Influence de la biodisponibilité des nutriments sur la fixation de N2 et réponse de Crocosphaera watsonii face à la limitation en fer

Violaine Jacq

▶ **To cite this version:**

Violaine Jacq. Influence de la biodisponibilité des nutriments sur la fixation de N2 et réponse de Crocosphaera watsonii face à la limitation en fer. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066365 . tel-01127359

HAL Id: tel-01127359
https://theses.hal.science/tel-01127359

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

Université Pierre et Marie Curie

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

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

Influence de la biodisponibilité des nutriments sur la fixation de N_2 et réponse de *Crocosphaera watsonii* face à la limitation en fer

Par **Violaine Jacq**

Thèse de doctorat de Biogéochimie Marine

Dirigée par Céline Ridame et Alain Saliot

Présentée et soutenue publiquement le 30 Juin 2014

Devant un jury composé de :

M. Stéphane Blain	Professeur	LOMIC-UPMC	Président de jury
Mme Eva Bucciarelli	Maître de conférence	LEMAR-IUEM	Rapporteur
Mme Julie LaRoche	Professeur	Université Dalhousie	Rapporteur
M. Fauzi Mantoura	Professeur émérite	UPMC	Examinateur
M. Alain Saliot	Professeur émérite	LOCEAN-UPMC	Directeur de thèse
Mme Céline Ridame	Maître de conférence	LOCEAN-UPMC	Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Influence de la biodisponibilité des nutriments sur la fixation de N_2 et réponse de *Crocosphaera watsonii* face à la limitation en fer

Violaine Jacq

Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire d'Océanographie et du Climat : Expérimentations et Approches Numériques, Institut Pierre Simon Laplace (UPMC, LOCEAN, IPSL), Paris

Résumé

La fixation de N_2, ou diazotrophie, est un processus biogéochimique majeur en raison de son apport en azote nouveau dans la couche de surface de l'océan. Cependant ses facteurs de contrôle restent mal connus. Le fer, dont les concentrations de surface sont faibles, est un élément potentiellement limitant de la fixation de N_2 du fait du contenu en fer important de l'enzyme responsable de ce processus : la nitrogénase. En raison de leur découverte récente, peu d'études ont été menées sur les cyanobactéries diazotrophes unicellulaires (UCYN) pouvant être responsables de ~50% de la fixation de N_2 à l'échelle globale. Des expériences en culture ont permis de caractériser et quantifier pour la première fois la réponse d'une UCYN, *Crocosphaera watsonii*, face à la limitation en fer. Lors de la diminution des concentrations en fer dans le milieu, il a été observé une réduction de la croissance et des taux de fixation de N_2 de cet organisme ainsi qu'une stratégie d'adaptation des cellules avec une diminution de leur biovolume. De plus, la stimulation de la croissance et de l'activité de *C. watsonii* cultivées en condition de limitation en fer suite à l'ajout d'une pluie saharienne artificielle a permis de mettre en évidence qu'une partie au moins du fer issu de poussières désertiques est biodisponible. En Atlantique subtropical Nord, où nous avons déterminé une forte contribution de la fixation de N_2 à la production nouvelle, nous avons observé une limitation de la fixation de N_2 et de la production primaire principalement par les phosphates et mis en évidence le rôle des métaux traces dans le contrôle de la fixation de N_2. Un ajout de pluie saharienne a permis de stimuler systématiquement la fixation de N_2 et la production primaire. L'ensemble de ces résultats participe donc à la réflexion globale sur la fixation de N_2 en milieu océanique et apporte des informations sur les mécanismes responsables des interactions entre les cycles biogéochimiques du fer, de l'azote et du carbone.

Mots clés : Fixation de N_2, limitation en fer, *Crocosphaera watsonii*, poussières désertiques, Atlantique subtropical Nord, métaux traces.

Impact of nutrients bioavailability on N_2 fixation and response of *Crocosphaera watsonii* to iron limitation

Violaine Jacq

Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire d'Océanographie et du Climat : Expérimentations et Approches Numériques, Institut Pierre Simon Laplace (UPMC, LOCEAN, IPSL), Paris, France

Abstract

Despite the biogeochemical importance of N_2 fixation, which represents the largest source of newly-fixed nitrogen to the open ocean, some uncertainties remain about its controlling factors. Iron (Fe) is widely suspected as a key controlling factor due to the high Fe content of the nitrogenase complex involved in the biological N_2 fixation and to its low concentration in oceanic surface seawaters. N_2 fixation rates associated with unicellular N_2 fixing cyanobacteria (UCYN) were estimated to be ~50% of the total N_2 fixation at global scale, but as they have been recently discovered few studies have been conducted on these organisms. We performed culture experiments in order to quantify for the first time the response of an UCYN, *Crocosphaera watsonii*, to Fe limitation. Reduction of ambient Fe concentration led to significant decreases in growth rate and N_2 fixation rates per cell and we observed an adaptive strategy to Fe limitation with a cell volume reduction. Then, the enhancement of growth and activity of *C. watsonii* under Fe limitation condition after artificial Saharan rain addition highlighted that at least a part of the Fe released by the dust is bioavailable. In subtropical North Atlantic, an important contribution of N_2 fixation to new production was observed and we showed that primary production and N_2 fixation were globally P-limited. We revealed that trace metals play a key role in controlling N_2 fixation in this area. Saharan rain addition stimulated N_2 fixation, presumably by supplying these nutrients. All these results contribute to our knowledge of the control of oceanic N_2 fixation and provide new insight about interactions between Fe, nitrogen and carbon biogeochemical cycles.

Keywords: N_2 fixation, iron limitation, *Crocosphaera watsonii*, Saharan dust, subtropical North Atlantic, trace metals

Remerciements

Ces pages de remerciements sont probablement les premières que vous lisez et néanmoins les dernières que j'aurais écrites dans ce manuscrit. Leur rédaction met donc un terme à 4 années de travail au LOCEAN. Je souhaite y faire figurer toutes les personnes ayant contribué à cette thèse, de près ou de loin, du début à la fin, à terre ou en mer, professionnellement et personnellement.

Dans un premier temps, je remercie mes directeurs de thèse :
Céline Ridame et Alain Saliot.

Céline, tout d'abord pour avoir écrit le sujet de cette thèse, qui a été mon unique choix pour me lancer dans la réalisation d'un tel travail. Ensuite, pour m'avoir accordé rapidement ta confiance lors des manipulations en conditions ultra-propres en laboratoire, ce qui m'a permis d'acquérir rapidement une autonomie de travail avec les cultures ; pour ta grande disponibilité lors de mes divers questionnements scientifiques, que ce soit pour le travail en laboratoire, la compréhension du sujet de recherche que tu m'as fait découvrir et as partagé avec moi, la transmission de tes compétences d'enseignante mais aussi pour ton implication dans mon accompagnement lors de la rédaction scientifique, aussi bien en anglais qu'en français, via tes relectures attentives.
Et enfin, un grand merci à toi pour m'avoir permis d'embarquer en mer durant un mois, vivre la grande expérience d'une campagne océanographique.

Alain, je te remercie pour avoir contribué à l'existence de cette thèse grâce à ton co-encadrement. Tu as pu, au cours de ces 4 années, partager avec moi ton expérience de scientifique averti dans le domaine de la biogéochimie marine, mais également tes grandes connaissances du fonctionnement global de la recherche scientifique et de l'enseignement universitaire. Je te remercie également pour tes conseils et ton soutient lors de cette période si difficile mais si importante de la rédaction du manuscrit.

Parmi toutes les personnes avec qui j'ai pu partager le travail au labo et à la fac :

Je souhaite remercier en premier lieu Fanny Kaczmar, technicienne à mi-temps au labo «cultures». Ton arrivée au début de ma deuxième année de thèse m'a permis de sortir plus régulièrement du labo pour pouvoir me consacrer à la rédaction de mon premier article scientifique. Grâce à ta rapide adaptation, ton soutient technique m'a été très précieux lors de la réalisation de tous mes travaux expérimentaux. Merci donc pour la préparation des litres et des litres de milieux culture et le « chelexage » d'une bonne partie de ces milieux ou encore les innombrables comptages de Croco en « Malassez ». Je te souhaite une bonne continuation avec tout cela (et bon courage avec le capricieux « chelex » !).

Je remercie ensuite Damien Cardinal pour le partage de tes connaissances dans l'enseignement. Je te remercie plus particulièrement pour avoir partagé avec moi l'encadrement des ateliers de recherche encadrés des licences 1 lors de mon année en tant qu'ATER grâce auxquels tu m'as fait découvrir la très intéressante approche pédagogique de l'apprentissage par problème.

Au labo, je remercie également Giovanni Aloisi pour m'avoir accordé sa confiance sur son projet de modélisation des diazotrophes en me permettant d'y prendre part. Malgré notre courte collaboration, tu m'auras fait découvrir un domaine spécifique de la recherche océanographique totalement nouveau pour moi en lien avec mon sujet de thèse.

Toujours à Jussieu, un remerciement spécial pour Virginie Racapé avec qui nous avons partagé notre espace de vie diurne (et parfois nocturne!) durant 3 années, pour toutes nos discussions sur des sujets divers et variés, mais aussi pour les conseils précieux (comme aligner dans « power

pont » ou la découverte d'ODV) et les pauses déjeuner partagées, surtout lors de nos tristes repas à base de sandwichs lors de l'absence de nos cuisiniers attitrés.

Mais également des remerciements pour les autres thésards avec qui l'on a pu partager notre expérience de doctorant : Ivia Closset d'abord, pour les discussions et le soutient dans les moments difficiles, les petites pauses pour causer de tout et de rien et se changer les idées et pour l'aide de la rédaction d'un paragraphe! Marion Benetti à bord et Renaud Gomez encore au labo. Après avoir partagé mon bureau pendant ma période d'asociabilité totale lors de la rédaction, un petit clin d'œil pour nos discussions et notre partage d'opinion et pour les « fellowship c'est naaaze! ». Maintenant que tu occupes mon bureau, profite bien de la magnifique vue de Paris que j'ai pu observer pendant ces 4 ans. Enfin, plus récemment un dernier clin d'œil à Mangalaa qui a pu nous faire découvrir la culture Indienne et pour ses cadeaux lors de son retour!

Je remercie également les stagiaires que j'ai encadrés: Benjamin Ledoux, le tout premier stagiaire que j'ai co-encadré et dont les résultats ont servi de base à un article maintenant publié ; Manon Tonnard à qui j'ai pu faire découvrir Crocosphaera et le fer : ton encadrement m'a permis d'enrichir mon expérience pédagogique et les résultats que tu as fournis ont pu contribuer à ceux présentés dans le premier chapitre et l'article. Merci à Camille Bernard, stagiaire avec qui j'ai pu travailler sur les délicates mesures de concentration en fer dans l'eau de mer, pour l'aide expérimentale sur le LWCC qu'elle m'a apporté. Et enfin Lisa Casu qui a pris la suite de mes études expérimentales lors de son récent stage.
Puis un petit clin d'œil pour eux et les autres stagiaires pasés labo (Margaux, Marianne, Violaine n°2) pour la bonne humeur. Et aujourd'hui on peut même noter que les « Violaines » thésardes se relaient au LOCEAN !

Enfin pour le LOCEAN, un grand merci à l'équipe informatique (Julien Vincent, Paul Zakharov, Pierre Brochard puis Frederic Bongat) toujours présents pour donner le coup de main ou le conseil indispensable, à l'équipe administrative, que ce soit les personnes avec qui j'ai plus souvent travaillé (Nathalie Teinturier-Ortelieb, Christianne Willem, Sandrine Beauvilain) ou plus occasionnellement (Virginie Larue et Céline LeHelley) pour votre grande efficacité et votre éclairage dans la complexité des démarches. Et sans oublier Dany Thomas, pour ton aide précieuse dans toutes les démarches administratives, la communication avec les différents services de la fac et tout ça avec une immense gentillesse.
Je remercie également Laurence Eymard, directrice du LOCEAN à mon arrivée, et Anne-Marie Lezine, directrice actuelle pour l'acceuil au sein de votre laboratoire durant ces 4 années.

Hors de Jussieu, je remercie également les autres personnes avec qui j'ai pu travailler pour leur sympathie et leur aide précieuse : Karine Desboeufs, merci pour tes conseils d'atmosphéricienne et pour les analyses, Stéphane L'Helguen pour toutes tes mesures, tes conseils et tes relectures constantes, notamment de l'article, Hervé Rybarczyk pour ton enseignement de qualité mais également ta grande disponibilité lors de mes demandes de conseils pour une utilisation optimale des statistiques et enfin Geraldine Sarthou qui a accepté de participer à cette thèse en tant que membre de mon comité de thèse et qui m'aura appris à utiliser ces fameuses bouteilles Go-Flo.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont contribué à mon expérience dans le domaine scientifique avant le début de cette thèse : Bernard Queginer pour m'avoir fait découvrir, lors des mes 2 années de Master d'océanographie à Luminy (Marseille), le domaine de la biogéochimie marine et m'avoir permis d'acquérir, grâce à tes enseignements complets, les bases nécessaires à ce travail de thèse ; mon directeur de stage de Master 2, Christos Panagiotopoulos, pour m'avoir permis de faire ma première expérience de labo et m'avoir récemment associé à la publication des tes résultats, issus en partie de mes travaux de stage ; puis Julien Dekaezemacker, membre de la Croco-team comme il dit, pour sa bonne humeur à Marseille puis pour nos échanges de mails de soutient mutuel lors de mes débuts parisiens.

Je souhaite également remercier ceux qui ont contribué à cette thèse, en mer : Gilles Reverdin d'abord en qualité de chef de la mission STRASSE pour m'avoir donné une place à bord puis pour son implication et son intérêt dans mes travaux malgré les différences de nos sujets de recherche ; l'équipe scientifique et l'équipage de la Thalassa au complet pour la bonne humeur à bord: on s'est bien marré quand même! Parmi l'équipage un merci particulier à Régis Joffre et Claude Le coupannec pour leur aide (avec implication!) lors de la mise à l'eau des Go-Flo et les manipulations ultra-propres concernant le métaux sur le pont d'un bateau, pas facile à priori, mais menées avec une grande efficacité, et Régis pour mon diplôme le plus important à ce jour : le certificat de baignade en pleine mer avec 5300 m de fond !

Hors de la recherche scientifique, je souhaite remercier Yann Goosens pour le stage « Enseigner avec aisance grâce au théâtre » de l'association En act que tu nous a dispensé qui m'a permis de découvrir le théâtre et m'a apporté d'importants outils pour enseigner et communiquer grâce au très juste parallèle entre l'enseignement et le théâtre puis pour la dynamique que tu as créée et qui a permis de monter nos petites troupes par la suite : merci à tous pour les moments mémorables et l'expérience que j'en ai retirée lors de la préparation et des représentations de nos 2 pièces.

Viennent enfin tous ceux que je souhaite remercier sur le plan personnel :
Antoine, pour sa présence à mes côtés, son soutien, notre avancée ensemble dans nos diverses réflexions, tous les bons moments partagés et bien sûr sans oublier tous les plats cuisinés!
Mes parents, d'abord pour le classique « sans qui je ne serais pas là et n'aurais pas pu vivre ces moments et réaliser cette thèse » (Merci Maman Papa pour l'inspiration…) et plus sérieusement pour leur soutient ainsi que leur patiente et minutieuse relecture,
Amélie ma soeureTTTe: malgré l'éloignement géographique et mon manque de temps on s'est soutenues durant ces 4 ans au cours desquels on a toutes les deux parcouru beaucoup de chemin.
Pour leur écoute, leur soutien et tous les bons moments partagés, je remercie Juliette (psycho-statisticienne géolocalisatrice et accesoirement relectrice), JB (à la fois tueur de plantes, de rideaux, de balais et de torchon), Laeti (vive la campagne!), Mathilde (pour nos envolées théâtrales dans ton T5 de 100 m2 avec vue sur la tour Eiffel) et Martine (créatrice d'Antoine et de séjours réussis en Méditerranée).
Pour les bons souvenirs de vacances, ces précieux moments à penser à autre chose et à profiter : Joël (créateur d'Antoine et de concepts informatiques), Edouard (dompteur de vagues et de côtes de boeuf), Béné (fabricante de fausses bananes et synthétiseuse de produit vaisselle), sans oublier Zacha et Lili (les diablotins).
Et plus récemment, pour la préparation des mets succulents du 30 Juin Alessandra (patissière sociologue), JB, Laeti et Juliette
Tonton Bernard, pour ton écoute et tes conseils issus de ton expérience d'enseignant-chercheur.
Olivier, pour les repas comiques et politiques partagés à la maison et surtout pour m'avoir permis « de ne pas oublier d'arroser mes algues »!

Et je voudrais conclure ces pages pour mon Frère, Mael, et sa famille que je n'ai pas pu voir souvent ces dernières années : Ludivine et mes p'tites nièces Ilina puis Inès et Elisa, arrivées depuis le début de la thèse.

Ce manuscrit est dédié à mes deux grands-mères : Gisèle Alison et ses 84 années et Marie-Jeanne Jacq et ses 95 années.

Table des matières

Liste des figures : 15
Liste des tableaux : 20

Introduction générale : contexte scientifique et état de l'art
I. Production océanique : photosynthèse et phytoplancton 25
II. L'azote dans l'océan : zones oligotrophes 26
III. La fixation de N_2 océanique 27
IV. Les acteurs de la fixation de N_2 océanique 30
IV.1. Les cyanobactéries diazotrophes filamenteuses 30
IV. 2. Les cyanobactéries diazotrophes unicellulaires 31
IV.3. Différentes stratégies de séparation de la fixation de N_2 et de la photosynthèse au sein des cyanobactéries diazotrophes marines 33
IV.4. Distribution spatiale des cyanobactéries diazotrophes marines 35
IV.5. Importance biogéochimique des UCYN 36
V. Les facteurs de contrôle de la fixation de N_2 océanique 37
V.1. La température et l'intensité lumineuse 37
V.2. Le phosphore 38
V.3. Le fer 39
VI. Objectifs de la thèse 41

Méthodologie des expériences en culture au laboratoire
I. Manipulations en conditions « ultra-propres » au laboratoire 47
II. Choix de l'espèce étudiée 48
III. Préparation du milieu de culture sans fer-EDTA 49
IV. Cultures de *Crocosphaera watsonii* WH8501 50
V. Les paramètres mesurés dans les cultures 52
V.1. Abondance cellulaire 52
V.2. Concentration de chlorophylle *a* 53
V.3. Taux de fixation de CO_2 et de N_2 et contenus cellulaires en carbone et azote 53
V.4. Dosage des phosphates dans les cultures 56

<u>CHAPITRE 1.</u> Réponse physiologique de *C. watsonii* à la limitation en fer : expériences en culture
I. Introduction et objectifs 61
II. Protocole expérimental pour la détermination de l'influence de la disponibilité en fer chez C. watsonii 63
II.1. Préparation du milieu de culture 63
II.2. Détermination de Fe' 64
II.3. Mesure du volume cellulaire 66
II.4. Non-axénie des cultures 67
II.5. Autres paramètres mesurés 67

II.6. Comparaison de deux méthodes de détermination de l'abondance cellulaire : Malassez et cytométrie en flux....68
II.7. Expériences complémentaires....69
II.8. Traitement statistique....70
III. Caractérisation de l'influence de la disponibilité en fer sur l'abondance et la physiologie de *C. watsonii* 71
III.1. Impact de la limitation en fer sur l'abondance de *C. watsonii* 71
III.2. Impact de la biodisponibilité du fer sur le taux de croissance de *C. watsonii* 74
III.3. Impact de la limitation en fer sur le volume cellulaire de *C. watsonii*....75
III.4. Impact de la limitation en fer sur les contenus cellulaires et rapports élémentaires de *C. watsonii* 77
III.4.1. Contenus cellulaires en C, N et Chla 77
III.4.2.. Rapports élémentaires....78
III.5. Impact de la limitation en fer sur les taux cellulaires de fixation de N_2 et de CO_2 de *C. watsonii* 78
III.6. Impact de la limitation en fer sur les contenus cellulaires et les taux de fixation normalisés par le volume cellulaire....79
III.6.1. Contenus cellulaires par unité de volume....79
III.6.2. Taux de fixation par unité de volume....80
IV. *C. watsonii* : caractéristiques physiologiques en condition de non-limitation et réponses en fonction du degré de limitation en fer 81
IV.1. Caractéristiques physiologiques de *C. watsonii* WH8501 en condition non-limitante....81
IV.2. Réponse physiologique de *C. watsonii* en fonction du degré de limitation en fer 83
IV.2.1. Vers une limitation modérée en fer (de 403.3 à 43.3 nM de Fe)....84
IV.2.2. Vers une limitation sévère en fer (de 43.3 à 3.3 nM de Fe)....87
V. Etude comparative des caractéristiques physiologiques des cyanobactéries diazotrophes en condition de non-limitation et de leurs réponses face à la limitation en fer.... 92
V.1. *C. watsonii* vs UCYN-C et UCYN-A....92
V.1.1.Comparaison en condition de non-limitation en fer....92
V.1.2. Comparaison de la réponse à la limitation en fer 95
V.2. *C. watsonii* vs *T. erythraeum* 96
V.2.1. Comparaison en condition de non-limitation en fer....96
V.2.2. Comparaison de la réponse à la limitation en fer 97
VI. Conclusions et influence du fer sur la biogéographie des cyanobactéries diazotrophes en milieu naturel.... 103

<u>CHAPITRE 2</u>. Impact d'une pluie saharienne sur la croissance et l'activité de *C. watsonii* cultivée en condition de limitation en fer
I. Importance biogéochimique des apports atmosphériques de fer à l'océan ouvert ... 109
II. Synthèse de la pluie désertique: simulation d'un dépôt humide de poussières sahariennes 113
II.1. Le choix des poussières et de la charge particulaire de la pluie simulée 113

II.2. Caractérisation chimique et minéralogique des poussières 114
II.3. Le choix du ligand organique du fer 115
II.4. Préparation de la pluie saharienne 116
II.5. Les mesures dans la pluie artificielle 118
III. Mise en place des cultures pour l'étude de la réponse de *C. watsonii* à l'apport d'une pluie artificielle 119
III.1. Protocole de préparation du milieu de culture et purification sur résine chelex® 119
III.2. L'utilisation de l'oxalate comme agent complexant du fer dans le milieu de culture 120
III.3. Les expériences préliminaires en présence de fer et oxalate 122
III.4 Enrichissement des cultures de *C. watsonii* par la pluie artificielle : protocole expérimental. 125
III.5. Paramètres et processus mesurés dans les cultures 126
III.6. Tests statistiques 128
III.7 Expérience d'ajout d'une pluie simulée sans poussières 128
III.8. Les ajouts de fer en fin de croissance 129
IV. Composition de la pluie saharienne simulée 131
V.1. Abondance et croissance 133
V.2. Facteur responsable de l'arrêt de la croissance 135
V.3. Volume cellulaire 136
V.4. Contenus en C, N et Chl*a* 137
V.5. Taux de fixation de N_2 et de CO_2 138
VI. Du fer biodisponible libéré par les poussières sahariennes ? *C. watsonii* comme bio-indicateur 139
VII. La réponse physiologique de C. watsonii à l'apport d'une pluie saharienne simulée. 141
VIII. Comparaison de la réponse de différents organismes phytoplanctoniques à un apport saharien : études en laboratoire et en milieu naturel 144
VIII.1. Phytoplancton non-diazotrophe : les diatomées 144
VIII.2. Les diazotrophes 144
VIII.2.1.Trichodesmium spp. : expériences en laboratoire 144
VIII.2.2. Expériences en milieu naturel 146
IX. Stimulation des UCYN-B à un apport saharien et conséquences biogéochimiques 147
IX.1. Interaction avec la communauté phytoplanctonique et microbienne 147
IX.2. Impact des changements futurs sur la réponse à un apport saharien 148

<u>CHAPITRE 3.</u> Distribution spatiale et facteurs de contrôle de la fixation de N_2 et de la production primaire dans l'Atlantique subtropical Nord : expériences en microcosmes
I. Contexte scientifique : l'océan Atlantique subtropical Nord, une zone oligotrophe soumise aux apports sahariens 153
II. La campagne STRASSE : objectifs et méthodologie 157
II.1. Objectifs du projet et localisation des zones d'intérêt 157

II.2. Localisation des stations pour la mesure des paramètres biogéochimiques (fixation de N_2 et production primaire) et les expériences en microcosmes 159
II.3. Distribution de surface de la production primaire et de la fixation de N_2 160
II.4. Expériences en microcosmes avec ajouts d'éléments nutritifs et poussières sahariennes.....162
II.5. Autres paramètres d'intérêt.....166
II.6. Traitement statistique 167
III. Caractéristiques hydrologiques et biogéochimiques 168
IV. Distribution de surface de la production primaire et de la fixation de N_2 - implications biogéochimiques..... 171
IV.1. Distribution spatiale de la fixation de N_2 et de la production primaire 171
IV.2. Fixation de N_2 nocturne et diurne 175
IV.3. Contribution de la fixation de N_2 à la production primaire.....179
IV.5. Contribution de la fixation de N_2 à la production nouvelle.....180
V. Elément limitant la production primaire et la fixation de N_2..... 182
V.1. Transect aller et retour.....182
V.1.1. Transect aller : des Canaries au centre du NASTG 182
V.1.2. Transect retour : du centre du NASTG aux Açores.....184
V.2. Des réponses contrastées au cœur du NASTG 185
V.2.1. Zones 1 et 4 185
V.2.2. Zones 2 et 3 188
VI. Impact des apports atmosphériques désertiques sur la production primaire et la fixation de N_2..... 189
VI.1. Composition des pluies simulées et apports résultants en macro et micronutriments dans les microcosmes.....189
VI.1.1. Composition chimique des pluies simulées 189
VI.1.2. 'pluie Niger' non évapo-condensée vs 'pluie Tunisie' évapo-condensée 190
VI.1.3. Apports dans les microcosmes.....190
VI.2. Impact d'un dépôt sec sur la production primaire et la fixation de N_2 191
VI.3. Impact d'un dépôt humide sur la production primaire et la fixation de N_2 191
VI.4. Les métaux trace comme facteurs de contrôle de la production primaire et de la fixation de N_2 193
VII. Conclusion..... 195

Conclusions et perspectives
Synthèse des principaux résultats..... 199
Perspectives 202

Références bibliographiques..... 207
Annexes..... 233
Annexe 1. Publication des résultats presentés dans le chapitre1.....242
Annexe 2. Récapitulatif des paramètres mesurés (chapitre 1).....254
Annexe 3. *curriculum vitae* 246

Liste des figures :

Figure 1. Représentation schématique des pompes de carbone biologique et physique dans l'océan (modifié d'après Chisholm 2000)…….. **p. 25**

Figure 2. Moyenne annuelle des concentrations de surface (A) en NO_3^- (en µM)(World Ocean Atlas 2009, Garcia et al. 2010) et (B) en chlorophylle (en $mg.m^{-3}$) (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)…….. **p. 27**

Figure 3. Représentation schématique de la pompe biologique incluant le rôle des cyanobactéries diazotrophes. Modifiée, d'après (Chisholm 2000)…….. **p. 28**

Figure 4. Moyennes géométriques des taux de fixation de N_2 intégrés sur la profondeur (en $\mu molN.m^{-2}.j^{-1}$ selon une échelle logarithmique). (Luo et al. 2012) …… **p. 29**

Figure 5. (A) Colonies de *Trichodesmium* sous forme de « tufts » (à gauche) et de « puffs » (à droite). Photo : MIT/WHOI Joint Program student Abby Heithoff. (B) Photographie de trichomes isolés de *Trichodesmium* sp. observés au microscope électronique à balayage (Roe et al. 2012)…… **p. 31**

Figure 6. Photographie prise au microscope d'une UCYN-A hybridée avec une sonde fluorescente (Le Moal et al. 2011), de *Crocosphaera watsonii* souche WH8501 (UCYN-B, Webb et al., 2009) et de TW3 (UCYN-C, Taniuchi et al., 2012)…… **p. 32**

Figure 7. Photographie (A) de la diatomée *Rhizosolenia* sp. et de son symbiote diazotrophe *R. intracellularis* et (B) de la diatomée *Hémiaulus* sp.et de son symbiote diazotrophe *Richelia intracellularis* apparaissant en fluorescence en orange…….. **p. 33**

Figure 8. Représentation schématique des différents types de morphologie et de stratégie d'adaptation des cyanobactéries diazotrophes marines (filamenteux hétérocystés, filamenteux non hétérocystés et UCYN). D'après Berman-Frank et al. 2007 ……**p. 34**

