45(3), 569–579, doi:10.4319/lo.2000.45.3.0569, 2000.

Michaelis, L. and Menten, M. L.: Die Kinetik der Invertinwirkung, Biochem Z, 49(333–369), 352, 1913.

Mitchell-Innes, B. A. and Winter, A.: Coccolithophores: a major phytoplankton component in mature upwelled waters off the Cape Peninsula, South Africa in March, 1983, Mar. Biol., 95(1), 25–30, 1987.

Monod, J.: The growth of bacterial cultures, Annual Review of Microbiology., 1949.

Morel, F. M. M.: Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton, J. Phycol., 23(1), 137–150, doi:10.1111/j.0022-3646.1987.00137.x, 1987.

Morse, J. W. and Mackenzie, F. T.: Geochemistry of sedimentary carbonates, Elsevier, 1990.

Moutin, T., Karl, D. M., Duhamel, S., Rimmelin, P., Raimbault, P., Van Mooy, B. A. S. and Claustre, H.: Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean, Biogeosciences, 5(1), 95–109, doi:10.5194/bg-5-95-2008, 2008.

Mucci, A.: The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure, Am. J. Sci., 283(7), 780–799, doi:10.2475/ajs.283.7.780, 1983.

Muggli, D. L. and Harrison, P. J.: Effects of nitrogen source on the physiology and metal nutrition of *Emiliania huxleyi* grown under different iron and light conditions, Mar. Ecol. Prog. Ser., 130, 255–267, 1996.

Muggli, D. L. and Harrison, P. J.: Effects of iron on two oceanic phytoplankters grown in natural NE subarctic pacific seawater with no artificial chelators present, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 212(2), 225–237, doi:10.1016/S0022-0981(96)02752-9, 1997.

Müller, M. N., Antia, A. N. and LaRoche, J.: Influence of cell cycle phase on calcification in the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 53(2), 506–512, doi:10.4319/lo.2008.53.2.0506, 2008.

Müller, M. N., Kısakürek, B., Buhl, D., Gutperlet, R., Kolevica, A., Riebesell, U., Stoll, H. and Eisenhauer, A.: Response of the coccolithophores *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus braarudii* to changing seawater Mg^{2+} and Ca^{2+} concentrations: Mg/Ca, Sr/Ca ratios and $d^{44/40}Ca$, $d^{26/24}Mg$ of coccolith calcite, Geochim. Cosmochim. Acta, 75, 2088–2102, doi:10.1016/j.gca.2011.01.035, 2011.

Müller, M. N., Beaufort, L., Bernard, O., Pedrotti, M. L., Talec, A. and Sciandra, A.: Influence of CO_2 and nitrogen limitation on the coccolith volume of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta), Biogeosciences, 9(10), 4155–4167, doi:10.5194/bg-9-4155-2012, 2012.

Mullin, M. M., Sloan, P. R. and Eppley, R. W.: Relationship between carbon content, cell volume, and area in phytoplankton, Limnol. Oceanogr., 11(2), 307–311, doi:10.4319/lo.1966.11.2.0307, 1966.

Murray, J. and Renard, A. F.: Report on deep-sea deposits based on the specimens collected during the voyage of HMS Challenger in the years 1872 to 1876., in Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. Challenger during the Years 1873-1876, HMSO London., 1891.

N

Nanninga, H. and Tyrrell, T.: Importance of light for the formation of algal blooms by *Emiliania huxleyi*, Mar. Ecol. Prog. Ser., 136, 195–203, doi:10.3354/meps136195, 1996.

Nielsen, M. V.: Growth, dark respiration and photosynthetic parameters of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) acclimated to different day length-irradiance combinations, J. Phycol., 33(5), 818–822, doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00818.x, 1997.

Nimer, N. A. and Merrett, M. J.: Calcification rate in *Emiliania huxleyi* Lohmann in response to light, nitrate and availability of inorganic carbon, New Phytol., 123(4), 673–677, doi:10.1111/j.1469-8137.1993.tb03776.x, 1993.

O

O'Brien, C. J., Peloquin, J. A., Vogt, M., Heinle, M., Gruber, N., Ajani, P., Andruleit, H., Arístegui, J., Beaufort, L., Estrada, M., Karentz, D., Kopczyńska, E., Lee, R., Poulton, A. J., Pritchard, T. and Widdicombe, C.: Global marine plankton functional type biomass distributions: coccolithophores, Earth Syst. Sci. Data, 5(2), 259–276, doi:10.5194/essd-5-259-2013, 2013.

Okada, H. and Honjo, S.: The distribution of oceanic coccolithophorids in the Pacific, Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr., 20(4), 355–374, doi:10.1016/0011-7471(73)90059-4, 1973.

Okada, H. and McIntyre, A.: Seasonal distribution of modern coccolithophores in the western North Atlantic Ocean, Mar. Biol., 54(4), 319–328, doi:10.1007/BF00395438, 1979.

Oviedo, A., Ziveri, P., Álvarez, M. and Tanhua, T.: Is coccolithophore distribution in the Mediterranean Sea related to seawater carbonate chemistry?, Ocean Sci., 11(1), 13–32, doi:10.5194/os-11-13-2015, 2015.

Oviedo, A. M., Langer, G. and Ziveri, P.: Effect of phosphorus limitation on coccolith morphology and element ratios in Mediterranean strains of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 459, 105–113, doi:10.1016/j.jembe.2014.04.021, 2014.

P

Paasche, E.: Coccolith formation, Nature, 193, 1094–1095, doi:10.1038/1931094b0, 1962.

Paasche, E.: A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid *Coccolithus huxleyi*, Physiol Plant Suppl, 3, 1–82, 1964.

Paasche, E.: Roles of nitrogen and phosphorus in coccolith formation in *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), Eur. J. Phycol., 33(1), 33–42, doi:10.1080/09670269810001736513, 1998.

Paasche, E.: Reduced coccolith calcite production under light-limited growth: a comparative study of three clones of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), Phycologia, 38(6), 508–516, doi:10.2216/i0031-8884-38-6-508.1, 1999.

Paasche, E.: A review of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions, Phycologia, 40(6), 503–529, doi:10.2216/i0031-8884-40-6-503.1, 2002.

Pascher, A.: Chrysomonaden aus dem Hirschberger Grossteiche, Int Rev Gesamten Hydrobiol Hydrogr., Klinkhardt., 1910.

Perrin, L., Probert, I., Langer, G. and Aloisi, G.: Growth of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* in light- and nutrient-limited batch reactors: relevance for the BIOSOPE deep ecological niche of coccolithophores, Biogeosciences, 13(21), 5983–6001, doi:10.5194/bg-13-5983-2016, 2016.

Pienaar, R. N.: Ultrastructure and calcification of coccolithophores, in Coccolithophores, pp. 13–37, Cambridge., 1994.

Pilson, M. E. Q.: An Introduction to the chemistry of the sea, Prentice Hall., Cambridge University Press., 1998.

Platt, T. C., Gallegos, L. and Harrison, W. G.: Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton, J. Mar. Res., 38, 687–701, 1980.

Poulton, A. J., Sanders, R., Holligan, P. M., Stinchcombe, M. C., Adey, T. R., Brown, L. and Chamberlain, K.: Phytoplankton mineralization in the tropical and subtropical Atlantic Ocean, Glob. Biogeochem. Cycles, 20(4), GB4002, doi:10.1029/2006GB002712, 2006.

Poulton, A. J., Adey, T. R., Balch, W. M. and Holligan, P. M.: Relating coccolithophore calcification rates to phytoplankton community dynamics: Regional differences and implications for carbon export, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 54(5–7), 538–557, doi:10.1016/j.dsr2.2006.12.003, 2007.

Poulton, A. J., Stinchcombe, M. C., Achterberg, E. P., Bakker, D. C. E., Dumousseaud, C., Lawson, H. E., Lee, G. A., Richier, S., Suggett, D. J. and Young, J. R.: Coccolithophores on the North-West European shelf: calcification rates and

environmental controls, Biogeosciences, 11(14), 3919–3940, doi:10.5194/bg-11-3919-2014, 2014.

Predotti: Variable production of transparent exopolymeric particles by haploid and diploid life stages of coccolithophores grown under different CO_2 concentrations, J. Plankton Res., 34(5), 388–398, doi:10.1093/plankt/fbs012, 2012.

Price, L. L., Yin, K. and Harrison, P. J.: Influence of continuous light and L:D cycles on the growth and chemical composition of Prymnesiophyceae including coccolithophores, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 223(2), 223–234, doi:10.1016/S0022-0981(97)00168-8, 1998.

R

Raffi, I., Backman, J., Fornaciari, E., Pälike, H., Rio, D., Lourens, L. and Hilgen, F.: A review of calcareous nannofossil astrobiochronology encompassing the past 25 million years, Quat. Sci. Rev., 25(23), 3113–3137, doi:10.1016/j.quascirev.2006.07.007, 2006.

Raimbault, P. and Garcia, N.: Evidence for efficient regenerated production and dinitrogen fixation in nitrogen-deficient waters of the South Pacific Ocean: impact on new and export production estimates, Biogeosciences, 5, 323–338, doi:10.5194/bg-5-323-2008, 2008.

Raimbault, P., Garcia, N. and Cerutti, F.: Distribution of inorganic and organic nutrients in the South Pacific Ocean-evidence for long-term accumulation of organic matter in nitrogen-depleted waters, Biogeosciences, 5(2), 281–298, 2008.

Ras, J., Claustre, H. and Uitz, J.: Spatial variability of phytoplankton pigment distributions in the subtropical South Pacific Ocean: comparison between *in situ* and predicted data, Biogeosciences, 5(2), 353–369, 2008.

Raven, J. A. and Crawfurd, K.: Environmental controls on coccolithophore calcification, Mar Ecol Prog Ser, 470, 137–166, doi:10.3354/meps09993, 2012.

Redfield, A. C.: The influence of organisms on the composition of sea-water, The Sea, 26–77, 1963.

Rhodes, L. L., Peake, B. M., MacKenzie, A. L. and Marwick, S.: Coccolithophores *Gephyrocapsa oceanica* and *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae = Haptophyceae) in New Zealand's coastal waters: Characteristics of blooms and growth in laboratory culture, N. Z. J. Mar. Freshw. Res., 29(3), 345–357, doi:10.1080/00288330.1995.9516669, 1995.

Riebesell, U. and Tortell, P. D.: Effects of ocean acidification on pelagic organisms and ecosystems, Ocean Acidif., 99–121, 2011.

Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P. D., Zeebe, R. E. and Morel, F. M. M.: Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO_2, Nature, 407(6802), 364–367, doi:10.1038/35030078, 2000.

Riegman, R., Stolte, W., Noordeloos, A. A. M. and Slezak, D.: Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC 3:1:3:1) activity of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous cultures, J. Phycol., 36(1), 87–96, doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99023.x, 2000.

van Rijssel, M. and Gieskes, W. W. C.: Temperature, light, and the dimethylsulfoniopropionate (DMSP) content of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), J. Sea Res., 48, 17–27, 2002.

Rokitta, S. D. and Rost, B.: Effects of CO_2 and their modulation by light in the life-cycle stages of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 57(2), 607–618, doi:10.4319/lo.2012.57.2.0607, 2012.

Rosas-Navarro, A., Langer, G. and Ziveri, P.: Temperature affects the morphology and calcification of *Emiliania huxleyi* strains, Biogeosciences, 13, 2913–2926, doi:10.5194/bg-13-2913-2016, 2016.

Rost, B. and Riebesell, U.: Coccolithophores and the biological pump: responses to environmental changes, in Coccolithophores, pp. 99–125, Springer, 2004.

Rost, B., Zondervan, I. and Riebesell, U.: Light-dependent carbon isotope fractionation in the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 47(1), 120–128, doi:10.4319/lo.2002.47.1.0120, 2002.

Roth, P. H.: Distribution of coccoliths in oceanic sediments, in Coccolithophores, pp. 199–218, Cambridge, 1994.

Rouco, M., Branson, O., Lebrato, M. and Iglesias-Rodríguez, M. D.: The effect of nitrate and phosphate availability on *Emiliania huxleyi* (NZEH) physiology under different CO_2 scenarios, Front. Aquat. Microbiol., 4, 155, doi:10.3389/fmicb.2013.00155, 2013.

S

Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, Cs., Wallace, D. W., Tilbrook, B. and others: The oceanic sink for anthropogenic CO_2, science, 305(5682), 367–371, 2004.

Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J., Rousseau, V. and Lancelot, C.: *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review, J. Sea Res., 53(1–2), 43–66, doi:10.1016/j.seares.2004.01.008, 2005.

Schulz, K. G., Zondervan, I., Gerringa, L. J. A., Timmermans, K. R., Veldhuis, M. J. W and Riebesell U.: Effect of trace metal availability on coccolithophorid calcification, Nature, 430, 673–676, 2004.

Sciandra, A., Harlay, J., Lefèvre, D., Leme, R., Rimmelin, P., Denis, M. and Gattuso, J.: Response of coccolithophorid *Emiliania huxleyi* to elevated partial pressure of CO_2 under nitrogen limitation, Mar. Ecol. Prog. Ser., 261, 111–122, doi:10.3354/meps261111, 2003.

Selph, K. E., Landry, M. R., Taylor, A. G., Yang, E.-J., Measures, C. I., Yang, J., Stukel, M. R., Christensen, S. and Bidigare, R. R.: Spatially-resolved taxon-specific phytoplankton production and grazing dynamics in relation to iron distributions in the Equatorial Pacific between 110 and 140°W, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 58(3–4), 358–377, doi:10.1016/j.dsr2.2010.08.014, 2011.

Sett, S., Bach, L. T., Schulz, K. G. and Koch-Klavsen, S.: Temperature modulates coccolithophorid sensitivity of growth, photosynthesis and calcification to increasing seawater pCO_2, PLOS ONE, 9, doi:10.1371/journal.pone.0088308, 2014.

Sheldon, R. W., Prakash, A. and Sutcliffe, W. H.: The size distribution of particles in the ocean, Limnol. Oceanogr., 17(3), 327–340, 1972.

Shi, D., Xu, Y. and Morel, F. M. M.: Effects of the pH/pCO_2 control method on medium chemistry and phytoplankton growth, Biogeosciences, 6(7), 1199–1207, doi:10.5194/bg-6-1199-2009, 2009.

Shuter, B.: A model of physiological adaptation in unicellular algae, J. Theor. Biol., 78(4), 519–552, 1979.

Shutler, J. D., Land, P. E., Brown, C. W., Findlay, H. S., Donlon, C. J., Medland, M., Snooke, R. and Blackford, J. C.: Coccolithophore surface distributions in the North Atlantic and their modulation of the air-sea flux of CO_2 from 10 years of satellite Earth observation data, Biogeosciences, 10(4), 2699–2709, doi:10.5194/bg-10-2699-2013, 2013.

Sieburth, J.: Sea Microbes, Oxford University Press, New York., 1979.

Siesser, W. G.: Historical background of coccolithophores studies, in Coccolithophores, pp. 1–11, Cambridge, 1994.

Sikes, C. S., Roer, R. D. and Wilbur, K. M.: Photosynthesis and coccolith formation: inorganic carbon sources and net inorganic reaction of deposition, Limnol. Oceanogr., 25(2), 248–261, doi:10.4319/lo.1980.25.2.0248, 1980.

Simó, R.: Production of atmospheric sulfur by oceanic plankton: biogeochemical, ecological and evolutionary links, Trends Ecol. Evol., 16(6), 287–294, 2001.

Sommer, U.: The paradox of the plankton: Fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures, Limnol. Oceanogr., 29, 633–639, doi:10.4319/lo.1984.29.3.0633, 1984.

Sommer, U.: A comparison of the Droop and the Monod models of nutrient limited growth applied to natural populations of phytoplankton, Funct. Ecol., 5(4), 535–544, doi:10.2307/2389636, 1991.

Souza, M. S., Mendes, C. R. B., Garcia, V. M. T., Pollery, R. and Brotas, V.: Phytoplankton community during a coccolithophorid bloom in the Patagonian Shelf: microscopic and high-performance liquid chromatography pigment analyses, J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 92(1), 13–27, doi:10.1017/S0025315411000439, 2012.

Steinmetz, J. C.: Sedimentation of coccolithophores, in Coccolithophores, pp. 179–197, Cambridge, 1994.

Stoll, H., Langer, G., Shimizu, N. and Kanamaru, K.: B/Ca in coccoliths and relationship to calcification vesicle pH and dissolved inorganic carbon concentrations, Geochim. Cosmochim. Acta, 80, 143–157, doi:10.1016/j.gca.2011.12.003, 2012.

Stolte, W., Kraay, G. W., Noordeloos, A. A. M. and Riegman, R.: Genetic and physiological variation in pigment composition of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) and the potential use of its pigment ratios as a quantitative physiological marker, J. Phycol., 36(3), 529–539, doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99158.x, 2000.

Sunda, W. G.: Trace metal interactions with marine phytoplankton, Biol. Oceanogr., 6(5–6), 411–442, 1989.

Sunda, W. G. and Huntsman, S. A.: Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton, Mar. Chem., 50, 189–206, doi:doi:10.1016/0304-4203(95)00035-P, 1995.

Sunda, W. G. and Huntsman, S. A.: Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling, Limnol. Oceanogr., 45(7), 1501–1516, 2000.

T

Terry, K. L.: Nitrate and phosphate uptake interactions in a marine Prymnesiophyte, J. Phycol., 18(1), 79–86, doi:10.1111/j.1529-8817.1982.tb03159.x, 1982.

Thierstein, H. R., Geitzenauer, K. R., Molfino, B. and Shackleton, N. J.: Global synchroneity of late Quaternary coccolith datum levels Validation by oxygen isotopes, Geology, 5(7), 400–404, doi:10.1130/0091-7613(1977)5<400:GSOLQC> 2.0.CO;2, 1977.

Triantaphyllou, M., Dimiza, M., Krasakopoulou, E., Malinverno, E., Lianou, V. and Souvermezoglou, E.: Seasonal variation in *Emiliania huxleyi* coccolith morphology and calcification in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean), Geobios, 43(1), 99–110, 2010.