Figure 9. Trichomes de *T. erythraeum* avec fluorescence de la protéine codée par le gène *nifH* due à un anticorps anti-nifH couplé à un composé fluorescent bleu, permettant de mettre en évidence les diazocytes…… **p. 35**

Figure 10. Observations de la distribution des trois « types » majeurs de cyanobactéries diazotrophes dans l'océan ouvert: (A) symbiotes diazotrophes/diatomées, (B) *Trichodesmium* spp. et (C) UCYN. (Zehr 2011)…….. **p. 36**

Figure 11. Moyennes annuelles des concentrations de surface (0-100m) en fer dissous (dFe, en nM) issues du modèle NEMO-PISCES (Toulza et al. 2012)……**p. 40**

Figure 12. Hotte à flux laminaire classe 100 utilisée pour les expériences de laboratoire …… **p. 47**

Figure 13. Photographie de *C. watsonii* WH8501 observée au microscope électronique à balayage (Zehr et al. 2001)…… **p. 49**

Figure 14. Courbe de croissance d'une culture unicellulaire en milieu aqueux fermé. ……**p. 51**

Figure 15. (A) Taux de croissance (en h^{-1}) de *C. watsonii* WH8501 en fonction de la température (d'après Webb et al. 2009). (B) Taux de croissance (en j^{-1}) *C. watsonii* WH8501 en fonction de l'intensité lumineuse d'après Goebel et al. (2008) …… **p. 52**

Figure 16. (A) Microscope à épifluorescence Nikon Eclipse 50i utilisé pour les comptages cellulaires. (B) Photographie de *C. watsonii* WH8501 observées au microscope à épifluorescence (grossissement x40) ……..**p. 53**

Figure 17. Rendement photosynthétique et fixation de N_2 *C. watsonii* WH8501 en conditions optimales de croissance au cours d'un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité. Les zones verte et bleue correspondent respectivement aux périodes d'incubation pour les mesures des taux de fixation de CO_2 et de N_2 réalisées dans cette étude (d'après Mohr et al. 2010a)…. **p. 54**

Figure 18. $^{15}N_2$ dissous mesuré dans du YBCII après injection de $^{15}N_2$ gazeux ou d'eau de mer enrichie en $^{15}N_2$ (d'après Mohr et al. 2010b). La zone bleue correspond à la durée d'incubation de nos échantillons pour la mesure des taux de fixation de N_2 ……**p. 56**

Figure 1.1. Schéma conceptuel du fonctionnement du complexe enzymatique nitrogénase (d'après Howard et Rees 1996; 2006; Seefeldt et al. 2009)…… **p. 61**

Figure 1.2. Spéciation du Fe(III) dans l'eau de mer (S=35) en fonction du pH. (Millero et al. 1995) …… **p. 64**

Figure 1.3. Abondances de *C. watsonii* obtenues par comptage sur cellule de Malassez et par cytométrie en flux…… **p. 68**

Figure 1.4. Schéma du protocole des expériences complémentaires d'ajouts de Fe + EDTA ou de phosphates dans des cultures de *C. watsonii* en phase stationnaire……**p. 69**

Figure 1.5. (A) Evolution de l'abondance de *C. watsonii* pour 8 concentrations en Fe en fonction du temps (B) Agrandissement pour les cultures aux plus faibles concentrations de fer. …..**p. 71**

Figure 1.6. (A) Concentrations moyennes en phosphates dans les cultures en phase stationnaire..... **p. 72**

Figure 1.7. Abondance de *C. watsonii* en présence de différentes concentrations en Fe et réponse après ajout de Fe ou de phosphates. ……**p. 73**

Figure 1.8. Taux de croissance moyen de *C. watsonii* en fonction des concentrations en Fe et Fe' et régression non-linéaire de Monod (calculée à partir de Fe) …… **p. 74**

Figure 1.9. Photographies de cellules de *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance provenant d'une culture contenant (A) 403.3 nM de Fe et (B) 3.3 nM de Fe, observées au microscope électronique à balayage. …… **p.76**

Figure 1.10. (A) Biovolume et (B) rapport surface/volume de *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance en fonction des concentrations en Fe et Fe'……**p. 77**

Figure 1.11. Contenus cellulaires en carbone (A) et azote (B) et contenus cellulaires en Chl*a* (C), de *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance durant la période lumineuse en fonction des concentrations en Fe et Fe'. …… **p. 78**

Figure 1.12. (A) Rapport molaire C/N et (B) rapport Chl*a*/C chez *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance durant la période lumineuse en fonction des concentrations en Fe et Fe' …… **p. 79**

Figure 1.13. (A) Taux de fixation de N_2 et (B) de CO_2 chez *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance en fonction des concentrations en Fe et Fe' ……**p. 79**

Figure 1.14. Contenus cellulaires par unité de volume (μm^3) en (A) carbone, (B) azote et (C) chlorophylle *a* chez *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance en fonction des concentrations en Fe et Fe' ……**p. 80**

Figure 1.15. (A) Taux de fixation N_2 et (B) de CO_2 normalisés par le volume en fonction des concentrations en Fe et Fe' ……**p. 80**

Figure 1.16. Réponse physiologique de *C. watsonii* en condition de limitation en fer modérée correspondant à une diminution de Fe de 403.3 à 43.3 nM : taux de croissance (μ), taux de

fixation de N_2 et de CO_2 par cellule et contenus cellulaires en C, N, et Chl*a* en fonction du biovolume. …… **p. 84**
Figure 1.17. Schéma conceptuel d'un mécanisme hypothétique d'assimilation du fer(III) colloïdal par une cellule phytoplanctonique…… **p. 86**
Figure 1.18. Schéma conceptuel du mécanisme de réduction du Fe(III)' et du Fe(III) complexé à un ligand à la surface d'une cellule phytoplanctonique. D'après Shaked et al., (2005)…….. **p. 87**
Figure 1.19. Réponse physiologique de *C. watsonii* en condition de limitation en fer modérée : taux de croissance (μ), taux de fixation de N_2 et de CO_2 par cellule et contenus cellulaires en C, N et Chl*a* en fonction du biovolume. …… **p. 88**
Figure 1.20. Taux de croissance moyen de *T. erythraeum* IMS101 en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM) d'après Bucciarelli et al. (2013) et Rochelle-Newall et al. (2014)…… **p. 100**
Figure 1.21. Stratégie de conservation du fer effectuée par *C. watsonii*. D'après M. Saito…..**p. 101**

Figure 2.1. Flux annuel de dépôts de fer total atmosphérique à la surface des continents et océans et principales sources désertiques de poussières atmosphériques D'après Mahowald et al. (2009) et Maher et al. (2010)…… **p. 110**
Figure 2.2. Photos satellites d'un panache atmosphérique de poussières sahariennes au-dessus de l'océan Atlantique Nord. ……**p. 111**
Figure 2.3. Distribution des différentes sources de poussières atmosphériques et de leurs principales trajectoires de transports et localisation de la source des poussières utilisées ici D'après Maher et al. (2010)……..**p. 113**
Figure 2.4. Solubilité du fer contenu dans des fractions fines de sols issues de différentes régions sahariennes en fonction de la concentration en oxalate dans des pluies artificielles. D'après Paris et al. (2011) …….. **p. 116**
Figure 2.5. Protocole de préparation de la pluie simulée……**p. 117**
Figure 2.6. Schéma conceptuel résumant le cycle photochimique des complexes Fe(III)-oxalate dans l'eau de mer. D'après Sunda, comm. pers……..**p. 121**
Figure 2.7. Taux de croissance moyens de *C. watsonii* cultivée en présence de fer et d'oxalate ou d'EDTA. …….. **p. 123**
Figure 2.8. Protocole expérimental pour l'étude de la réponse de *C. watsonii* limitée en fer à un dépôt humide de poussières sahariennes. ……..**p. 125**
Figure 2.9. pH moyen mesuré dans les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' en début et fin de phase exponentielle de croissance. ……**p. 126**
Figure 2.10. Schéma du protocole de l'expérience d'ajout de pluie sans poussières…… **p. 128**
Figure 2.11. Abondances moyennes de *C. watsonii* dans les cultures 'Contrôle 2' et '+ Pluie SP' (ajout de pluie sans poussières)…… **p 129**
Figure 2.12. Expériences complémentaires d'ajouts de Fe + oxalate en fin de phase de croissance…… **p. 130**
Figure 2.13. Abondances moyennes de *C. watsonii* cultivée en condition de limitation en fer sans ou avec ajout d'une pluie saharienne simulée en fonction du temps depuis l'ajout. …….. **p. 133**
Figure 2.14. Logarithmes népériens des abondances moyennes de *C. watsonii* dans les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie'…….. **p. 134**
Figure 2.15. Abondance cellulaire dans le traitement 'Contrôle' transféré dans flacons de 60ml, dans les bouteilles de 2L et après ajout de Fe en début de phase stationnaire ……**p. 135**

Figure 2.16. Abondance cellulaire dans le traitement 'Contrôle' transféré dans flacons de 60ml, dans les bouteilles de 2L et après ajout de Fe en début de phase stationnaire ……..**p. 136**

Figure 2.17. Photographie prise au microscope d'une colonie naturelle de *Trichodesmium* sp. ramenant en son centre des poussières désertiques. D'après Rubin et al. (2011). …… **p. 145**

Figure 2.18. Schéma conceptuel de la réponse d'une communauté phytoplanctonique et microbienne suite à la stimulation de la croissance et de l'activité de *C. watsonii* par un apport atmosphérique saharien, dans un milieu oligotrophe où la production primaire serait limitée par l'azote…… ……**p. 148**

Figure 3.1. Climatologie des concentrations de surface en nitrates et phosphates pour le mois de Septembre (World Ocean Atlas 2009) et concentrations de surface en Chl*a* pour le mois de Septembre 2012 (données du satellite MODIS)……..**p.153**

Figure 3.2. Image satellite d'un panache de poussières d'origine saharienne en Atlantique subtropical Nord est en Novembre 1998. Seawifs……**p. 155**

Figure 3.3. Salinité de surface de l'océan Atlantique subtropical Nord déduite des mesures SMOS (Soil Moisture and Ocean Salinity satellite) pour le mois d'août 2010. ……**p. 157**

Figure 3.4. Trajectoire effectuée lors de la campagne STRASSE. ……**p. 158**

Figure 3.5. Stations des transects aller et retour (A) et du site d'intérêt (B) où ont été effectuées des mesures de production primaire et de fixation de N_2 seules, des mesures de fixation de N_2 nocturnes et des expériences en microcosmes avec enrichissements. …… **p. 160**

Figure 3.6. (A) Les incubateurs sur le pont avant du bateau avec une alimentation continue en eau de mer de surface. (B) Rampe de filtration utilisée à bord pour la filtration de l'eau incubée… ……**p. 162**

Figure 3.7. Protocole expérimental des expériences d'incubation avec ajouts d'éléments potentiellement limitants. ……**p. 163**

Figure 3.8. Anomalies potentielles de densité des 300 premiers mètres de la colonne d'eau en fonction des numéros des stations CTD échantillonnées durant la campagne STRASSE. …**p. 168**

Figure 3.9. (A) Salinité et (B) température de surface (SSS et SST). ……**p.169**

Figure 3.10. (A) Production primaire et (B) fixation de N_2. ……..**p. 171**

Figure 3.11. (A) Concentrations en chl*a*, (B) production primaire et (C) fixation de N_2 en surface (10 m de profondeur) pour le site d'intérêt. …… **p. 173**

Figure 3.12. Salinité des eaux de surface dans la zone d'intérêt de la campagne STRASSE. (A) avant le 3 Septembre 2012, durant l'échantillonnage de la zone 2 (Z2) et (B) à partir du 3 septembre 2012 au soir, durant l'échantillonnage de la zone 3 (Z3). ……**p. 174**

Figure 3.13. Position des stations du transect aller et retour sur fond de carte représentant les taux de fixation de N_2 à 10 m de profondeur. Les diagrammes secteurs représentent les taux de fixation en période nocturne et diurne ……**p. 176**

Figure 3.14. Localisation des stations du site d'intérêt sur fond de carte représentant les taux de fixation de N_2 à 10 m de profondeur. Les diagrammes secteurs représentent les taux de fixation de N_2 en période nocturne et diurne …… **p. 178**

Figure 3.15. Relation entre la production primaire et la fixation de N_2 pour toutes les stations. ……**p. 179**

Figure 3.16. Production primaire et fixation de N_2 moyennes dans les microcosmes contrôle et 48 h après ajout de phosphates ou de poussières du Niger sous forme de dépôt sec pour les stations du transect aller ……..**p. 183**
Figure 3.17. Images satellite (MSG/SEVIRI) de l'épaisseur optique des aérosols (sans dimension) entre les 10 et 15 août 2012, au-dessus de la zone de la campagne STRASSE …….. **p. 184**
Figure 3.18. Production primaire et fixation de N_2 moyennes dans les microcosmes sans ajout et 48h après ajout de nutriments inorganiques ou de pluie saharienne pour la station 91. ..**p. 185**
Figure 3.19. Production primaire et fixation de N_2 moyennes dans les microcosmes sans ajout et 48h après ajout de nutriments inorganiques ou de pluie saharienne pour les 4 zones du site d'intérêt. ……. **p. 187**

Liste des tableaux :

Tableau I. Composition de base du milieu YBCII, sans fer et sans agent complexant (modifié d'après Chen et al. 1996)……**p.50**

Tableau 1.I. Concentrations en Fe et en fer inorganique dissous (Fe') dans les milieux de culture……**p.65**

Tableau 1.II. Synthèse bibliographique des paramètres physiologiques mesurés pour *C. watsonii* WH8501 cultivée en conditions nutritives non-limitantes. ……..**p.82**

Tableau 1.III. Pourcentage du carbone fixé par photosynthèse dédié à la croissance selon les différentes concentrations ambiantes en Fe. ……**p.90**

Tableau 1.IV. Synthèse bibliographique des données physiologiques mesurées pour différentes souches de *C. watsonii*, pour une UCYN-C océanique (*Cyanothece* TW3) et différentes souches de *Cyanothece* spp. côtières en conditions nutritives non-limitantes comparées à *C. watsonii* WH8501 en condition non-limitante. ……**p.94**

Tableau 1.V. Synthèse bibliographique des données physiologiques mesurées pour des cultures de *Trichodesmium* spp. en conditions nutritives non-limitantes comparées à *C. watsonii* WH8501 en condition non-limitante. ……..**p.97**

Tableau 1.VI. Réponses physiologiques à la limitation en fer de *C. watsonii* WH8501 et de *T. erythraeum* IMS101……**p.99**

Tableau 1.VII. Récapitulatif des paramètres de Monod pour *C. watsonii* WH8501 et *T. erythraeum* IMS101……..**p.100**

Tableau 2.I. Composition chimique de la fraction fine de sols utilisée pour l'enrichissement des cultures de *C. watsonii*…… **p.115**

Tableau 2.II. Taux de croissance de *C. watsonii* cultivée en présence de différentes concentrations en Fe et oxalate. …… **p.122**

Tableau 2.III. Concentrations en Fe' calculées pour différentes concentrations en Fe et oxalate ……**p.124**

Tableau 2.IV. Concentrations en éléments dissous dans la pluie simulée et pourcentage de dissolution du Cu, Fe, Mn, P et N contenus dans les poussières……**p.132**

Tableau 2.V. Taux de croissance pour chaque réplicat des cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' et taux de croissance moyens …… **p.134**

Tableau 2.VI. Contenus cellulaires moyens en C, N et rapports C/N pour des échantillons prélevés de jour et de nuit, contenus cellulaires moyens en Chl*a* et rapport Chl*a*/C et contenus en C, N et Chl*a* par µm^3 pour les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie'. …… **p.137**

Tableau 2.VII. Taux de fixation moyens de N_2 et CO_2 par cellule, par unité de chl*a* et par µm^3 pour les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie'. ……**p.138**

Tableau 2.VIII. Production primaire, taux de croissance et pourcentage du C fixé par photosynthèse dédié à la croissance. ……**p.143**

Tableau 3.I. Concentrations finales en macro et micronutriments dans les microcosmes, charge particulaire des poussières ajoutées sous forme de dépôt sec et quantité de pluie simulée ajoutée des microcosmes pour chaque expérience. ……**p. 164**

Tableau 3.II. Concentrations finales dans les microcosmes des différents métaux ajoutés……..**p.164**
Tableau 3.III. Composition chimique des fractions fines de sols utilisées ici. ……. **p.165**
Tableau 3.IV. Caractéristiques hydrologiques et biogéochimiques des eaux de surface. ……**p.170**
Tableau 3.V. Concentrations en éléments dissous dans les pluies filtrées et % de dissolution de ces éléments ……**p.189**
Tableau 3.VI. Concentrations en éléments dissous ajoutés dans les microcosmes via les ajouts de pluies et des ajouts de phosphates, fer ou du mélange de métaux. ……**p.190**

Introduction générale :

contexte scientifique et état de l'art

I. Production océanique : photosynthèse et phytoplancton

L'hydrosphère océanique est l'une des composantes clés du cycle biogéochimique du carbone *via* l'importance des flux à l'interface air-mer de CO_2, l'un des principaux gaz à effet de serre, et sa capacité à stocker du carbone dans les sédiments à l'échelle des temps géologiques. L'estimation du puits de carbone océanique est de 2.6 ± 0.5 PgC an^{-1} (Global Carbon Project 2013), ce qui représente environ 30 % des émissions annuelles de combustibles fossiles dans l'atmosphère, soulignant le rôle central joué par l'océan dans le système climatique global. Ce puits océanique de carbone est le résultat combiné des pompes de carbone physique et biologique (Figure 1).

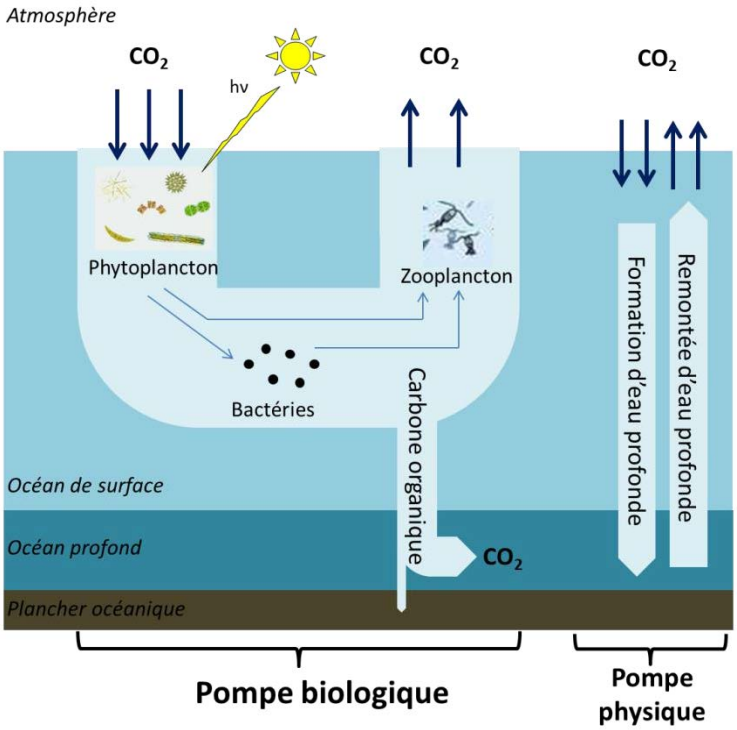


Figure 1. Représentation schématique des pompes de carbone biologique et physique dans l'océan (modifié d'après Chisholm 2000).

La pompe physique correspond à l'absorption du CO_2 à l'interface air-mer contrôlée par son équilibre thermodynamique et son transport vertical dans l'océan *via* la circulation thermohaline globale. La pompe biologique de carbone correspond à la transformation, dans la couche

euphotique[1], du CO_2 dissous en carbone organique au cours de la photosynthèse. Une grande partie de ce carbone organique est reminéralisée dans la colonne d'eau par les organismes hétérotrophes (zooplancton et bactéries) et seule une faible fraction est piégée dans les sédiments océaniques (environ 0.02 % du carbone organique particulaire synthétisé dans la couche de surface (Bopp et Le Quéré 2009) (Figure 1).

La photosynthèse, dont la réaction est donnée ci-dessous (réaction 1), permet la conversion de matière minérale dissoute en matière organique sous l'action de l'énergie lumineuse.

$$106CO_2 + 16NO_3^- + HPO_4^{2-} + 122H_2O + 18H^+ \xrightarrow{h\nu} (CH_2O)_{106}(NH_3)_{16}(H_3PO_4) + 138O_2 \quad \text{(Réaction1)}$$

Dans l'océan, elle est réalisée par les organismes phytoplanctoniques, groupe taxonomique comprenant tous les organismes planctoniques photo-autotrophes, majoritairement unicellulaires (Falkowski et al. 2003). Cette production de carbone organique disponible pour le reste de l'écosystème océanique hétérotrophe représente la production primaire et dépend, entre autres, de la disponibilité en azote et phosphore indispensables à la réalisation de la photosynthèse.

II. L'azote dans l'océan : zones oligotrophes

La forme majoritaire de l'azote dans l'océan est le diazote (N_2) dissous, représentant 94 % du stock d'azote océanique (Gruber 2008). Mais ce N_2 demeure non-utilisable par la majorité de la communauté phytoplanctonique. En effet, les formes azotées assimilables par le phytoplancton sont principalement les formes inorganiques dissoutes comme le nitrate (NO_3^-), le nitrite (NO_2^-) et l'ammonium (NH_4^+) formant à eux trois l'azote inorganique dissous et dans une moindre mesure certaines molécules d'azote organique dissous (Moore et al. 2002; Pustizzi et al. 2004). Les nitrates représentent 88 % de l'azote inorganique dissous (Gruber 2008). Leurs faibles concentrations dans la couche de surface (Figure 2A) font des nitrates l'élément limitant la production primaire dans de vastes zones de l'océan ouvert (Capone 2000) et ce même à l'échelle des temps géologiques (Falkowski 1997). Ces zones océaniques pauvres en nutriments et en biomasse phytoplanctonique sont dites oligotrophes (du grec *oligos*: petit ou peu

[1] définie comme la couche d'eau recevant jusqu'à 1 % de l'éclairement de surface

nombreux et *trophein*: manger) ou LNLC (« Low Nutrient Low Chlorophyll »), les plus importantes étant les grands gyres subtropicaux du Pacifique, de l'Atlantique et de l'océan Indien (Figure 2B).

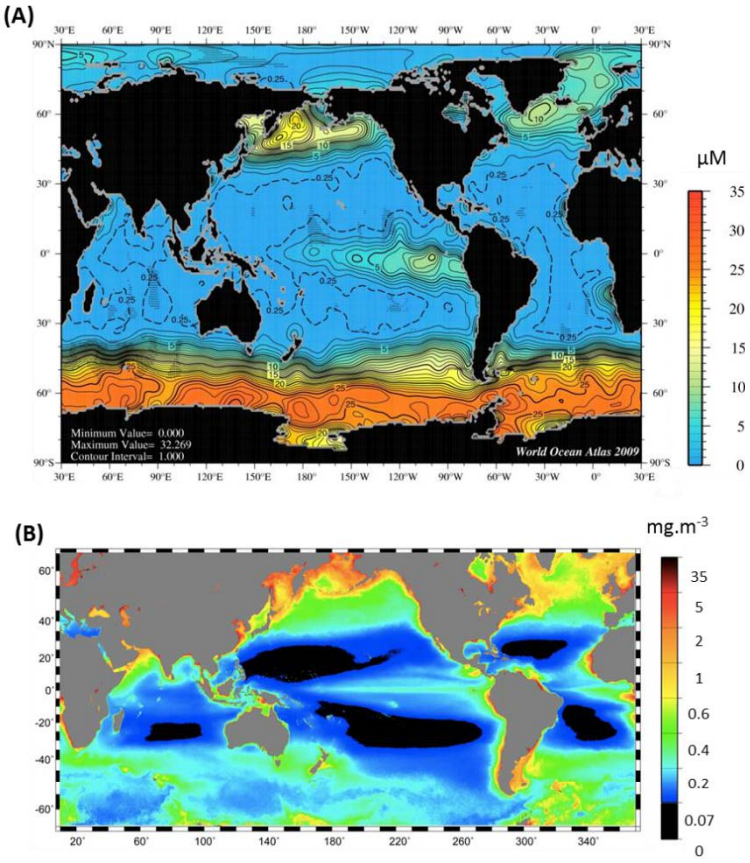


Figure 2. Moyenne annuelle des concentrations de surface (A) en NO_3^- (en µM) (World Ocean Atlas 2009, Garcia et al. 2010) et (B) en chlorophylle (en $mg.m^{-3}$) (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA).

III. La fixation de N_2 océanique

Au sein du phytoplancton marin, certaines cyanobactéries, appelées diazotrophes ou fixateurs de N_2, sont capables de réduire biologiquement le N_2 atmosphérique dissous dans la couche de surface en substrat biologiquement utilisable (ammoniaque, NH_3) selon la réaction ci-dessous (réaction 2), *via* un complexe enzymatique spécifique: la nitrogénase, en partie codée par le gène *nifH*.

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi \quad \text{(Réaction 2)}$$

avec Pi le phosphore inorganique.

Les cyanobactéries diazotrophes possèdent donc un avantage écologique majeur par rapport au phytoplancton non diazotrophe puisqu'elles ne peuvent pas être limitées par la disponibilité en azote. La fixation biologique de N_2 a été quantifiée à l'échelle globale pour la première fois en 1970 à la hauteur d'environ 20 $TgN.an^{-1}$ (Delwich 1970), mais les estimations les plus récentes sont de l'ordre de 52 à 135 $TgN.an^{-1}$ (Galloway et al. 2004; Codispoti 2007; Gruber 2008; Monteiro et al. 2010; Luo et al. 2012; Eugster et Gruber 2012). Ce processus représente, à l'échelle globale, environ la moitié des apports externes d'azote à l'océan (Gruber 2008 et références internes). Dans certaines régions oligotrophes, la fixation de N_2 est responsable d'un apport considérable en azote biodisponible dans la couche de surface, pouvant égaler les apports en NO_3^- par remontée d'eaux profondes (*e.g.* Capone et al. 2005). La fixation de N_2 contribue ainsi jusqu'à la moitié de la production nouvelle[2] dans les régions oligotrophes du Pacifique subtropical Nord (Karl et al. 1997) et de l'Atlantique tropical Nord (Capone et al. 2005). La fixation biologique de N_2 est donc un processus jouant un rôle important dans le cycle biogéochimique du carbone en raison de son apport en azote nouveau stimulant la pompe biologique de carbone (Figure 3).

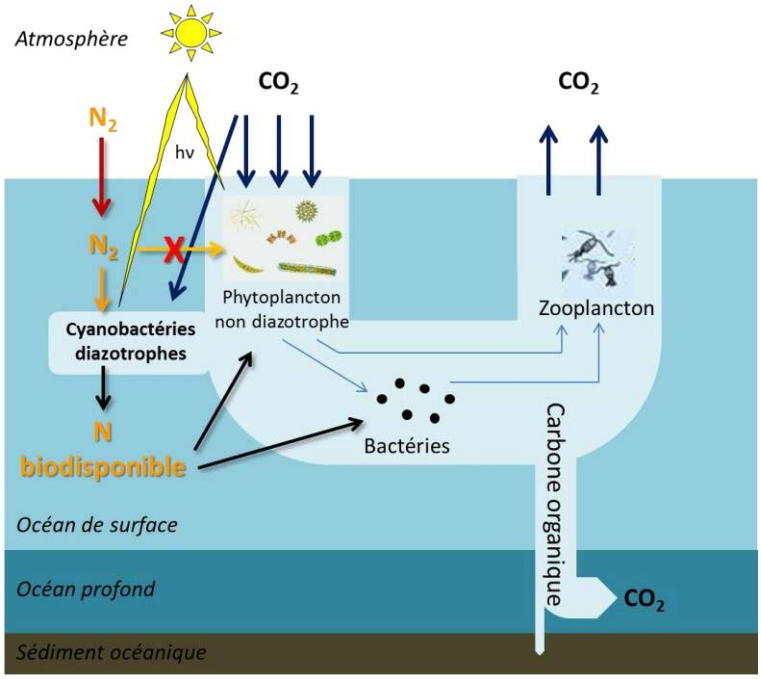


Figure 3. Représentation schématique de la pompe biologique incluant le rôle des cyanobactéries diazotrophes (modifié, d'après Chisholm 2000).

[2] Production nouvelle : production primaire réalisée à partir des apports externes d'azote à la couche euphotique (Dugdale et Goering 1967)

A l'échelle globale, la fixation de N_2 influence fortement le cycle l'azote puisqu'elle permet d'augmenter le stock d'azote biodisponible dans l'océan et ainsi de contrebalancer, au moins en partie, les pertes d'azote biodisponible dues aux processus de dénitrification (réaction 3) et d'anammox (anaerobic oxydation of ammonium, réaction 4) ayant lieu dans les régions anoxiques et suboxiques (telles les zones de minimum d'oxygène ou OMZ) (Galloway et al. 2004; Gruber 2004; Kuypers et al. 2005; Deutsch et al. 2007; Gruber 2008; Eugster et Gruber 2012).

$$C_{106}H_{175}O_{42}N_{16}P + 104NO_3^- \rightarrow 106CO_2 + 60N_2 + H_3PO_4 + 138H_2O \quad \text{(Réaction 3)}$$

$$NO_2^- + NH_4^+ \rightarrow 2N_2 + 2H_2O \quad \text{(Réaction 4)}$$

Mais le bilan du cycle océanique global de l'azote dressé à ce jour semble déséquilibré (Gruber 2008). Bien que Gruber (2004) estime la somme totale des sources d'azote à l'océan à 265 ± 55 TgN.an^{-1} (dont ~135 TgN.an^{-1} issus de la fixation de N_2) et la somme totale des puits à 275 ± 55 TgN.an^{-1} (dont ~245 TgN.an^{-1} liés aux processus de dénitrification et d'anammox), le bilan présenté par Codispoti (2007) est par conte fortement déficitaire (d'environ 200 TgN.an^{-1}). Néanmoins, dans tous les bilans actuels, les pertes excèdent toujours les gains, ce qui est généralement attribué à une surestimation du processus de dénitrification ou une sous-estimation de la fixation de N_2 (Codispoti et al. 2001 ; Gruber 2008). A l'heure actuelle, il existe de fortes incertitudes dans l'estimation globale et régionale des flux de fixation de N_2 notamment en raison du sous-échantillonnage de vastes régions de l'océan, tel l'océan Indien (Figure 4, Luo et al. 2012).

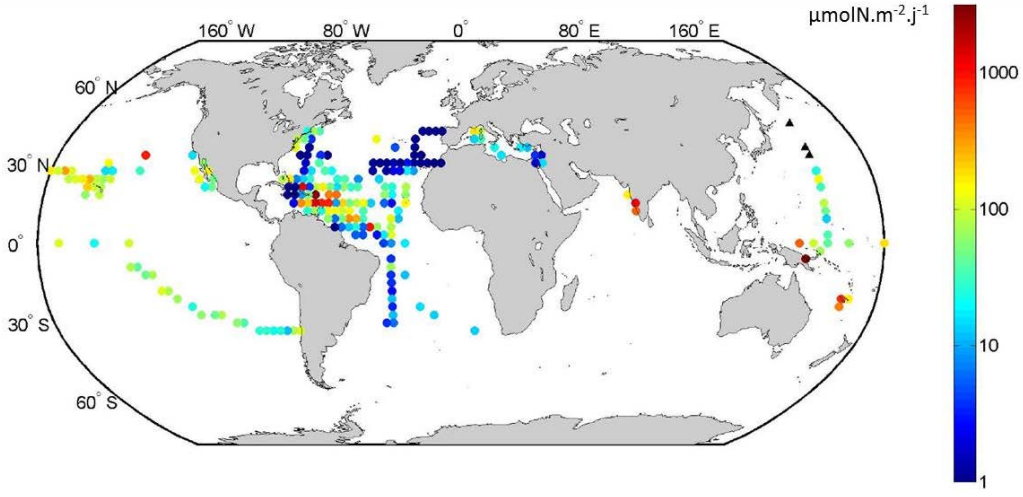


Figure 4. Moyennes géométriques des taux de fixation de N_2 intégrés sur la profondeur (en µmolN.m^{-2}.j^{-1} selon une échelle logarithmique). Les triangles noirs correspondent à des stations explorées mais présentant des valeurs indétectables. (Luo et al. 2012, Creative Commons Attribution 3.0 License).

IV. Les acteurs de la fixation de N_2 océanique

La fixation de N_2 est un processus exclusivement réalisé par des organismes procaryotes et on considère à l'heure actuelle qu'il est majoritairement effectué dans l'océan par les cyanobactéries diazotrophes, seuls organismes phototrophes capables réaliser la fixation de N_2 dans la couche de surface (Zehr 2011). Néanmoins, l'expression du gène *nifH* a été récemment mise en évidence dans l'océan chez des bactéries hétérotrophes (Church et al. 2005a), notamment certaines protéobactéries appartenant aux groupes phylogénétiques α, β, γ et δ (Langlois et al. 2008; Yogev et al. 2011; Farnelid et al. 2011) et dans une moindre mesure chez certaines archaebactéries (Riemann et al. 2010). Les cyanobactéries diazotrophes marines peuvent être divisées selon deux types morphologiques majeurs : les cyanobactéries diazotrophes filamenteuses et les cyanobactéries diazotrophes unicellulaires (ou UCYN) (Zehr 2011). L'existence de ces dernières a été mise en évidence récemment (Zehr et al. 1998; 2001).

IV.1. Les cyanobactéries diazotrophes filamenteuses

Certaines cyanobactéries diazotrophes filamenteuses, du genre *Richelia* ou *Calothrix*, vivent uniquement en symbiose avec des diatomées (Foster et Zehr 2006) et fournissent ainsi à leur hôte une source d'azote assimilable (Foster et al. 2011). Ces organismes restent actuellement peu étudiés et sont ainsi mal connus (Thompson et Zehr 2013). Les cyanobactéries filamenteuses non symbiotiques sont représentées essentiellement par les genres *Trichodesmium* spp. (Figure 5) comprenant les espèces *T. thiebauthii* et *T. erythraeum.* et *Katagnymene* spp. (Lundgren et al. 2001). Leurs cellules sont réunies en trichomes (assemblage de cellules formant un filament recouvert d'une gaine mucilagineuse) (Figure 5).

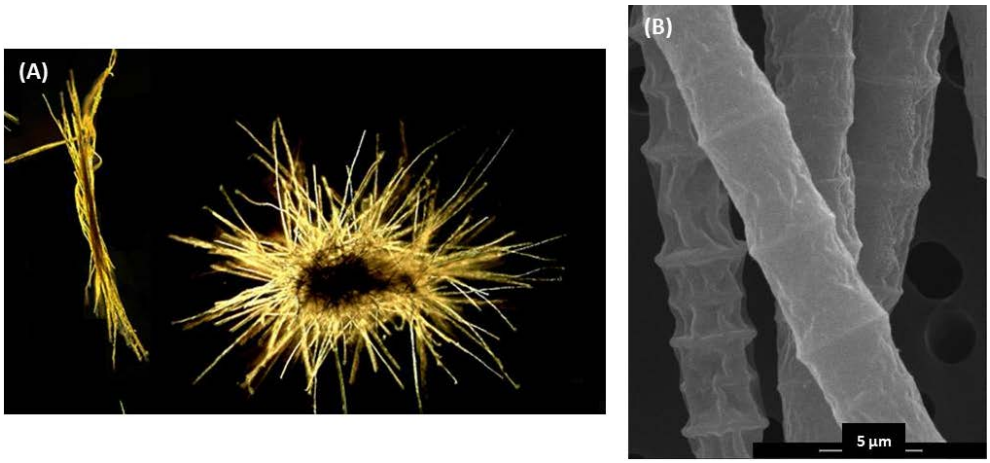


Figure 5. (A) Colonies de *Trichodesmium* sous forme de « tufts » (à gauche) et de « puffs » (à droite). Photo : MIT/WHOI Joint Program student Abby Heithoff. (B) Photographie de trichomes isolés de *Trichodesmium* sp. observés au microscope électronique à balayage (Roe et al. 2012, avec la permission de John Wiley and sons, licence n° 3403140765943).

Alors que seuls des trichomes isolés ont été observés pour *Katagnymene* spp. (Lundgren et al. 2001), la cyanobactérie *Trichodesmium* spp est généralement présente dans le milieu naturel sous forme de colonies, appelées « tufts » ou « puffs » selon leur forme (Figure 5). La longueur d'un trichome de *T. erythraeum* varie de 100 à 1000 µm (Berman-Frank et al. 2007), ce qui place cet organisme dans la classe du micro-phytoplancton. De plus, *Trichodesmium* spp. peut former de vastes efflorescences, s'étendant sur plusieurs kilomètres et pouvant ainsi être détectées par satellite (Dupouy et al. 2000). Cette facilité d'observation en a fait la cyanobactérie diazotrophe marine la plus étudiée à ce jour.

IV. 2. Les cyanobactéries diazotrophes unicellulaires

L'évolution des techniques de biologie moléculaire de ces dernières années et notamment l'utilisation de l'amplification du gène *nifH*, ont permis de découvrir d'autres cyanobactéries diazotrophes, plus petites que *Trichodesmium* spp.: les UCYN. L'activité de fixation de N_2 chez des cyanobactéries unicellulaires de taille inférieure à 10 µm a été mise en évidence par l'équipe de Jonathan Zehr (Zehr et al. 1998; 2001). Ces UCYN sont regroupées dans 3 groupes phylogénétiques distincts : groupes A, B et C et seront notées UCYN-A, UCYN-B et UCYN-C par la suite (Figure 6).

Les UCYN-A (Figure 6), non isolées et donc non cultivées à ce jour, constituent un groupe original du fait de leurs caractéristiques physiologiques uniques. En effet, ces cyanobactéries appartenant à la classe du pico-phytoplancton (0.7 à 1 µm de diamètre, Goebel et al. 2007) sont dépourvues de phycoérythrine (le pigment caractéristique des cyanobactéries) et de photosystème II (Zehr et al. 2008; Tripp et al. 2010). Cette dernière caractéristique fait de ces organismes des photo-hétérotrophes, ayant donc besoin d'une source de carbone organique. Il a été supposé que la symbiose avec d'autres organismes autotrophes, fortement suspectée comme obligatoire, permettrait de couvrir ses besoins en matière organique (Tripp et al. 2010). Très récemment, Thompson et al. (2012) ont mis en évidence la symbiose entre une UCYN-A et une haptophyte unicellulaire.

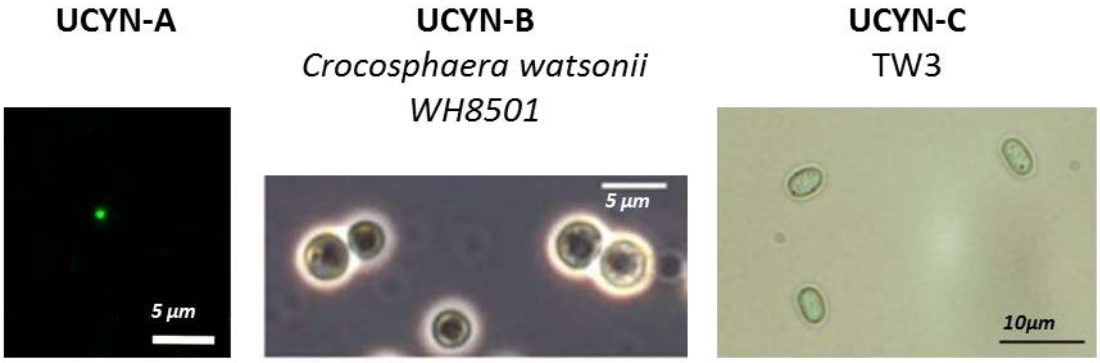


Figure 6. Photographie prise au microscope d'une UCYN-A hybridée avec une sonde fluorescente (Le Moal et al. 2011, Creative Commons Attribution 3.0 License), de *Crocosphaera watsonii* souche WH8501 (UCYN-B, Webb et al., 2009, avec la permission de John Wiley and sons, licence n°3403161270130) et de TW3 (UCYN-C, Taniuchi et al., 2012, avec la permission de John Wiley and sons, licence n° 3325410092108).

Le deuxième groupe, les UCYN-B (Figure 6), s'apparente à l'espèce *Crocosphaera watsonii* (Zehr et al. 2001), appartenant à la classe du nano-phytoplancton (de 2 à 6 µm de diamètre, Webb et al. 2009). *C. watsonii* est actuellement l'UCYN présente dans l'océan ouvert la plus étudiée car elle en a été jusque très récemment le seul représentant disponible en culture. Une souche de cette espèce (WH8501) a été isolée et décrite pour la première fois il y a une vingtaine d'années par Waterbury et Rippka (1989). Depuis, plusieurs souches présentant des différences en termes de taille ont été isolées (Webb et al. 2009). Malgré ces différences, il semble exister au sein de ce groupe une très faible diversité génomique (plus de 99 % de similitude, Zehr et al. (2007a)).

Enfin, le troisième groupe, les UCYN-C, appartenant également à la classe du nano-phytoplancton, comprend principalement des organismes isolés en milieu côtier (telles

Cyanothece sp. ATCC 51142 ou BG 043511, Zehr et al. 2005). A ce jour, seule une souche a été isolée dans l'océan ouvert: TW3 (Figure 6), isolée très récemment dans le courant de Kuroshio (branche Ouest du gyre Pacifique subtropical Nord, Taniuchi et al. 2012). L'UCYN TW3, de forme allongée, mesure entre 2.5 et 3µm de large et entre 4 et 6 µm de long.

IV.3. Différentes stratégies de séparation de la fixation de N_2 et de la photosynthèse au sein des cyanobactéries diazotrophes marines

L'activité de la nitrogénase est inhibée en présence d'oxygène, ce qui fait de la fixation de N_2 un processus anaérobie strict. Cela oblige donc les diazotrophes photosynthétiques à développer différentes stratégies afin de séparer la fixation de N_2 du processus de photosynthèse dont l'oxygène est un sous-produit obligatoire ; cette séparation temporelle et/ou spatiale entraîne un coût énergétique supplémentaire (Karl et al. 2002; Vitousek et al. 2002). Afin de pallier à cet effet inhibiteur de l'oxygène, les cyanobactéries filamenteuses symbiotiques possèdent des cellules spécialisées dans la fixation de N_2 appelées hétérocystes (Figure 7). Il s'agit de cellules anaérobies du fait de l'absence de photosystèmes, exprimant la nitrogénase et constituées d'une membrane empêchant la diffusion de l'oxygène (Bothe et al. 2010).

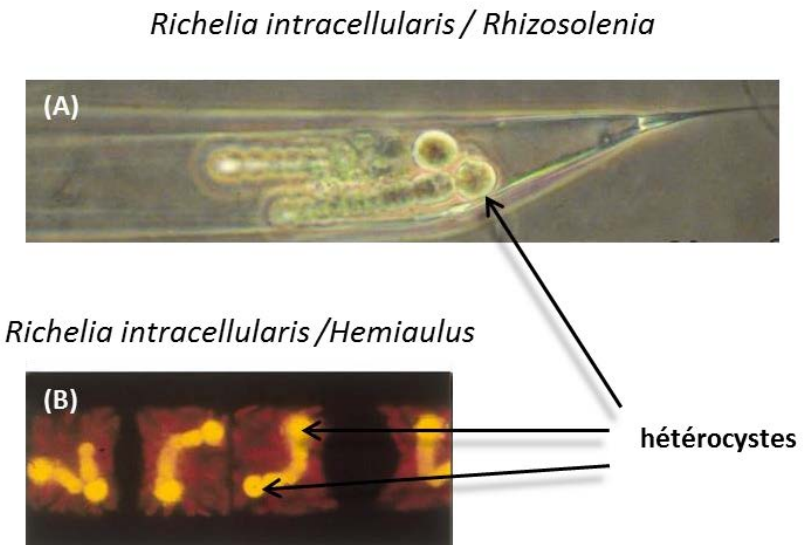


Figure 7. Photographie (A) de la diatomée *Rhizosolenia* sp. et de son symbiote diazotrophe *R. intracellularis* et (B) de la diatomée *Hémiaulus* sp.et de son symbiote diazotrophe *Richelia intracellularis* apparaissant en fluorescence en orange.

La fixation de N_2 chez les cyanobactéries hétérocystées est ainsi effectuée durant la photopériode, de concert avec la photosynthèse (Figure 8). De très rares cyanobactéries filamenteuses à hétérocystes non symbiotiques ont été observées dans l'océan ouvert, telle *Anabaena gerdii* (Carpenter et Janson 2001).

Chez les diazotrophes filamenteux non hétérocystés, tels *Trichodesmium* spp., la fixation de N_2 est réalisée durant la période lumineuse, malgré la production d'oxygène liée à la photosynthèse (Berman-Frank et al. 2001a; LaRoche et Breitbarth 2005). La stratégie employée par cet organisme afin de protéger la nitrogénase des dommages irréversibles liés à l'oxygène est alors une séparation à la fois spatiale et temporelle des deux processus (Figure 8).

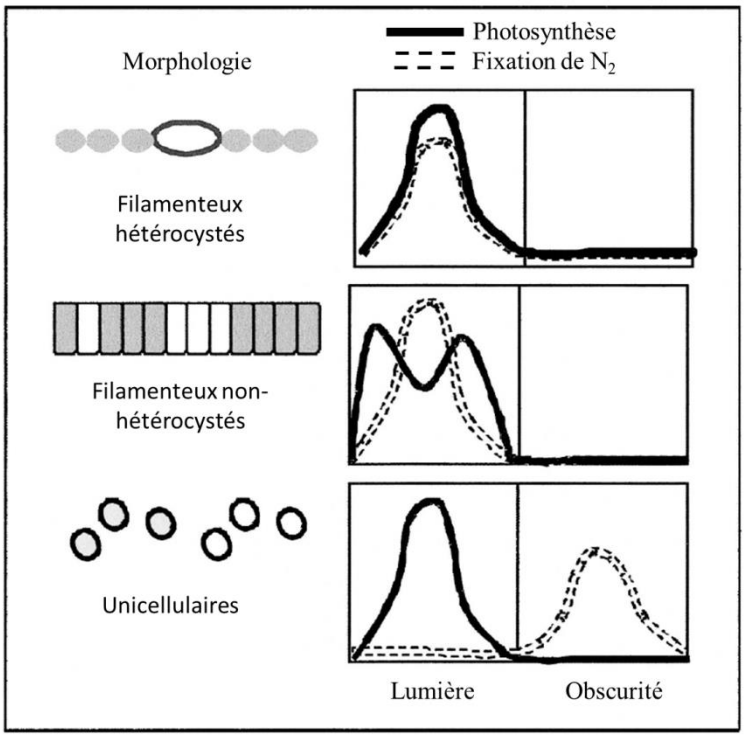


Figure 8. Représentation schématique des différents types de morphologie et de stratégie d'adaptation des cyanobactéries diazotrophes marines (filamenteux hétérocystés, filamenteux non hétérocystés et UCYN). La coloration blanche des cellules indique la localisation de la nitrogénase. Sur les graphiques, sont indiquées les activités de photosynthèse (trait plein) et de fixation de N_2 (trait pointillé) pour un cycle jour:nuit de 12h:12h. D'après Berman-Frank et al. 2007 (Copyright 2014 by the Association for the Sciences of Limnology and Oceanography, Inc.).

Berman-Frank et al. (2001a) ont montré, chez *T. erythraeum*, l'existence d'un pic d'activité de la nitrogénase corrélé à une baisse de l'activité photosynthétique et une augmentation de la consommation d'oxygène, approximativement au milieu de la période lumineuse. Ces auteurs

ont également mis en évidence le fait que, malgré l'absence d'hétérocystes et une capacité de photosynthèse dans toutes les cellules, certaines d'entre elles, appelées diazocytes, peuvent moduler leur production et consommation d'oxygène afin de se spécialiser dans la fixation de N_2 (Fredriksson et Bergman 1997) (Figure 9).

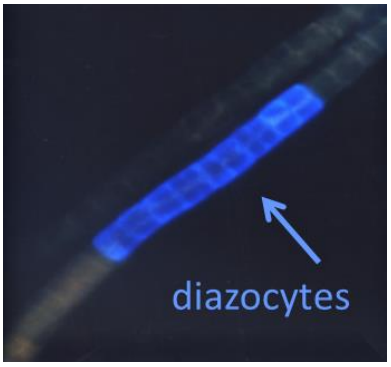


Figure 9. Trichomes de *T. erythraeum* avec fluorescence de la protéine codée par le gène *nifH* due à un anticorps anti-nifH couplé à un composé fluorescent bleu, permettant de mettre en évidence les diazocytes (birgittabergman.wordpress.com consulté le 03/07/14).

Les UCYN-B et -C ne pouvant pas effectuer de séparation spatiale entre la fixation de N_2 et la photosynthèse du fait de leur morphologie, elles utilisent une stratégie de séparation temporelle. Ainsi, ces organismes effectuent une fixation de N_2 nocturne (Tuit et al. 2004; Church et al. 2005b; Needoba et al. 2007; Taniuchi et al. 2012; Brauer et al. 2013), conjointement à la respiration cellulaire (Großkopf et Laroche 2012) (Figure 8). Les UCYN-A, photo-hétérotrophes, ne produisent pas d'oxygène du fait de l'absence du photosystème II et peuvent donc effectuer leur fixation de N_2 de jour (Church et al. 2005a; Zehr et al. 2007b; Zehr 2011). Il existe donc des différences physiologiques au sein des UCYN qui entraînent la nécessité de ne pas les considérer comme un seul groupe homogène.

IV.4. Distribution spatiale des cyanobactéries diazotrophes marines

Les données actuelles de la répartition spatiale de ces trois grands 'types' de cyanobactéries diazotrophes (filamenteux non hétérocystés représentés par *Trichodesmium* spp., UCYN et symbiotes diazotrophes-diatomées) dans l'océan ouvert montrent une distribution limitée aux

zones tropicales et subtropicales, avec une coexistence des trois 'types' souvent observée (Zehr 2011) (Figure 10).

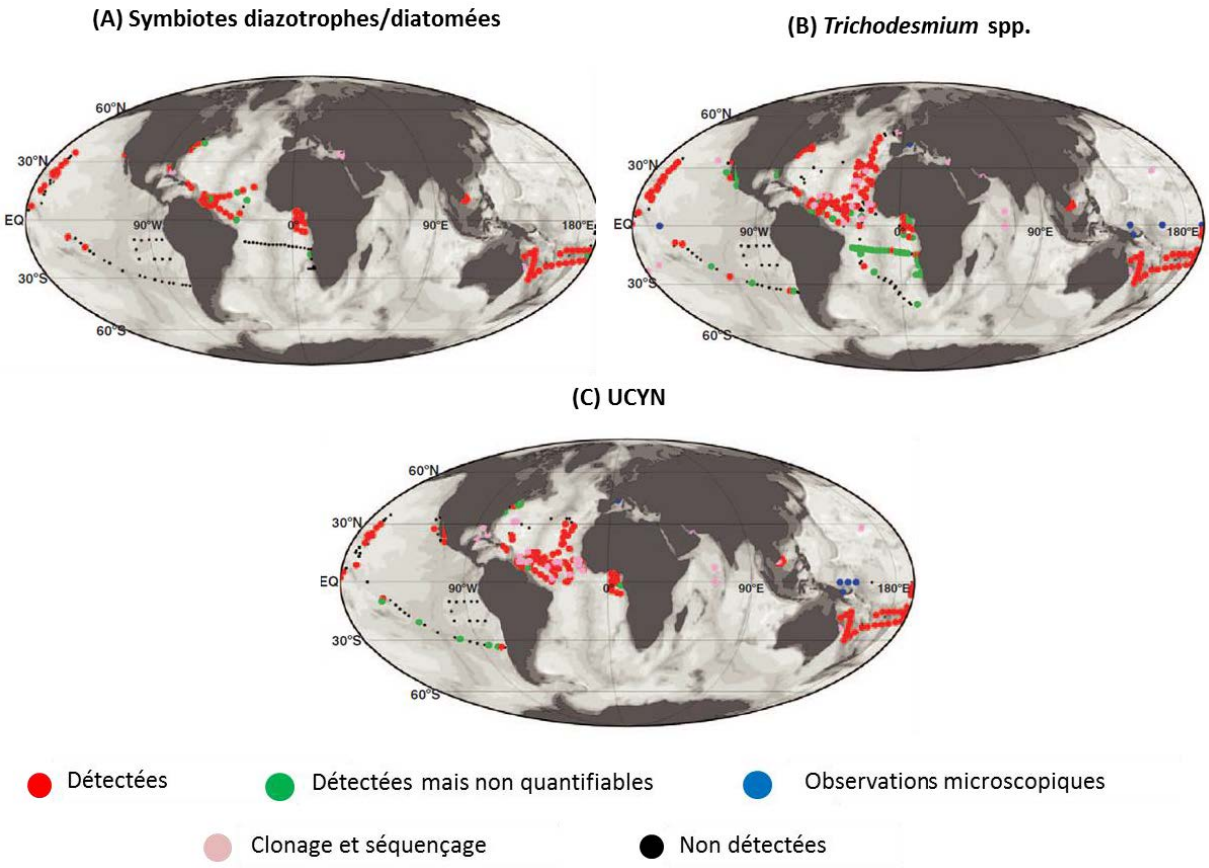


Figure 10. Observations de la distribution des trois « types » majeurs de cyanobactéries diazotrophes dans l'océan ouvert: (A) symbiotes diazotrophes/diatomées, (B) *Trichodesmium* spp. et (C) UCYN. La détection a principalement été effectuée par une méthode de biologie moléculaire de polymérisation en chaine quantitative du gène *nifH* (qPCR, points rouges, roses lorsque les séquences observées ont été clonées et séquencées, ou verts lorsqu'il a eu détection mais à de trop faible concentration pour pouvoir effectuer une quantification). Les points noirs correspondent à des échantillonnages pour lesquels les cyanobactéries n'ont pas été détectées et les bleus à une détection par observations microscopiques (Zehr 2011, avec la permission de John Wiley and sons, licence n°3403171243667).

IV.5. Importance biogéochimique des UCYN

Trichodesmium spp. a longtemps été considérée comme l'organisme diazotrophe dominant et responsable de la majorité de la fixation de N_2 dans l'océan global (Capone et al. 1997). Mais depuis la découverte des UCYN, cette vision a été remise en question et ces cyanobactéries pourraient être responsables d'une grande part de la fixation océanique de N_2. Il a récemment

été montré de forts taux de fixation de N_2 dans la fraction de taille inférieure à 10 ou 20 µm dans laquelle des UCYN ont été détectées et pouvant être à l'échelle régionale égaux voir supérieurs à ceux de *Trichodesmium* spp. (Falcón et al. 2004; Montoya et al. 2004; Biegala et Raimbault 2008). Dans le Pacifique Equatorial Ouest, Bonnet et al. (2009) ont mesuré des taux de fixation de N_2 associés aux diazotrophes de taille inférieure à 10 µm qui représentent 75 % de la fixation totale de N_2. De récents travaux de modélisation ont permis d'appuyer cette importance des UCYN dans la fixation océanique de N_2 à l'échelle globale avec une contribution équivalente des UCYN (49 %) et des filamenteux du genre *Trichodesmium* (43 %) à la fixation totale de N_2 ; les 8 % restant étant attribués aux diazotrophes symbiotes de diatomées (Monteiro et al. 2010).

V. Les facteurs de contrôle de la fixation de N_2 océanique

La variabilité spatiale des flux de fixation de N_2 (Luo et al. 2012) (Figure 4) et de l'abondance relative des gènes *nifH* associée aux diverses cyanobactéries diazotrophes (Zehr 2011) conduit à s'interroger sur le rôle des conditions environnantes, telles que la température, l'intensité lumineuse et les concentrations en macronutriments (phosphate) et micronutriments (fer), comme facteurs de contrôle de la fixation de N_2 océanique et de la croissance de ces organismes.

V.1. La température et l'intensité lumineuse

Des études menées sur des cultures d'UCYN-B et -C et de *Trichodesmium* spp., montrent que la croissance et les activités de fixation de N_2 de ces organismes sont restreintes à un intervalle de température allant d'environ 20°C à 35°C (Falcón et al. 2005; Breitbarth et al. 2007; Webb et al. 2009; Brauer et al. 2013; Fu et al. 2014). Ces résultats sont confirmés par la distribution spatiale des cyanobactéries diazotrophes (filamenteux et UCYN-A, -B, -C) et de la fixation de N_2 restreintes aux zones tropicales et subtropicales là où la température est supérieure à 20°C (LaRoche et Breitbarth 2005; Langlois et al. 2008; Stal 2009 ; Moisander et al. 2010; Zehr 2011; Luo et al. 2012; Agawin et al. 2013) (Figures 4 et 10).