Trimborn, S., Langer, G. and Rost, B.: Effect of varying calcium concentrations and light intensities on calcification and photosynthesis in *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 52(5), 2285–2293, doi:10.4319/lo.2007.52.5.2285, 2007.

Tyrrell, T. and Merico, A.: *Emiliania huxleyi*: bloom observations and the conditions that induce them, in Coccolithophores, pp. 75–97, Springer., 2004.

Tyrrell, T. and Taylor, A. H.: A modelling study of *Emiliania huxleyi* in the NE Atlantic, J. Mar. Syst., 9(1), 83–112, 1996.

V-W

de Vargas, C., Aubry, M. P., Probert, I. and Young, J.: Origin and evolution of coccolithophores: from coastal hunters to oceanic farmers, Evol. Prim. Prod. Sea, 12, 251–285, 2007.

Voss, K. J., Balch, W. M. and Kilpatrick, K. A.: Scattering and attenuation properties of *Emiliania huxleyi* cells and their detached coccoliths, Limnol. Oceanogr., 43(5), 870–876, doi:10.4319/lo.1998.43.5.0870, 1998.

Westbroek, P., Brown, C. W., Bleijswijk, J. van, Brownlee, C., Brummer, G. J., Conte, M., Egge, J., Fernández, E., Jordan, R., Knappertsbusch, M., Stefels, J., Veldhuis, M., van der Wal, P. and Young, J.: A model system approach to biological climate forcing. The example of *Emiliania huxleyi*, Glob. Planet. Change, 8(1–2), 27–46, doi:10.1016/0921-8181(93)90061-R, 1993.

Winter, A., Jordan, R. W. and Roth, P. H.: Biogeography of living coccolithophore ocean waters, in Coccolithophores, pp. 161–177, Cambridge, 1994.

Winter, A., Henderiks, J., Beaufort, L., Rickaby, R. E. M. and Brown, C. W.: Poleward expansion of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, J. Plankton Res., 36(2), 316–325, doi:10.1093/plankt/fbt110, 2014.

Y

Young, J., Geisen, M., Cros, L., Klejne, A., Sprengel, C., Probert, I. and Østergaard, J.: A guide to extant coccolithophore taxonomy, International Nannoplankton Association., 2003.

Young, J. R.: Observations on heterococcolith rim structure and its relationship to developmental

processes, Nannofossils and their applications, Ellis Horwood Chichester, 1989.

Young, J. R.: The description and analysis of coccolith structure, Nannoplankton Res. Hamrsmid B Young JR Eds ZPZ Knihovnicha, 35–71, 1992.

Young, J. R.: Function of coccoliths, in Coccolithophores, pp. 63–82, Cambridge, 1994.

Young, J. R. and Bown, P. R.: An ontogenetic sequence of coccoliths from the Late Jurassic Kimmeridge Clay of England, Palaeontology, 34(4), 843–850, 1991.

Young, J. R. and Bown, P. R.: Higher classification of calcareous nannofossils, J. Nannoplankton Res., 19(1), 15–20, 1997.

Young, J. R. and Henriksen, K.: Biomineralization within vesicles: The calcite of coccoliths, Rev. Mineral. Geochem., 54(1), 189–215, doi:10.2113/0540189, 2003.

Young, J. R. and Westbroek, P.: Genotypic variation in the coccolithophorid species *Emiliania huxleyi*, Mar. Micropaleontol., 18, 5–23, 1991.

Young, J. R. and Ziveri, P.: Calculation of coccolith volume and it use in calibration of carbonate flux estimates, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 47(9), 1679–1700, 2000.

Young, J. R., Bergen, J. A., Bown, P. R., Burnett, J. A., Fiorentino, A., Jordan, R. W., Kleijne, A., Van Niel, B. E., Romein, A. T. and Von Salts, K.: Guidelines for coccolith and calcareous nannofossil terminology, Palaeontology, 40(4), 875–912, 1997.

Young, J. R., Geisen, M. and Probert, I.: A review of selected aspects of coccolithophore biology with implications for paleobiodiversity estimation, Micropaleontology, 51(4), 267–288, doi:10.2113/gsmicropal.51.4.267, 2005.

Z

Zeebe, R. E. and Wolf-Gladrow, D. A.: CO_2 in seawater: Equilibrium, kinetics, isotopes, Gulf Professional Publishing, 2001.

Ziveri, P., Broerse, A. T., Van Hinte, J. E., Westbroek, P. and Honjo, S.: The fate of coccoliths at 48°N 21°W, northeastern Atlantic, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 47(9), 1853–1875, 2000.

Ziveri, P., Baumann, K.-H., Böckel, B., Bollmann, J. and Young, J. R.: Biogeography of selected Holocene coccoliths in the Atlantic Ocean, in Coccolithophores, pp. 403–428, Springer Berlin Heidelberg, 2004.

Ziveri, P., de Bernardi, B., Baumann, K.-H., Stoll, H. M. and Mortyn, P. G.: Sinking of coccolith carbonate and potential contribution to organic carbon ballasting in the deep ocean, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 54(5), 659–675, 2007.

Zondervan, I.: The effects of light, macronutrients, trace metals and CO_2 on the production of calcium carbonate and organic carbon in coccolithophores—A review, Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., 54(5–7), 521–537, doi:10.1016/j.dsr2.2006.12.004, 2007.

Zondervan, I., Zeebe, R. E., Rost, B. and Riebesell, U.: Decreasing marine biogenic calcification: a negative feedback on rising atmospheric pCO_2, Glob. Biogeochem. Cycles, 15(2), 507–516, 2001.

Zondervan, I., Rost, B. and Riebesell, U.: Effect of CO_2 concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 272(1), 55–70, doi:10.1016/S0022-0981(02)00037-0, 2002.

Zonneveld, C.: Modelling the kinetics of non-limiting nutrients in microalgae, J. Mar. Syst., 9(1–2), 121–136, doi:10.1016/0924-7963(96)00021-8, 1996.

ANNEXES

ANNEXE 1 : MILIEU K/2 (MILIEU K DILUE)

K/2(-Tris-Si) (Keller *et al.*, 1987) – modifié par Ian Probert

To 994 ml of seawater (optional: Heat seawater to 80°C for 2 hours and leave to cool – this should kill most organisms but should not chemically modify the medium too much) add:

Quantity	**Compound**	**Stock solution** (sterile)	**Final conc. in K medium**
0.5ml	$NaNO_3$	48.9542g/litre H_2O	288µM
0.5ml	NH_4Cl *	0.535g/litre H_2O	5µM
0.5ml	NaH_2PO4	4.8992g/litre H_2O	18µM
0.5ml	FeEDTA solution	(see recipe below)	(see below)
0.5ml	Trace metal solution	(see recipe below)	(see below)
1.0ml	f/2 vitamin solution	(see recipe below)	(see below)

* Optional

FeEDTA solution

To 950ml distilled H_2O add:

Quantity	**Compound**	**Stock solution**	**Final conc. in K medium**
4.3g	(Na)FeEDTA	-	5.85µM

Make up to 1 litre with milliQ H_2O, sterilize (filter 0.22µm) and store in fridge.

Trace metal solution

To 950ml distilled H_2O add:

Quantity	**Compound**	**Stock solution**	**Final conc. in K medium**
37.22g	$Na_2EDTA.2H_2O$	-	50µM
1.0ml	$Na_2MoO_4.2H_2O$	7.2585g/litre H_2O	0.015µM
1.0ml	$ZnSO_4.7H_2O$	23.0g/litre H_2O	0.004µM
1.0ml	$CoSO4.7H_2O$	14.055g/litre H_2O	0.025µM
1.0ml	$MnCl_2.4H_2O$	178.11g/litre H_2O	0.45µM
1.0ml	H_2SeO_3	1.29g/litre H_2O	0.005µM
1.0ml	NiCl2.6H20	1.49 g/litre H_2O	0.00314µM

Make up to 1 litre with milliQ H_2O, sterilize (filter 0.22µm) and store in fridge.

f/2 Vitamin solution

To 950ml distilled H_2O add:

Quantity	Compound	Stock solution	Final conc. in K medium
1.0ml	Vit. B_{12} (cyanocobalamin)	0.5g/litre H_2O	0.37nM
1.0ml	Biotin	5.0mg/litre H_2O	2.0nM
100.0mg	Thiamine HCl	-	0.3µM

Make up to 1 litre with milliQ H2O, filter sterilize into plastic vials and store in freezer.

After addition of supplements, adjust pH of medium to 8.2 (with 0.2M solution of NaOH)
For K-ET, add 10-30 ml marine soil extract (ET)

Sterilization of medium : Filter sterilize through 0.22µm filters (e.g. Millipore Steritop units) into sterile (autoclaved) polycarbonate bottles.

ANNEXE 2 : PREMIERES EXPERIENCES NON REUSSIES

Pour réaliser la partie “cultures” de cette thèse, il avait été décidé rapidement de mettre en place des expériences afin de tester la co-limitation des cultures en lumière et en nutriments, et dans un deuxième temps de reproduire les conditions observées dans la niche profonde de coccolithophoridés à la station GYR du transect BIOSOPE. Pour ceci, nous avions fixé la lumière (30 et 140 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), le cycle jour:nuit (12:12) et la température (20°C) comme indiqué dans les sections 2.2 et 2.4 du chapitre II, et le pH (échelle NBS) à 8.1. Le milieu de culture et le choix de la souche sont décrits dans la section 2. Concernant les concentrations non limitantes en nitrate et phosphate, nous avions choisi respectivement 100 et 6.25 $\mu mol.L^{-1}$. Les concentrations limitantes ont, quant à elles, été définies en appliquant un facteur 10 de dilution des concentrations non limitantes : 10 et 0.6 $\mu mol.L^{-1}$ respectivement pour le nitrate et le phosphate, en respectant de plus le ratio N:P de Redfield 16:1 (Langer et al., 2009; Zondervan et al., 2002). Par crainte de modifier le système du carbone inorganique dissous pendant l’expérience, nous avons arrêté les expériences à une densité cellulaire maximum de 60000 $cells.mL^{-1}$ comme reporté dans Zondervan et al. (2002). Ceci a été la première erreur et nous a empêché d’atteindre la limitation en nutriments pour les expériences limitées en nitrate et en phosphate (voir Figure A2). Nous pouvons en effet remarquer sur la figure A2 qu’après une phase initiale de latence, les cultures entrent dans une phase de croissance exponentielle qui dure jusqu’à la fin de l’expérience et ainsi n’atteignent pas la phase stationnaire témoignant d’une limitation en nutriments.

Malgré tout, nous avons échantillonné les cultures et analysé la matière particulaire, les nutriments, le carbone inorganique dissous (DIC) et mesuré les cellules. Les résultats de ces expériences ne sont pas exploités ou décrits dans ce manuscrit. Cependant, ce premier travail en laboratoire aura permis de faire une liste des précautions à prendre pour réussir à atteindre les objectifs fixés (voir liste ci-dessous). Il aura aussi permis d’être personnellement formée sur les différents appareils utilisés (cytomètre à flux, microscope électronique à balayage et optique, pHmètre, …), de s’intégrer au sein du laboratoire de Roscoff et de collaborer avec les ingénieurs qui ont réalisé certaines analyses et enfin, de se familiariser avec le matériel, les commandes et les différents salles de manipulations (salle d’incubateurs, salle d’autoclavage, salle de microscopie, salle de comptage des cultures,…).

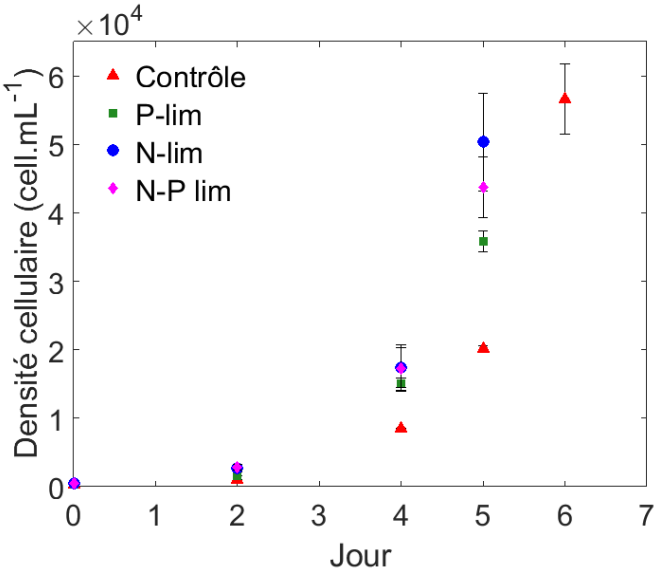


Figure A2 : Evolution de la densité cellulaire selon le jour de l'expérience (expériences non réussies). Expérience en forte lumière : en conditions « contrôle » (riche en nutriments), P-lim : limitée en phosphate, N-lim : limitée en nitrate et N-P lim : limité en nitrate et en phosphate**.**

Nous avons donc dressé une liste des changements et des précautions à prendre pour les expériences suivantes, dont la description de la méthode est faite dans le chapitre II et la description des résultats dans le chapitre III de ce manuscrit :

- tester préalablement les concentrations limitantes en nutriments afin d'atteindre la limitation à une densité cellulaire autour de 100000 cells.mL^{-1} voire 150000 cells.mL^{-1} (communication personnelle Gerald Langer)
- mesurer le pH sur l'échelle total « total scale » et non pas l'échelle « NBS » dont l'étalonnage n'est pas adapté à la conductivité ionique de l'eau de mer.
- utiliser des piluliers en verre et non pas des boîtes de pétri en polyéthylène pour échantillonner les filtres pour les analyses de matière particulaire afin d'éviter toute contamination. En effet, il peut y avoir une contamination par le polyéthylène lors de la décarbonatation et séchage. Pour cette raison, les filtres ont été transférés sur du papier aluminium mais étaient dans ce cas plus exposés à l'acide.
- prendre plusieurs filtres avec un volume filtré de cultures différent pour la microscopie électronique à balayage pour être certain d'avoir un nombre de cellules suffisant pour faire des mesures statistiquement fiables.

ANNEXE 3: BASE DE DONNEES DES EXPERIENCES EN CULTURES SUR *E. HUXLEYI*

Base de données utilisées dans le chapitre V selon les filtres qui y sont décrits.

Exp. = expériences, **C** = Chemostat, **B** = Batch µ= taux de croissance, **RCa** = Taux de calcification, **opt.** = concentration optimale (non limitée), **RCa corrigé** et **µ corrigé** = Valeurs initiales de µ ou RCa corrigées avec l'équation de Rost et al. (2002) (équation V-5), **RCaIrr** et **µIrr** = références utilisées pour le calcul de la dépendance du taux de calcification et du taux de croissance à l'irradiance, **RCaTemp** et **µTemp** = références utilisées pou le calcul de la dépendance de RCa ou µ à la température, **$RCaNO_3$** = références utilisées pour le calcul de la dépendance de RCa à la concentration en nitrate et / = signifie que les données en sont pas disponible dans la publication.

Référence	Souche	Type d'exp.	Jour	Nuit	Irradiance	Température	Salinité	pCO_2	Ca^{2+}	NO_3	PO_4	µ	RCa	RCa corrigé	µ corrigé
RCaIrr / µIrr	-	*C/B*	*heures*	*heures*	*µmol photons. $m^{-2}.s^{-1}$*	*°C*	*‰*	*µatm*	*mmol. kg^{-1}*	*µmol. kg^{-1}*	*µmol. kg^{-1}*	*d^{-1}*	*pgC. $cell^{-1}.d^{-1}$*	*pgC. $cell^{-1}.d^{-1}$*	*d^{-1}*
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.7	100	5	0.48	8.7	8.35	0.46
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.7	100	5	0.46	8	7.68	0.44
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.6	100	5	0.53	8.4	8.06	0.51
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.6	100	5	0.54	9.1	8.74	0.52
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.7	100	5	0.60	7.7	7.39	0.58
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.7	100	5	0.61	10.7	10.27	0.59
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.5	100	5	0.65	8.8	8.45	0.62
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.5	100	5	0.66	9.4	9.02	0.63
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.4	100	5	0.67	9.2	8.83	0.64
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	125	15	35	380	9.4	100	5	0.72	11.9	11.42	0.69
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	200	15	35	475	9.8	100	5	1.20	6.1	5.86	1.15
Müller et al. (2011)	PeECE iso	B	14	10	200	15	35	475	9.8	100	5	1.20	7.8	7.49	1.15
Trimborn et al. (2007)	PML B92/11	B	16	8	30	15	35	269	10.0	100	6.25	0.47	0.75	0.61	0.38
Trimborn et al. (2007)	PML B92/11	B	16	8	300	15	35	269	10.0	100	6.25	1.09	1.41	1.14	0.88
Trimborn et al. (2007)	PML B92/11	B	16	8	800	15	35	269	10.0	100	6.25	0.96	2.64	2.14	0.78
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	15	15	31.5	485	9.5	100	6.25	0.53	1.56	0.78	0.27
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	15	15	31.5	501	9.5	100	6.25	0.54	1.47	0.74	0.27
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	15	15	31.5	335	9.5	100	6.25	0.53	1.48	0.74	0.27
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	30	15	31.5	469	9.5	100	6.25	0.81	4.25	2.13	0.41
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	30	15	31.5	429	9.5	100	6.25	0.83	4.66	2.33	0.42
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	30	15	31.5	300	9.5	100	6.25	0.77	4.35	2.18	0.39
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	80	15	31.5	490	9.5	100	6.25	1.03	9.12	4.56	0.52
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	80	15	31.5	485	9.5	100	6.25	1.08	9.09	4.55	0.54
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	150	15	31.5	454	9.5	100	6.25	1.10	9.48	4.74	0.55
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	24	0	150	15	31.5	422	9.5	100	6.25	1.15	9.20	4.60	0.58
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	16	8	30	15	29.7	425	9.5	100	6.25	0.74	4.24	3.44	0.60
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	16	8	80	15	29.7	427	9.5	100	6.25	1.06	8.89	7.21	0.86
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	16	8	80	15	29.7	329	9.5	100	6.25	0.99	8.10	6.57	0.80
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	16	8	150	15	29.7	471	9.5	100	6.25	1.10	8.01	6.49	0.89
Rost et al. (2002)	PML B92/11	B	16	8	150	15	29.7	316	9.5	100	6.25	1.15	9.30	7.53	0.93