Dans l'Atlantique Nord, les UCYN-A dominent les eaux plus froides de l'est du bassin (température minimale de 20 à 25°C), les diazotrophes filamenteux, comme *Trichodesmium* spp. et les UCYN-C ont plutôt été observés dans des eaux plus chaudes à l'ouest du bassin (> 24°C) et la présence des UCYN-B a été relevée dans une plus large gamme de température (de 19 à 28°C) (Langlois et al. 2008; Goebel et al. 2010). De même, dans le Pacifique (sub)tropical Sud, les

distributions relatives des UCYN-A, -B et *Trichodesmium* spp. sont contrôlées par la température, avec là aussi une abondance maximale des UCYN-A à des températures moins élevées (~24°C) que pour les UCYN-B ou *Trichodesmium* spp. (~29°C) (Moisander et al. 2010).

Une hypothèse proposée pour expliquer ce contrôle de la température sur les cyanobactéries diazotrophes est que ces organismes sont restreints aux eaux chaudes du fait de la plus faible solubilité de l'oxygène et de plus forts taux de respiration permettant aux cellules de maintenir des conditions intracellulaires anoxiques afin de protéger la nitrogénase (Stal 2009). Les UCYN-A ne produisant pas d'oxygène *via* la photosynthèse semblent donc moins fortement soumises à cette contrainte de température.

Des études sur cultures ont également montré une dépendance du taux de croissance de *T. erythraeum* (Breitbarth et al. 2008) et *C. watsonii* (Goebel et al. 2008; Fu et al. 2014) à l'intensité lumineuse disponible pour la photosynthèse (PAR, photosynthetic available radiation) jusqu'à des valeurs ~200 µmol $m^{-2}s^{-1}$. Luo et al (2014) ont effectué une évaluation des facteurs de contrôle environnementaux de la fixation de N_2 océanique à l'échelle globale en utilisant leur base de données publiée en 2012 (Luo et al., 2012). Il ressort de cette analyse statistique que la variation des taux de fixation de N_2 à l'échelle globale est en premier lieu expliquée par l'irradiance solaire, puis par les variations de température de surface, ces deux paramètres étant liés dans le milieu naturel (Luo et al. 2014). Ces paramètres semblent donc contraindre le développement et la fixation de N_2 des cyanobactéries aux eaux chaudes des faibles latitudes.

V.2. Le phosphore

Le transport d'électrons au sein de la nitrogénase permettant la réduction de N_2 en NH_3 entraîne une consommation de 16 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) pour 1 molécule de N_2 fixée (réaction 2) (Howard et Rees 1996; Seefeldt et al. 2009). L'ATP étant fournie lors de la respiration des hydrates de carbone produits durant la photosynthèse, la fixation biologique du N_2 conduit à une photosynthèse accrue afin de soutenir le fort coût énergétique de ce processus. Les besoins des diazotrophes en phosphore, élément clé de la synthèse de l'ATP, sont donc important, or les phosphates sont présents à de faibles concentrations dans la majeure partie de l'océan ouvert de surface (moins de 1 µM, Sarmiento et Gruber 2006; Garcia et al. 2010: World Ocean Atlas 2009), ce qui en fait un élément potentiellement limitant de la fixation de N_2. Il a en effet été montré qu'une diminution des concentrations ambiantes en phosphates affectait le taux de croissance et l'activité de fixation de N_2 de *Trichodesmium* en culture (Mulholland et al. 2002; Mulholland et

Bernhardt 2005; Fu et al. 2005; Spungin et al. 2014). Concernant les UCYN, seule une étude en laboratoire a permis de mettre en évidence une limitation de la croissance de *C. watsonii* (UCYN-B) par la disponibilité des phosphates (Dyhrman et Haley 2006).

Du fait de sa capacité à absorber plusieurs formes de phosphore organique dissous (phosphomonoesters et phosphonates) (Dyhrman et al. 2006) *T. erythraeum* semble plus adapté aux milieux pauvres en phosphates que *C. watsonii* qui possède la capacité d'hydrolyser les phosphomonoesters mais ne peut pas absorber les phosphonates (Dyhrman et Haley 2006).

Ces résultats sont en accord avec la mise en évidence d'une limitation de la fixation de N_2 par les phosphates dans l'océan Atlantique tropical Nord (Sañudo-Wilhelmy et al. 2001) ainsi qu'en Méditerranée (Ridame et al. 2011) et d'une limitation de la croissance de *Trichodesmium* spp. par les phosphates dans le Pacifique tropical Nord (Karl et al. 1992) et Sud (Moutin et al. 2005) et également dans l'Atlantique tropical Nord (Sohm et al. 2008). Enfin Turk-Kubo et al. (2012) ont récemment mis en évidence une stimulation de l'expression du gène *nifH* des UCYN-A et -B après ajout de phosphates dans des microcosmes dans l'Atlantique tropical Nord-Est.

V.3. Le fer

Les besoins photosynthétiques accrus dus à l'activité de diazotrophie entraînent également une augmentation des besoins en fer, qui est un cofacteur de plusieurs enzymes mises en jeu durant la photosynthèse. A ces besoins en fer, se rajoutent ceux liés à la synthèse du complexe protéique nitrogénase, constituée de 38 à 50 atomes de fer (Kustka et al. 2003a; Howard et Rees 2006 ; Küpper et al. 2008; Whittaker et al. 2011). L'activité de diazotrophie chez *T. erythraeum* génère des besoins importants en fer, mobilisant jusqu'à 50 % du fer intracellulaire, alors qu'en présence de NH_4^+ la réduction du taux de fixation de N_2 implique qu'environ 80 % du fer intracellulaire est dédié à la photosynthèse (Kustka et al. 2003b). De nombreuses études ont montré que le fer contrôle la croissance et la fixation de N_2 chez *Trichodesmium* sp. en culture (*e.g.* Rueter et al. 1990; Berman-Frank et al. 2001b ; Bucciarelli et al. 2013; Rochelle-Newall et al. 2014). Berman-Frank et al. (2001b) ont suggéré que *Trichodesmium* pourrait être limité par le fer dans 75 % de l'océan global. Du fait de leur récente découverte, très peu d'études concernant l'impact de la limitation en fer chez les UCYN ont été menées à ce jour. Une étude concernant l'UCYN *Cyanothece* WH8904, isolée en zone côtière, a mis en évidence une faible diminution du taux de croissance en conditions de limitation en fer, mais aucun impact sur le taux de fixation de N_2 (Berman-Frank et al. 2007). Concernant les UCYN océaniques, il a seulement été montré une

diminution des taux de croissance et de fixations de N_2 dans une culture de *C. watsonii* limitée en fer (une seule concentration en fer) par rapport à une culture non-limitée (Fu et al. 2008). Cela souligne le manque important de données concernant les facteurs de contrôle des UCYN. Dans l'océan ouvert, le rôle limitant du fer chez les cyanobactéries diazotrophes est renforcé du fait des très faibles concentrations en fer dissous dans la couche de surface (0-100m), inférieures à ~1 nM (Figure 11, Toulza et al. 2012). De plus, plus de 99 % de cette fraction se trouve sous forme complexée à des ligands organiques (Gledhill et Van Den Berg 1994; Rue et Bruland 1995) dont la biodisponibilité reste aujourd'hui très mal connue (Hunter et Boyd 2007; Shaked et Lis 2012).

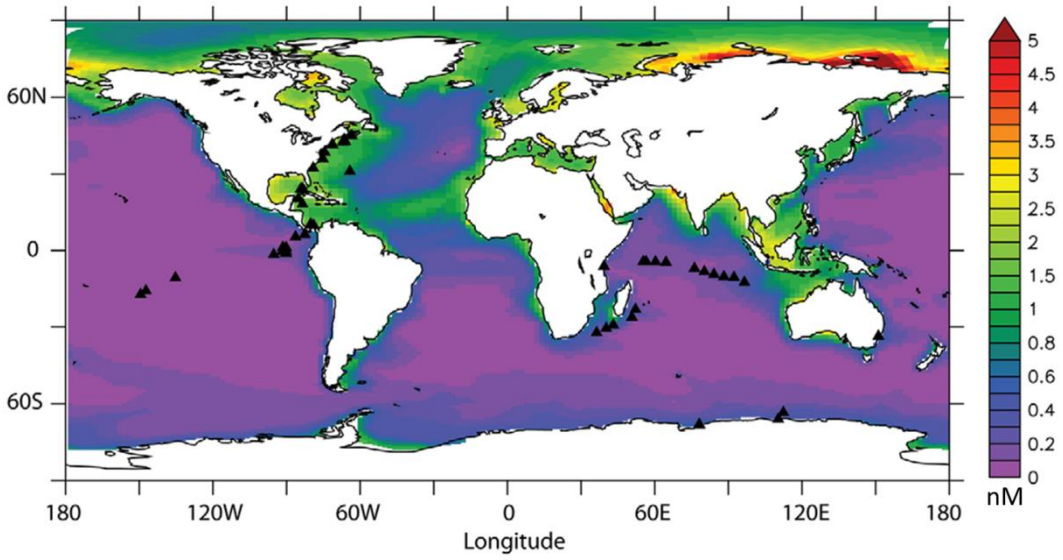


Figure 11. Moyennes annuelles des concentrations de surface (0-100m) en fer dissous (dFe, en nM) issues du modèle NEMO-PISCES (Toulza et al. 2012, Creative Commons Attribution 3.0 License).

De récentes expériences en microcosmes enrichis en fer réalisées dans le Pacifique (sub)tropical Sud ont montré que l'abondance des UCYN est contrôlée par la biodisponibilité en fer (Moisander et al. 2012). Les apports atmosphériques d'origine désertique étant la principale source de fer à l'océan ouvert (Jickells et al. 2005; Moore et Braucher 2008), ils pourraient contrôler l'intensité de la fixation de N_2 (Falkowski 1997). Par exemple, dans l'Atlantique (sub)tropical Sud, recevant de faibles apports en fer issus des poussières désertiques le taux de fixation de N_2 et l'abondance de *Trichodesmium* spp. sont plus faibles que dans l'Atlantique (sub)tropical Nord, fortement soumis à ces apports éoliens (Moore et al., 2009).

Falkowski (1997) a suggéré que la limitation de la fixation de N_2 par le fer pourrait limiter l'absorption de CO_2 atmosphérique dans l'océan actuel *via* la production primaire. De plus, selon Falkowski (1997), l'augmentation du dépôt de poussières atmosphériques d'origine désertique riches en fer à la surface des bassins océaniques centraux lors du dernier maximum glaciaire (-18 000 ans) aurait permis de stimuler la fixation de N_2 dans les zones LNLC. Cela aurait entraîné une augmentation du stock d'azote biodisponible stimulant ainsi la production nouvelle, ce qui aurait intensifié la pompe biologique de carbone et contribué à la diminution de la teneur atmosphérique en CO_2 (Falkowski 1997). Mais l'influence de la fixation de N_2 sur les grands bouleversements climatiques historiques a ensuite été fortement nuancée (Gruber 2004). L'hypothèse de Falkowski pose en effet, implicitement, le postulat que seul le fer serait l'élément limitant la fixation de N_2 océanique à l'échelle globale. Or, comme nous venons de le voir, le phosphore peut également jouer un rôle clé dans le contrôle de la fixation de N_2 et dans certaines régions océaniques, il a été montré que le P et le Fe sont co-limitants de ce processus (Mills et al. 2004).

VI. Objectifs de la thèse

Ainsi, malgré l'importance biogéochimique du processus de fixation de N_2 sur les cycles du C et du N, des inconnues subsistent, notamment en ce qui concerne ses facteurs de contrôle. La découverte récente des capacités de fixation de N_2 chez certaines cyanobactéries unicellulaires a fait émerger de nouvelles questions à ce sujet. Les UCYN contribuent de façon importante à la fixation de N_2, mais les facteurs environnementaux contrôlant leur croissance et leurs activités de diazotrophie restent peu connus. L'importance du fer dans la fixation de N_2 a conduit à de nombreuses études chez *Trichodesmium* spp. mais l'impact de sa biodisponibilité sur la croissance et l'activité des UCYN n'a jamais été caractérisé.

Le premier objectif de ma thèse a donc été de déterminer et de quantifier la réponse physiologique d'une UCYN océanique à la limitation en fer.

Pour cela une approche expérimentale a été choisie, avec la mise en place de cultures du représentant des UCYN le plus étudié : *Crocosphaera watsonii* (UCYN-B). Les résultats de cette expérience présentés dans le **chapitre 1** ont permis de déterminer et quantifier l'impact de plusieurs concentrations en fer sur différents paramètres physiologiques (croissance, volume cellulaire, contenus cellulaires en carbone, azote et chlorophylle *a*) et sur les taux de fixation de N_2 et de CO_2.

Afin d'appréhender le rôle biogéochimique des UCYN dans l'océan et de mieux comprendre le rôle joué par le fer comme facteur de contrôle, il est important de connaitre leur réponse face à un apport en fer issu de l'une des plus importantes sources à l'océan: les poussières désertiques. Pour cela **le deuxième objectif de ma thèse a été de d'étudier la réponse de *C. watsonii* a un apport en fer issu de la dissolution de poussières désertiques et de déterminer si le fer libéré par un tel apport est biodisponible pour cette UCYN.**

Une deuxième expérience en culture a été spécifiquement mise en place pour répondre à cet objectif et a permis d'observer la réponse physiologique de *C. watsonii* en culture en condition de limitation en fer lors de l'ajout d'une pluie saharienne. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le **chapitre 2**.

Dans le but d'améliorer notre compréhension des facteurs de contrôle de la fixation de N_2, il est important de comprendre les limitations de ce processus par les éléments nutritifs tels que le fer mais également les phosphates et le rôle pouvant être joué par les métaux traces, très peu connu à ce jour. L'Atlantique subtropical Nord-Est constitue pour cela une région d'étude intéressante puisque les taux de fixation de N_2 et la production primaire y sont relativement faibles alors qu'elle est soumise à d'importants apports atmosphériques, source de fer.

Le troisième objectif de ma thèse a ainsi été (i) de déterminer l'importance biogéochimique et les variations spatiales à fine échelle de la fixation de N_2 et de la production primaire dans l'Atlantique subtropical Nord-Est ainsi que la contribution de la fixation de N_2 à la production primaire et à la production nouvelle, (ii) de caractériser les facteurs de contrôle de ces deux processus et (iii) de mesurer l'impact des apports atmosphériques d'origine désertique sur ces deux processus.

Pour cela des expériences en microcosmes présentées dans le **chapitre 3** ont été réalisés lors de la campagne STRASSE (PI : Gilles Reverdin, LOCEAN) menée en Août et Septembre 2012 en Atlantique subtropical Nord. Ces expériences ont permis de mesurer la production primaire et la fixation de N_2 journalière et nocturne en surface. Elles ont également permis de mesurer la fixation de N_2 et la production primaire lors d'ajouts d'éléments potentiellement limitants (phosphates, fer et métaux traces) ou lors d'apports sahariens simulés.

Méthodologie des expériences en culture au laboratoire

Cette section présente seulement la méthodologie commune aux expériences en laboratoire présentées chapitres 1 et 2. Les protocoles expérimentaux spécifiques à chacune de ces expériences notamment en ce qui concerne la finalisation de la préparation des milieux de culture, sont présentés au début des chapitres leurs correspondants. La méthodologie des expériences en mer est intégralement décrite au début du chapitre 3, présentant ces expériences.

I. Manipulations en conditions « ultra-propres » au laboratoire

Le fer est présent de façon ubiquiste dans notre environnement. Il est donc indispensable de prendre de nombreuses précautions au laboratoire afin d'éviter toute contamination en fer due aux poussières présentes dans l'air, ou apportées par l'expérimentateur. Ces précautions consistent à travailler de façon systématique avec des techniques dites « ultra-propres ». Ainsi, toutes les manipulations ont été effectuées dans un laboratoire propre en surpression, dont l'air entrant est préalablement filtré (filtre H14) afin de minimiser la quantité de particules présentes et sous une hotte à flux laminaire stérile classe 100 exempte de métaux (ADS laminaire®, Figure 12).

Figure 12. Hotte à flux laminaire classe 100 utilisée pour les expériences de laboratoire

De l'eau ultra-pure (résistivité 18.2 MΩ.cm^{-1}, purificateurs Millipore® Elix 5 et synergy®) a été utilisée pour la préparation des réactifs et du milieu de culture. Les flacons utilisés dans l'ensemble des expérimentations de laboratoire et de terrain étaient en polycarbonate (PC) ou en polyéthylène à haute densité (HDPE). Tout le matériel a été systématiquement lavé selon le protocole suivant :

- trois rinçages à l'eau ultra-pure
- trempage une semaine dans de l'eau-ultra pure acidifiée à 5 % en volume (HCl, qualité pour analyses HPLC)
- trois rinçages à l'eau ultra-pure
- trempage une semaine dans de l'eau-ultra pure acidifiée à 5 % en volume (HCl, qualité suprapur®, Merck-Millipore®)
- trois rinçages à l'eau ultra-pure
- séchage sous la hotte à flux laminaire

Le matériel propre a ensuite été stocké dans des sacs en plastique hermétiques avant son utilisation.

De plus, afin de minimiser la présence de bactéries dans les cultures, tout le matériel entrant en contact avec le milieu de culture stérile ou les cultures elles-mêmes a été stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120°C, dans un double sac afin d'éviter toute contamination métallique due à la structure de l'autoclave elle-même. Toute manipulation impliquant l'utilisation de matériel stérile a ensuite été réalisée sous la hotte à flux laminaire stérile. Afin de tester une éventuelle contamination en fer liée à l'autoclavage, des mesures de fer total dans de l'eau ultra-pure avant et après autoclavage ont été réalisées au LISA (Laboratoire Interuniversitaire des Sciences de l'Environnement, en collaboration avec Karine Desboeufs) par Spectrométrie d'Emission Atomique avec source Plasma à couplage inductif (ICP-AES). Les concentrations étaient indétectables avant et après autoclavage (limite de détection de 0.9 nM).

II. Choix de l'espèce étudiée

L'espèce étudiée ici est l'UCYN-B *Crocosphaera watsonii* WH8501 (Figure 13) mesurant de 2 à 5 µm de diamètre (Goebel et al. 2008; Webb et al. 2009), isolée pour la première fois par John Waterbury (Waterbury et Rippka 1989) dans l'océan Atlantique sud (28°S 43°W). La souche non-axénique, cultivée au laboratoire a été fournie par Sophie Bonnet (Mediterranean Institute of Oceanography, Marseille). Il s'agissait, du début de mes travaux de thèse, de la seule espèce d'UCYN isolée dans l'océan ouvert disponible en culture. La souche WH8501 reste la plus étudiée au sein des UCYN ce qui permet de comparer les résultats obtenus lors de ces travaux avec ceux publiés dans la littérature.

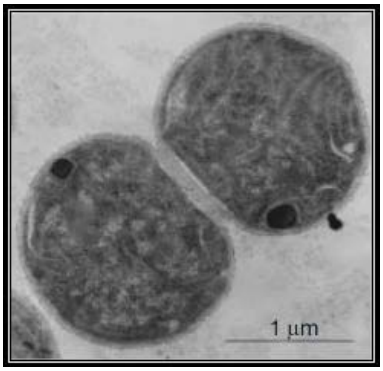


Figure 13. Photographie de *C. watsonii* WH8501 observée au microscope électronique à balayage (Zehr et al. 2001, avec la permission de John Wiley and sons, licence n°3403171243667).

III. Préparation du milieu de culture sans fer-EDTA

Le milieu de culture YBCII décrit par Chen et al. (1996) est le milieu de culture spécifique des cyanobactéries diazotrophes. En effet, il est dépourvu de toute source d'azote inorganique dissous permettant de forcer la fixation de N_2 chez ces organismes. Ce milieu a été élaboré pour une croissance optimale des cellules (Chen et al. 1996) ; il est composé de sels, de vitamines, d'un mélange de métaux traces (dont 410 nM de fer), de phosphates et d'un agent complexant de ces métaux : l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 2 µM. La composition de ce milieu a été modifiée afin de (i) faire varier les concentrations ambiantes en fer (pour une concentration en EDTA constante, cf. chapitre 1) et (ii) de modifier la nature de l'agent complexant (oxalate à la place de l'EDTA, cf. chapitre 2). Les concentrations en fer ajoutées ainsi que celles de l'agent complexant sont présentées dans les sections II.1 du chapitre 1 et III.3 du chapitre 2. La composition de base du milieu, sans fer et sans agent complexant et utilisé dans toutes les expérimentations sur culture, est présentée dans le tableau I. Près de 70 % de la masse des produits chimiques utilisés pour la préparation du milieu de culture étaient de qualité Suprapur®. La préparation des milieux de culture spécifiques des expérimentations présentées aux chapitres 1 et 2 est détaillée dans les sections II.1 et III.1 de ces chapitres respectifs.

Tableau I. Composition de base du milieu YBCII, sans fer et sans agent complexant (modifié d'après Chen et al. 1996).

Type de composé	Nom du compose	Concentration ($mol.L^{-1}$)
Sels	NaCl	$4.2\ 10^{-1}$
	KCl	$1\ 10^{-2}$
	$MgCl_2$	$2\ 10^{-2}$
	$CaCl_2$	$1\ 10^{-2}$
	$MgSO_4$	$2.5\ 10^{-2}$
	KBr	$9.7\ 10^{-4}$
	H_3BO_3	$5.8\ 10^{-4}$
	$SrCl_2$	$6.5\ 10^{-5}$
	NaF	$7\ 10^{-5}$
	LiCl	$2.5\ 10^{-5}$
Vitamines	Thiamine	$2.96.10^{-7}$
	Biotine	$2.05\ 10^{-9}$
	B_{12}	$3.69\ 10^{-10}$
Métaux	Mn	$2\ 10^{-8}$
	Zn	$4\ 10^{-9}$
	Co	$2.5\ 10^{-9}$
	Mo	$1.1\ 10^{-8}$
	Cu	$1\ 10^{-9}$
Carbone inorganique	$NaHCO_3$	$2.5\ 10^{-3}$
Nutriment	KH_2PO_4	$2\ 10^{-5}$

IV. Cultures de *Crocosphaera watsonii* WH8501

Les expériences sur cultures ont été menées en milieu fermé (ou «batch »), c'est-à-dire sans entrée ni sortie de milieu de culture, à l'inverse de la culture continue en chemostat. La courbe de croissance caractéristique de cellules cultivées selon cette méthode peut être divisée en différentes phases (Figure 14). Après repiquage des cellules, il peut être observé une phase de latence (I) correspondant au temps d'adaptation des organismes à leur nouveau milieu, suivie éventuellement d'une phase d'accélération de la croissance (II). Les cellules entrent ensuite en phase de croissance exponentielle (III), au cours de laquelle la division cellulaire atteint une vitesse maximale conduisant à un taux de croissance maximal et constant. C'est durant cette phase qu'est calculé le taux de croissance de l'espèce, noté μ, pour les conditions nutritives du milieu. Enfin, les cellules présentent une phase de ralentissement de croissance (IV) suivie par une phase stationnaire (V) où la biomasse est constante et la croissance nulle, pour finir par une phase de décroissance.

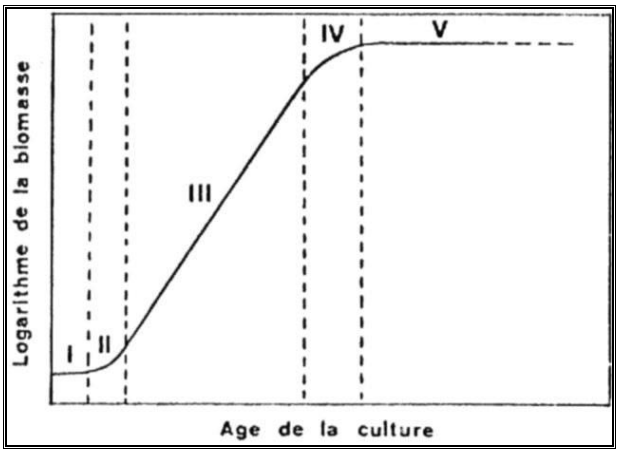


Figure 14. Courbe de croissance d'une culture unicellulaire en milieu aqueux fermé. La biomasse est reportée sur une échelle logarithmique et le temps sur une échelle arithmétique. Les chiffres romains correspondent aux différentes phases de croissance : I : phase de latence, II : phase d'accélération de la croissance, III : phase de croissance exponentielle, IV : phase de diminution de la croissance et V : phase stationnaire.

Les cellules de *C. watsonii* cultivées au laboratoire ont été acclimatées aux différentes concentrations en fer pendant au minimum 20 générations, ce qui est plus long que les temps d'acclimatation généralement trouvés dans la littérature (5 à 10 générations, *e.g.* Kustka et al. 2003b; Berman-Frank et al. 2007; Fu et al. 2008). Le maintien de ces cultures a été effectué par repiquages successifs (environ toutes les 1 à deux semaines) en prélevant 3 mL de culture introduits dans 30 mL de nouveau milieu. Ce repiquage a été effectué tous les 10-15 jours et les cultures sont ainsi conservées par repiquages successifs au laboratoire.

Toutes les expériences présentées ici (chapitres 1 et 2) ont été réalisées à l'aide de triplicats de culture. Les cultures ont été incubées dans des flacons en polycarbonate placés à l'intérieur d'une armoire thermostatée (Sanyo® MLR-350) permettant de maintenir une température constante de 27.5°C, optimale pour la croissance (Webb et al., 2009) (Figure 15A). Les cultures ont été soumises à un cycle lumineux de 12h à une irradiance de ~150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, correspondant à son optimum de croissance (Goebel et al. 2008) (Figure 15B), suivi de 12h d'obscurité. Les cultures ont été placées sur des tables agitatrices afin de favoriser leur suspension dans le milieu.

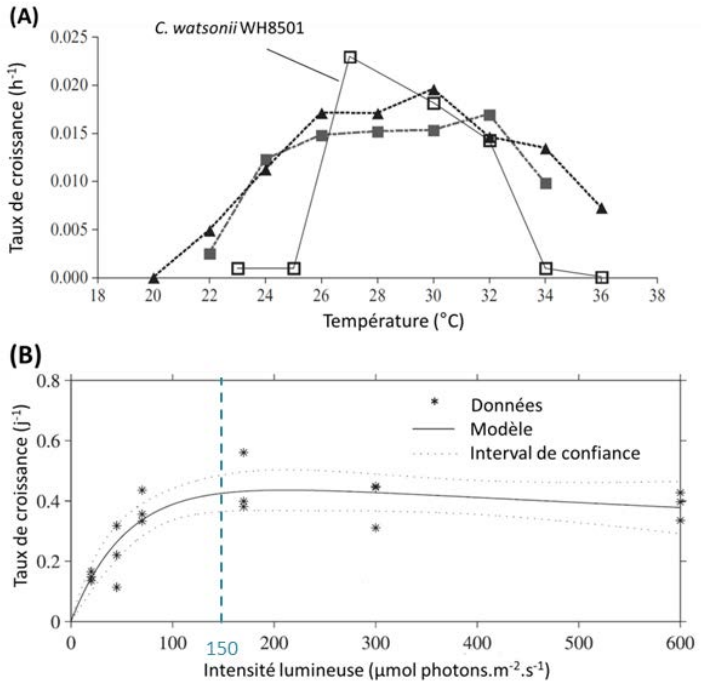


Figure 15. (A) Taux de croissance (en h^{-1}) de *C. watsonii* WH8501 (carré blanc) en fonction de la température, d'après Webb et al. (2009) (avec la permission de John Wiley and sons, licence n° 3325410092108). (B) Taux de croissance (en j^{-1}) *C. watsonii* WH8501 en fonction de l'intensité lumineuse d'après Goebel et al. (2008) (avec la permission de John Wiley and sons, licence n° 3403180464637).

V. Les paramètres mesurés dans les cultures

V.1. Abondance cellulaire

L'abondance de *C. watsonii* a été mesurée régulièrement par comptage visuel des cellules à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse 50i) avec un objectif permettant un grossissement x40 (Figure 16A). Pour cela un échantillon de culture a été prélevé et rapidement placé sur une cellule de Malassez d'une contenance d'un microlitre sur laquelle est gravée un micro-quadrillage (Figure 16B). La fluorescence de la chlorophylle *a* (chl*a*) contenue dans les cellules permet de visualiser et ainsi de compter les cellules vivantes (Figure 16B). Le taux de croissance, µ, a été calculé à partir des abondances cellulaires en phase exponentielle de croissance pour chacune des cultures. Il correspond à la pente de la droite du logarithme népérien de l'abondance en fonction du temps. Le temps de doublement de la population a été calculé selon : ln2/µ.