Référence	Souche	Type d'exp.	Jour	Nuit	Irradiance	Température	Salinité	pCO_2	Ca^{2+}	NO_3	PO_4	µ	RCa	
														µ corrigé
µIrr	-	*C/B*	*heures*	*heures*	*µmol photons. $m^{-2}.s^{-1}$*	*°C*	*‰*	*µatm*	*mmol. kg^{-1}*	*µmol. kg^{-1}*	*µmol. kg^{-1}*	*d^{-1}*	*pgC. $cell^{-1}.d^{-1}$*	*d^{-1}*
Langer et al (2013)	PML B92/11	B	16	8	400	15	32	228	9.7	680	32	1.34	11.26	1.09
Langer et al (2013)	PML B92/11	B	16	8	400	15	32	228	9.7	780.0	34.00	1.19	11.22	0.96
Rokitta and Rost (2012)	RCC 1216	B	16	8	50	15	32	404	9.7	100.0	6.25	0.63	6.52	0.51
Rokitta and Rost (2012)	RCC 1216	B	16	8	300	15	32	435	9.7	100.0	6.25	1.02	8.96	0.83
Rokitta and Rost (2012)	RCC 1217	B	16	8	50	15	32	356	9.7	100.0	6.25	0.87	0.50	0.71
Rokitta and Rost (2012)	RCC 1217	B	16	8	300	15	32	355	9.7	100.0	6.25	1.18	0.72	0.96
RCaNO3														
Fritz (1999)	CCMP 378	C	14	10	185	17	/	380	10.0	0.01	5.00	0.20	0.77	**RCa corrigé aux données de Fritz:**
Fritz (1999)	CCMP 378	C	14	10	185	17	/	380	10.0	0.02	5.00	0.37	0.93	
Fritz (1999)	CCMP 378	C	14	10	185	17	/	380	10.0	0.04	5.00	0.59	0.91	
Fritz (1999)	CCMP 378	C	14	10	185	17	/	380	10.0	0.08	5.00	0.67	1.16	
Perrin et al. (2016)	RCC 911	B	12	12	134	20	35	400	/	100	6.25	0.91	3.14	2.97
RCaTemp														
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	10	35	277	9.9	65	5	0.61	7.29	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	10	35	375	9.9	65	5	0.64	6.72	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	10	35	497	9.9	65	5	0.65	6.38	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	15	35	289	9.9	65	5	1.11	9.09	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	15	35	400	9.9	65	5	1.09	11.00	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	15	35	494	9.9	65	5	1.11	8.90	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	20	35	314	9.9	65	5	1.35	7.76	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	20	35	431	9.9	65	5	1.26	10.03	
Sett et al. (2014)	PML B92/11	B	16	8	150	20	35	572	9.9	65	5	1.29	9.40	
Rosas-Navarro et al. (2016)	RCC1710	B	16	8	300	10	32	482	/	opt.	opt.	0.26	3.98	
Rosas-Navarro et al. (2016)	RCC1710	B	16	8	300	15	32	530	/	opt.	opt.	0.75	10.55	
Rosas-Navarro et al. (2016)	RCC1710	B	16	8	300	20	32	571	/	opt.	opt.	1.15	13.16	
Rosas-Navarro et al. (2016)	RCC1252	B	16	8	300	10	32	427	/	opt.	opt.	0.26	2.15	
Rosas-Navarro et al. (2016)	RCC1252	B	16	8	300	15	32	533	/	opt.	opt.	0.73	7.22	
Rosas-Navarro et al. (2016)	RCC1252	B	16	8	300	20	32	571	/	opt.	opt.	1.15	12.01	
Rosas-Navarro et al. (2016)	IAN01	B	16	8	300	15	32	551	/	opt.	opt.	0.81	8.20	

Référence	Souche	Type d'exp.	Jour	Nuit	Irradiance	Temperature	Salinité	pCO_2	Ca^{2+}	NO_3	PO_4	µ	µ corrigé
µTemp	-	*C/B*	*heures*	*heures*	*µmol photons. $m^{-2}.s^{-1}$*	*°C*	*‰*	*µatm*	*mmol. kg^{-1}*	*µmol. kg^{-1}*	*µmol. kg^{-1}*	*d^{-1}*	*d^{-1}*
Langer et al (2013)	PML B92/11	B	16	8	400	15	32	228	9.7	680	32	1.34	1.09
Langer et al (2013)	PML B92/11	B	16	8	400	15	32	228	9.7	780.0	34.00	1.19	0.96
Perrin et al. (2016)	RCC 911	B	12	12	134	20	35	400	/	100	6.25	0.91	/
Perrin et al. (2016)	RCC 911	B	12	12	29	20	35	400	/	100	6.25	0.28	/
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	6	/	/	/	opt.	7.2	0.32	0.31
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	9	/	/	/	opt.	7.2	0.23	0.22
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	12	/	/	/	opt.	7.2	0.68	0.65
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	15	/	/	/	opt.	7.2	0.95	0.91
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	15	/	/	/	opt.	7.2	0.99	0.95
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	20	/	/	/	opt.	7.2	1.62	1.56
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	20	/	/	/	opt.	7.2	1.38	1.32
Buithenhuis et al. (1999)	TQ26DIP	B	14	10	180	25	/	/	/	opt.	7.2	0.81	0.78

ANNEXE 4 : ARTICLE PUBLIE AU JOURNAL *Biogeosciences.*

Perrin, L., Probert, I., Langer, G. and Aloisi, G.: Growth of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* in light- and nutrient-limited batch reactors: relevance for the BIOSOPE deep ecological niche of coccolithophores, *Biogeosciences*, 13(21), 5983–6001, doi:10.5194/bg-13-5983-2016, 2016.

Biogeosciences, 13, 5983–6001, 2016
www.biogeosciences.net/13/5983/2016/
doi:10.5194/bg-13-5983-2016
© Author(s) 2016. CC Attribution 3.0 License.

Biogeosciences
Open Access

Growth of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* in light- and nutrient-limited batch reactors: relevance for the BIOSOPE deep ecological niche of coccolithophores

Laura Perrin[1], **Ian Probert**[2], **Gerald Langer**[3], **and Giovanni Aloisi**[4]

[1]Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06-CNRS-IRD-MNHN, LOCEAN-IPSL, 75252 Paris, France
[2]CNRS-UPMC Université, Paris 06 FR2424, Roscoff Culture Collection, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France
[3]The Marine Biological Association of the United Kingdom, The Laboratory, Citadel Hill, Plymouth, Devon, PL1 2PB, UK
[4]LOCEAN, UMR 7159, CNRS-UPMC-IRD-MNHN, 75252 Paris, France

Correspondence to: Laura Perrin (lpelod@locean-ipsl.upmc.fr)

Received: 10 May 2016 – Published in Biogeosciences Discuss.: 14 June 2016
Revised: 30 September 2016 – Accepted: 12 October 2016 – Published: 2 November 2016

Abstract. Coccolithophores are unicellular calcifying marine algae that play an important role in the oceanic carbon cycle via their cellular processes of photosynthesis (a CO_2 sink) and calcification (a CO_2 source). In contrast to the well-studied, surface-water coccolithophore blooms visible from satellites, the lower photic zone is a poorly known but potentially important ecological niche for coccolithophores in terms of primary production and carbon export to the deep ocean. In this study, the physiological responses of an *Emiliania huxleyi* strain to conditions simulating the deep niche in the oligotrophic gyres along the BIOSOPE transect in the South Pacific Gyre were investigated. We carried out batch culture experiments with an *E. huxleyi* strain isolated from the BIOSOPE transect, reproducing the in situ conditions of light and nutrient (nitrate and phosphate) limitation. By simulating coccolithophore growth using an internal stores (Droop) model, we were able to constrain fundamental physiological parameters for this *E. huxleyi* strain. We show that simple batch experiments, in conjunction with physiological modelling, can provide reliable estimates of fundamental physiological parameters for *E. huxleyi* that are usually obtained experimentally in more time-consuming and costly chemostat experiments. The combination of culture experiments, physiological modelling and in situ data from the BIOSOPE cruise show that *E. huxleyi* growth in the deep BIOSOPE niche is limited by availability of light and nitrate. This study contributes more widely to the understanding of *E. huxleyi* physiology and behaviour in a low-light and oligotrophic environment of the ocean.

1 Introduction

Coccolithophores are unicellular, photosynthetic and calcifying algae that are very abundant in the marine environment and play key roles in the global carbon cycle (Paasche, 2002; Roth, 1994). Through photosynthesis they contribute to the upper ocean carbon pump (CO_2 sink), while via calcification they contribute to the carbonate counter-pump (CO_2 source) (Paasche, 2002; Westbroek et al., 1993). The relative importance of calcification and photosynthesis is one of the factors that dictates the effect of coccolithophores on ocean–atmosphere CO_2 fluxes (Shutler et al., 2013). Environmental conditions such as temperature, irradiance, nutrient concentrations and pCO_2 exert a primary control on the calcification/photosynthesis ratio in coccolithophores and also affect cellular growth rates, which, together with grazing, mortality, sinking of cells and oceanic transport, define the biogeography of coccolithophores.

Despite the fact that certain coccolithophores have been fairly extensively studied in the laboratory (e.g. Daniels et al., 2014; Iglesias-Rodriguez et al., 2008; Krug et al., 2011;

Langer et al., 2012; Rouco et al., 2013), the factors controlling their biogeography in the global ocean are poorly understood (Boyd et al., 2010). In controlled laboratory conditions, coccolithophore growth is monitored as given environmental parameters are varied (e.g. Buitenhuis et al., 2008; Feng et al., 2008; Fritz, 1999; Langer et al., 2006; Leonardos and Geider, 2005; Paasche, 1999; Trimborn et al., 2007). In the ocean, geographical surveys of coccolithophore abundance and concomitant measurements of environmental variables contribute to defining coccolithophore biogeography in relation to the environment (Claustre et al., 2008; Henderiks et al., 2012). Although extrapolation of results from laboratory experiments to field distributions might not be straightforward, this approach has been widely used and continues to yield important insights into coccolithophore ecology and its reaction to a rapidly changing environment.

In this respect, one of the least well-understood but possibly globally relevant niches where coccolithophores can be relatively abundant is that occurring at the deep pycnocline of oceanic gyres, probably the best studied example of which was observed during the BIOSOPE cruise in the South Pacific Gyre (Beaufort et al., 2008; Claustre et al., 2008). This deep coccolithophore niche occurred at about 200 m depth, at a very low irradiance level ($< 20\,\mu$mol photons $m^{-2}\,s^{-1}$) and at a depth corresponding to the nitrate and phosphate nutricline with dissolved nitrate (NO_3) and phosphate (PO_4) concentrations of about 1 and 0.2 µM respectively. The niche was dominated by coccolithophore species belonging to the family Noëlaerhabdaceae, i.e. *Emiliania huxleyi* and species of *Gephyrocapsa* and *Reticulofenestra* (Beaufort et al., 2008). Deep-dwelling coccolithophores have also been observed in other geographic regions. Okada and McIntyre (1979) observed coccolithophores in the North Atlantic Ocean down to a depth of 100 m, where *Florisphaera profunda* dominated assemblages in summer and *E. huxleyi* dominated assemblages for the rest of the year. Deep coccolithophore populations dominated by *F. profunda* in the lower photic zone (LPZ > 100 m) of subtropical gyres were observed by Cortés et al. (2001) in the central North Pacific Gyre (station ALOHA) and by Haidar and Thierstein (2001) in the Sargasso Sea (North Atlantic Ocean). Jordan and Winter (2000) reported assemblages of coccolithophores dominated by *F. profunda* in the LPZ in the north-eastern Caribbean with a high abundance and co-dominance of *E. huxleyi* and *G. oceanica* through the water column down to the top of the LPZ. These deep-dwelling coccolithophores are not recorded by satellite-based remote sensing methods (Henderiks et al., 2012; Winter et al., 2014), which detect back-scattered light from coccoliths from a layer only a few tens of metres thick at the surface of the ocean (Holligan et al., 1993; Loisel et al., 2006).

Understanding the development of deep coccolithophore populations in low-nutrient, low-irradiance environments would contribute to building a global picture of coccolithophore ecology and biogeography. Laboratory culture experiments with coccolithophores that combine both nutrient and light limitation, however, are scarce. One reason is that investigating phytoplankton growth under nutrient limitation in laboratory experiments is complicated. In batch cultures the instantaneous growth rate decreases as nutrients become limited, making it hard to extract the dependence of growth rate on nutrient concentrations (Langer et al., 2013). This can be avoided by employing chemostat cultures, in which growth rates and nutrient concentrations are kept constant under nutrient-limited conditions (Engel et al., 2014; Leonardos and Geider, 2005; Müller et al., 2012). Physiological parameters obtained in chemostat experiments have been used in biogeochemical models to investigate environmental controls on phytoplankton biogeography (Follows and Dutkiewicz, 2011; Gregg and Casey, 2007). Despite their relevance to nutrient-limited growth, chemostat cultures are relatively rarely used because they are more expensive, time-consuming and complicated to set up and run than batch cultures (LaRoche et al., 2010).

In this study, we investigated growth of the coccolithophore *E. huxleyi* under light and nutrient co-limitation and applied the results of this culture study to investigate the conditions controlling growth in the deep niche of the South Pacific Gyre. Using an *E. huxleyi* strain isolated during the BIOSOPE cruise, we carried out batch culture experiments that reproduced the low- in situ light and nutrient conditions of the deep ecological niche. We monitored the nitrogen and phosphorus content of particulate organic matter, as well as cell, coccosphere and coccolith sizes, because these parameters are known to vary with nutrient limitation (Fritz, 1999; Kaffes, 2010; Rouco et al., 2013). To overcome the conceptual limitations inherent in nutrient-limited batch experiments (Langer et al., 2013), we modelled the transient growth conditions in the batch reactor assuming that assimilation of nutrients and growth are either coupled (Monod, 1949) or decoupled (Droop, 1968) processes in the coccolithophore *E. huxleyi*. An independent check of our modelling approach was obtained by also modelling the *E. huxleyi* batch culture data of Langer et al. (2013). The range of physiological parameters that can be directly assessed in batch culture experiments is limited (Eppley et al., 1969; Marañón et al., 2013). We show that batch cultures, if coupled to simple physiological modelling, may provide valuable estimates of fundamental physiological parameters that are more widely obtained in more time-consuming and costly chemostat experiments (Eppley and Renger, 1974; Terry, 1982; Riegman et al., 2000; Müller et al., 2012). Our joint culture and modelling approach also provides information on the conditions that control the growth of *E. huxleyi* in the deep ecological niche of the South Pacific Gyre.

2 Materials and methods

2.1 Experimental

2.1.1 Growth medium and culture conditions

Natural seawater collected near the Roscoff Biological Station (Brittany, France) was sterile-filtered and enhanced to *K* (−Si, −Tris, +Ni, −Cu) medium according to Keller et al. (1987), with only nitrate (no ammonium) as a nitrogen source. *Emiliania huxleyi* strain RCC911, isolated in summer 2004 from a water sample collected at 10 m depth near the Marquesas Islands during the BIOSOPE cruise (November to December 2004), was grown in batch cultures. Experiments were conducted in triplicate in 2.7 L polycarbonate bottles (Nalgene) with no head space. Experimental conditions were chosen to reproduce those prevalent in surface waters and at the nitricline of the oligotrophic gyre in the South Pacific Ocean (Morel et al., 2007). Cultures were grown under a 12:12 h light:dark (L:D) cycle (taken from a calculation of L:D cycle at the GYR station at the date of the sampling), at a temperature of 20 °C and at a salinity of 34.7. Cultures were grown at two irradiance levels: high light (ca. 140 µmol photons m^{-2} s^{-1}) and low light (ca. 30 µmol photons m^{-2} s^{-1}). The latter corresponds to the upper end of the irradiance range of the deep BIOSOPE coccolithophore niche (10–30 µmol photons m^{-2} s^{-1}). We chose not to run experiments at irradiance levels lower than 30 µmol photons m^{-2} s^{-1} in order to avoid very long experimental runs. Nutrient concentrations at the beginning of batch experiments were 100 and 2.5–5.1 µM for nitrate and 6.25 and 0.45–0.55 µM for phosphate in nutrient-replete and nutrient-limited conditions respectively. For each irradiance level, three experiments were carried out (in triplicate): control (nutrient-replete), phosphate limited (P-limited) and nitrate limited (N-limited) conditions. Cells were acclimated to light, temperature and carbon chemistry conditions for at least three growth cycles prior to experiments.

2.1.2 Cell enumeration and growth rate

The growth of batch cultures was followed by conducting cell counts every day or every other day using a BDFacs Canto II flow cytometer. Experiments were stopped before the cell density reached ca. 1.5×10^5 cells mL^{-1} in order to minimise shifts in the dissolved inorganic carbon (DIC) system. Cultures remained in the exponential growth phase throughout the duration of the control (nutrient-replete) experiments. In these control cultures, the growth rate (μ) was obtained by conducting a linear regression of the cell density data on the logarithmic scale. Nutrient-limited experiments were allowed to run until growth stopped. The growth rate in nutrient-limited conditions decreases in time as nutrients are depleted and it is therefore not possible to calculate growth rate by means of regression analysis (Langer et al., 2013). The dependence of growth rate on nutrient concentration in nutrient-limited conditions was investigated with the numerical model introduced in Sect. 2.2 below.

2.1.3 Cell and coccosphere diameter and coccolith length

Samples were taken at the end of the experiments at roughly the same point in the L:D cycle (between noon and 16:00 UTC) to acquire images of cells using an optical microscope (×100, oil immersion, Olympus BX51 microscope). The internal cell diameter of 100 cells was measured for each experimental culture using the ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Images of coccospheres and coccoliths were obtained with scanning electron microscopy (SEM). For SEM observations, samples were filtered onto 0.8 µm polycarbonate filters (Millipore), rinsed with a basic solution (180 µL of 25 % ammonia solution in 1 L of MilliQ water) and dried at 55 °C for 1 h. After mounting on an aluminum stub, they were coated with gold–palladium and images were taken with a Phenom G2 pro desktop scanning electron microscope. For each experimental culture 100 coccospheres were measured using ImageJ. Three hundred coccoliths per sample were measured using a script (Young et al., 2014) that is compatible with ImageJ in order to measure the distal shield length (DSL) of coccoliths.

2.1.4 Dissolved inorganic carbon (DIC) and nutrient analyses

Subsamples for pH_T (pH on the total scale), DIC and nutrient analyses were taken from culture media at the beginning and at the end of each experiment. The pH was measured with a pH meter-potentiometer pHenomenal pH 1000 L with a Ross ultra combination pH electrode on the total scale (precision ± 0.02 pH units) and was calibrated with a TRIS buffer. Samples for the determination of DIC were filtered through pre-combusted (4 h at 450 °C) glass fibre filters (Whatman GF/F) into acid-washed glass bottles and poisoned with mercuric chloride. Bottles were stored at 4 °C prior to analysis. A LICOR7000 CO_2 / H_2O gas analyser was used for DIC analysis (precision ± 2 µmol kg^{-1}). A culture aliquot (100 mL) was filtered onto pre-combusted (4 h at 450 °C) glass fibre filters (Whatman GF/F) and stored at −20 °C in a polyethylene flask until nutrient analysis. Nitrate and phosphate concentrations were measured using an auto-analyser Seal Analytical AA3 (detection limits were 0.003 µM for PO_4 and 0.01 µM for NO_3).

2.1.5 POC, PON, PIC, POP

For particulate organic carbon (POC), particulate organic nitrogen (PON) and particulate organic phosphorus (POP) analyses, samples (200 or 250 mL) were filtered onto pre-combusted (4 h at 450 °C) glass fibre filters (Whatman GF/F) and preserved at −20 °C. POC and PON were measured on

the same filter that was dried overnight at 50 °C after being placed in a fuming hydrochloric acid dessicator for 2 h to remove coccolith calcite. POC and PON were analysed using a NC Analyzer Flash EA 1112. Particulate inorganic carbon (PIC) was obtained by using a 7500cx Agilent ICP-MS to analyse the calcium concentration in samples filtered onto 0.8 µm polycarbonate filters (Millipore) and extracted by a 0.4 M solution of nitric acid. PIC was obtained considering a 1 : 1 stoichiometry between Ca^{2+} and PIC, i.e. all of the calcium on the filters was considered to have come from calcium carbonate (Fagerbakke et al., 1994). POP was determined as the difference between the total particulate phosphorus and particulate inorganic phosphorus, analysed using an auto-analyser Seal Analytical AA3, after the filters were placed in a solution of hydrochloric acid, according to the method of Labry et al. (2013).

2.2 Modelling

2.2.1 Monod and Droop model

Growth of *E. huxleyi* in the batch reactors was simulated using Monod and Droop models of cellular growth.

In the Monod model (Monod, 1949), the growth rate depends on the external nutrient concentration and is calculated as

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{[R]}{[R] + K_R}, \tag{1}$$

where $\mu_{\max}$ (in days^{-1}) is the maximum growth rate in nutrient-replete conditions, K_R (in µmol L^{-1}) is the (Monod) half-saturation constant for growth and $[R]$ (in µmol L^{-1}) is the concentration of nutrient R in the batch reactor. Both $\mu_{\max}$ and K_R were obtained by fitting the model to the data, while $[R]$ is the nutrient concentration in the culture experiments calculated as detailed below.

Two differential equations keep track of the total cell abundance in the batch reactor (Cells) and the limiting nutrient concentration in the reactor:

$$\frac{\mathrm{d\,Cells}}{\mathrm{d}t} = \mu \times \mathrm{Cells} \tag{2}$$

$$\frac{\mathrm{d}\,[R]}{\mathrm{d}t} = \frac{-R_{\mathrm{UP}} \times \mathrm{Cells}}{V}, \tag{3}$$

where V (in L) is the volume of the batch reactor, Cells (in cells mL^{-1}) is the cell density measured during the experiments and R_{UP} is the cell-specific R uptake rate (in µmol$_R$ cell^{-1} d^{-1}) given by

$$R_{\mathrm{UP}} = \mu \times Q_R, \tag{4}$$

where Q_R, the (constant) cellular quota of nutrient R (in µmol$_R$ cell^{-1}), is the value of the quota R at the end of the control experiment.

In the Droop model (Droop, 1968) nutrient uptake and cellular growth are decoupled and cellular growth depends on the internal store of the limiting nutrient. The time-dependent rate of nutrient uptake, R_{up} (in µmol$_R$ cell^{-1} d^{-1}), is simulated using Michaelis–Menten uptake kinetics:

$$R_{\mathrm{UP}} = S_{\mathrm{Cell}} \times V_{\mathrm{maxR}} \times \frac{[R]}{[R] + K_R}, \tag{5}$$

where S_{Cell} (in µm^3) is the surface area of the cell, $V_{\max R}$ (in µmol$_R$ µm^{-2} d^{-1}) is the maximum surface-normalised nutrient uptake rate (obtained by fitting the model to the data) and K_R (in µmol L^{-1}) is the (Michaelis–Menten) half-saturation constant for uptake of nutrient R. The volume and surface of cells (S_{cell}) was obtained either by measurements of cells (both in the control culture and at the end of the nutrient-limited cultures) for the RCC911 strain experiments, or was estimated from Q_{C}, the cellular organic carbon quota (in pmol$_{\mathrm{C}}$ cell^{-1}), and the density of carbon in coccolithophore biomass (approximately equal to 0.015 pmol$_{\mathrm{C}}$ µm^{-3}; Aloisi, 2015) for the batch experiments of Langer et al. (2013), for which cell measurements were not made.

The phytoplankton growth rate µ (in d^{-1}) was calculated based on the normalised ^{n}Quota equation reported in Flynn (2008):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{(1 + KQ_R) \times \left(Q - Q_R^{\min}\right)}{\left(Q - Q_R^{\min}\right) + KQ_R \times \left(Q_R^{\max} - Q_R^{\min}\right)}, \tag{6}$$

where $\mu_{\max}$ (in d^{-1}) is the maximum growth rate attained at the maximum nutrient cell quota $Q_R^{\max}$ (in µmol cell^{-1}), $Q_R^{\min}$ (in µmol cell^{-1}) is the minimum (subsistence) cellular quota of nutrient R below which growth stops and KQ_R is a dimensionless parameter that can be readily compared between nutrient types and typically has different values for NO_3 and PO_4 (Flynn, 2008). While $Q_R^{\max}$ was obtained from the analysis of the nutrient quota (N or P) at the end of the control experiments, $Q_R^{\min}$ was estimated by calculation described in the Sect. 2.2.2 below and KQ_R was obtained from fitting the model to the experimental data. Thus, in the Droop model the growth rate depends on the internal cellular quota of nutrient R rather than on the external nutrient concentration like in the Monod model of phytoplankton growth.

Three differential equations keep track of the total cell abundance in the batch reactor (Cells), the nutrient concentration in the reactor ($[R]$, in µmol L^{-1}) and the internal cellular quota of nutrient (Q_R, in µmol cell^{-1}):

$$\frac{\mathrm{d\,Cells}}{\mathrm{d}t} = \mu \times \mathrm{Cells} \tag{7}$$

$$\frac{\mathrm{d}[R]}{\mathrm{d}t} = \frac{-R_{\mathrm{UP}} \times \mathrm{Cells}}{V} \tag{8}$$

$$\frac{\mathrm{d}Q_R}{\mathrm{d}t} = R_{\mathrm{UP}} - \mu \times Q_R. \tag{9}$$

These three differential equations are integrated forward in time starting from initial conditions chosen based on experimental values of the number of cells, nutrient concentration

at the beginning of the experiment and the cellular nutrient quota determined during growth in nutrient-replete conditions.

The dependence of the maximum growth rate on irradiance was determined independently by fitting the growth rate determined in the exponential growth phase in our experiments and in the experiment of Langer et al. (2013) to the following equation from MacIntyre et al. (2002):

$$\mu = \mu_{\max}\left(1 - e^{\left(\frac{-\mathrm{Irr}}{K_{\mathrm{Irr}}}\right)}\right), \tag{10}$$

where K_{Irr} is the light-saturation parameter of growth in µmol photons $\mathrm{m}^{-2}\,\mathrm{s}^{-1}$ (MacIntyre et al., 2002; Fig. S1 in the Supplement) and was determined by this equation.

2.2.2 Modelling strategy

The Droop model presented here does not take into account the variation of size of coccolithophore cells between the different experiments. This model has eight parameters. Four are considered to be known and constant for a given experiment: batch volume V, cell volume (and surface area S_{Cell}) and minimum and maximum cellular quota of nutrient respectively $Q_{\min}$ and $Q_{\max}$. The unknown parameters (the physiological parameters of interest) are: the (Michaelis–Menten) half-saturation constant for nutrient uptake K_R, the maximum surface-normalised nutrient uptake rate V_{maxR}, the maximum growth rate µmax and the dimensionless parameter KQ_R. The Monod model has fewer known parameters: batch volume V and cellular quota of nutrient Q_R. Unknown parameters are: maximum growth rate $\mu_{\max}$ and the (Monod) half-saturation constant for growth K_R.

Concerning $Q_R^{\min}$, the measured minimum PON value (5.71 fmol cell^{-1}) for the N-limited experiment of Langer et al. (2013) is very low compared with the PON quota in other N-limited *E. huxleyi* experiments reported in the literature (38.9–39.3 fmol cell^{-1} in Sciandra et al., 2003; and 51.4 fmol cell^{-1} in Rouco et al., 2013). When the $Q_{\mathrm{N}}^{\min}$ value of Langer et al. (2013) was used in the model, the model fit to the experimental data degraded considerably (data not shown). Consequently, we decided to recalculate $Q_{\mathrm{N}}^{\min}$ using the initial concentration of dissolved N and the final cell density in the reactor (column "Calculation" in Table 3). This calculated value of $Q_{\mathrm{N}}^{\min}$, that in all cases except for the N-limited experiments of Langer et al. (2013) was very similar to the measured minimum PON quota, was comparable to values reported in the literature for *E. huxleyi* and resulted in a very good fit of the model to the experimental data. To be coherent, we applied this approach to all values of $Q_{\mathrm{N}}^{\min}$ and $Q_{\mathrm{P}}^{\min}$ used in the modelling exercise.

A point to note concerning the $Q_{\mathrm{P}}^{\max}$ used for the P-limited experiment of Langer et al. (2013) is that the initial C : P ratio for the control experiment was 214, which is much higher than the Redfield ratio of 106 (Redfield, 1963). It is not possible to reproduce the experimental data when imposing such a high C : P ratio on the model. Thus, the $Q_{\mathrm{P}}^{\max}$ value had to be increased in order to reproduce the data and thus estimate additional physiological parameters for this experiment. For this reason, the modelling results for this particular experiment should be taken with caution.

The time-dependent cell density, limiting nutrient concentration and cellular particulate organic nitrogen and phosphorus calculated by the models were fitted to the same quantities measured in the experiments. For our experiments there were only two nutrient cellular quota data points, one at the beginning and one at the end of the experiments. We artificially inserted a third nutrient-quota data point at the end of the exponential growth phase, setting it equal to the nutrient quota at the beginning of the experiment. In this way the model is forced to keep the nutrient quota unchanged during the exponential growth phase. This is a reasonable assumption, as cellular nutrient quotas should start to be affected only when nutrient conditions become limiting.

The quality of the model fit to the experimental data was evaluated with a cost function. For a given model run, the total cost function was calculated as follows:

$$\mathrm{TotCost} = \sum_{i=1}^{n} (\Delta x_i)^2, \tag{11}$$

where n is the number of data points available and Δx_i is the difference between the data. The model for the ith data point is as follows:

$$\Delta x_i = \mathrm{Data}\,(x_i) - \mathrm{Model}\,(x_i)\,, \tag{12}$$

where x_i is the data or model value for the considered variable (cell density, limiting nutrient concentration or cellular limiting nutrient quota). The lower the cost function is, the better the quality of the model fit to the data. For a given experiment, the best-fit of the model to the data was obtained by running the model and repeatedly imposing a high number of combinations of input parameters (typically 500 000 model runs for every experiment) and selecting the parameter setting that yielded the lowest cost.

3 Results

3.1 Laboratory experiments with *E. huxleyi* strain RCC911

Growth curves for all experiments with *E. huxleyi* strain RCC911 are shown in Fig. 1. Experiments run in high-light conditions attained target cell densities (in nutrient-replete, control experiments) or nutrient limitation (in nutrient-limited experiments) in a shorter time compared to experiments run in low-light conditions. Growth in nutrient-replete cultures in both light conditions followed an exponential growth curve (growth rates in the control nutrient-replete experiments were 0.91 ± 0.03 and $0.28 \pm 0.01\,\mathrm{d}^{-1}$

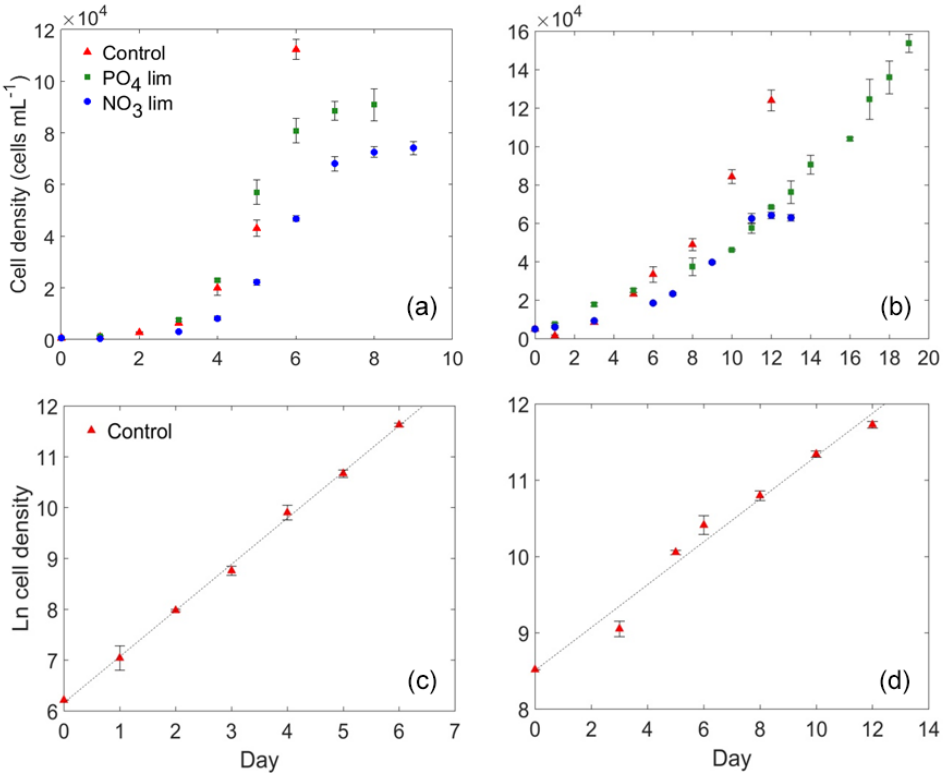


Figure 1. The evolution of cell density with time in culture experiments with *E. huxleyi* strain RCC911 in **(a)** high irradiance, **(b)** low irradiance and cell density on a logarithmic scale for nutrient-replete cultures in **(c)** high irradiance and **(d)** low irradiance.

for the high-light and low-light experiments respectively; Table 1) whereas in nutrient-limited experiments growth evolved from an exponential to a stationary phase at the end of the experiment, except the P-limited culture at low light where the stationary phase was not attained (growth rate of $0.13 \pm 0.01\,d^{-1}$).

In the high-light experiment, NO_3 concentration decreased to $0.18 \pm 0.03\,\mu M$ in N-limited cultures and PO_4 concentration decreased to $0.011 \pm 0.004\,\mu M$ in P-limited cultures at the end of the experiments, and in low-light conditions the final NO_3 and PO_4 concentrations were 0.13 ± 0.02 and $0.008 \pm 0.006\,\mu M$ respectively (Table 1). Thus, nutrients where nearly completely exhausted at the end of our nutrient-limited experiments. Seawater carbonate chemistry was quasi-constant over the course of the experiments in all treatments, with, as reported by Langer et al. (2013), the P-limited cultures undergoing the largest change in DIC (12–13 %; Table 1).

Compared to the control experiments, cellular POC, PIC and PON quotas increased in the P-limited cultures at both light levels, while cellular POP quota decreased (Table 2; Fig. 2d). In the N-limited cultures, cellular PIC and POC quotas (Fig. 2a and b) increased, with the exception of POC at low light, which remained nearly unchanged, while cellular PON and POP quotas (Fig. 2c and d) decreased at both light levels. N-limiting conditions resulted in an increase of the POC : PON ratio in both light regimes (Fig. 3a, Table 2). POC : POP (Fig. 3b) was higher in P-limited experiments compared to nutrient-replete experiments. The PIC : POC ratio increased with both N and P limitation (Fig. 3c) at both light regimes. For the high-light experiment, the PIC : POC ratio was highest in the P-limited culture (0.52 ± 0.14), while in the low-light conditions, the highest ratio was recorded in the N-limited culture (0.33 ± 0.02) (Fig. 3c).

Light limitation led almost invariably to a decrease in POC and PIC, with the exception of POC in nutrient-replete conditions (Table 2, Fig. 2). In P-limited cultures POP and PON decreased with light limitation, whereas in N-limited cultures POP and PON increased with light limitation (Fig. 2). With the exception of the POC : POP ratio in P-limiting conditions, which was not affected by the change in light regime, both POC : PON and POC : POP ratios decreased with light limitation. Finally, the PIC : POC ratio decreased with light limitation in all three nutrient conditions.

Cell size varied with both nutrient and light limitation (Table S1 in the Supplement). Compared to the control culture in high-light conditions, the cell volume was higher for the P-limited culture ($77.2 \pm 19.9\,\mu m^3$) and was similar for the N-limited culture ($47.33 \pm 11.13\,\mu m^3$). The same pattern was observed in low-light conditions. In both light regimes P limitation resulted in higher coccosphere volume and higher DSL than the other nutrient conditions (Table S1).