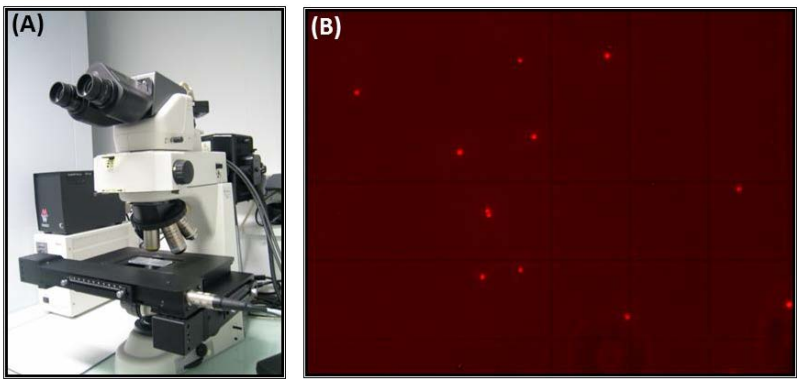


Figure 16. (A) Microscope à épifluorescence Nikon Eclipse 50i utilisé pour les comptages cellulaires. (B) Photographie de *C. watsonii* WH8501 observées au microscope à épifluorescence (grossissement x40) avec réémission de la florescence de chl*a* contenue dans les cellules vivantes apparaissant en surbrillance rouge. Le quadrillage de la cellule de Malassez apparaît en fond.

V.2. Concentration de chlorophylle *a*

Afin de mesurer la concentration en chl*a* dans les cultures et ainsi de calculer les contenus cellulaires en chl*a*, des échantillons de culture en phase exponentielle de croissance (de 10 à 100 mL selon la concentration en fer dans les cultures) ont été délicatement filtrés (à pression inférieure à 200 mbar) sur des filtres en microfibre de verre de porosité 0.7 µm (GF/F, Whatman®). Les filtres ont ensuite été conservés à -25°C jusqu'à l'analyse. Après extraction dans de l'acétone à 90 %, la fluorescence de la chl*a* a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Hitachi F-4500®). La chl*a* a été excitée dans une gamme de longueur d'onde allant de 390 à 480 nm et la fluorescence émise a été recueillie à 670 nm (Strickland et Parsons, 1972; Dandonneau et Neveux, 2002). Les contenus cellulaires en chl*a* de *C. watsonii* ont été calculés en divisant les concentrations obtenues pour chaque culture par l'abondance cellulaire du jour de l'échantillonnage.

V.3. Taux de fixation de CO_2 et de N_2 et contenus cellulaires en carbone et azote

Les taux de fixation de CO_2 ont été déterminés par ajout de l'isotope stable ^{13}C (Hama et al. 1983) en procédant de la manière suivante : sept heures après le début de la période lumineuse, des sous-échantillons de cultures en phase exponentielle de croissance (de 25 à 500 mL) ont été incubés pendant 3h30 en présence d'un ajout de $NaH^{13}CO_3$ (99 %, Eurisotop®) conduisant à un enrichissement d'environ 10 %. A la fin de la période d'incubation, les échantillons ont été

délicatement filtrés (pression inférieure à 200 mbar) sur des filtres GF/F de 25mm, préalablement grillés pendant 8h à 450°C, puis ces échantillons ont été stockés à -25°C avant leur analyse. Les taux de fixation de N_2 ont été déterminés par ajout de l'isotope stable du N_2 gazeux : le $^{15}N_2$ (Montoya et al. 1996). Pour cela, des incubations ont été réalisées le même jour que celles pour la détermination des taux de fixation de CO_2, mais en période d'obscurité puisque *C. watsonii* effectue une fixation de N_2 nocturne (*e.g.* Tuit et al., 2004) afin de palier à l'effet inhibiteur de l'oxygène produit lors de la photosynthèse sur la nitrogénase (Großkopf et Laroche 2012). Ainsi, deux heures après le début de la période d'obscurité, des sous-échantillons de cultures (de 45 à 630 mL) ont été prélevés et transférés dans des bouteilles en polycarbonate, en prenant soin de ne laisser aucune bulle d'air dans la bouteille avant de la refermer avec un bouchon muni d'un septum. Le $^{15}N_2$ gazeux (98.3 %, EURISOTOP®) a été ajouté à l'aide d'une seringue étanche de façon à obtenir un enrichissement final d'environ 10 %. Les flacons ont ensuite été agités plusieurs fois, puis incubés durant 3h30. Les filtrations et le stockage des filtres ont été réalisés comme décrit dans le paragraphe précédent.

Les taux de fixation de N_2 et de CO_2 de *C. watsonii* ne sont pas constants durant les phases sombres et lumineuses (*e.g.* Mohr et al. 2010a; Dron et al. 2012a); la Figure 17 permet de visualiser les périodes d'incubation réalisées ici sur des courbes journalières des taux de fixation de N_2 et du rendement photosynthétique de *C. watsonii* issues de la littérature (Mohr et al. 2010a).

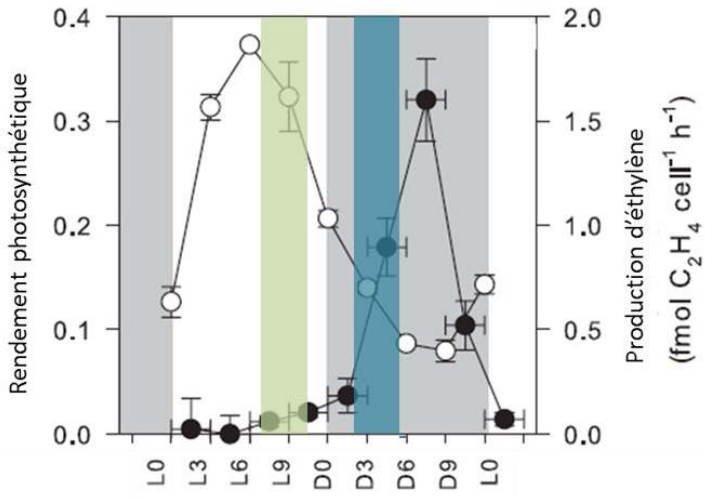


Figure 17. Rendement photosynthétique (point blanc) et fixation de N_2 (représentée par la production d'éthylène, point noir) de *C. watsonii* WH8501 en conditions optimales de croissance au cours d'un cycle de 12h de lumière (région blanche) et 12h d'obscurité (région grisée). Les zones verte et bleue correspondent respectivement aux périodes d'incubation pour les mesures des taux de fixation de CO_2 et de N_2 réalisées dans cette étude. L'axe des abscisses représente le nombre d'heures après le début de la période lumineuse (L) ou de la période obscure (D). (Mohr et al. 2010a, avec la permission de John Wiley and sons, licence n° 3403180612744).

Avant analyse, les filtres ont été séchés dans une étuve à 40°C pendant 48h. Les teneurs en carbone et azote organique particulaire (respectivement notés COP et NOP), ainsi que les enrichissements de la matière particulaire en ^{13}C et ^{15}N ont été analysés en IRMS (isotopic ratio mass spectrometer), de type Delta plus, Thermo Fisher Scientific® couplé à un analyseur élémentaire (de type CE Flash, Thermo Fisher Scientific®) via une interface de type III en collaboration avec Stéphane L'Helguen (Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR), Brest). Les écart-types spécifiques de cet appareil sont de 0.009 $\mu mol.L^{-1}$ et 0.004 $\mu mol.L^{-1}$ respectivement pour le COP et le NOP et de 0.0002 % et 0.0001 % respectivement pour les enrichissements en ^{13}C et ^{15}N.

Le rapport COP/NOP noté (C/N) de la matière organique particulaire a été calculé pour les périodes lumineuse et obscure. Les contenus cellulaires en C et N ont été calculés en divisant les concentrations de COP et NOP de jour par l'abondance cellulaire mesurée le jour de l'échantillonnage (en période lumineuse). Les taux de fixation de CO_2 ont été calculés selon le bilan de masse isotopique décrit par Hama et al. (1983). Les taux de fixation de N_2 ont été déterminés d'après le bilan de masse isotopique de Montoya et al. (1996) basé sur le coefficient de solubilité de Weiss (1970) supposant un équilibre complet et rapide entre le $^{15}N_2$ gazeux et l'eau de mer.

La méthode utilisée pour la détermination des taux de fixation de N_2 par ajout de gaz $^{15}N_2$ a conduit à la sous-estimation des flux. En effet, il a récemment été montré par Mohr et al. (2010b) que l'équilibre isotopique entre le $^{15}N_2$ gazeux et l'eau de mer n'est pas atteint pour le temps d'incubation de 3.5h utilisé ici (Figure 18). Mohr et al. (2010b) ont mesuré, entre 0 et 3.5h d'incubation, une concentration moyenne de $^{15}N_2$ dissous égale à 24 % de la concentration calculée pour un équilibre complet (W. Mohr, comm. pers.). Cette dissolution incomplète entraîne donc, pour une incubation de 3.5h, une sous-estimation de 76 % des taux de fixation de N_2 mesurés par la méthode d'ajout du $^{15}N_2$ gazeux par rapport à la méthode d'injection d'eau de mer enrichie en $^{15}N_2$ permettant un équilibre complet (Mohr et al. 2010b; Wilson et al. 2012). Nous avons ainsi ré-estimé les taux de fixation de N_2 initialement déterminés dans nos expérimentations sur cultures à partir d'une quantité de $^{15}N_2$ initiale égale à 24 % de celle estimée d'après Montoya et al. (1996) selon le coefficient de solubilité de Weiss (1970).

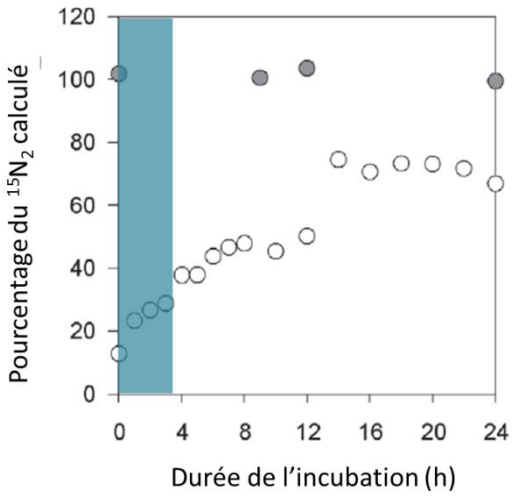


Figure 18. $^{15}N_2$ dissous mesuré dans du YBCII après injection de $^{15}N_2$ gazeux (point blanc) ou d'eau de mer enrichie en $^{15}N_2$ (points gris) exprimé en pourcentage par rapport à la concentration calculée en supposant un équilibre isotopique rapide et complet. D'après Mohr et al. (2010b, Creative Commons Attribution 3.0 License). La zone bleue correspond à la durée d'incubation de nos échantillons pour la mesure des taux de fixation de N_2.

V.4. Dosage des phosphates dans les cultures

La concentration en phosphates a été mesurée durant la phase stationnaire de croissance. Pour cela, 10 mL de culture ont été filtrés à l'aide d'un 'filtre seringue' (PES, Minisart®) de porosité 0.2 µm monté sur une seringue, puis ces filtrats ont été stockés à -25°C jusqu'à leur analyse. Les phosphates ont été dosés par la méthode colorimétrique par spectrophotométrie manuelle (Murphy et Riley, 1962; Strickland et Parsons, 1972). Cette méthode permet d'analyser uniquement le phosphore sous forme de phosphates via l'ajout d'un réactif acide contenant des ions molybdates permettant de former un complexe phospho-molybdique dont l'absorbance a été mesurée à 887 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Bioblock scientific®). La concentration en phosphates a ensuite été calculée à l'aide d'une droite d'étalonnage préparée le jour des analyses. La limite de détection est de 0.03 µM.

CHAPITRE 1

Réponse physiologique de *C. watsonii* à la limitation en fer : expériences en culture

I. Introduction et objectifs

Malgré l'importance biogéochimique du processus de fixation de N_2 sur les cycles de l'azote et du carbone, ses facteurs de contrôle et notamment ceux concernant les UCYN récemment découvertes (Zehr et al. 2001) restent mal connus. Or, les taux de fixation de N_2 associés aux UCYN peuvent être équivalents à l'échelle globale, voir supérieurs à l'échelle régionale, à ceux de *Trichodesmium* spp. (Bonnet et al. 2009; Monteiro et al. 2010). Jusque très récemment, seule une UCYN isolée en océan ouvert était disponible en culture : *Crocosphaera watsonii*, appartenant au groupe des UCYN-B. Sa croissance en culture est contrôlée par l'intensité lumineuse (Goebel et al. 2008; Garcia et al. 2013) et par la température (Webb et al. 2009), ce qui est cohérent avec les observations faites en milieu naturel (Moisander et al. 2010). Concernant les facteurs de contrôle en lien avec la disponibilité des nutriments, très peu d'études ont été menées à ce jour sur les UCYN comparé aux cyanobactéries filamenteuses *Trichodesmium* spp.. Dyhrman et Haley (2006) ont mis en évidence chez *C. watsonii* un contrôle de la croissance par la concentration ambiante en phosphates. Le fer est largement suspecté comme un facteur de contrôle important de la diazotrophie, le complexe protéique nitrogénase étant constitué de deux protéines métalliques (Figure 1.1) (Howard et Rees 2006; Seefeldt et al. 2009) :

- la dinitrogénase réductase (codée par le gène *nifH*), formée de sous-unités reliées par un centre 4Fe/4S, permet un transfert d'électrons vers la dinitrogénase.
- La dinitrogénase catalyse la réduction à proprement dit du N_2 en NH_3 et est formée de deux sous unités comprenant chacune un centre 8Fe/7S et associées chacune à un cofacteur Fer-Molybdène, contenant 7 atomes de fer et 1 atome de molybdène.

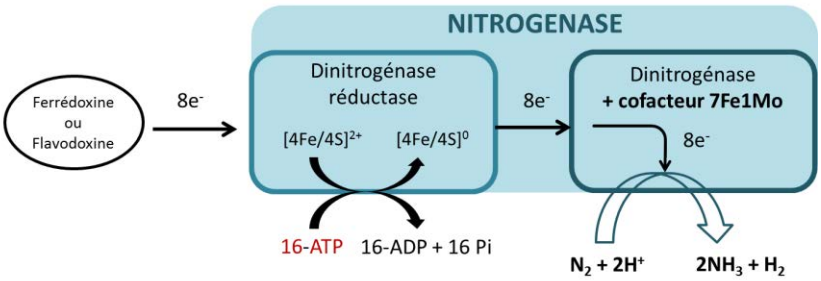


Figure 1.1. Schéma conceptuel du fonctionnement du complexe enzymatique nitrogénase (fond bleu) constituée de deux protéines métalliques (encadrés bleus) : la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase associée à un cofacteur Fer-Molybdène (FeMo). La dinitrogénase réductase contient un centre 4Fe/4S de charge totale +2, réduit lors du processus de fixation de N_2 à une charge totale neutre (d'après Howard et Rees 1996; 2006; Seefeldt et al. 2009).

La dinitrogénanse réductase est généralement présente selon un rapport 2:1 à 5:1 par rapport à la dinitrogénase soit au total 38 à 50 atomes de fer pour le complexe nitrogénase (Kustka et al. 2003a; Howard et Rees 2006; Küpper et al. 2008; Whittaker et al. 2011).

De plus, le fort coût énergétique de ce processus (16 molécules d'ATP par molécule de N_2 fixée) (Figure 1.1) (Howard et Rees 1996; Seefeldt et al. 2009), impose une activité photosynthétique accrue afin de fournir suffisamment d'énergie à la cellule (Raven 1988; Kustka et al. 2003a). Cela entraine des besoins supplémentaires en fer, celui-ci jouant un rôle de donneur d'électrons dans de nombreuses enzymes photosynthétiques (Behrenfeld et Milligan 2013). Les très faibles concentrations de surface en dFe dans l'océan ouvert (< 1 nM, Figure 11) (Toulza et al. 2012), renforcent ce rôle limitant du fer sur la fixation de N_2 océanique. Il a été montré chez *C. watsonii* une modification dans l'expression de certaines protéines (*e.g.* la protéine IdiA ou la ribulose-biphosphate carboxylase) en condition de stress en fer (Webb et al. 2009; Saito et al. 2011). Une seule étude, axée sur l'interaction entre les changements de pCO_2 et la limitation en fer, a mis en évidence une diminution du taux de croissance et du taux de fixation de N_2 pour des cellules de *C. watsonii* cultivées dans un milieu appauvri en fer, relativement à un milieu non-limitant en fer (Fu et al. 2008). Si la réponse physiologique de la cyanobactérie filamenteuse *Trichodesmium* spp. en réponse à la limitation en fer a été particulièrement étudiée (voir chapitre « introduction générale »), celle des UCYN reste très mal caractérisée et doit être quantifiée.

L'objectif de ce chapitre est donc de **déterminer et quantifier l'impact de la limitation en fer sur la croissance et l'activité de *C. watsonii.*** Pour cela une approche en culture a été choisie afin de caractériser la réponse physiologique de cette UCYN en présence de huit concentrations en fer. Les résultats obtenus permettront alors d'améliorer notre compréhension du contrôle du fer sur la fixation de N_2 océanique, mais aussi d'améliorer les connaissances concernant les UCYN afin de mieux comprendre leur biogéographie et d'affiner leur paramétrisation dans les modèles biogéochimiques.

Les principaux résultats de cette l'étude ont fait l'œuvre d'une publication en 2014 dans Plos one (Jacq et al. 2014) présentée en annexe 1.

II. Protocole expérimental pour la détermination de l'influence de la disponibilité en fer chez C. watsonii

II.1. Préparation du milieu de culture

La composition du milieu de culture sans fer et sans agent complexant est indiquée chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire » section III puis le milieu spécifique aux expériences présentées dans ce chapitre 1 a été préparé selon le protocole suivant : Après ajout des sels dans de l'eau ultra-pure, le pH a été ajusté à 8.15 (pH-mètre Orion 3 star Thermo®) à l'aide d'une solution de NaOH (qualité suprapur®). Le milieu a ensuite été stérilisé par autoclavage (20 min à 120°C). Après refroidissement à température ambiante, des solutions stériles ('filtre seringue' en polyethersulfone de porosité 0.2 µm Minisart®) de vitamines, phosphates, bicarbonates ($NaHCO_3$) ainsi qu'une solution stérile contenant un mélange de métaux traces (excepté le fer) ont ensuite été ajoutés. Le pH a été mesuré dans un aliquote de milieu et ajusté à 8.15, si nécessaire, avec une solution stérile de NaOH (filtration 0.2 µm) de qualité Suprapur®. Puis, du fer ($FeCl_3$) complexé à de l'EDTA a été ajouté au milieu de culture de façon à obtenir une gamme de 8 concentrations en fer total (noté Fe par la suite). Après ajout du fer complexé à l'EDTA, le milieu a été stérilisé à nouveau à l'aide d'une unité de filtration sous vide munie d'une membrane en polyethersulfone de porosité 0.2 µm (Nalgène®). Cette deuxième étape de stérilisation du milieu est nécessaire, les solutions de fer-EDTA ajoutées dans le milieu n'étant elles-mêmes pas stériles. De plus cela permet d'éliminer d'éventuelles particules de $NaHCO_3$ qui auraient pu se former durant les quelques jours de conservation (à 4°C) du milieu avant l'ajout de fer. Toutes les membranes utilisées pour la filtration des solutions ou du milieu n'ont pas subit de protocole de lavage à l'acide.

Des mesures de concentration en dFe (< 0.2 µm) dans du milieu stérilisé, avant ajout de fer, ont été effectuées (analyse en flux par injection continue avec pré-concentration en ligne et détection par chimiluminescence, FIA, en collaboration avec Matthieu Bressac et Cécile Guieu, Laboratoire d'océanographie de Villefranche sur mer (LOV), UPMC). Ces mesures ont montré la présence d'une contamination résiduelle dans le milieu de 3.3 nM de dFe. Cette valeur a donc été systématiquement inclue dans les résultats et les 8 concentrations en Fe résultantes dans les milieux de culture sont ainsi comprises entre 3.3 et 403.3 nM (Tableau 1.I). La concentration d'EDTA a été maintenue constante à 2 µM dans toutes les cultures.

II.2. Détermination de Fe'

Dans l'eau de mer (naturelle ou artificielle), le fer existe principalement sous deux états d'oxydation : Fe(II) et Fe(III). La concentration en Fe(II) peut être négligée car dans le milieu oxydant que constitue l'eau de mer, il est rapidement oxydé en Fe(III) par l'oxygène ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) suivant une cinétique de réaction de l'ordre de la minute (Millero et al., 1987). Le Fe(III) inorganique dissous, noté **Fe'**, existe dans l'eau de mer majoritairement sous forme d'espèces hydrolysées : **$Fe(OH)_2^+$; $Fe(OH)_3^0$ et $Fe(OH)_4^-$** (Figure 1.2) (Hudson et Morel 1990; Millero et al. 1995; Waite 2001). Il existe un équilibre permanent entre ces formes hydrolysées dû à leurs cinétiques d'échanges ce qui permet de les considérer comme un seul groupe réactif (Sunda 2001). Les concentrations en $Fe(OH)^{2+}$ et Fe^{3+} peuvent être négligées, le rapport de concentration entre ces formes et Fe' étant inférieur à 10^{-10} au pH de l'eau de mer (Hudson et Morel 1990; Millero et al. 1995) (Figure 1.2).

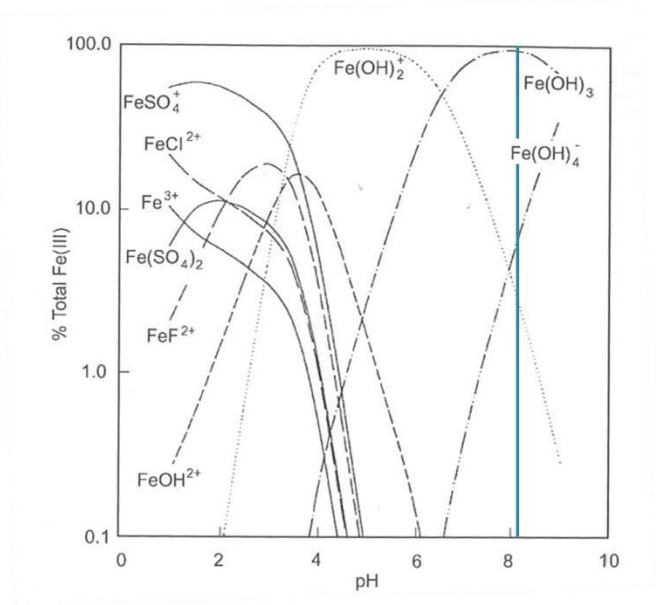


Figure 1.2. Spéciation du Fe(III) dans l'eau de mer (S = 35) en fonction du pH. (Millero et al. 1995, avec la permission d'Elsevier licence n°3403180910386). La barre verticale bleue indique le pH du milieu de culture (8.15).

Au-delà de la limite de solubilité du Fe', dépendante du pH, de l'intensité lumineuse et de la température (Sunda et Huntsman 2003), les formes hydrolysées précipitent sous forme d'hydroxydes de fer (Waite 2001). Dans le milieu marin, la présence de ligands organiques va prévenir cette précipitation du fer (Hunter et Boyd 2007). Dans un milieu de culture tel que le YBCII, ce rôle est assuré par l'EDTA, un agent artificiel chélateur des métaux traces permettant

d'obtenir une concentration métallique constante et contrôlée (Sunda et al. 2005). Dans une eau de mer artificielle en présence d'EDTA, les complexes Fe-EDTA sont peu susceptibles d'être directement assimilés par le phytoplancton (Shaked et al. 2005) et seule la fraction inorganique dissoute Fe' est supposée biodisponible (Hudson et Morel 1990; Sunda 2001). Cette fraction Fe' correspond donc, dans notre milieu de culture, au dFe non complexé à l'EDTA (Sunda et Huntsman 2003, réaction 1.1)

$$Fe' + EDTA^* \leftrightarrow \sum FeEDTA(OH)_i^{-1-i} \qquad \text{(réaction 1.1)}$$

avec :

- EDTA*: la concentration en EDTA dit « libre » ($CaEDTA^{2-}$ et $MgEDTA^{2-}$)
- Fe': les formes inorganiques dissoutes hydrolysées $Fe(OH)_2^+$; $Fe(OH)_3^0$ et $Fe(OH)_4^-$
- $\sum FeEDTA(OH)_i^{-1-i}$: la somme des complexes Fe-EDTA ($FeEDTA^-$, $FeEDTA(OH)^{2-}$ et $FeEDTA(OH)_2^{3-}$).

Les concentrations en Fe' dans les différents milieux utilisés ici ont été déterminées à partir des constantes de complexation avec l'EDTA publiées par Sunda et Huntsman (2003), qui tiennent compte du pH, de l'intensité lumineuse et de la température. En effet, la constante de dissociation du complexe Fe-EDTA augmente avec le pH et l'intensité lumineuse (du fait de la photodissociation du complexe) ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration en Fe' (Sunda et Huntsman 2003). Ce phénomène de photodissociation est néanmoins diminué pour des températures élevées (supérieure à 20°C, Sunda et Huntsman (2003)). Les concentrations en Fe' calculées pour nos conditions de culture (pH, température et intensité lumineuse), en accord avec William Sunda (comm. pers.) sont présentées Tableau 1.I. Le rapport de concentrations entre la forme ionique libre Fe^{3+} et Fe' de $4.3x10^{-11}$ dans nos milieux de culture confirme le fait que la concentration en Fe^{3+} est bien négligeable devant celle de Fe'.

Tableau 1.I. Concentrations en fer total (Fe) et en fer inorganique dissous (Fe') dans les milieux de culture lors du repiquage. Les valeurs en italique représentent les concentrations en Fe' supérieures à la limite de solubilité du Fe' déterminée expérimentalement par Sunda et Huntsman (2003). La concentration d'EDTA est de 2 µM dans tous les milieux de cultures.

Fe (nM)	3.3	5.3	8.3	13.3	23.3	43.3	103.3	403.3
Fe' (nM)	0.16	0.26	0.41	0.66	1.16	*2.16*	*5.16*	*20.16*

Il est important de noter que les trois concentrations en Fe' les plus élevées (Fe' = 2.16, 5.16 et 20.16 nM) sont supérieures à la limite de solubilité du Fe' de ~1.45 nM déterminée expérimentalement par Sunda et Huntsman (2003) dans des conditions de culture proches des nôtres (pH = 8, EDTA = 3 µM et Fe =20 nM). Néanmoins, la solubilité du Fe' augmente avec le pH et des concentrations en Fe' de 2.7 nM ont été mesurées pour un pH de ~9 en présence de 20 nM de Fe et 50 µM d'EDTA (Sunda et Huntsman 2003). Il est également à noter que Sunda et Huntsman (2003) ont effectué leurs mesures pour des concentrations de 20 nM de Fe. En accord avec William Sunda, nous avons choisi d'utiliser la valeur de 1.45 nM comme limite de solubilité de Fe' tout en étant conscient que cette valeur peut être sous-estimée pour nos conditions de culture. Ainsi **en théorie les concentrations en Fe', seule forme supposée biodisponible dans le milieu, sont identiques (~1.45 nM) dans les cultures à 403.3, 43.3 et 23.3 nM de Fe.** Les résultats de ce chapitre sont présentés à la fois en fonction des concentrations en Fe et Fe'. La variation de pH entre le début et la fin de la phase exponentielle est en moyenne de 0.2 unités, ce qui limite les effets du pH sur la spéciation du fer. De plus, ces faibles variations de pH indiquent qu'il n'y a pas eu de limitation par le carbone inorganique dissous.