Table 1. Growth rate, nutrient concentration, pH, DIC at the end of the experiments and shift in DIC compared with the initial DIC (averages from triplicate, $n = 3$).

Sample	Growth rate* (d^{-1})	SD	NO_3 ($\mu mol\,L^{-1}$)	SD	PO_4 ($\mu mol\,L^{-1}$)	SD	pH	SD	DIC ($\mu mol\,kg^{-1}$)	SD	DIC shift (%)
High light											
Control	0.91	0.03	67.92	1.98	3.95	0.12	8.13	0.01	2177	19.14	2.1
PO_4 lim	0.00		80.88	0.35	0.01	0.00	8.21	0.01	1894	21.01	12.1
NO_3 lim	0.00		0.18	0.03	5.74	0.00	8.14	0.00	2060	3.61	4.7
Low light											
Control	0.28	0.01	79.10	1.15	4.90	0.04	8.13	0.02	2161	7.55	4.1
PO_4 lim	0.13	0.01	75.25	1.24	0.01	0.01	8.30	0.01	1956	8.33	13.2
NO_3 lim	0.00		0.13	0.02	5.83	0.02	8.09	0.00	2139	4.16	39

* Cells are in exponential growth phase at the end of control experiments.

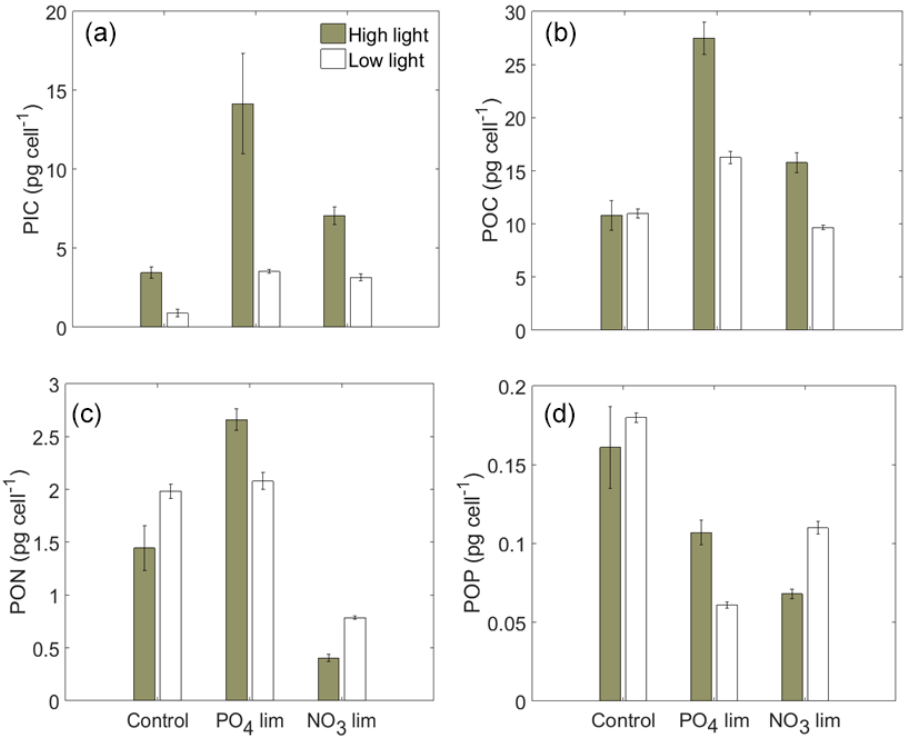


Figure 2. Cellular PIC **(a)**, POC **(b)**, PON **(c)**, POP **(d)** quotas.

For example, the coccosphere volume in high light was $260 \pm 88\,\mu m^3$ for the P-limited experiment, whereas it was $109 \pm 23\,\mu m^3$ for the control experiment and $139 \pm 41\,\mu m^3$ for the N-limited experiment. There was no measurement of coccosphere volume and DSL in the low-light control culture because of a lack of visible cells on the filters. However, the coccosphere volume for the P-limited treatment followed the same trend as the cell size, i.e. a decrease with lower light. Figure 4a shows the correlation between POC content and cell volume ($R^2 = 0.85$, $p<0.05$, $n = 6$) and Fig. 4b shows the correlation between cell and coccosphere volume ($R^2 = 0.92$, $p<0.03$, $n = 5$). Relationships between DSL and coccosphere size ($R^2 = 0.68$, $p<0.3$, $n = 5$) and between DSL and cell size ($R^2 = 0.86$, $p<0.06$, $n = 5$) are illustrated in Fig. 4c. These parameters were not significantly correlated, but the sample size was rather low. The thickness of the coccolith layer, calculated by subtracting the cell diameter from the coccosphere diameter and dividing by two, was higher for P-limited cultures in both light conditions: $1.294 \pm 0.099\,\mu m$ for high light and $1.02 \pm 0.043\,\mu m$ for low light compared with the other cultures, which were between 0.66 and 1 µm. These observations are consistent with the high PIC quota and relatively large size of coccospheres and coccoliths of *E. huxleyi* under P limitation.

Table 2. Cellular carbon, nitrogen and phosphorus quotas (averages from triplicate, $n = 6$ for cellular quotas measurements).

Sample	PIC (pg cell^{-1})	SD	POC (pg cell^{-1})	SD	PON (pg cell^{-1})	SD	POP (pg cell^{-1})	SD	PIC : POC	SD	POC : PON	SD	POC : POP	SD
High light														
Control	3.46	0.36	10.8	1.38	1.45	0.21	0.16	0.03	0.32	0.05	8.72	1.45	173	14.0
PO_4 lim	14.16	3.19	27.49	1.53	2.66	0.10	0.11	0.01	0.52	0.12	12.05	0.70	661	24.3
NO_3 lim	7.06	0.55	15.77	0.95	0.4	0.04	0.07	0.00	0.45	0.04	45.59	4.12	600	16.7
Low light														
Control	0.89	0.10	10.98	0.41	1.98	0.07	0.18	0.00	0.08	0.01	6.46	0.28	158	2.51
PO_4 lim	3.53	0.25	16.25	0.56	2.08	0.08	0.06	0.00	0.22	0.017	9.11	0.41	693	13.4
NO_3 lim	3.15	0.13	9.67	0.21	0.79	0.02	0.11	0.00	0.33	0.015	14.35	0.37	226	3.38

Table 3. Values of $Q_R^{\min}$ (which correspond to the cellular PON (POP) at the end of the experiment: values measured and calculated) and the parameters obtained with the best-fit indicated for N- and P-limited experiment (high light = HL and low light = LL).

Strain	Light	Limitation	$Q_R^{\min}$ Analysis (fmol cell^{-1})	$Q_R^{\min}$ Calculation (fmol cell^{-1})	Best-fit $V_{\max R}$ (µmol cell^{-1} d^{-1})	Best-fit K_R (µmol L^{-1})	Best-fit $\mu_{\max}$ (d^{-1})	Best-fit KQ_R
PML B92/11		NO_3	5.71	27.7	$1.46.10^{-7}$	0.35	1.3	0.39
PML B92/11		PO_4	0.645	2.04	$1.36.10^{-8}$	0.051	1.57	0.98
RCC911	HL	NO_3	28.57	31.28	$1.05.10^{-7}$	0.205	1.01	0.25
RCC911	HL	PO_4	3.464	5.931	$1.47.10^{-8}$	0.35	1.2	0.9
RCC911	LL	NO_3	56.14	78.99	$3.34.10^{-8}$	0.09	0.2	0.3
RCC911	LL	PO_4	1.968	2.875	$5.74.10^{-10}$	0.275	0.52	0.47

3.2 Modelling results

We applied the modelling approach to both the data from our batch culture experiments with strain RCC911 and to the batch culture data of Langer et al. (2013), who tested N- and P-limited growth of *E. huxleyi* strain PML B92/11 cultured in high-light conditions (400 µmol photons m^{-2} s^{-1}), optimal temperature (15 °C) and quasi-constant carbon system conditions. Measurements of cell density, nutrient concentrations and cellular particulate matter from both sets of experiments were used for the present modelling study.

The Droop model was able to accurately reproduce both experimental data sets (Figs. 5, 6 and 8; Figs. S2, S3 and S4), whereas the Monod model was not able to reproduce the rise in cell number after the limiting nutrient had been exhausted (Fig. 5). The modelling approach allows evaluation of the evolution of experimental variables that are complicated to determine analytically, i.e. (1) the nutrient-uptake rate, which follows the same trend as the nutrient concentration in the reactor, (2) the C / limited-nutrient ratio, that starts at a minimum value, stays constant during the duration of the exponential phase and then increases due to exhaustion of the external nutrient, reaching a maximum as the culture attains the stationary phase and (3) the instantaneous growth rate, which follows the trend of the limiting nutrient ratio, reaching zero when the culture attains the stationary phase.

The values for the physiological parameters of the best-fit obtained by applying the Droop model to our experiments with *E. huxleyi* strain RCC911 and to the experiments of Langer et al. (2013) are presented in Table 3. Overall, the best-fit values for the two strains in high-light conditions were very similar, suggesting that the modelling approach is sound. Values for the half-saturation constant for nitrate uptake K_N determined in our experiments in high-light conditions and in those of Langer et al. (2013) were comparable. However, for K_P the value was consistent between our high- and low-light experiments, but considerably lower for the Langer et al. (2013) experiment, which, as noted above, is a result that should be taken with caution. The maximum surface nutrient-uptake rates $V_{\max R}$ were similar between our high-light experiment and that of Langer et al. (2013). The dimensionless parameters KQ_N and KQ_P were also comparable between the two studies for high-light conditions and in both cases KQ_P was higher than KQ_N. Maximum growth rates in high-light conditions were similar for both N-limited and P-limited experiments. As expected, maximum growth rates for our low-light cultures were considerably lower (Table 3).

To test the reliability of the model to obtain estimates of the physiological parameters, we forced the model to run with a range of values for a given parameter, while letting the other three parameters vary over a wide range. These tests

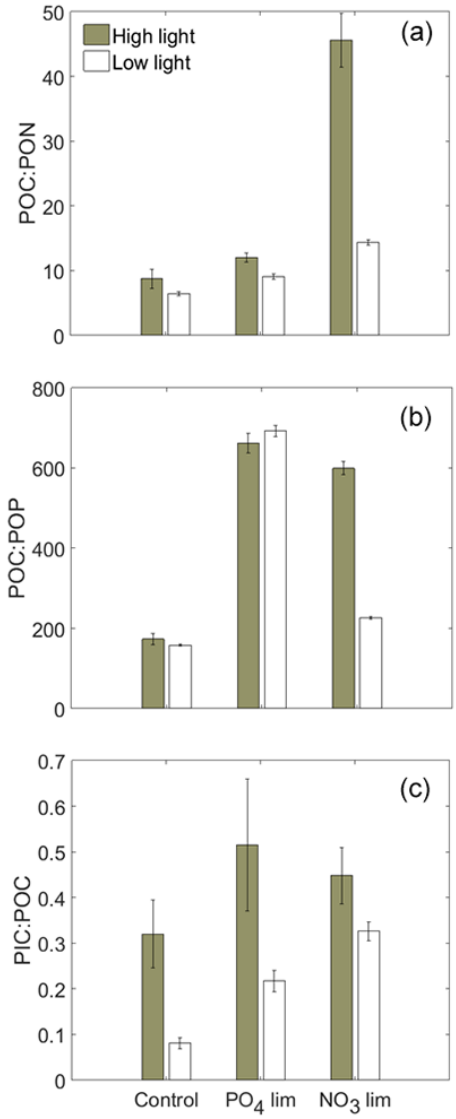


Figure 3. Cellular POC : PON **(a)**, POC : POP **(b)** and PIC : POC **(c)** ratios.

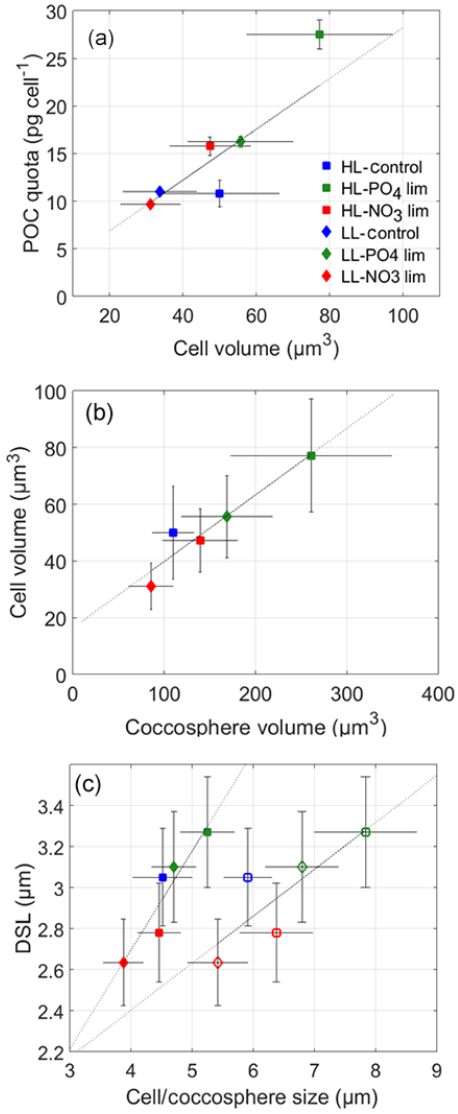


Figure 4. **(a)** POC quota vs. cell volume, **(b)** Cell volume vs. coccosphere volume in high-light (HL) and low-light (LL) conditions, **(c)** Distal shield length (DSL) vs. coccosphere and cell diameter. Solid symbols are cell size and open symbols are coccosphere size. Dotted line is the linear regression.

give us plots of the value of the cost function (Eq. 11) as a function of the value of the imposed parameter. The process was repeated separately for the four unknown parameters and Fig. S5 shows the results for the N-limited culture of Langer et al. (2013). For all of the parameters except for K_R, this exercise yielded a U shaped curve with a minimum of the cost function corresponding to the best-fit parameter values presented in Table 3. This shows that the model is well suited to find a best-fit value for these parameters. Three minima of the cost function were found for K_R (Fig. S5), of which only the lowest was consistent with values reported in the literature (e.g. Riegman et al., 2000). This value was chosen to obtain the best-fit of the model to the experimental data.

4 Discussion

4.1 Batch culture experiments

The batch culture experiments presented here provide new insights into the physiology of the numerically dominant coccolithophore *E. huxleyi* under conditions of light and nutrient limitation. Leonardos and Geider (2005) carried out cultures in low-light and low-phosphate conditions with a non-calcifying *E. huxleyi* strain and thus did not report PIC : POC ratios. The culture study reported here is thus the first experiment where changes in the PIC : POC ratio due to light limitation are explored for nutrient-limited cultures. In our

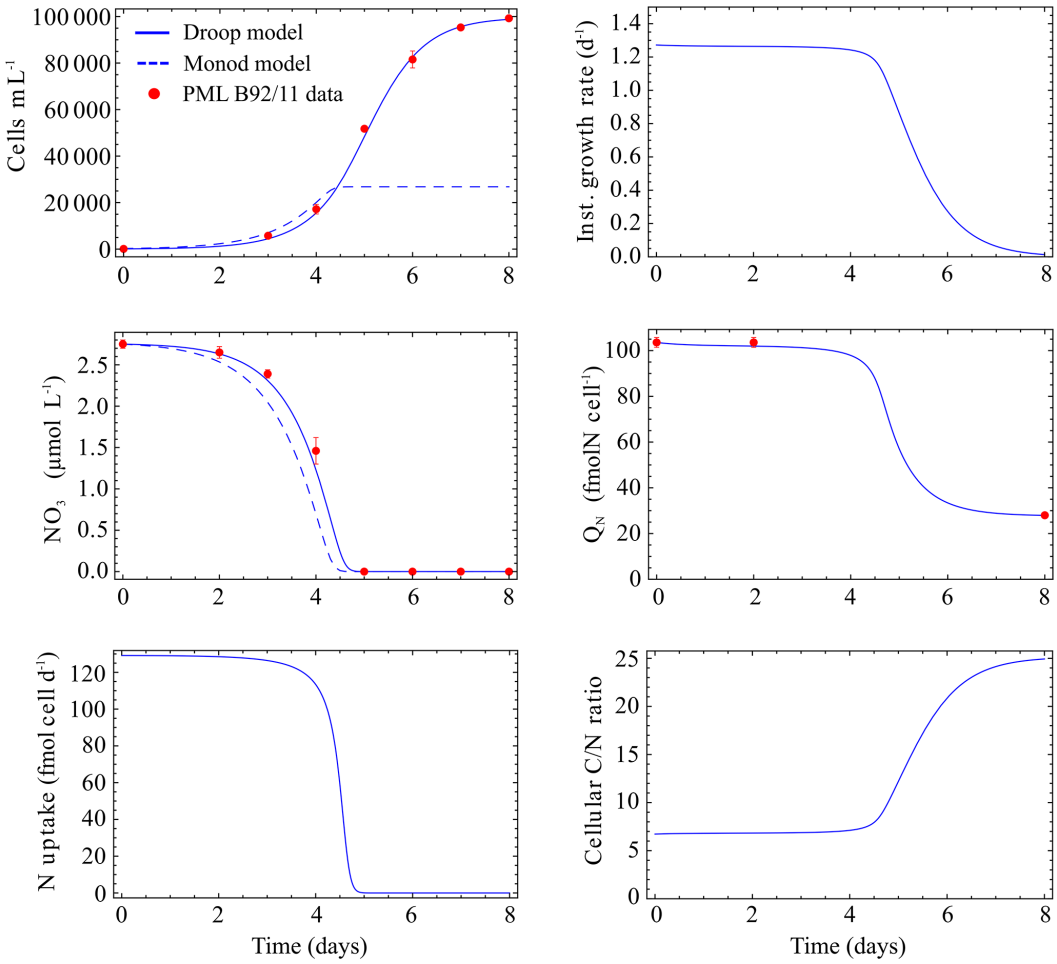


Figure 5. Model fitted to the data of the nitrate-limited cultures of Langer et al. (2013) (Inst = instantaneous).

experiments, cultures were harvested at relatively low cell densities, i.e. a maximum of ca. 1.6×10^5 cells mL^{-1} in the P-limited low-light experiment and $< 1.3 \times 10^5$ cells mL^{-1} in all other treatments. The aim was to ensure that changes in the carbonate system were within a minimal range (< 10 % except for the P-limited experiments in which the DIC changes were 12 and 13 %; Table 1) that is not expected to have a significant influence on measured physiological parameters (Langer et al., 2007; LaRoche et al., 2010). Hence, it can be stated that the observed phenomena stem from N or P limitation and/or light limitation (depending on the treatment) rather than from carbon limitation.

Comparison of the growth curves illustrated in Fig. 1 demonstrates that growth limitation was attained in both our low-nutrient and low-light treatments relative to control conditions. Consistent with previous experimental results (Langer et al., 2013; Leonardos and Geider, 2005; Müller et al., 2012; Oviedo et al., 2014; Rouco et al., 2013), the relatively low cellular PON or POP quotas (and high POC : PON and POC : POP ratios) at the end of the low-nutrient experiments relative to the control indicate that nutrient limitation of growth occurred in our low-nutrient experiments. The stationary phase was not attained in the P-limited low-light culture, but it can be inferred that cells were P limited from (a) the POP quota, which was lower than that of the control, (b) the POC : POP ratio, which was higher than that of the control and (c) a deviation of the growth curve from exponential growth starting (at the latest) on day 16 of 19. While a decline in POP quota is an early sign of limitation, the decline in growth rate occurs later, indicating more severe limitation. The cessation of cell division (stationary phase) would be the last stage in the process of becoming fully P limited over the course of a batch culture.

In nutrient-replete conditions, low light had no effect on POC quota (Fig. 2b) and cell size (Fig. 4) within the limit of uncertainty of the measurements, whereas it caused a decrease in PIC quota (and therefore a decrease in PIC : POC ratio). Although PIC quota also decreased in low light for nutrient-limited conditions (Fig. 2a), the PIC quota for nutrient-replete conditions in low light was unexpectedly low indicating a potential anomaly in the calcification process for this experiment.

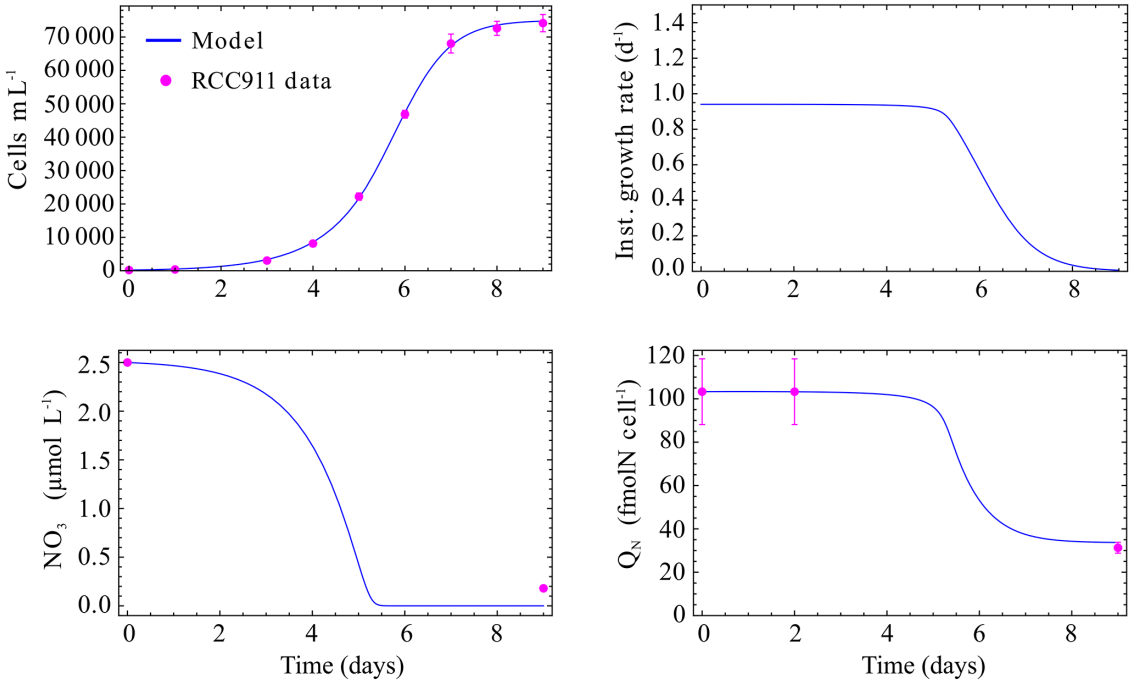


Figure 6. Model fitted to the data of the nitrate-limited cultures of strain RCC911 in high-light conditions.

In our experiments N limitation led to an increase in the PIC : POC ratio in both high- and low-light conditions, a result that is consistent with most previous N limitation studies with *E. huxleyi* (see review by Raven and Crawfurd, 2012), but the cause of this increase appears to vary. According to Müller et al. (2008) and Raven and Crawfurd (2012), N-limited cells decrease in volume due to substrate limitation and lower assimilation of nitrogen in the G1 phase of the cell division cycle, but in our experiments N limitation did not cause an obvious decrease in cell volume or POC quota, but rather an increase in PIC quota relative to nutrient-replete cells in both high- and low-light conditions (Fig. 2a). Both Müller et al. (2008) and Fritz (1999) also reported an increase of the PIC content of *E. huxleyi* in N-limited conditions. The increase in PIC quota is difficult to explain in light of the observations that coccolith size was lower in N-limited cultures and coccosphere volume was broadly comparable (given the error margins) in control and N-limited cultures (Fig. 4).

P limitation had the greatest effect on cell size, cells being significantly larger under P limitation than in control conditions, for both high- and low-light regimes. The increase in cell volume was accompanied by increases in both POC and PIC quotas, again in both light conditions (Fig. 2). According to Müller et al. (2008), P limitation inhibits DNA replication while biomass continues to build up, leading to an increase in cell volume. This could explain the very high volume of P-limited cells in high-light conditions in our experiments, and the slightly increased cell volume in the P-limited, low-light experiment, compared to experiments not limited by PO_4. P limitation resulted in a considerably higher coccosphere volume than the other nutrient conditions, in line with the observations of Müller et al. (2008) and Oviedo et al. (2014). In high light, the PIC quota in P-limited cells was more than tripled relative to nutrient-replete conditions. This general effect of phosphate limitation was also reported by Raven and Crawfurd (2012) and is likely due to the occurrence of larger (as shown by high DSL values) and potentially more numerous coccoliths (Gibbs et al., 2013). In the P-limited experiment, PIC : POC ratios increased relative to nutrient-replete cultures, similar to the experiments of van Bleijswijk et al. (1994) and Berry et al. (2002), although Oviedo et al. (2014) reported that the response of the PIC : POC ratio to P limitation is strain specific in *E. huxleyi*. The increase in PIC : POC in *E. huxleyi* is often greater for P limitation than for N limitation (Zondervan, 2007), as in our high-light experiment. However, in low light the PIC : POC ratio was higher under N limitation, highlighting that co-limitation can have unexpected physiological consequences.

In our experiments the PIC : POC ratio decreased with light limitation in nutrient-replete and nutrient-limited conditions (Fig. 3). Zondervan (2007) stated that the ratio of calcification to photosynthetic C fixation increases with decreasing light intensities due to the lower saturation irradiance for calcification than for photosynthesis in *E. huxleyi*. However, due to a more rapid decline of calcification relative to photosynthesis below saturation levels, this ratio decreases again under strong light-limiting conditions (below approximately 30 µmol photons m^{-2} s^{-1}). Several culture studies us-

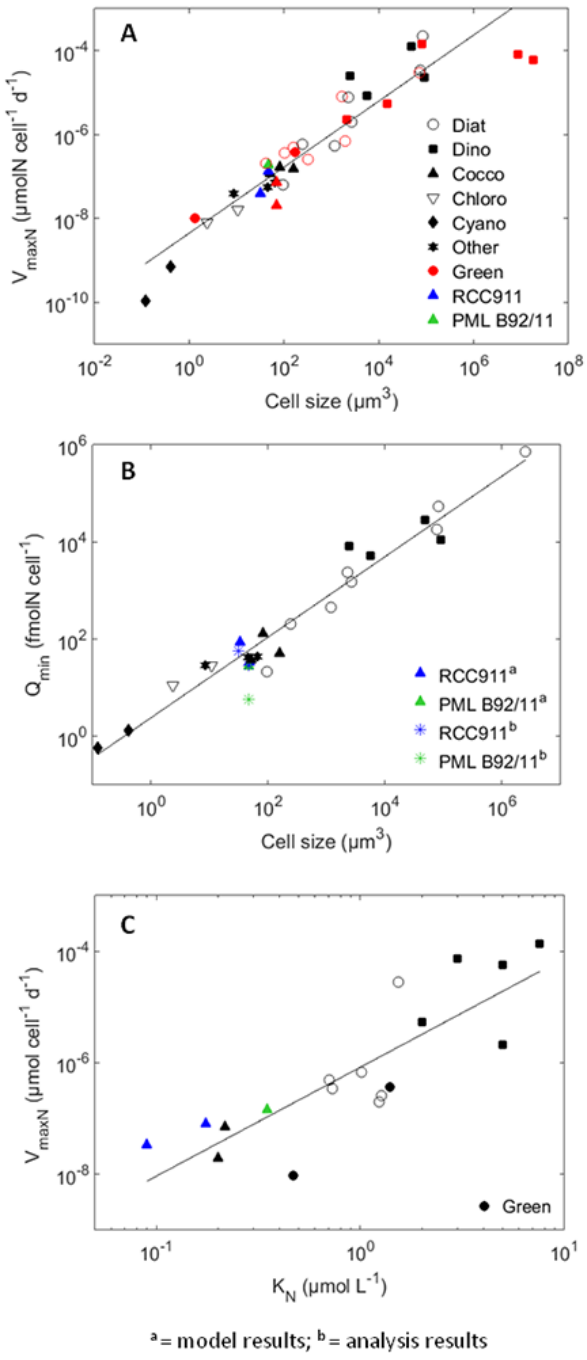


Figure 7. (a) Maximum normalised surface uptake rate V_{maxN} for nitrate vs. the cell volume. Data from Marañón et al. (2013) in black, data from Litchman et al. (2007) in red and the Droop model output for the experiments presented in this work in blue and green depending on the strain. **(b)** Minimum cellular quota Q_{min} for nitrate vs. the cell volume. Data of Marañón et al. (2013) and the results from the model and analysis of the present study. **(c)** V_{maxN} vs. the half-saturation constant for nitrate uptake K_N. Data of Litchman et al. (2007) and results from the Droop model in nitrate-limited conditions.

ing different *E. huxleyi* strains have reported this trend. Using the same L:D cycle (12:12) as employed in our experiments, Feng et al. (2008) also reported a decreasing PIC : POC ratio between 400 and 50 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Comparable observations have been reported in studies that used a 16:8 L:D cycle, with decreasing light from 300 down to a minimum of 30 µmol photons m^{-2} s^{-1} (Trimborn et al., 2007; Rokitta and Rost, 2012). Again with a 16:8 L:D cycle, Rost et al. (2002) reported a decrease of the PIC : POC ratio between 80 and 150 µmol photons m^{-2} s^{-1} (for a pCO_2 level comparable to that in our experiments), but an increase of the ratio to 80 µmol photons m^{-2} s^{-1} with an increase of the irradiance from 15 to 30 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Our results indicate that calcification was more severely limited than photosynthesis at 30 µmol photons m^{-2} s^{-1} in strain RCC911.

The non-significant correlation between DSL and coccosphere size (Fig. 4c) is not consistent with the correlation reported by Gibbs et al. (2013) between coccolith and coccosphere size in fossil sediment samples, but the number of observations in our study was too low to draw a robust conclusion about the relationship. The significant correlation between cell and coccosphere volume (Fig. 4b) and observations of other studies (e.g. Aloisi, 2015; Gibbs et al., 2013) support the conclusion that coccosphere size in the water column and in sediments could be used as a proxy for cell size (and thus POC quota).

In summary, apart from the phosphate-limited low-light experiment, nutrient limitation led to a cessation of cell division (entry into stationary phase) at the end of the experiment. Nutrient limitation decreased the particulate organic P or N quota for the limiting nutrient (POP for P limitation and PON for N limitation) and increased the PIC : POC ratio under both light conditions. Discerning the effect of nutrient limitation on morphological properties was complicated by the relatively large margins of error, but the overall trend was of an increase in cell/coccosphere size under P limitation and no obvious effect under N limitation. Light limitation decreased the PIC quota, the cell size and the PIC : POC ratio in every nutrient condition, whereas POC : PON and POC : POP decreased with light limitation. Further investigations need to be carried out to improve the understanding of the effect of light intensity on the PIC : POC ratio.

4.2 *E. huxleyi* physiological parameters obtained by modelling growth in a batch reactor

In contrast to the Monod model, the Droop model was able to accurately reproduce the experimental data obtained in experiments with *E. huxleyi* strain RCC911 as well as the experiments of Langer et al. (2013). The Droop model was notably able to reproduce the increase in cell number after the limiting nutrient had been exhausted. This indicates that, as for several other phytoplankton groups (Lomas and Glibert, 2000), *E. huxleyi* has the ability to store nutrients internally to continue growth to some extent when external nutrient lev-

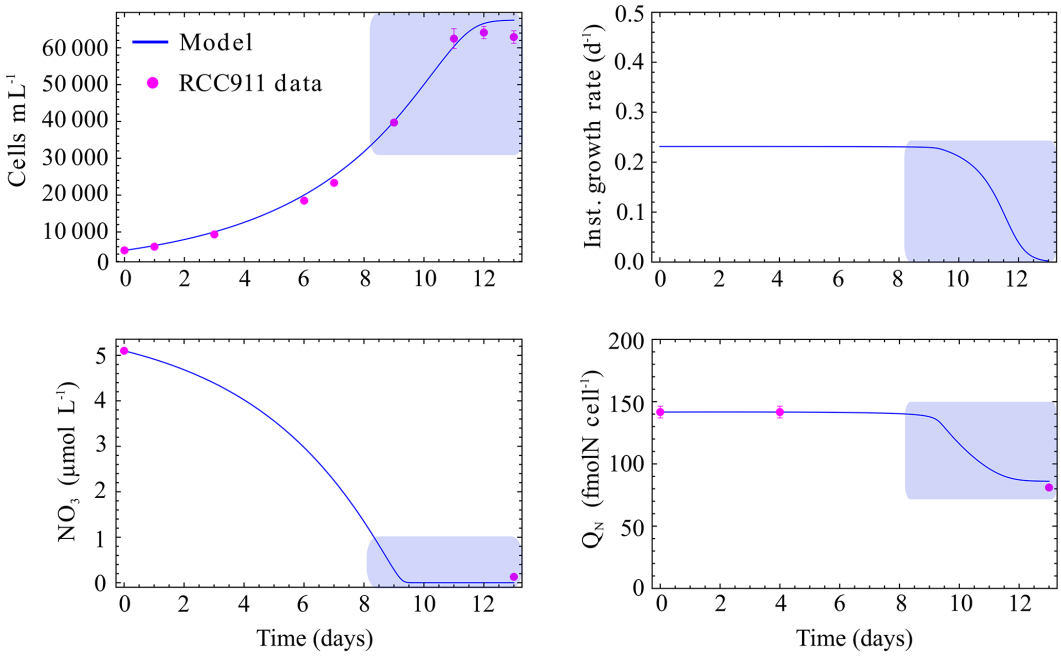


Figure 8. Model fitted to the data of the nitrate-limited cultures on RCC911 strain in low light. The shaded area corresponds to the equivalent nitrate concentration in the BIOSOPE ecological niche of coccolithophores at the GYR station (between 150 and 200 m depth).

els become very low. In our experiments and those of Langer et al. (2013), cells grew on their internal nutrient reserves and managed two to three cell divisions in the absence of external nutrients. These observations are consistent with the explanation of both Monod and Droop models by Bernard (2011).

Numerous studies have estimated the maximum nutrient uptake rate V_{maxR} and the half-saturation constant for nutrient uptake K_R, especially for nitrate uptake, for a variety of phytoplankton species. The values obtained in our study for K_{N} for high-light *E. huxleyi* cultures (Table 3) are comparable to those reported in the literature. Using *E. huxleyi* in chemostat experiments, Riegman et al. (2000) found K_{N} values between 0.18 and 0.24 µM and K_{P} between 0.10 and 0.47 µM. In addition, they reported a V_{maxN} of $7.4.10^{-6}$ µmol cell^{-1} d^{-1}, which is similar to that found for RCC911 and PML B92/11 (Table 3).

When comparing physiological parameters between phytoplankton taxa, the scaling of physiological parameters with cell size has to be taken into account (Marañón et al., 2013). Marañón et al. (2013) plotted Q_{min} and μ_{max} against cell size (see Fig. 7b for Q_{min} vs. cell size) for different phytoplankton species. In these plots coccolithophores fall with the smallest diatoms. Figure 7a reports V_{maxN} vs. cell size for different groups of phytoplankton based on the results of Litchman et al. (2007) (using a compiled database) and of Marañón et al. (2013) (22 cultivated species) and the results obtained with the Droop model in this study. Despite the different procedures used to obtain V_{maxN} (simulated with a model or measured experimentally), all values for coccolithophores fall in the same range. Collos et al. (2005) and Litchman et al. (2007) found a linear correlation between the maximum uptake rate and the half-saturation constant for nitrate uptake across several phytoplankton groups (Fig. 7c). This correlation defines a physiological relation between the capacity to assimilate nutrients efficiently (high V_{maxR}) and the capacity to assimilate nutrients in low-nutrient environments (low K_R), and thus thrive in oligotrophic conditions. This analysis shows that large phytoplankton like diatoms and dinoflagellates have high maximum nitrate uptake rates and high half-saturation constants for nitrate uptake. The half-saturation constant for nitrate uptake for *E. huxleyi* is consistently low compared to other groups of phytoplankton, which means that it will be competitive in low-nitrate waters (Litchman et al., 2007).