II.3. Mesure du volume cellulaire

Pour quatre traitements en fer : Fe = 403.3, 43.3, 13.3 et 3.3 nM, des cellules ont été collectées en phase exponentielle par filtration (pression < 200 mbar) sur membrane en polycarbonate (0.4 µm de porosité). Ces prélèvements ont été réalisés 1h après le début de la phase d'obscurité. Les échantillons ont ensuite été préparés et analysés à la plate-forme de microscopie électronique de l'UPMC (FRE3595) en collaboration avec Michaël Trichet selon le protocole suivant : la membrane a été incubée une nuit avec un fixateur à osmolarité ajustée (Glutharaldehyde 3 % dans 0.1M de cacodylate à pH 7.4 et NaCl à 1.75 %). L'impact de ce fixateur sur la taille des cellules n'a pas été testé ici. Le lendemain matin, après un lavage des membranes, les cellules ont été à nouveau fixées pendant 1h (tétra-oxyde d'osmium 1 % dans 0.1M de cacodylate tamponné avec du NaCl à 1.75 %), puis déshydratées selon la technique du séchage par contournement du point critique. Cette technique évite les dommages causés par les augmentations de température et de pression nécessaires à la déshydratation, notamment sur la morphologie des cellules du fait de leur contenu en eau. Pour cela, toute l'eau des cellules a été remplacée par du CO_2 liquide grâce à un fluide d'échange, ici de l'éthanol ajouté selon un gradient de concentration croissant (50, 70, 96 et 100 %). Grâce à ce remplacement, la

déshydratation a été effectuée en soumettant l'échantillon à de moins fortes augmentations de pression et de température, le « point critique » d'évaporation du CO_2 étant situé à de plus faibles température et pression que celui de l'eau. Cette étape a été effectuée avec un appareil de séchage au point critique (CPD 7501, Quorum Technologies®). Une fois déshydratées, les cellules ont été métallisées (Métaliseur Scancoat Six, Edwards®) puis observées en microscopie électronique à balayage (MEB, Scanning Electron Microscope, Cambridge Stereoscan S260, FRE3595, UPMC, Paris). Les images obtenues ont été traitées avec le logiciel de traitement et d'analyse d'images « Image J » (1.43u, Schneider et al., 2012) afin de mesurer avec précision le diamètre des cellules. Entre 6 et 10 images par culture ont ainsi été sélectionnées. *C. watsonii* pouvant être assimilée à une sphère, son volume et sa surface ont été déterminés par les formules suivantes :

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad \text{et} \quad S = 4\pi r^2 \quad \text{(2) et (3)}$$

avec V le volume, S la surface et r le rayon.

II.4. Non-axénie des cultures

Nos cultures de *C. watsonii* ne sont pas axéniques. Afin de minimiser le développement bactérien, le matériel de culture a été systématiquement stérilisé et les cultures manipulées uniquement sous hotte à flux laminaire stérile. Le biovolume des bactéries (Troussellier et al. 1999) a été déterminé par cytométrie en flux (collaboration avec Philippe Catala, Laboratoire d'Océanographie MICrobienne (LOMIC), Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer, UPMC) dans des triplicats de cultures pour 5 des 8 concentrations en Fe étudiées. Leur contenu cellulaire en carbone a ensuite été estimé à partir du biovolume selon la relation déterminée par Gundersen et al. (2002), ce qui a permis d'estimer leur biomasse. Le COP bactérien représente ainsi en moyenne 2.8 ± 0.9 % du COP total des cultures.

II.5. Autres paramètres mesurés

L'abondance cellulaire, les concentrations en chlorophylle *a*, les taux de fixation de N_2 et CO_2 ainsi que le COP et le NOP ont été mesurés selon les protocoles décrits dans le chapitre

méthodologie générale. Les flux de fixation de N_2 ont été ré-estimés en se basant sur les résultats de Mohr et al. (2010b) pour un temps d'incubation de 3.5h (surestimation du $^{15}N_2$ dissous de 76 %, cf. chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire », section V.3)

II.6. Comparaison de deux méthodes de détermination de l'abondance cellulaire : Malassez et cytométrie en flux

Des comptages en cytométrie en flux (collaboration avec Philippe Catala, LOMIC observatoire océanologique de Banyuls sur mer, UPMC) ont été réalisés en parallèle de ceux sur cellule de Malassez pour 5 des 8 traitements en fer (Figure 1.3)..

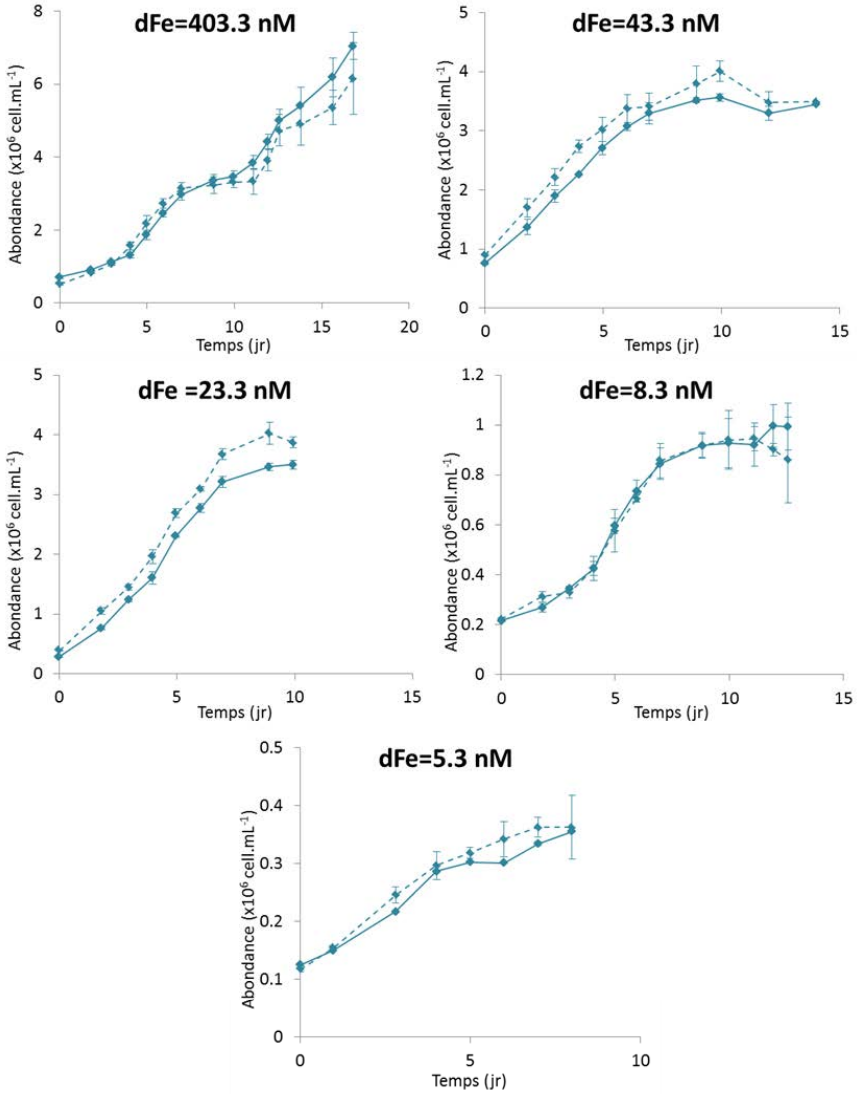


Figure 1.3. Abondances de *C. watsonii* obtenues par comptage sur cellule de Malassez (trait pointillé) et par cytométrie en flux (trait plein).

Les abondances obtenues par cytométrie en flux représentent 105 ± 15 % des abondances issues des comptages sur cellules de Malassez, ce qui valide la technique de comptage « à l'œil » effectuée au laboratoire permettant d'obtenir les abondances en temps réel

II.7. Expériences complémentaires

Des expériences complémentaires ont été menées dans le but de déterminer l'élément responsable de l'arrêt de la croissance des cellules. Pour cela, des ajouts de Fe + EDTA ou de phosphates ont été réalisés selon le protocole schématisé Figure 1.4. Dans des cultures en phase stationnaire, chacun des triplicats de cultures à Fe = 43.3, 23.3 et 5.3 nM a été séparé en deux. Un ajout de Fe + EDTA a été effectué dans l'une des sous cultures et la deuxième a été gardée comme contrôle. Chacun des triplicats de la culture à Fe = 403.3 nM a été séparée en trois au moment de la phase stationnaire. , Un ajout de Fe + EDTA a été effectué dans une des sous-cultures, un ajout de phosphates dans une seconde et la troisième a été gardée comme contrôle. L'abondance a été mesurée dans les différents traitements pendant plusieurs jours.

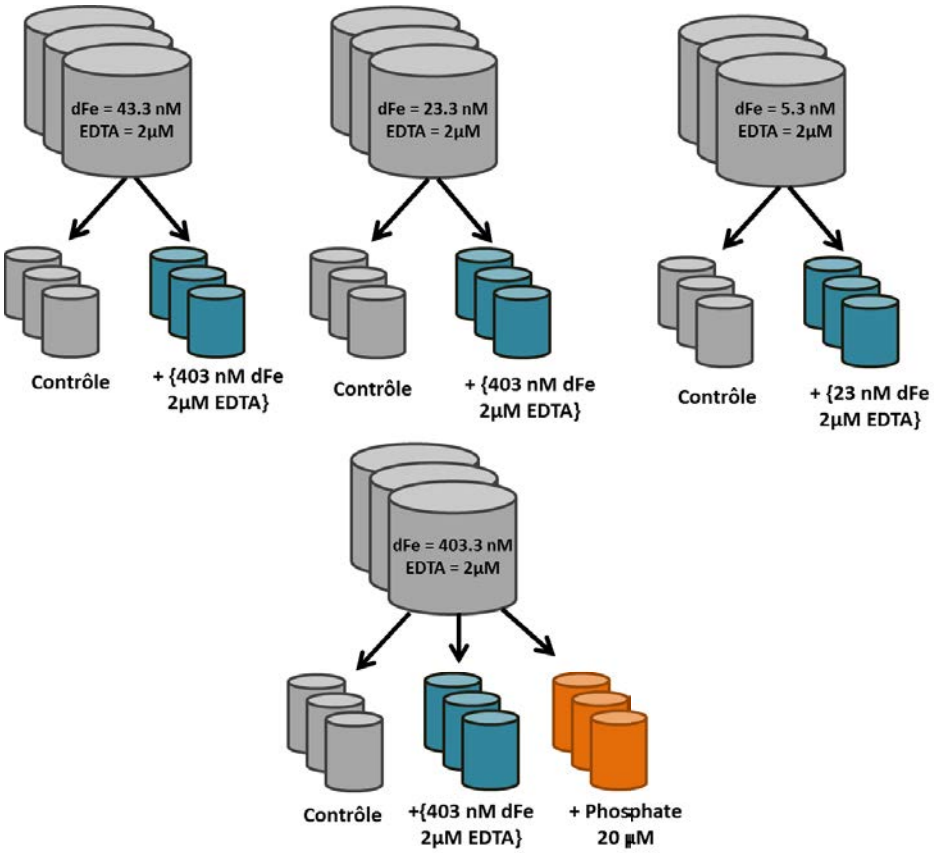


Figure 1.4. Schéma du protocole des expériences complémentaires d'ajouts de Fe + EDTA ou de phosphates dans des cultures de *C. watsonii* en phase stationnaire.

II.8. Traitement statistique

Pour chaque paramètre, les valeurs moyennes obtenues en phase exponentielle aux différentes concentrations en Fe ont été comparées à l'aide de tests statistiques. Une fois l'homoscedasticité validée à l'aide d'un test de Bartlett, il a été réalisé une ANOVA à un facteur suivie d'un test t de comparaison deux à deux avec la méthode de Holm pour l'ajustement de la *p* value ($\alpha = 0.05$). En cas de non-validation de l'homoscedasticité, les données ont été transformées en logarithme. Après vérification de l'homoscedasticité, les tests ont été réalisés à partir de ces valeurs transformées. Le nombre d'échantillons (n) était compris entre 3 et 12 selon les contraintes expérimentales. Tous ces tests, ainsi que la régression non-linéaire de Monod et le calcul des paramètres de croissance associés ($K_{\mu Fe}$ et μ_{max}) ont été réalisés avec le logiciel libre R (R core team 2013).

III. Caractérisation de l'influence de la disponibilité en fer sur l'abondance et la physiologie de *C. watsonii*

Les valeurs moyennes obtenues pour chaque paramètre et pour chaque concentration en Fe sont regroupées en annexe 2.

III.1. Impact de la limitation en fer sur l'abondance de *C. watsonii*

L'abondance cellulaire de *C. watsonii* est fortement influencée par la concentration en Fe présente dans le milieu de culture. Plus la concentration en Fe dans le milieu est élevée, plus l'abondance de *C. watsonii* est importante (Figure 1.5)..

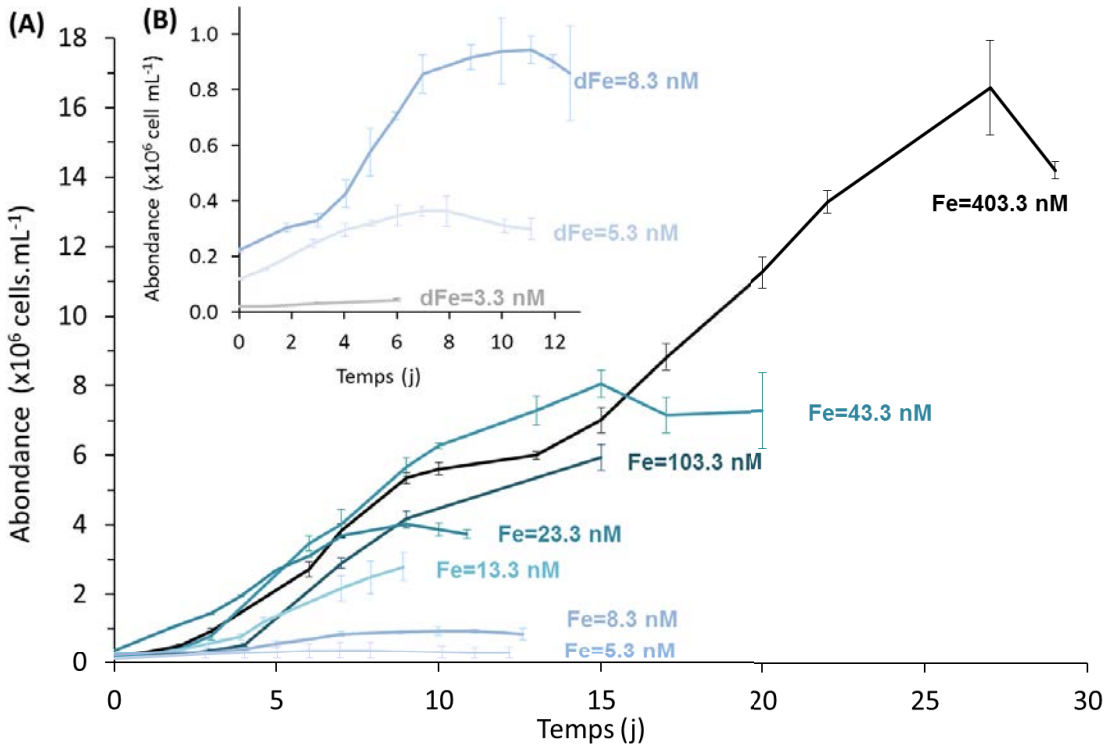


Figure 1.5. (A) Evolution de l'abondance de *C. watsonii* pour 8 concentrations en Fe en fonction du temps (B) Agrandissement pour les cultures aux plus faibles concentrations de fer. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés (n = 3).

Il est à noter que les abondances moyennes de la culture à 43.3 nM de Fe sont plus importantes que celles des cultures à 103.3 et 403.3 nM de Fe, mais les taux de croissance moyens de ces trois cultures sont similaires (section III.2). La culture en présence de la concentration en fer la plus forte (Fe = 403.3 nM) se distingue par une phase de croissance exponentielle plus longue (Figure 1.5). **La biodisponibilité du fer contrôle donc la biomasse de *C. watsonii* et son évolution temporelle**

Au cours de la phase de croissance de *C. watsonii,* la concentration en phosphates, initialement de 20 µM a diminué de 0.5 µM pour la culture à 3.3 nM de Fe jusqu'à épuisement dans la culture à 403.3 nM de Fe (Figure 1.6). **C'est donc probablement la carence en phosphates qui a entraîné l'arrêt de la croissance des cellules dans la culture à 403.3 nM de Fe, supposée non-limitée et potentiellement la biodisponibilité en fer dans les cultures dont les concentrations en fer sont inférieures ou égales à 23.3 nM.** Des concentrations en phosphates de ~8 µM ont été mesurées dans une culture à Fe = 43.3 nM en phase stationnaire, mais ne correspondant pas à la culture dont la courbe d'abondance est présentée Figure 1.5.

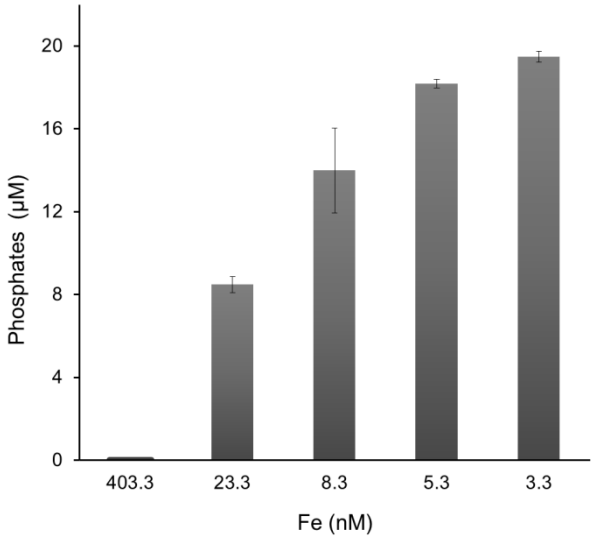


Figure 1.6. (A) Concentrations moyennes en phosphates dans les cultures en phase stationnaire, mesurées dans des cultures dont l'abondance est présentée Figure 1.5. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés (n = 3). La concentration initiale en phosphates était de 20 µM.

En effet, l'ajout de phosphates en phase stationnaire dans la culture supposée non-limitée en fer (Fe = 403.3 nM) a entraîné une reprise rapide de la croissance alors qu'aucune stimulation de l'abondance n'a été observée après ajout de fer (Figure 1.7). A l'inverse l'ajout de fer dans les

cultures à Fe = 43.3, 23.3 et 5.3 nM en phase stationnaire a systématiquement induit une reprise de la croissance (Figure 1.7). L'ensemble de ces expériences mettent donc bien en évidence un arrêt de la croissance (i) dû à une carence en fer pour les cultures dont les concentrations en Fe sont inférieures ou égales à 43.3 nM et (ii) dû à une carence en phosphates lorsque la concentration en Fe est de 403.3 nM et non-limitante. Il reste cependant une interrogation concernant la culture à 103.3 nM de fer.

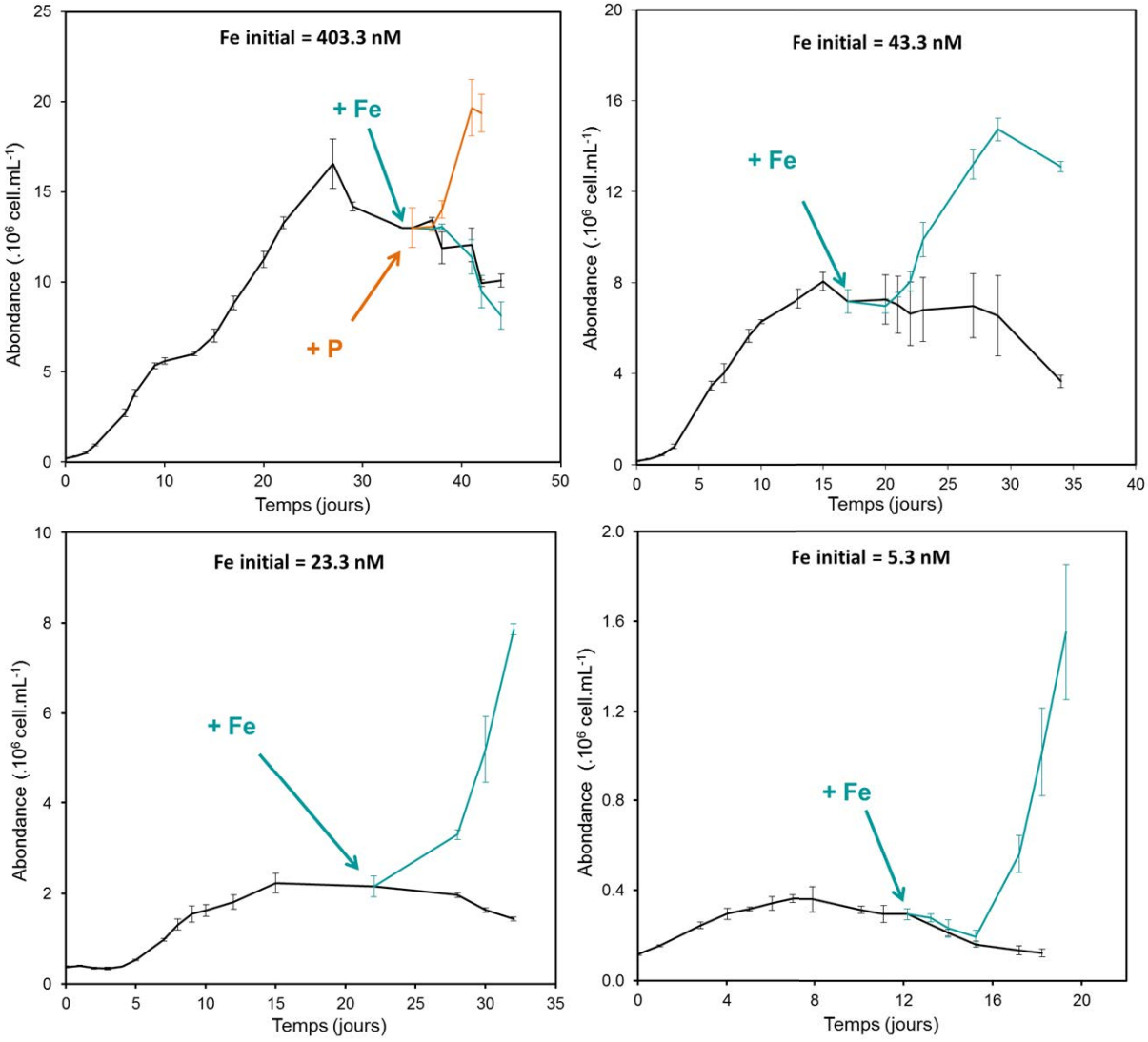


Figure 1.7. Abondance de *C. watsonii* en présence de différentes concentrations en Fe (courbe noire) et réponse après ajout de Fe (courbe bleue) ou de phosphates (courbe orange). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés (n = 3).

III.2. Impact de la biodisponibilité du fer sur le taux de croissance de *C. watsonii*

Le taux de croissance, µ, est contrôlé par les concentrations ambiantes en Fe et Fe' (Figure 1.8). En effet, pour un Fe maximum de 403.3 nM, le µ moyen est de 0.52 ± 0.03 j^{-1}, ce qui correspond à un temps de doublement de la population de 1.3 ± 0.1 j et pour un Fe minimum de 3.3 nM le µ diminue significativement d'un facteur 2.6 pour atteindre 0.20 ± 0.03 j^{-1} (Figure 1.8), ce qui correspond à un temps de doublement de la population de 3.6 ± 0.5 j. **Le taux de croissance et le temps de doublement des cellules dans les 3 cultures présentant les plus fortes concentrations en Fe (403.3, 103.3 et 43.3 nM) sont significativement identiques.**

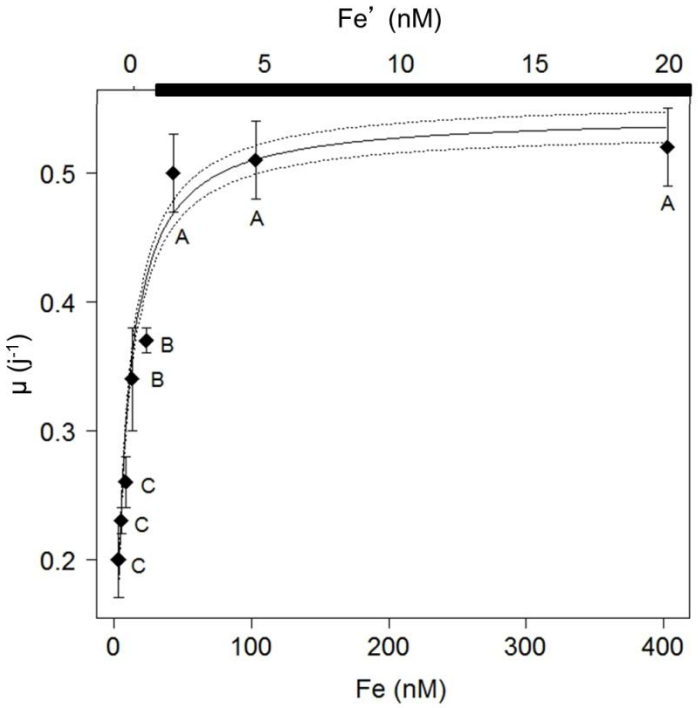


Figure 1.8. Taux de croissance moyen (µ, en j^{-1}) de *C. watsonii* en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM). Les barres d'erreur représentent les écart-types associés. Le trait plein représente la régression non-linéaire de Monod et ses écart-types associés en pointillé (calculée à partir de Fe). Des lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (p < 0.05). La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer.

La relation entre µ et Fe satisfait la distribution théorique du modèle de Monod (R^2 = 0.92, Figure 1.8) déterminé selon l'équation 1.1:

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{[Fe]}{[Fe] + K_{\mu Fe}} \qquad \text{(équation 1.1)}$$

Avec μ_{max} le taux de croissance maximum et $K_{\mu Fe}$ la constante de demi-saturation pour Fe, correspondant à la concentration en Fe permettant un taux de croissance égal à la moitié de μ_{max}. Ainsi, pour *C. watsonii*, **le μ_{max} est de 0.54 ± 0.01 j^{-1}** et le $K_{\mu Fe}$ de 6.95 ± 0.66 nM de Fe. Cela montre que **la concentration la plus élevée en Fe (403.3 nM) est bien non-limitante pour la croissance**, puisqu'elle permet d'obtenir un μ égal à μ_{max}**, de même que pour les concentrations en Fe de 43.3 et 103.3 nM**. En revanche **les concentrations en Fe inférieures à 43.3 nM sont limitantes pour la croissance de *C. watsonii*.**

La concentration en Fe' n'a pas été utilisée dans cette équation (1.1) car pour les trois concentrations les plus fortes (Fe = 43.3, 103.3 et 403.3 nM), la concentration de Fe' dépasse la limite de solubilité théorique de Fe' (~1.45 nM, Sunda et Huntsman (2003)). Néanmoins, nous pouvons estimer $K_{\mu Fe'}$ pour chaque concentration en Fe' inférieure à la limite de solubilité (soit Fe' = 0.16, 0.26, 0.41, 0.66 et 1.16 nM) connaissant μ_{max} et les concentrations en Fe' à partir de l'équation 1.2 :

$$K_{\mu Fe'} = \frac{[Fe'](\mu_{max} - \mu)}{\mu} \quad \text{(équation 1.2)}$$

avec : μ_{max} le taux de croissance maximum obtenu à partir du modèle de Monod et des concentrations en Fe, **Fe'** la concentration en Fe' calculées selon Sunda et Huntsman (2003) et **μ** le taux de croissance correspondant.

Nous obtenons ainsi un $K_{\mu Fe'}$ moyen de 0.38 ± 0.11 nM.

III.3. Impact de la limitation en fer sur le volume cellulaire de *C. watsonii*

Le volume cellulaire de *C. watsonii* a diminué de 2.2 fois entre la condition non-limitante (Fe = 403.3 nM) et la condition la plus appauvrie en fer (Fe = 3.3 nM), passant de 8.4 ± 2.6 μm^3 à 3.8 ± 0.7 μm^3 (Figures 1.9 et 1.10). Les cellules en présence de 3.3, 13.3 et 43.3 nM de Fe présentent des volumes significativement identiques (Figure 1.10A). La diminution du volume des cellules cultivées dans les deux conditions extrêmes (Fe = 403.3 et 3.3 nM) a donc pour conséquence une augmentation du rapport surface cellulaire/volume cellulaire, noté S/V, passant de 2.4 ± 0.3 μm^{-1} pour Fe = 403.3 nM à 3.1 ± 0.2 μm^{-1} pour Fe = 3.3 nM (soit une augmentation d'un facteur 1.3, Figure 1.10B).