4.3 Controls on *E. huxleyi* growth in the deep BIOSOPE niche

The BIOSOPE cruise was carried out in 2004 along a transect across the South Pacific Gyre from the Marquesas Islands to the Peru–Chili upwelling zone. The aim of this expedition was to study the biological, biogeochemical and bio-optical properties (Claustre et al., 2008) of the most oligotrophic zone of the world ocean (Claustre and Maritorena, 2003). The deep ecological niche of coccolithophores along this transect occurred at the deep chlorophyll maximum (DCM; Beaufort et al., 2008). According to Claustre et al. (2008) and Raimbault et al. (2008), the nitrate concentration at the GYR station at the DCM (between 150 and 200 m depth) was be-

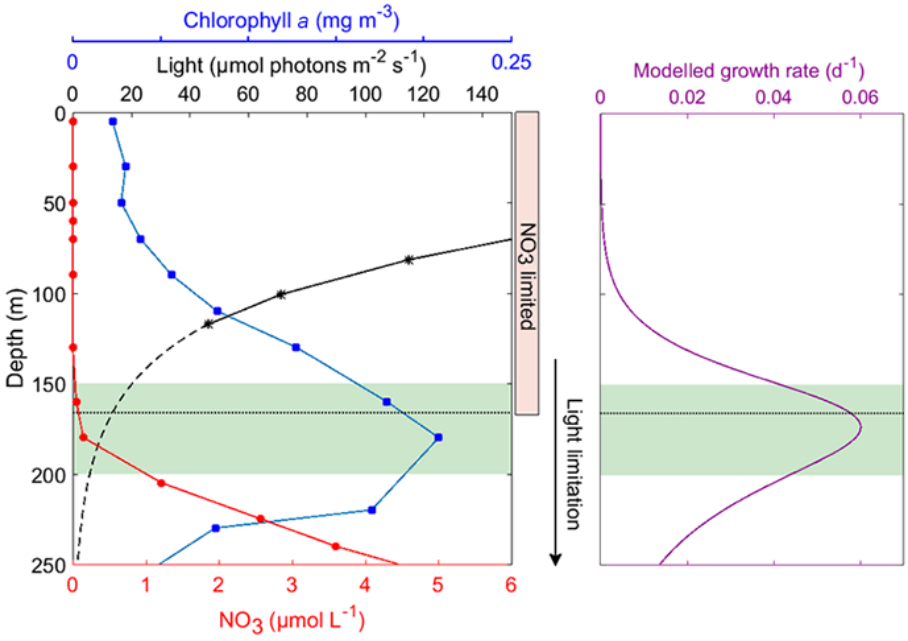


Figure 9. Left panel: In situ data (0 to 250 m) at the GYR station of the BIOSOPE transect (114.01° W, 26.06° S). Profiles of in situ measured chlorophyll *a*, PAR irradiance and nitrate concentration are shown. The dashed line represents an extrapolation of the irradiance between 117 m (last point measured) and 250 m considering a constant attenuation coefficient K_d ($K_d = 0.025\ m^{-1}$ from Claustre et al., 2008) and a simple light calculation taken from MacIntyre et al. (2002). The dotted black line is the depth at which the K_N (0.09 µM) is observed. This depth also corresponds to the lower limit of nitrate limitation. Light limitation starts above the DCM and intensifies with depth. The green shaded area corresponds to the location of the maximum of coccosphere abundance taken from Beaufort et al. (2008) between 120° and 107° W. The right panel shows the growth rate of *E. huxleyi* with depth at the GYR station (calculated using Appendix Eq. A8).

tween 0.01 and 1 µM. In our nitrate-limited low-light culture experiment (Fig. 8), this concentration occurred between the end of the exponential growth phase and the beginning of the stationary phase (days 8 to 9), when nitrate limitation began to affect instantaneous growth rates. Claustre et al. (2008) reported a nitrate concentration < 3 nM (i.e. below the detection limit) in the 0–100 m water column, whereas phosphate concentration was always above 0.1 µM in surface layers (Raimbault and Garcia, 2008). Moutin et al. (2008) concluded that phosphate was apparently not the limiting nutrient for phytoplankton along the BIOSOPE transect. A potential influence of organic nitrogen sources, which *E. huxleyi* is capable of using (Benner and Passow, 2010), cannot be excluded, but these would be expected to have been distributed vertically in a similar way to nitrate.

The picture that emerges from Fig. 9 is consistent with the model of Klausmeier and Litchman (2001), who predicted that growth in a DCM should be limited by both light and one nutrient, with the upper layer of the DCM being limited by nutrient supply and the deeper layer by light. The experiments and modelling work presented here allow us to confirm that growth of *E. huxleyi* in the deep niche at the GYR station of the BIOSOPE transect was clearly limited by light in the lower part of the DCM, and by nitrogen in the upper part of the DCM and upper water column. Nitrification and the vertical diffusivity of nitrate through the nitracline (Holligan et al., 1984) needs to be taken into account and could potentially be a source of dissolved nitrate in the deep niche of coccolithophores. The depth-distribution of the modelled *E. huxleyi* growth rate, and of dissolved nitrogen, light intensity, chlorophyll *a* concentration and coccolithophore abundance supports the inferred light–nitrate co-limitation (Fig. 9). We used the physiological parameters constrained in our experiments together with a steady state assumption for uptake and assimilation of nitrate (see appendix) to obtain the vertical profile of *E. huxleyi* growth rate at the GYR station (Fig. 9). This calculation, forced by the irradiance and nitrate data from the GYR station, shows that *E. huxleyi* growth rate was maximal at a depth corresponding to that of the measured maximum chlorophyll *a* concentration. The half-saturation constant for nitrate uptake K_N constrained with the Droop model (0.09 µM) lies within the deep niche (Fig. 9). The maximum estimated growth rate at the GYR station (0.06 d^{-1} at 173 m depth) corresponds to an *E. huxleyi* generation time of 11.5 days, suggesting that division rate at the DCM was extremely slow (0.086 division per day), all the more so since this estimate does not consider grazing and vertical export of cells. Reports of the in situ growth rate of phytoplankton are not common, including for *E. huxleyi*, due to the inherent difficulties in measuring

this parameter (Laws, 2013). Goldman et al. (1979) reported phytoplankton doubling times in the North Pacific around 0.36–0.89 per day which corresponds to a growth rate of approximately $0.25\,d^{-1}$. Selph et al. (2011) estimated growth rates in the equatorial Pacific between 110 and 140° W to be below $0.3\,d^{-1}$ for the phytoplankton community living at 1 % of surface irradiance with net growth rates (considering mortality rates) around zero.

With the above limitation pattern in mind, it is possible to predict the effect of nitrate and light variability on the vertical evolution of the *E. huxleyi* PIC : POC ratio in gyre conditions. According to our experimental results, the PIC : POC ratio increases slightly with nitrate limitation but the strongest effect on PIC : POC ratio seems to be in response to light intensity. As noted above (Sect. 4.1), several studies have shown that the PIC : POC ratio increases with decreasing irradiance down to an average of $55 \pm 25\,\mu mol\ photons\,m^{-2}\ s^{-1}$, but that it decreases with light limitation below this value. At the BIOSOPE GYR station, the PIC : POC ratio of *E. huxleyi* would be expected to be intermediate in surface waters (nitrate-poor but high light intensity) and then to increase and attain a maximum value in lower subsurface waters down to the upper part of the deep niche (between 80 and $30\,\mu mol\ photons\,m^{-2}\,s^{-1}$; therefore between 110 m and 150 m depth). The PIC : POC ratio would then decrease in the lower part of the deep niche, and finally decrease drastically in deeper, relatively nitrate-rich but extremely low-irradiance waters. This prediction cannot be verified with the available published data from the BIOSOPE transect and PIC : POC ratio of coccolithophores are not only controlled by light and nitrate conditions, but a comparable pattern for the upper part of the ocean was observed through in situ measurements by Fernández et al. (1993). Our predictions need to be verified via in situ studies of DCM zones dominated by coccolithophores. Klaas and Archer (2002) reported that coccolithophores are responsible for the main part of calcium carbonate export to the deep sea and that the rain of organic carbon is mostly associated with calcium carbonate particles, because of their higher density than opal particles and higher abundance than terrigenous material. The gyre ecosystem is a good example of the fact that effects on the rain ratio, and therefore on the carbon pump and carbonate counter-pump, need to be integrated over the whole photic zone. A low PIC quota due to the majority of production occurring at low irradiance in the deep niche would limit the *E. huxleyi*-related calcium carbonate rain to the sediments, and potentially also limit the ballasting of organic carbon to the deep ocean.

5 Conclusions

We present one of the few laboratory culture experiments investigating the growth and PIC : POC ratio of the coccolithophore *E. huxleyi* in light- and nutrient-limited conditions, mimicking those of the deep ecological niche of coccolithophores in the South Pacific Gyre (Beaufort et al., 2008; Claustre et al., 2008). By combining batch culture experiments with a simple numerical model based on the internal stores (Droop) concept, we show that (1) *E. huxleyi* has the capacity to divide up to several times in the absence of external nutrients by using internal nutrient stores; (2) a simple batch culture experimental set-up combined with a Droop model, as opposed to the more time-consuming and expensive continuous culture approach, can be used to estimate fundamental physiological parameters that describe the response of phytoplankton growth to nutrient availability and (3) the position of the deep coccolithophore niche of the South Pacific Gyre coincides with the depth of maximum potential growth rate calculated by our physiological model for *E. huxleyi*; at shallower depths growth is strongly limited by dissolved nitrate availability, while at greater depths it is strongly limited by the paucity of light. These observations confirm the theoretical prediction of Klausmeier and Litchman (2001) with regard to the environmental controls of growth in the DCM. Our conclusions were based on experiments using *E. huxleyi* strain RCC911 that was isolated from surface waters of the BIOSOPE transect and it will be important to repeat this approach using deep-dwelling strains. There is potential for our approach to shed light on the functioning of other oligotrophic, low-light phytoplankton ecosystems live in cold, dark, nutrient-poor Arctic and Antarctic waters.

6 Data availability

Data from the BIOSOPE transect of attenuation coefficient, nitrate concentration and chlorophyll *a* were taken from the BIOSOPE database available on the website: http://www.obs-vlfr.fr/proof/php/x_datalist.php?xxop=biosope&xxcamp=biosope; and access have been provide by C. Schmechtig.

Appendix A

To obtain the growth rate through the vertical profile at the station GYR, we needed to express the cellular quota Q_N as a function of the nitrate concentration NO_3 $[N]$. To achieve this, we resolved the system of three equations from the Droop theory:

$$\frac{dQ_N}{dt} = N_{UP} - \mu \times Q_N \quad \text{(A1)}$$

$$N_{UP} = S_{Cell} \times V_{maxN} \times \frac{[N]}{[N] + K_N} \quad \text{(A2)}$$

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{(1 + K\,Q_N) \times \left(Q - Q_N^{min}\right)}{\left(Q - Q_N^{min}\right) + K\,Q_N \times \left(Q_N^{max} - Q_N^{min}\right)}. \quad \text{(A3)}$$

Considering a stationary state (uptake-assimilation steady state) and thus assuming the differential Eq. (A1) equal to zero, we resolved the system to express the cellular quota Q_N vs. the nitrate concentration (see Fig. A1):

$$A = \frac{1}{2 \times (1 + K\,Q_N) \times \mu_{max} \times (K_N + [N])} \times \left(K_N \times (1 + K\,Q_N) \times \mu_{max} \times Q_N^{min}\right) \quad \text{(A4)}$$

$$B = \left((1 + K\,Q_N) \times \mu_{max} \times [N] \times Q_N^{min}\right) + ([N] \times S_{cell} \times V_{maxN}). \quad \text{(A5)}$$

$$C = \sqrt{\begin{array}{l} 4\,(1 + K\,Q_N) \times \mu_{max} \times [N] \\ \times (K_N + [N]) \times \left(K\,Q_N \times Q_N^{max} - (1 + K\,Q_N) \times Q_N^{min}\right) \times S_{cell} \times V_{maxN} \\ + \left((1 + K\,Q_N) \times \mu_{max} \times (K_N + [N]) \times Q_N^{min} + [N] \times S_{cell} \times V_{maxN}\right)^2 \end{array}} \quad \text{(A6)}$$

$$Q_N = A \times (B + C) \quad \text{(A7)}$$

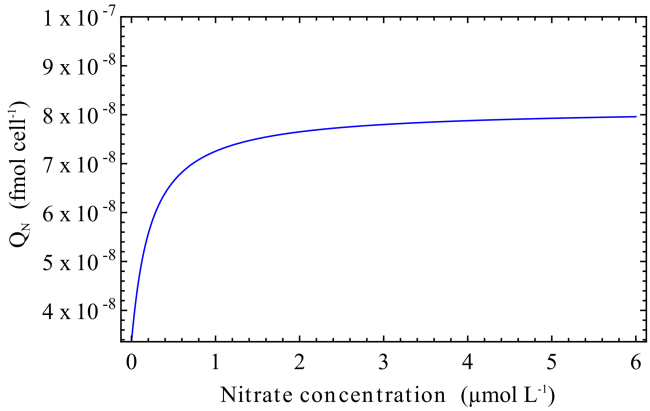


Figure A1. Cellular quota of nitrogen vs. the nitrate concentration using parameters of the best-fit results of the model ran for the low-light and nitrate-limited experiment with RCC911.

Thus, the growth rate can be expressed depending on the irradiance (and K_{Irr}; see Sect. 2.2.1) and the cellular quota Q_N. Physiological parameters are known (output of the model for the experiment in high-light and low-nitrate conditions):

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{(1 + K\,Q_N) \times \left(Q - Q_N^{min}\right)}{\left(Q - Q_N^{min}\right) + K\,Q_N \times \left(Q_N^{max} - Q_N^{min}\right)} \times \left(1 - e^{\left(\frac{-Irr}{K_{Irr}}\right)}\right). \quad \text{(A8)}$$

The vertical profile of the growth rate of coccolithophores at the GYR station, calculated with this equation, is shown in Fig. 9.

The Supplement related to this article is available online at doi:10.5194/bg-13-5983-2016-supplement.

Acknowledgements. This project was supported by the TELLUS CLIMAHUX project (INSU-CNRS), the MODIF project of the Institut Pierre Simon Laplace (IPSL), and the CALHIS project (French ANR). We thank C. Schmechtig for providing access to the BIOSOPE database, F. Le Cornec and I. Djouraev for helping with PIC analysis at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) ALYSE platform and C. Labry and A. Youenou for carrying out the POP analysis at IFREMER Centre de Brest. From the Roscoff Biological Station we are grateful to C. Leroux for analysis of POC and PON samples and the Marine Chemistry research team, specifically T. Cariou for dissolved nutrient analyses and acid treatment of POC and PON samples, M. Vernet for help processing DIC samples, and Y. Bozec for DIC analysis. We also thank A. Charantonis for his advice for the modelling methodology and two anonymous reviewers for their useful comments. The lead author was supported by a doctoral fellowship from the French Minister of Education and Research (MESR).

Edited by: E. Boss
Reviewed by: two anonymous referees

References

Aloisi, G.: Covariation of metabolic rates and cell size in coccolithophores, Biogeosciences, 12, 6215–6284, doi:10.5194/bg-12-4665-2015, 2015.

Beaufort, L., Couapel, M., Buchet, N., Claustre, H., and Goyet, C.: Calcite production by coccolithophores in the south east Pacific Ocean, Biogeosciences, 5, 1101–1117, doi:10.5194/bg-5-1101-2008, 2008.

Benner, I. and Passow, U.: Utilization of organic nutrients by coccolithophores, Mar. Ecol. Prog. Ser., 404, 21–29, 2010.

Bernard, O.: Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO_2 mitigation and biofuel production, J. Proc. Control, 21, 1378–1389, 2011.

Berry, L., Taylor, A. R., Lucken, U., Ryan, K. P., and Brownlee, C.: Calcification and inorganic carbon acquisition in coccolithophores, Funct. Plant Biol., 29, 289–299, 2002.

Boyd, P. W., Strzepek, R., Fu, F., and Hutchins, D. A.: Environmental control of open-ocean phytoplankton groups: Now and in the future, Limnol. Oceanogr., 55, 1353–1376, 2010.

Buitenhuis, E. T., Pangere, T., Franklin, D. J., Le Quéré, C., and Malin, G.: Growth rates of six coccolithophorid strains as a function of temperature, Limnol. Oceanogr., 53, 1181–1185, 2008.

Claustre, H. and Maritorena, S.: The Many Shades of Ocean Blue, 302, 1514–1515, 2003.

Claustre, H., Sciandra, A., and Vaulot, D.: Introduction to the special section bio-optical and biogeochemical conditions in the South East Pacific in late 2004: the BIOSOPE program, Biogeosciences, 5, 679–691, doi:10.5194/bg-5-679-2008, 2008.

Cortés, M. Y., Bollmann, J., and Thierstein, H. R.: Coccolithophore ecology at the HOT station ALOHA, Hawaii, Deep-Sea Res. Pt II, 48, 1957–1981, doi:10.1016/S0967-0645(00)00165-X, 2001.

Daniels, C. J., Sheward, R. M., and Poulton, A. J.: Biogeochemical implications of comparative growth rates of *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus* species, Biogeosciences, 11, 6915–6925, doi:10.5194/bg-11-6915-2014, 2014.

Droop, M. R.: Vitamin B12 and Marine Ecology, IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition, in: *Monochrysis Lutheri*, J. Mar. Biol. Assoc. UK, 48, 689–733, 1968.

Engel, A., Cisternas Novoa, C., Wurst, M., Endres, S., Tang, T., Schartau, M., and Lee, C.: No detectable effect of CO_2 on elemental stoichiometry of *Emiliania huxleyi* in nutrient-limited, acclimated continuous cultures, Mar. Ecol. Prog. Ser., 507, 15–30, 2014.

Eppley, R. W. and Renger, E. H.: Nitrogen Assimilation of an Oceanic Diatom in Nitrogen-Limited Continuous Culture, J. Phycol., 10, 15–23, 1974.

Eppley, R. W., Rogers, J. N., and McCarthy, J. J.: Half-Saturation Constants for Uptake of Nitrate and Ammonium by Marine Phytoplankton, Limnol. Oceanogr., 14, 912–920, 1969.

Fagerbakke, K. M., Heldal, M., Norland, S., Heimdal, B. R., and Båtvik, H.: *Emiliania huxleyi*. Chemical composition and size of coccoliths from enclosure experiments and a Norwegian fjord, Sarsia, 79, 349–355, 1994.

Feng, Y., Warner, M. E., Zhang, Y., Sun, J., Fu, F.-X., Rose, J. M., and Hutchins, D. A.: Interactive effects of increased pCO_2, temperature and irradiance on the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), Eur. J. Phycol., 43, 87–98, 2008.

Fernández, E., Boyd, P., Holligan, P. M., and Harbour: Production of organic and inorganic carbon within a large-scale coccolithophore bloom in the northeast Atlantic Ocean, Mar. Ecol. Prog. Ser., 97, 271–285, 1993.

Flynn, K.: The importance of the form of the quota curve and control of non-limiting nutrient transport in phytoplankton models, J. Plankton Res., 30, 423–438, 2008.

Follows, M. J. and Dutkiewicz, S.: Modeling Diverse Communities of Marine Microbes, Annu. Rev. Mar. Sci., 3, 427–451, 2011.

Fritz, J. J.: Carbon fixation and coccolith detachment in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* in nitrate-limited cyclostats, Mar. Biol., 133, 509–518, doi:10.1007/s002270050491, 1999.

Gibbs, S. J., Poulton, A. J., Brown, P. R., Daniels, C. J., Hopkins, J., Young, J. R., Jones, H. L., Thiemann, G. J., O'Dea, S. A., and Newsam, C.: Species-specific growth response of coccolithophores to Palaeocene–Eocene environmental change, Nat. Geosci., 6, 218–222, 2013.

Goldman, J. C., McCarthy, J. J., and Peavey, D. G.: Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters, Nature, 279, 210–215, 1979.

Gregg, W. W. and Casey, N. W.: Modeling coccolithophores in the global oceans, Deep-Sea Res. Pt. II, 54, 447–477, 2007.

Haidar, A. T. and Thierstein, H. R.: Coccolithophore dynamics off Bermuda (N. Atlantic), Deep-Sea Res. Pt. II, 48, 1925–1956, 2001.

Henderiks, J., Winter, A., Elbrchter, M., Feistel, R., Plas, A. van der, Nausch, G., and Barlow, R.: Environmental controls on *Emiliania huxleyi* morphotypes in the Benguela coastal upwelling system (SE Atlantic), Mar. Ecol. Prog. Ser., 448, 51–66, 2012.

Holligan, P. M., Balch, W. M., and Yentsch, C. M.: The significance of subsurface chlorophyll, nitrite and ammonium maxima in relation to nitrogen for phytoplankton growth in stratified waters of the Gulf of Maine, J. Mar. Res., 42, 1051–1073, 1984.

Holligan, P. M., Fernández, E., Aiken, J., Balch, W. M., Boyd, P., Burkill, P. H., Finch, M., Groom, S. B., Malin, G., Muller, K., Purdie, D. A., Robinson, C., Trees, C. C., Turner, S. M., and van der Wal, P.: A biogeochemical study of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi*, in the North Atlantic, Global Biogeochem. Cy., 7, 879–900, 1993.

Iglesias-Rodriguez, M. D., Halloran, P. R., Rickaby, R. E. M., Hall, I. R., Colmenero-Hidalgo, E., Gittins, J. R., Green, D. R. H., Tyrrell, T., Gibbs, S. J., von Dassow, P., Rehm, E., Armbrust, E. V., and Boessenkool, K. P.: Phytoplankton calcification in a high-CO_2 world, Science, 320, 336–340, 2008.

Jordan, R. W. and Winter, A.: Assemblages of coccolithophorids and other living microplankton off the coast of Puerto Rico during January–May 1995, Mar. Micropaleontol., 39, 113–130, 2000.

Kaffes, A.: Carbon and nitrogen fluxes in the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* grown under different nitrate concentrations, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 393, 1–8, 2010.

Keller, M., Selvin, R., Claus, W., and Guillard, R.: Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton, J. Phycol., 23, 633–638, 1987.

Klaas, C. and Archer, D. E.: Association of sinking organic matter with various types of mineral ballast in the deep sea: Implications for the rain ratio, Global Biogeochem. Cy., 16, 1116, doi:10.1029/2001GB001765, 2002.

Klausmeier, C. A. and Litchman, E.: Algal games: The vertical distribution of phytoplankton in poorly mixed water columns, Limnol. Oceanogr., 46, 1998–2007, 2001.

Krug, S. A., Schulz, K. G., and Riebesell, U.: Effects of changes in carbonate chemistry speciation on *Coccolithus braarudii*: a discussion of coccolithophorid sensitivities, Biogeosciences, 8, 771–777, doi:10.5194/bg-8-771-2011, 2011.

Labry, C., Youenou, A., Delmas, D., and Michelon, P.: Addressing the measurement of particulate organic and inorganic phosphorus in estuarine and coastal waters, Cont. Shelf Res., 60, 28–37, 2013.

Langer, G., Geisen, M., Baumann, K.-H., Kläs, J., Riebesell, U., Thoms, S., and Young, J. R.: Species-specific responses of calcifying algae to changing seawater carbonate chemistry, Geochem. Geophys. Geosys., 7, 155–161, 2006.

Langer, G., Gussone, N., Nehrke, G., Riebesell, U., Eisenhauer, A., and Thoms, S.: Calcium isotope fractionation during coccolith formation in *Emiliania huxleyi*: Independence of growth and calcification rate, Geochem. Geophys. Geosys., 8, Q05007, doi:10.1029/2006GC001422, 2007.

Langer, G., Oetjen, K., and Brenneis, T.: Calcification of *Calcidiscus leptoporus* under nitrogen and phosphorus limitation, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 413, 131–137, 2012.

Langer, G., Oetjen, K., and Brenneis, T.: Coccolithophores do not increase particulate carbon production under nutrient limitation: A case study using *Emiliania huxleyi* (PML B92/11), J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 443, 155–161, 2013.

LaRoche, J., Rost, B., and Engel, A.: Bioassays, batch culture and chemostat experimentation, edited by: Riebesell, U., Fabry, V. J., Hansson, L., and Gattuso, J.-P., Guide to Best Practices for Ocean Acidification Research and Data Reporting, Publications Office of the European Union, 2010.

Laws, E. A.: Evaluation of In Situ Phytoplankton Growth Rates: A Synthesis of Data from Varied Approaches, Annu. Rev. Mar. Sci., 5, 247–268, 2013.

Leonardos, N. and Geider, R. J.: Elevated atmospheric carbon dioxide increases organic carbon fixation by Emiliania huhleyi (Haptophyta), under nutrient-limited high-light conditions, J. Phycol., 41, 1196–1203, 2005.

Litchman, E., Klausmeier, C. A., Schofield, O. M., and Falkowski, P. G.: The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level, Ecol. Lett., 10, 1170–1181, 2007.

Loisel, H., Nicolas, J.-M., Sciandra, A., Stramski, D., and Poteau, A.: Spectral dependency of optical backscattering by marine particles from satellite remote sensing of the global ocean, J. Geophys. Res., 111, C09024, doi:10.1029/2005JC003367, 2006.

Lomas, M. W. and Glibert, P. M.: Comparisons of Nitrate Uptake, Storage, and Reduction in Marine Diatoms and Flagellates, J. Phycol., 36, 903–913, 2000.

MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T., and Geider, R. J.: Photoacclimation of Photosynthesis Irradiance Response Curves and Photosynthetic Pigments in Microalgae and Cyanobacteria1, J. Phycol., 38, 17–38, 2002.

Marañón, E., Cermeño, P., López-Sandoval, D. C., Rodríguez-Ramos, T., Sobrino, C., Huete-Ortega, M., Blanco, J. M., and Rodríguez, J.: Unimodal size scaling of phytoplankton growth and the size dependence of nutrient uptake and use, Ecol. Lett., 16, 371–379, 2013.

Monod, J.: The Growth of Bacterial Cultures, Ann. Rev. Microbiol., 3, 371–394, 1949.

Morel, A., Gentili, B., Claustre, H., Babin, M., Bricaud, A., Ras, J., and Tièche, F.: Optical properties of the "clearest" natural waters, Limnol. Oceanogr., 52, 217–229, 2007.

Moutin, T., Karl, D. M., Duhamel, S., Rimmelin, P., Raimbault, P., Van Mooy, B. A. S., and Claustre, H.: Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean, Biogeosciences, 5, 95–109, doi:10.5194/bg-5-95-2008, 2008.

Müller, M. N., Antia, A. N., and LaRoche, J.: Influence of cell cycle phase on calcification in the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 53, 506–512, 2008.

Müller, M. N., Beaufort, L., Bernard, O., Pedrotti, M. L., Talec, A., and Sciandra, A.: Influence of CO_2 and nitrogen limitation on the coccolith volume of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta), Biogeosciences, 9, 4155–4167, doi:10.5194/bg-9-4155-2012, 2012.

Okada, H. and McIntyre, A.: Seasonal distribution of modern coccolithophores in the western North Atlantic Ocean, Mar. Biol., 54, 319–328, 1979.

Oviedo, A. M., Langer, G., and Ziveri, P.: Effect of phosphorus limitation on coccolith morphology and element ratios in Mediterranean strains of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 459, 105–113, 2014.

Paasche, E.: Reduced coccolith calcite production under light-limited growth: a comparative study of three clones of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), Phycologia, 38, 508–516, 1999.

Paasche, E.: A review of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions, Phycologia, 40, 503–529, 2002.

Raimbault, P. and Garcia, N.: Evidence for efficient regenerated production and dinitrogen fixation in nitrogen-deficient waters of the South Pacific Ocean: impact on new and export production estimates, Biogeosciences, 5, 323–338, doi:10.5194/bg-5-323-2008, 2008.

Raimbault, P., Garcia, N., and Cerutti, F.: Distribution of inorganic and organic nutrients in the South Pacific Ocean-evidence for long-term accumulation of organic matter in nitrogen-depleted waters, Biogeosciences, 5, 281–298, doi:10.5194/bg-5-281-2008, 2008.

Raven, J. A. and Crawfurd, K.: Environmental controls on coccolithophore calcification, Mar. Ecol. Prog. Ser., 470, 137–166, 2012.

Redfield, A. C.: The influence of organisms on the composition of sea-water, The Sea, 26–77, 1963.

Riegman, R., Stolte, W., Noordeloos, A. A. M., and Slezak, D.: Nutrient uptake and alkaline phosphatase (ec 3 : 1 : 3 : 1) activity of *Emiliania huxleyi* (PRYMNESIOPHYCEAE) during growth under N and P limitation in continuous cultures, J. Phycol., 36, 87–96, 2000.

Rokitta, S. D. and Rost, B.: Effects of CO_2 and their modulation by light in the life-cycle stages of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 57, 607–618, 2012.

Rost, B., Zondervan, I., and Riebesell, U.: Light-dependent carbon isotope fractionation in the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*, 2002.

Roth, P. H.: Distribution of coccoliths in oceanic sediments, in Coccolithophores, Cambridge, 199–218, 1994.

Rouco, M., Branson, O., Lebrato, M., and Iglesias-Rodríguez, M. D.: The effect of nitrate and phosphate availability on *Emiliania huxleyi* (NZEH) physiology under different CO_2 scenarios, Front. Aquat. Microbiol., 4, 155, doi:10.3389/fmicb.2013.00155, 2013.

Sciandra, A., Harlay, J., Lefèvre, D., Leme, R., Rimmelin, P., Denis, M., and Gattuso, J.: Response of coccolithophorid *Emiliania huxleyi* to elevated partial pressure of CO_2 under nitrogen limitation, Mar. Ecol. Prog. Ser., 261, 111–122, 2003.

Selph, K. E., Landry, M. R., Taylor, A. G., Yang, E.-J., Measures, C. I., Yang, J., Stukel, M. R., Christensen, S., and Bidigare, R. R.: Spatially-resolved taxon-specific phytoplankton production and grazing dynamics in relation to iron distributions in the Equatorial Pacific between 110 and 140° W, Deep-Sea Res. Pt. II, 58, 358–377, 2011.

Shutler, J. D., Land, P. E., Brown, C. W., Findlay, H. S., Donlon, C. J., Medland, M., Snooke, R., and Blackford, J. C.: Coccolithophore surface distributions in the North Atlantic and their modulation of the air-sea flux of CO_2 from 10 years of satellite Earth observation data, Biogeosciences, 10, 2699–2709, doi:10.5194/bg-10-2699-2013, 2013.

Terry, K. L.: Nitrate and phosphate uptake interactions in a marine Prymnesiophyte, J. Phycol., 18, 79–86, 1982.

Trimborn, S., Langer, G., and Rost, B.: Effect of varying calcium concentrations and light intensities on calcification and photosynthesis in *Emiliania huxleyi*, Limnol. Oceanogr., 52, 2285–2293, 2007.

van Bleijswijk, J. D. L., Kempers, R. S., Veldhuis, M. J., and Westbroek, P.: Cell and growth characteristics of types A and B of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) as determined by flow cytometry and chemical Analyses, J. Phycol., 30, 230–241, 1994.

Westbroek, P., Brown, C. W., Bleijswijk, J. van, Brownlee, C., Brummer, G. J., Conte, M., Egge, J., Fernández, E., Jordan, R., Knappertsbusch, M., Stefels, J., Veldhuis, M., van der Wal, P., and Young, J.: A model system approach to biological climate forcing. The example of *Emiliania huxleyi*, Glob. Planet. Change, 8, 27–46, 1993.

Winter, A., Henderiks, J., Beaufort, L., Rickaby, R. E. M., and Brown, C. W.: Poleward expansion of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, J. Plankton Res., 36, 316–325, 2014.

Young, J. R., Poulton, A. J., and Tyrrell, T.: Morphology of *Emiliania huxleyi* coccoliths on the northwestern European shelf – is there an influence of carbonate chemistry?, Biogeosciences, 11, 4771–4782, doi:10.5194/bg-11-4771-2014, 2014.

Zondervan, I.: The effects of light, macronutrients, trace metals and CO_2 on the production of calcium carbonate and organic carbon in coccolithophores – A review, Deep-Sea Res. Pt. II, 54, 521–537, 2007.

RESUME

Les coccolithophoridés sont des microalgues unicellulaires calcifiantes qui jouent un rôle important dans le cycle du carbone océanique via leurs processus cellulaires de photosynthèse (puits de CO_2) et de calcification (source de CO_2). L'espèce la plus abondante dans l'océan moderne est l'espèce cosmopolite *Emiliania huxleyi*, qui est caractérisée par une forte tolérance à de larges gammes de température, d'irradiance et de concentrations en nutriments. La distribution d'*E. huxleyi* qui s'étend des régions subarctiques aux régions subéquatoriales et des eaux eutrophes aux eaux oligotrophes en fait l'espèce de coccolithophoridés la plus étudiée jusqu'à présent. Cependant, sa réponse physiologique à des conditions environnementales clés comme la co-limitation en lumière et en nutriments reste peu étudiée, que ce soit *in situ*, où ces conditions sont rencontrées dans les niches profondes de coccolithophoridés des gyres oligotrophes, ou en laboratoire. J'ai ainsi réalisé des expériences de culture et une approche de modélisation numérique afin d'étudier la réponse physiologique d'*E. huxleyi* en conditions de limitation en nutriments et en lumière, avec pour objectif d'améliorer notre compréhension du contrôle environnemental des niches profondes de coccolithophoridés.

La première partie de cette thèse a été dédiée à des expériences de culture en batch réalisées à la Station Biologique de Roscoff afin de tester la co-limitation en lumière et en nutriments (nitrate et phosphate) avec une souche d'*E. huxleyi* isolée dans le gyre Pacifique-Sud (transect BIOSOPE). Ces expériences ont permis l'étude de la morphologie et des taux métaboliques d'*E. huxleyi* dans ces conditions de co-limitation, qui n'ont quasiment jamais été testées avant ce travail. Cette étude en laboratoire a montré que les effets de co-limitation en lumière et nutriments sont différents des effets des limitations séparées. Un modèle physiologique simple basé sur la théorie de Droop a été appliqué aux expériences de culture afin d'obtenir les valeurs de paramètres physiologiques pour *E. huxleyi* comme la constante de demi-saturation pour l'assimilation en nutriment et le taux d'assimilation maximum. Ces paramètres physiologiques sont plus communément obtenus à partir d'expériences en chemostat plus coûteuses et plus longues. Mon approche fournit une procédure simple et rapide pour estimer ces paramètres fondamentaux dont les valeurs obtenues sont en accord avec celles disponibles dans la littérature pour les coccolithophoridés et mettent en évidence leur forte affinité pour les nutriments et leur fort taux de croissance maximal par rapport à d'autres groupes phytoplanctoniques. Cette capacité à croître dans des environnements si différents est confirmée par l'existence de niches profondes telle que celle du gyre Pacifique-Sud observée pendant la campagne BIOSOPE. Cette niche, caractérisée par une forte communauté d'Isochrysidales comme *E. huxleyi*, *Gephyrocapsa* sp. et *Reticulofenestra* sp., a été étudiée dans la troisième partie de cette thèse. Combinant les paramètres physiologiques et les données biogéochimiques in situ, une approche analytique a été utilisée pour estimer le taux de croissance et le taux de calcification d'*E. huxleyi* le long du transect BIOSOPE, montrant que les principaux facteurs environnementaux contrôlant ces deux taux métaboliques sont la disponibilité en nitrate et en lumière.

Mots clés : Coccolithophoridés ; *Emiliania huxleyi* ; Co-limitation ; Nutriments et lumière ; Physiologie ; Modèle de Droop ; Paramètres physiologiques ; Gyre Pacifique-Sud ; BIOSOPE.