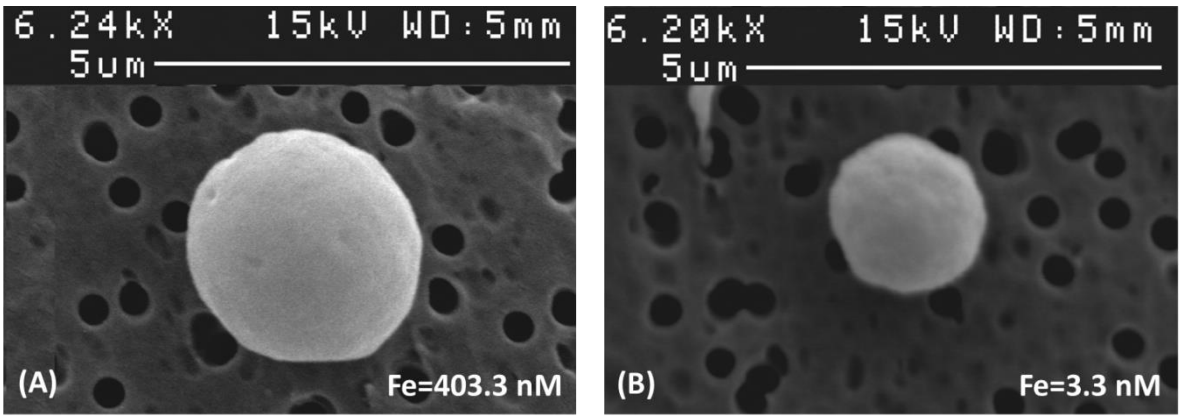


Figure 1.9. Photographies de cellules de *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance provenant d'une culture contenant (A) 403.3 nM de Fe et (B) 3.3 nM de Fe, observées au microscope électronique à balayage. Sur la partie supérieure de chaque cliché sont indiqués : le grossissement utilisé (kX soit (A) 6240 et (B) 6200 fois), la tension d'accélération en kV, la distance de la lentille par rapport à l'échantillon observé (distance de travail, WD) et la barre d'échelle représentant 5 µm. D'après Jacq et al. 2014, Creative Commons Attribution 3.0 License.

De même que pour le biovolume, le rapport S/V des cellules en présence de 3.3, 13.3 et 43.3 nM de Fe est identique ($p > 0.05$) (Figure 1.10B).

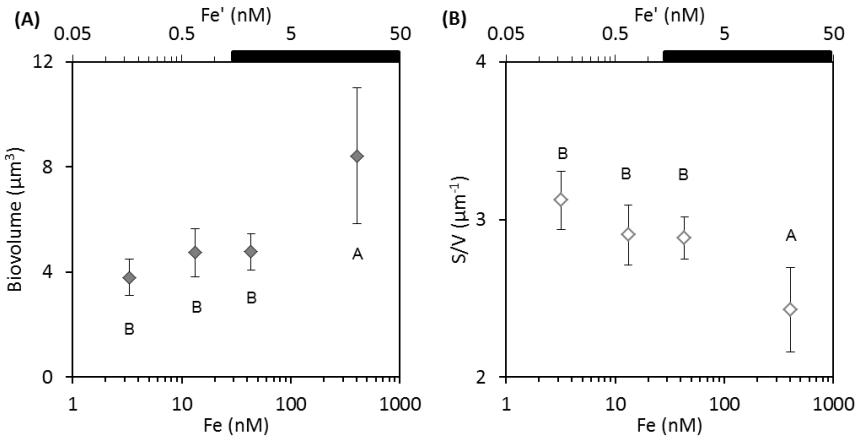


Figure 1.10. (A) Biovolume (en μm^3) et (B) rapport surface/volume (S/V) de *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM, échelle $\log_{10}$). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés. Des lettres différentes indiquent une différence significative des moyennes ($p < 0.05$). La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer. D'après Jacq et al. 2014, Creative Commons Attribution 3.0 License.

III.4. Impact de la limitation en fer sur les contenus cellulaires et rapports élémentaires de *C. watsonii*

III.4.1. Contenus cellulaires en C, N et Chla

En condition de non-limitation (Fe = 403.3 nM), les contenus cellulaires en C et N chez *C. watsonii* sont respectivement de 546.7 ± 24.6 fmolC.cell^{-1} et de 57.1 ± 4.9 fmolN.cell^{-1} (Figure 1.11 A-B)). **La diminution de la concentration en fer entraîne une diminution progressive des contenus cellulaires en C et N,** avec des facteurs de réduction respectifs de 3.8 et 3.3 de la condition non-limitante (Fe = 403.3 nM) à la condition la plus limitante (Fe = 3.3 nM) (Figure 1.11 A-B). De même, **les contenus cellulaires en chl*a* diminuent fortement avec l'appauvrissement en fer**, variant de 27.6 ± 2.9 fgchl*a* .cell^{-1} en présence de 403.3 nM de Fe à 6.7 ± 1.5 fgchl*a*.cell^{-1} en présence de 3.3 nM de Fe (soit un facteur de réduction de 4.1) (Figure 1.11C).

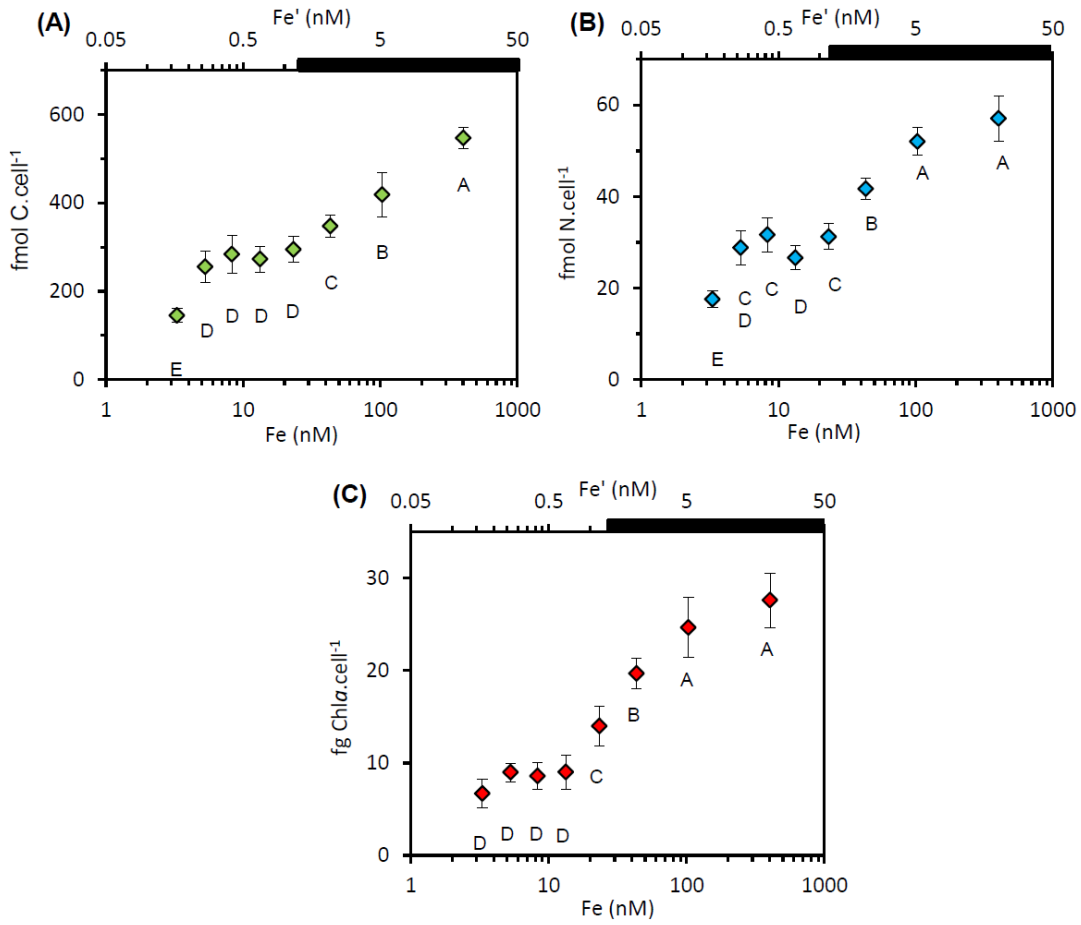


Figure 1.11. Contenus cellulaires en carbone (A) et azote (B) exprimés en fmol.cell^{-1} et contenus cellulaires en Chl*a* (C), exprimés en fg.cell^{-1} de *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance durant la période lumineuse en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM, échelle $\log_{10}$). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés. Des lettres différentes indiquent une différence significative des

moyennes ($p < 0.05$). La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer. D'après Jacq et al. 2014, Creative Commons Attribution 3.0 License.

III.4.2.. Rapports élémentaires

Le rapport molaire C/N en condition de non-limitation en fer est de 9.6 ± 0.5. Il est observé une diminution du rapport C/N (d'un facteur 1.2) entre les deux concentrations extrêmes en Fe (Figure 1.12A). Aucune corrélation entre les rapports C/N et la concentration en Fe ou Fe' n'est observé. Les rapports C/N sont tous supérieurs au rapport de Redfield (106/16 = 6.6) (Figure 1.12A). Les rapports cellulaires Chl*a*/C varient de 51.9 ± 4.7 (Fe = 403.3 nM) à 45.7 ± 7.6 (Fe = 3.3 nM). Il n'y a pas de tendance claire entre la valeur du rapport Chla/C et la concentration en Fe (ou Fe') (Figure 1.12B).

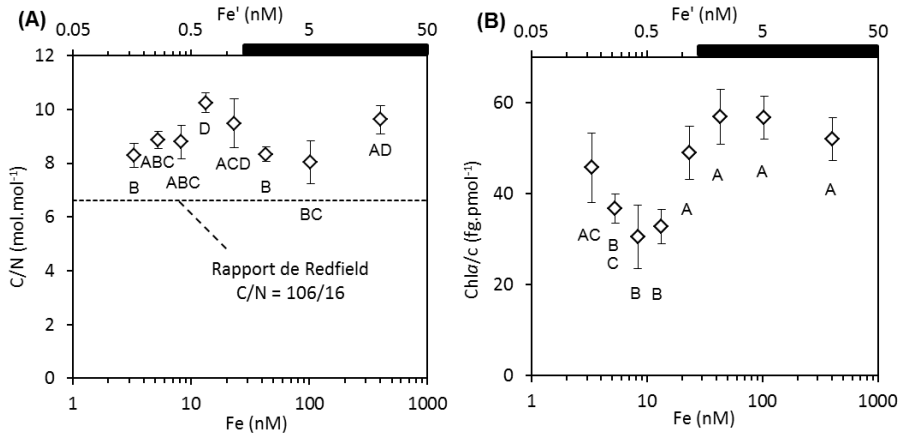


Figure 1.12. (A) Rapport molaire C/N et (B) rapport Chl*a*/C en fg.pmol^{-1} chez *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance durant la période lumineuse en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM, échelle $\log_{10}$). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés. Des lettres différentes indiquent une différence significative des moyennes ($p < 0.05$). La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer.

III.5. Impact de la limitation en fer sur les taux cellulaires de fixation de N_2 et de CO_2 de *C. watsonii*

Une diminution drastique du taux de fixation de N_2 d'un facteur ~19 a été observée entre la condition non-limitante et la condition la plus limitante (Fe =3.3 nM) (Figure 1.13A). **Le taux de fixation de CO_2 a également diminué progressivement** avec la diminution de la concentration ambiante en Fe, d'un facteur ~7 entre les deux concentrations extrêmes en Fe (Figure 1.13B).

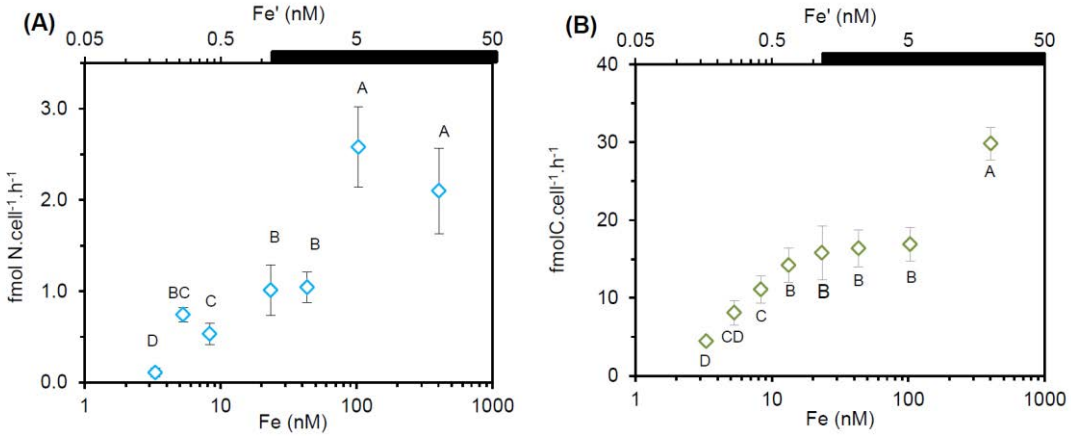


Figure 1.13. (A) Taux de fixation de N_2 et (B) de CO_2 chez *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM, échelle $\log_{10}$). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés. Des lettres différentes indiquent une différence significative des moyennes ($p < 0.05$). La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer. D'après Jacq et al. 2014, Creative Commons Attribution 3.0 License.

III.6. Impact de la limitation en fer sur les contenus cellulaires et les taux de fixation normalisés par le volume cellulaire

Le biovolume de *C. watsonii* diminuant avec la limitation en fer, il est pertinent de s'intéresser aux contenus cellulaires et aux taux de fixation par unité de volume. Cette normalisation par le volume permet de s'affranchir de « l'effet taille » c'est-à-dire de la diminution des contenus cellulaires et des taux de fixation liée uniquement à la diminution du volume de la cellule.

III.6.1. Contenus cellulaires par unité de volume

Les contenus en C, N et chl*a* normalisés par le biovolume (notés V-contenus) **diminuent en moyenne d'un facteur 1.8 entre les deux concentrations extrêmes en Fe (403.3 et 3.3 nM). Ces V-contenus sont identiques pour des cellules cultivées en présence de 403.3 nM et 43.3 nM de Fe** (Figure 1.14) et diminuent significativement lorsque l'appauvrissement en fer devient plus marqué (de 43.3 à 3.3 nM de Fe) (Figure 1.14).

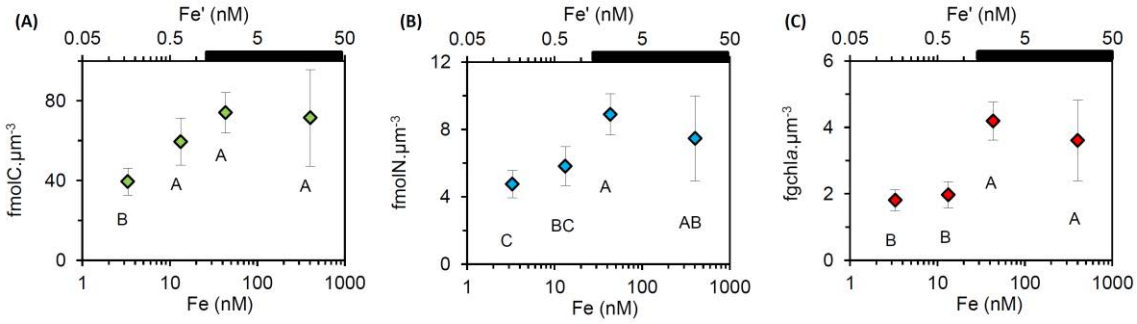


Figure 1.14. Contenus cellulaires par unité de volume (µm^3) en (A) carbone, (B) azote et (C) chlorophylle *a* chez *C. watsonii* en phase exponentielle de croissance en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM, échelle $\log_{10}$). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés Des lettres différentes indiquent une différence significative des moyennes ($p > 0.05$). La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer. D'après Jacq et al. 2014, Creative Commons Attribution 3.0 License.

III.6.2. Taux de fixation par unité de volume

Les taux de fixation de N_2 et de CO_2 normalisés par le volume (notées V-fixations ou respectivement V-N_2 fix et V-CO_2 fix) **diminuent respectivement d'un facteur ~9 et ~3 entre la condition non-limitante (Fe = 403.3 nM) et la plus faible concentration en fer (Fe = 3.3 nM). Comme pour les V-contenus, ces V-fixations restent inchangés pour les cultures à 403.3 nM et 43.3 nM de Fe** (Figure 1.15), puis diminuent significativement lorsque les concentrations en Fe sont réduites de à 3.3 nM (Figure 1.15).

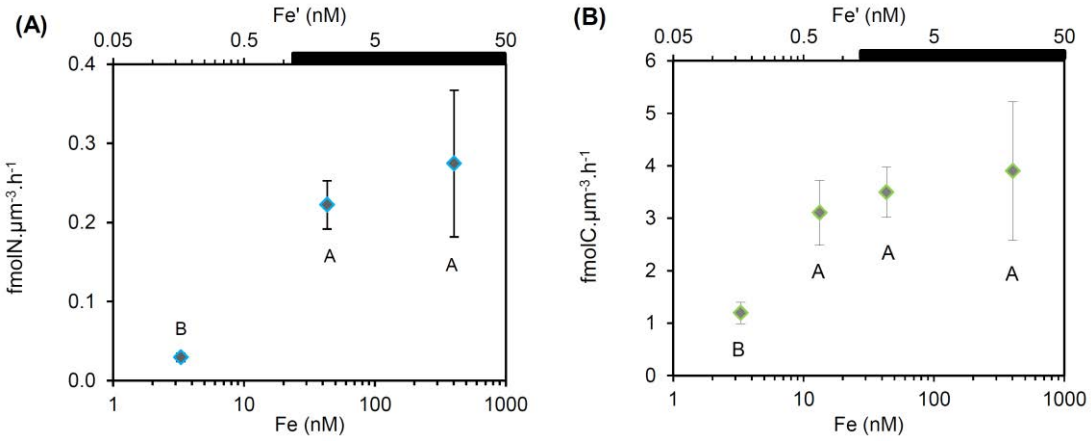


Figure 1.15. (A) Taux de fixation N_2 et (B) de CO_2 normalisés par le volume en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM, échelle $\log_{10}$). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés Des lettres différentes indiquent une différence significative des moyennes ($p < 0.05$). La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer. D'après Jacq et al. 2014, Creative Commons Attribution 3.0 License.

IV. *C. watsonii* : caractéristiques physiologiques en condition de non-limitation et réponses en fonction du degré de limitation en fer

IV.1. Caractéristiques physiologiques de *C. watsonii* WH8501 en condition non-limitante

Le taux de croissance, le biovolume, le contenu cellulaire en N ainsi que le rapport C/N obtenus pour *C. watsonii* WH8501 en condition non limitante se trouvent dans la gamme des valeurs précédemment publiées pour cette souche (Tableau 1.II). Le contenu cellulaire en C est, quant à lui, plus fort que ceux reportés dans les études précédentes, ce qui conduit à un rapport Chl*a*/C plus faible. L'observation d'un contenu cellulaire en C plus élevé ici (Tableau 1.II) pourrait être lié au fait que notre taux de croissance (0.52 j^{-1}) est nettement plus élevé que ceux observés par Dron et al. (2012a) et Großkopf et Laroche (2012) (0.20 et 0.28 j^{-1} respectivement) en chemostat. De même, les taux de fixation de N_2 et CO_2 mesurés ici sont plus forts que ceux obtenus par Mohr et al. (2013) pour des périodes d'incubation similaires et un protocole analytique identique (respectivement ajout de $^{15}N_2$ gazeux et taux de fixation ré-estimés selon Mohr et al. (2010b) ou ajout de $NaH^{13}CO_3$). Cela est certainement dû, ici aussi, aux différences de taux de croissance, les cultures de Mohr et al. (2013) présentant un taux de croissance considérablement plus faible (0.14 j^{-1}). Il en est de même si l'on compare les taux de fixation de N_2 que nous avons obtenus avec ceux de Dron et al. (2012a), établis pour un taux de croissance plus faible, de 0.2 j^{-1}.

Tableau 1.II. Synthèse bibliographique des paramètres physiologiques mesurés pour *C. watsonii* WH8501 cultivée en conditions nutritives non-limitantes. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écart-types associés.

Taux croissance j^{-1}	Biovolume μm^3	Contenu cellulaire C $fmolC.cell^{-1}$	Contenu cellulaire N $fmolN.cell^{-1}$	C/N $mol.mol^{-1}$	Chl*a*/C $mg.mol^{-1}$	fixation de CO_2 $fmolC.cell^{-1}.h^{-1}$	fixation de N_2			Références
							$fmolN.cell^{-1}.h^{-1}$	$molN.molChla^{-1}.h^{-1}$	$mmolN.molC^{-1}.h^{-1}$	
0.46			6.9 - 29.6	8.8 (1.5)						Tuit et al. 2004
0.47 (0.01)	4.2 - 65.5									Goebel et al. 2008
~0.23 (a)				6.9 (0.2)	74 (11)					Fu et al. 2008
~0.54	~14						~0.2 (f)			Webb et al. 2009
	12 - 13.6 (b)			8.5 (d)						Mohr et al. 2010a
							0.1 – 1 (f)(g)			Shi et al. 2010
		500 (c)	80 (c)	5.2 (c)			0.5 (f)(g)		0.92 (f)(g)	Dekaezemacker et Bonnet 2011
0.2 (a)	8.2 - 10.4 (b)	140 - 220 (b)	18 – 40 (b)	8.8 (d)			~0.1 - 0.9 (f)(g)		0.6 – 5 (f)(g)	Dron et al. 2012a
0.28 (0.02)		120-260 (b)	20-35 (b)	10.5 (d)						Großkopf et Laroche 2012
0.14				~7 - 9.5		~9 (e)	~0.8(g)(h)			Mohr et al. 2013
~0.27 (a)								34.5 (f)		Hutchins et al. 2013
0.52 (0.03)	8.4 (2.6) (c)	547 (25) (d)	57 (5) (d)	9.6 (0.5 (d)	52 (5) (d)	29.8 (2.1) (e)	2.1 (0.5) (g)(h)	78.4 (5.5) (g)(h)	3.9 (0.7)(g)(h)	Cette étude

(a) Culture en chemostat ou semi-continues avec µ fixé ne correspondant pas forcement au μ_{max}
(b) Intervalle de valeurs dans un cycle jour-nuit
(c) Mesures durant la période d'obscurité
(d) Mesures durant la période lumineuse
(e) Périodes d'incubation similaires pour la fixation de CO_2
(f) Mesure des taux de fixation de N_2 par méthode de réduction de l'acétylène
(g) Périodes d'incubation similaires pour la fixation de N_2
(h) Mesure des taux de fixation de N_2 par méthode d'ajout du $^{15}N_2$ gazeux ré-estimés selon Mohr et al. (2010b)

Le taux de croissance que nous avons obtenu en condition de non-limitation (0.52 j^{-1}) est proche de celui de *C. watsonii* sp. récemment mesuré (0.61 j^{-1}), dans des microcosmes, dans le Pacifique tropical Sud, après ajout de fer (400 nM) ayant fortement stimulé l'abondance des cellules (*nifH* gène copies mL^{-1}) (Moisander et al. 2012).

IV.2. Réponse physiologique de *C. watsonii* en fonction du degré de limitation en fer

Les résultats obtenus montrent que la concentration en Fe et Fe' contrôle la croissance, le volume, les contenus élémentaires par cellule et par μm^3 ainsi que les taux de fixation de N_2 et CO_2 par cellule et par μm^3 de *C. watsonii.* Fu et al. (2008) ont observé une diminution d'environ 35 % du taux de fixation de N_2 et de ~50 % du taux de croissance de *C. watsonii* WH8501 cultivée en présence de 10 nM de Fe par rapport à une culture non limitée à 450 nM. Mais dans cette étude, la concentration d'EDTA de 5 µM rend difficile une comparaison quantitative avec nos résultats du fait du manque d'informations sur la biodisponibilité en fer dans ces cultures. Dans le milieu naturel, l'influence de la limitation en fer sur la croissance ou l'activité de la nitrogénase des UCYN-B a été mise en évidence lors d'expériences en microcosmes avec une stimulation de l'abondance du gène *nifH* associé aux UCYN-B (copies *nifH*.L^{-1}) dans l'océan Atlantique tropical Nord-Est (Langlois et al. 2012) et une stimulation de l'expression du gène *nifH* (transcripts *nifH*.L^{-1}) dans l'Atlantique tropical Nord-Ouest (Turk-Kubo et al. 2012) suite à un ajout de fer et ce malgré des concentrations ambiantes en dFe relativement élevées de 1.3 et 1.9 nM respectivement. De même, dans l'océan Pacifique tropical Sud-Ouest, Moisander et al. (2012) ont mis en évidence une stimulation de l'abondance de *C. watsonii* sp. (copies *nifH*.L^{-1}) après ajout de fer + EDTA dans une eau de mer contenant initialement 0.2 nM de dFe. Le manque de connaissance concernant les concentrations en fer biodisponible dans le milieu naturel rend difficile la comparaison de ces résultats entre eux et avec ceux que nous avons obtenus mais ces expériences montrent une limitation en fer de la croissance et de l'activité des UCYN-B et de *C. watsonii* dans le milieu naturel, confirmée par nos expériences en culture. Nos résultats ont permis de mieux caractériser et quantifier la réponse de *C. watsonii* à une limitation en fer et **nous avons mis en évidence deux réponses distinctes en fonction du « degré de limitation » chez *C. watsonii* en culture que nous allons décrire dans les sections suivantes**.

IV.2.1. Vers une limitation modérée en fer (de 403.3 à 43.3 nM de Fe)

En condition de limitation en fer modérée, correspondant à une diminution de la concentration en Fe de 403.3 à 43.3 nM, le taux de croissance reste maximum alors que le biovolume, les contenus cellulaires en C, N et Chl*a* et les taux de fixation de N_2 et de CO_2 par cellule diminuent significativement (Figure 1.16). Du fait de la diminution du biovolume, les contenus par μm^3 et les taux de fixation de N_2 et CO_2 par μm^3 restent inchangés dans cette gamme de concentration en fer ($p > 0.05$) (Figures 1.14 et 1.15).

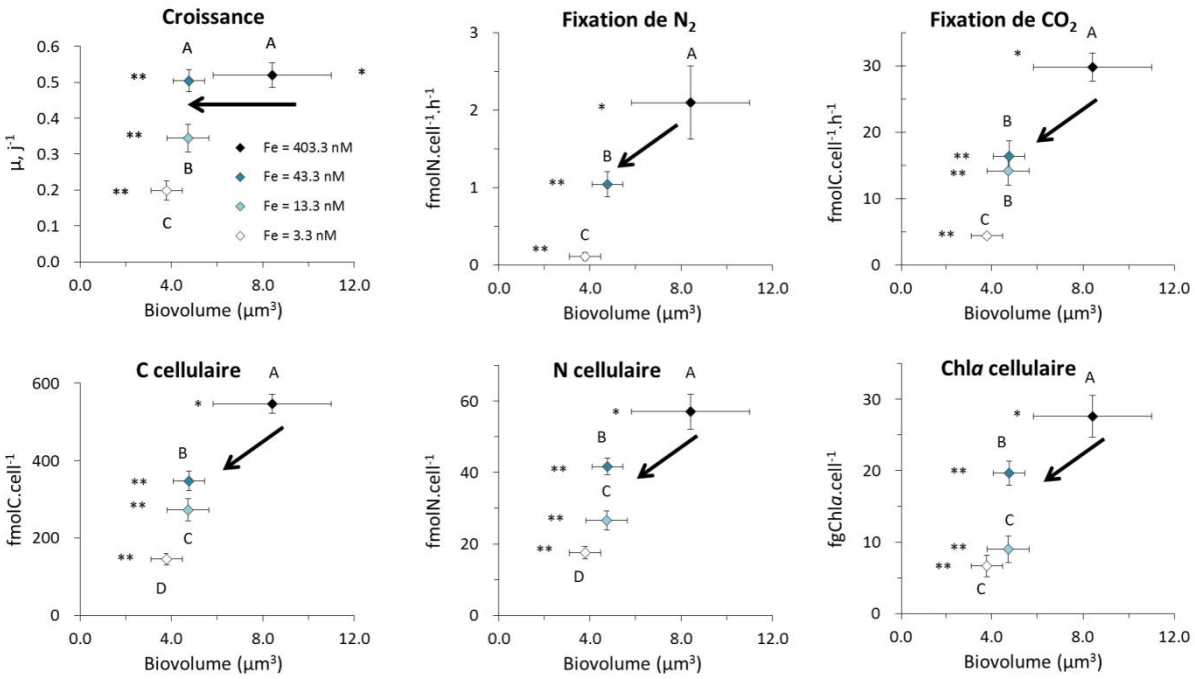


Figure 1.16. Réponse physiologique de *C. watsonii* en condition de limitation en fer modérée correspondant à une diminution de Fe de 403.3 à 43.3 nM : taux de croissance (μ), taux de fixation de N_2 et de CO_2 par cellule et contenus cellulaires en C, N et Chl*a* en fonction du biovolume. La flèche noire indique la variation observée du biovolume et des paramètres physiologiques pour une diminution de Fe de 403.3 à 43.3 nM. Un nombre différent d'étoiles indique une différence significative des moyennes du biovolume et des lettres différentes une différence significative des moyennes du paramètre considéré.

Une limitation modérée en fer induit une réduction du volume cellulaire ce qui permet à *C. watsonii* de maintenir des concentrations en C, N et chl*a* et des taux de fixation de N_2 et de CO_2 par unité de volume maximums et ainsi de générer suffisamment d'énergie pour conserver des taux de croissance optimaux. Cette réduction du biovolume peut être vue comme une stratégie d'adaptation des cellules à la diminution de la concentration en fer puisqu'elle entraîne une réduction des besoins nutritionnels du fait d'une taille réduite. La réduction du biovolume induit

également une augmentation du rapport S/V des cellules ce qui fournit alors un avantage à la cellule en termes d'absorption de fer permettant une augmentation du taux d'absorption du fer par unité de volume (Sunda et Huntsman 1997).

Cette stratégie adaptative de réduction du volume cellulaire en réponse à une carence en fer a déjà été observée chez certains organismes phytoplanctoniques eucaryotes (le coccolithophore *Emiliania huxleyi* et les diatomées *Thalassiosira weissflogii, Thalassiosira oceanica* (Sunda et Huntsman 1995) et C*haetoceros dichaeta* (Takeda 1998)).

Il est important de noter que sous ces conditions de limitation modérée en fer, la limite de solubilité de Fe' est dépassée. De ce fait, la concentration en Fe' est théoriquement constante et maximum (~1.45 nM) au sein de cette gamme de concentrations en Fe allant de 43.3 à 403.3). Les différences physiologiques observées en condition de limitation modérée en fer suggèrent que **le Fe' calculé ici n'est probablement pas la seule forme de fer biodisponible pour *C. watsonii* et/ou que la limite de solubilité de Fe' est plus élevée que 1.45 nM pour les conditions de cultures utilisées ici**. Deux hypothèses concernant les formes de fer biodisponible en plus de Fe', en milieu artificiel, peuvent être émises :

(i) Le fer colloïdal et/ou les particules amorphes issus de l'agrégation et de la précipitation des hydroxydes de fer pourraient venir compléter la fraction de fer biodisponible. Il a récemment été observé que *T. erythraeum* est capable d'assimiler du fer à partir d'un oxyhydroxyde de fer amorphe, la ferrhydrite, via des mécanismes d'adsorption et de dissolution à la surface des cellules (Rubin et al. 2011). Il a également été montré expérimentalement que *Trichodesmium* sp. et la cyanobactérie unicellulaire non-diazotrophe *Synechoccocus* sp.*,* peuvent utiliser du fer associé à des colloïdes organiques récemment formés (Wang et Dei 2003). Cette absorption ferait probablement suite à une réduction du fer colloïdal par les cellules elles-mêmes qui conduirait à des formes ferreuses (Fe(II)) hautement solubles (Sunda 2001) (figure 1.17).

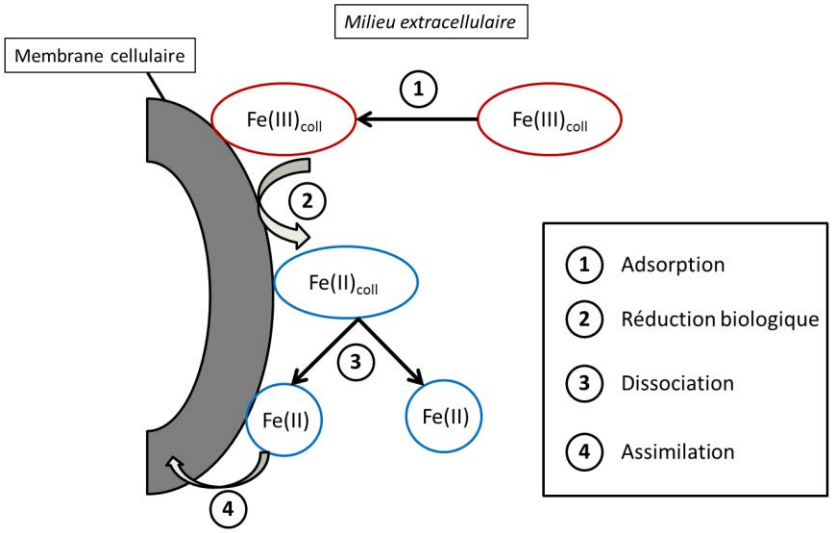


Figure 1.17. Schéma conceptuel d'un mécanisme hypothétique d'assimilation du fer(III) colloïdal (représenté par $Fe(III)_{coll}$) par une cellule phytoplanctonique.

(ii) le complexe Fe-EDTA ne peut pas traverser la membrane cellulaire et n'est donc pas directement biodisponible pour la cellule (Shaked et al. 2005). Néanmoins, de même que pour le fer colloïdal et/ou particulaire, le Fe(III) complexé à l'EDTA pourrait être réduit biologiquement en Fe(II) par les organismes au niveau de la surface membranaire puis ce Fe(II) à la surface des cellules pourrait être transporté à l'intérieur de celles-ci (Shaked et al. 2005) (Figure 1.18). Ce modèle d'acquisition du fer est basé sur le fait que la réduction du Fe(III) en Fe(II) est une étape nécessaire pour le transport du fer à l'intérieur des cellules, qu'il soit libre (Fe(III)') ou complexé (Shaked et al. 2005). Ce modèle reste actuellement peu étudié et est largement controversé (Morel et al. 2008). En effet, une fois dissocié, le Fe(II) formé à la surface des cellules pourrait diffuser loin des cellules et reformer des complexes avec l'EDTA présent dans le milieu (Morel et al., 2008). Néanmoins, Shaked et al. (2005) ont montré, pour la diatomée *T. weisflogii*, qu'une partie de ce Fe(II) provenant du complexe Fe-EDTA pouvait être directement assimilé par les cellules (Figure 1.18). Mais cette unique étude montre un taux de réduction du Fe(III) complexé à l'EDTA plus faible de 4 ordres de grandeur que les taux de réduction des formes non complexées, Fe(III)'.

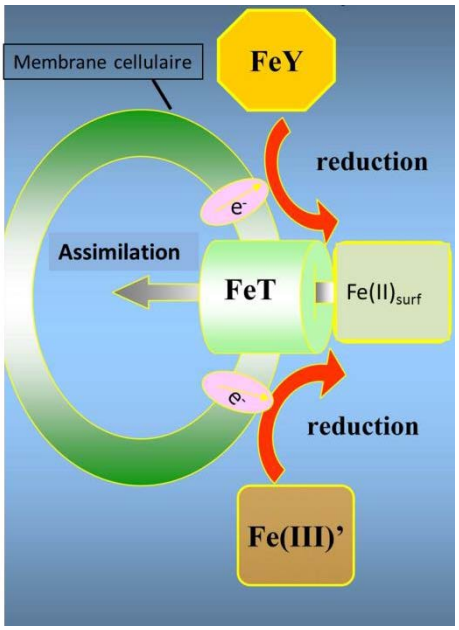


Figure 1.18. Schéma conceptuel du mécanisme de réduction du Fe(III)' et du Fe(III) complexé à un ligand (Y, tel l'EDTA) à la surface d'une cellule phytoplanctonique. Le Fe(II) libre ainsi formé à la surface des cellules (Fe $(II)_{surf}$) peut être assimilé par la cellule, via des transporteurs spécifiques (FeT). La diffusion possible du Fe(II) formé à la surface des cellules dans le milieu n'est pas représentée ici. D'après Shaked et al., 2005 (Copyright 2014 by the Association for the Sciences of Limnology and Oceanography, Inc.).

Cette réduction biologique de Fe(III)-EDTA n'étant pas prise en compte dans le calcul du Fe', elle pourrait alors expliquer le paradoxe révélé par l'existence de différences physiologiques chez *C. watsonii* malgré des concentrations en Fe' supposées homogènes et maximales. Les résultats obtenus suggèrent donc que les mécanismes d'acquisition du fer présentés ci-dessus pourraient exister chez *C. watsonii*. Néanmoins nous ne pouvons que poser des hypothèses, les mécanismes d'acquisition du fer chez *C. watsonii* n'étant à ce jour pas connus.

IV.2.2. Vers une limitation sévère en fer (de 43.3 à 3.3 nM de Fe)

Lorsque la concentration en fer continue de décroître, passant de 43.3 à 3.3 nM, la limitation s'intensifie. Contrairement à la situation de limitation en fer modérée, le taux de croissance diminue significativement (de 0.50 ± 0.03 à 0.20 ± 0.03 j^{-1}) (Figure 1.19). Les contenus cellulaires et les taux de fixation de N_2 et de CO_2 par cellule continuent de décroître progressivement (Figure 1.19). Le biovolume reste inchangé dans cette gamme de concentrations (Figure 1.19) ce qui signifie que les cellules ont atteint leur taille minimale aux alentours de 43.3 nM de Fe. En conséquence, les contenus en C, N et Chl*a* par μm^3 diminuent significativement (d'un facteur ~2)

(Figure 1.14), tout comme les taux de fixation de N_2 et de CO_2 par μm^3 qui diminuent respectivement d'un facteur 4 et 3 (Figures 1.15).

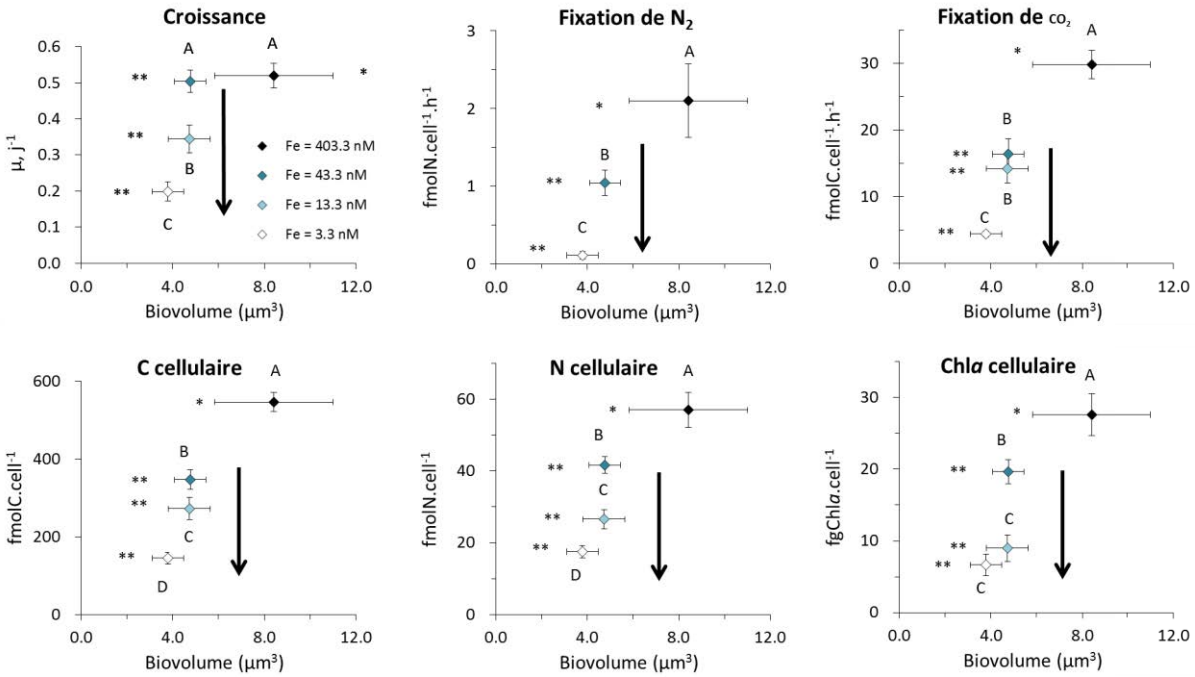


Figure 1.19. Réponse physiologique de *C. watsonii* en condition de limitation en fer modérée : taux de croissance (μ), taux de fixation de N_2 et de CO_2 par cellule et contenus cellulaires en C, N et Chl*a* en fonction du biovolume. La flèche noire indique la variation observée du biovolume et des paramètres physiologiques pour une diminution de Fe de 403.3 à 43.3 nM. Un nombre différent d'étoiles indique une différence significative des moyennes du biovolume et des lettres différentes une différence significative des moyennes du paramètre considéré.

En condition de sévère limitation en fer, les cellules ne sont donc plus capables de fixer suffisamment de C et de N afin de maintenir une composition optimale, de produire suffisamment de Chl*a* ni de générer suffisamment d'énergie pour maintenir une croissance maximale. La diminution de l'activité photosynthétique de fixation de CO_2 de *C. watsonii* observée lors d'une limitation sévère en fer peut être expliquée par le fait que le processus de photosynthèse met en jeu de nombreuses enzymes métalliques riches en fer, telles que les cytochromes (Saito et al. 2011; Behrenfeld et Milligan 2013). La diminution du contenu en Chl*a* par μm^3, couramment observée lors d'un stress en fer chez les organismes photo-autotrophes (Behrenfeld et Milligan 2013) est due au fait que beaucoup de protéines contenant du fer sont impliquées dans sa synthèse (Raven 1988; Behrenfeld et Milligan 2013). La Chl*a* étant un pigment photosynthétique majeur, sa diminution explique également, au moins en partie, la

baisse d'activité photosynthétique de *C. watsonii*. Chez les organismes photo-autotrophes, tels que *C. watsonii*, la cellule est alimentée en énergie chimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) générée lors de la respiration des hydrates de carbone produits durant la photosynthèse. **L'activité photosynthétique moins efficace chez *C. watsonii* en condition de limitation sévère en fer conduit alors à une diminution de la production d'énergie disponible pour les différents processus métaboliques de la cellule, comme la fixation de N_2.**

Les résultats montrent un **impact plus important de la limitation en fer sur le taux de fixation N_2 V-norm (diminution d'un facteur ~7) par rapport au taux de fixation de CO_2 V-norm (diminution d'un facteur ~3)**. Cette différence peut s'expliquer par le contenu important en fer de la nitrogénase associé au fort coût énergétique de la fixation biologique de N_2. De récentes études ont rapporté que la limitation en fer conduit à une régulation négative de l'expression de la nitrogénase chez *T. erythraeum*, entraînant une diminution du taux de fixation de N_2 et ce en culture (Küpper et al. 2008) et *in-situ* (Richier et al. 2012). Cela pourrait également être la cause de la diminution de l'activité de la nitrogénase observée ici chez *C. watsonii*, mais n'a pas été démontré à ce jour. De plus, comme mentionné plus haut, chez *C. watsonii* en condition de sévère limitation en fer, la production d'énergie au sein de la cellule est diminuée. Or, la fixation de N_2 est le processus utilisant le plus d'énergie au sein de la cellule puisque ~60 % de l'énergie produite lors la respiration est utilisée par ce processus (dont 20 % dévoué au fonctionnement de la nitrogénase et 40 % pour la protection de cette dernière contre les dommages dus à l'oxygène) (Großkopf et Laroche 2012). Donc, la diminution d'énergie produite entraîne également une diminution du taux de fixation de N_2 V-norm observée chez *C. watsonii*. Cette réponse métabolique explique l'**impact plus fort de la limitation en fer sur la fixation de N_2 comparé à la photosynthèse** puisqu'**en cas de limitation sévère en fer, la diminution de l'activité de fixation de N_2 due à une réduction de la quantité de nitrogénase produite serait accentuée par une réduction de la quantité d'énergie qui lui est fournie.**

La diminution de la fixation de CO_2 et N_2 par μm^3 chez *C. watsonii* en condition de sévère limitation en fer est associée à une diminution importante des contenus en C et N par μm^3. Cependant, le rapport C/N ne semble pas impacté par la diminution de la concentration en fer. Cela signifie que les contenus cellulaires en C et N ont diminué proportionnellement, alors que la V-fixation de N_2 a été plus affectée que la V-fixation de CO_2, ce qui aurait dû entraîner une

augmentation du rapport C/N. Un impact de la limitation en fer sur l'excrétion de N et/ou de C et sur la respiration de C permettant le maintien du rapport C/N est donc envisageable.

En condition de non-limitation nutritive *C. watsonii* semble fixer du N_2 en excès par rapport à ses besoins azotés pour la croissance et pourrait ainsi excréter jusqu'à 66 % de l'azote fraîchement fixé (Dron et al. 2012a). Malgré le fait que l'impact d'une limitation en fer sur le taux d'excrétion d'azote ne soit pas connu, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une réduction de la quantité de N excrété en condition de limitation en fer ce qui préviendrait d'une augmentation du rapport C/N.

A partir du contenu cellulaire en C et du taux de fixation de CO_2 et supposant que ce flux est constant durant la période lumineuse de 12h, nous avons calculé la production primaire en j^{-1} selon l'équation 1.3 :

$$PP\,(j^{-1}) = \frac{CO_2 fix \times 12}{C_{cell}} \qquad \text{(équation 1.3)}$$

avec : **CO_2fix** le taux de fixation de CO_2 en fmolC.cell^{-1}.h^{-1} et **C_{cell}** le contenu cellulaire en C en fmolC.cell^{-1}.

Puis connaissant le taux de croissance µ déterminé à partir de l'abondance cellulaire, nous avons calculé le pourcentage de carbone fixé photosynthétiquement et utilisé pour la croissance selon l'équation 1.4 :

$$PP_{\mu}(\%) = \frac{\mu * 100}{PP(J^{-1})} \qquad \text{(équation 1.4)}$$

avec : **µ** le taux de croissance en j^{-1}

Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans le Tableau 1.III. Le pourcentage restant correspond à la part de C respirée et excrétée.

Tableau 1.III. Pourcentage du carbone fixé par photosynthèse dédié à la croissance selon les différentes concentrations ambiantes en Fe.

Fe (nM)	3.3	5.3	8.3	13.3	23.3	43.3	103.3	403.3
%	54	62	55	55	59	89	103	79

Le pourcentage obtenu pour Fe = 103.3 nM de 103 % ne peut être pris en compte car cela supposerait une excrétion et une respiration de carbone nulles. En condition de non-limitation en fer (Fe = 403.3 nM) et de limitation modérée (Fe = 43.3 nM), ~80 % du C fixé est dédié à la croissance. En condition de sévère limitation en fer (Fe < 43.3 nM), ce pourcentage passe à environ 57 %. Cela signifie donc **une augmentation du pourcentage de C organique respiré et/ou excrété en condition de sévère limitation en fer**. En cas de limitation en fer, il a été rapporté une diminution de la respiration cellulaire de *T. erythraeum* (Fu et Bell 2003) et une diminution du pourcentage de carbone fixé utilisé lors de la respiration (Rochelle-Newall et al. 2014). Par analogie avec ces résultats et sachant que la respiration met en jeu des enzymes contenant du fer, tels les cytochromes, nous pouvons poser l'hypothèse d'une diminution de la respiration cellulaire chez *C. watsonii* en condition limitation en fer (Fu et al. 2008). Cela implique donc une augmentation du pourcentage de carbone excrété en condition de sévère limitation en fer, comme précédemment observé chez *T. erythraeum* (Rochelle-Newall et al. 2014). L'impact de la limitation en fer sur l'excrétion de DOC reste un sujet peu étudié chez le phytoplancton, diazotrophe ou non. De récentes études ont révélé que *C. watsonii* WH8501 produit et excrète des polysaccharides extracellulaires (EPS) riches en carbone organique (Sohm et al. 2011; Dron et al. 2012b). Il a été montré que pour *C. watsonii* WH0401, une souche appartenant à la même classe de taille que WH8501, une concentration en fer de 20 nM (EDTA = 2 µM) n'altère pas cette production d'EPS (Sohm et al. 2011). Au vu de nos résultats, il serait intéressant de (i) déterminer la production primaire dissoute de *C. watsonii* en présence d'une large gamme de concentration en Fe et (ii) de caractériser cette matière organique excrétée afin de déterminer la contribution des EPS et la présence d'autres molécules d'intérêt, tels les sidérophores (ligands organiques à forte affinité pour le fer) dont l'excrétion en condition de limitation en fer a été détectée chez certaines cyanobactéries marines non diazotrophes, telle *Synechoccocus* sp. (Wilhelm et Trick 1994; Lewis et al. 1995). De plus, certains polysaccharides ont été identifiés comme ligand à faible affinité pour le fer augmentant sa biodisponibilité pour des diatomées dans l'océan Austral (Hassler et al. 2010). L'excrétion potentielle de C organique sous forme d'EPS ou de sidérophores par *C. watsonii* en condition de sévère limitation en fer pourrait alors être une stratégie d'adaptation à la limitation en fer qui pourrait permettre d'augmenter la biodisponibilité du fer.

V. Etude comparative des caractéristiques physiologiques des cyanobactéries diazotrophes en condition de non-limitation et de leurs réponses face à la limitation en fer

V.1. C. watsonii vs UCYN-C et UCYN-A

V.1.1.Comparaison en condition de non-limitation en fer

Pour des cellules de *C. watsonii* plus grosses que la souche WH8501 appartenant à des souches différentes : *C. watsonii* WH0003 (diamètre = 5.08 µm, Webb et al. 2009) et WH0005 (diamètre = 4.31 ± 0.5 µm Webb et al. 2009), il a été mesuré de plus forts contenus en C et N que chez WH8501, ce qui est cohérent avec leur plus grand volume (Tableau 1.IV). Les taux de fixation de N_2 et de CO_2 par cellule mesurés pour WH0003 par Garcia et al. (2013) sont également plus élevés que ceux de WH8501, mais équivalent (fixation de N_2) ou inférieur (fixation de CO_2) lorsqu'ils sont normalisés par le biovolume. Ces différences peuvent être le reflet de mesures effectuées à différents moments au cours des périodes diurne et nocturne respectivement, du fait d'une forte variation de ces taux aux cours de ces périodes. Le rapport C/N des cellules plus grosses (WH0003 et WH0005) se trouve dans la même gamme de valeurs que pour WH8501 (de 5.2 à 10.5).

Les UCYN isolées en océan ouvert (*C. watsonii* et *Cyanothece* sp. TW3) peuvent atteindre des taux de croissances plus élevés que celles isolées en milieu côtier avec des taux jusqu'à 0.54 j^{-1} pour l'UCYN-B *C. watsonii* et 0.85 j^{-1} pour l'UCYN-C *Cyanothece* sp. TW3 (Tableau 1.IV). Il est à noter que l'UCYN-C TW3, océanique, atteint un taux de croissance beaucoup plus élevé que *C. watsonii*. Le rapport C/N de *Cyanothece* sp. BG043411 déterminé en fin de phase obscure est équivalent à la valeur nocturne chez *C. watsonii* WH8501 (Dekaezemacker et Bonnet 2011) (Tableau 1.IV) et correspond donc à un rapport minimal du fait d'un contenu en N maximal et en C minimal si l'on se réfère aux variations journalières présentées par Dron et al. 2012a. Les différences observées en termes de fixation de N_2 par cellule entre les UCYN-C côtières, l'UCYN-C océanique (TW3) et *C. watsonii* pourraient être due à des différences de biovolume entre ces cyanobactéries. Néanmoins, ce n'est pas le cas pour *Cyanothece* WH8904 qui a un volume similaire à *C. watsonii* mais des taux de fixation de N_2 normalisés par la biomasse (COP) environ 2 fois plus faibles. Ces différences peuvent aussi être le reflet de mesures effectuées à différents moments au cours de la période nocturne. En effet les taux de fixation de N_2 varient fortement au cours de la période nocturne chez *C. watsonii* (*e.g.* Mohr et al. 2010a; Dron et al. 2012a), *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (Schneegurt et al. 1994) et *Cyanothece* sp. TW3 (Taniuchi et al.

2012). De plus, les taux de fixation de N_2 présentés pour *Cyanothece* sp. TW3 sont probablement sous-estimé du fait de l'utilisation de la technique de $^{15}N_2$ gazeux pour leur mesure (Taniuchi et al. 2012). Malgré cela, l'UCYN-C côtière *Cyanothece* sp. ATCC 51142 peut atteindre des taux de fixation considérablement plus élevés que *C. watsonii* WH8501 (Tableau 1.IV).

Tableau 1.IV. Synthèse bibliographique des données physiologiques mesurées pour différentes souches de *C. watsonii*, pour une UCYN-C océanique (*Cyanothece* TW3) et différentes souches de *Cyanothece* spp. côtières (lignes grisées) en conditions nutritives non-limitantes comparées à *C. watsonii* WH8501 en condition non-limitante. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écart-types associés.

Taux croissance j^{-1}	Biovolume μm^3	Contenu cellulaire C fmolC.cell^{-1}	Contenu cellulaire N fmolN.cell^{-1}	C/N mol.mol^{-1}	fixation de CO_2		fixation de N_2			Espèce	Groupe phylogénétique	Références
					fmolC.cell^{-1}.h^{-1}	fmolC.μm^{-3}.h^{-1}	fmolN.cell^{-1}.h^{-1}	fmolN.μm^{-3}.h^{-1}	mmolN.molC^{-1}.h^{-1}			
	42									*C. watsonii* WH0005	B	Webb et al. 2009
0.29		533 (125)	93 (29)	7.2 (1.1)								Sohm et al. 2011
0.48	~65						~0.6			*C. watsonii* WH0003	B	Webb et al. 2009
		1290 (b)	120 (b)	9.4 (b)			~0.4 (d)(g)					Dekaezemacker et Bonnet 2011
~0.6 (a)	~66				~87.5	~1.3	~13 (d)	~0.20 (d)				Garcia et al. 2013
0.85							0 .3 - 1.4 (e)(f)			*Cyanothece* sp. TW3	C	Taniuchi et al. 2012
							1.7 - 68 (d)			*Cyanothece* sp. ATCC 51142	C	Schneegurt et al. 1994
~0.4				~5 (b)						*Cyanothece* sp. BG 043511	C	Brauer et al. 2013
0.28 (0.04)	~14								~1.7 (d)	*Cyanothece* sp. WH8904	C ?	Berman-Frank et al. 2007
0.52 (0.03)	8.4 (2.6) (b)			9.6 (0.5 (c)			2.1 (0.5)		3.9 (0.7)	*C. watsonii* WH8501	B	Cette étude
0.14 – 0.54	4.2 – 65.5			5.2 – 10.5			0.1 - 1		0.6 – 5 (d)			Voir Tableau 1.II

(a) Culture en chemostat ou semi-continues avec μ fixé ne correspondant pas forcement au μ_{max} (b) Mesures durant la période d'obscurité (c) Mesures durant la période de jour (d) Mesure des taux de fixation de N_2 par méthode de réduction de l'acétylène (e) Gamme de valeur pour toute la période d'obscurité (f) Mesure des taux de fixation de N_2 par méthode d'ajout du $^{15}N_2$ non ré-estimés

V.1.2. Comparaison de la réponse à la limitation en fer

A ce jour, une seule étude rapporte l'influence de la limitation en fer chez une autre UCYN, *Cyanothece* WH8904 (Berman-Frank et al. 2007) isolée en zone côtière (Ehrenreich et al. 2005) et qui appartiendrait aux UCYN-C (Le Moal et al. 2011). Il a été observé pour cet organisme une augmentation du taux de croissance de 36 % et une augmentation de l'efficacité photosynthétique (Fv/Fm 0.5 à 0.78) avec l'augmentation de la concentration en Fe mais aucune influence de la limitation en fer sur le taux de fixation de N_2 normalisé par le COP et ce dans une large gamme de concentrations en Fe (de 4 nM à 4 µM complexé à 20 µM d'EDTA) (Berman-Frank et al. 2007). Bien que les diamètres cellulaires de *C. watsonii* (2.5 µm, cette étude) et *Cyanothece* WH8904 (~ 3 µm, d'après Berman-Frank et al., 2007) en condition de non-limitation en fer soient proches et que ces deux cyanobactéries réalisent la fixation de N_2 en période nocturne, la diminution de la biodisponibilité du fer a des impacts contrastés sur la fixation de N_2 de ces deux UCYN. Des différences en termes de besoins et/ou d'acquisition du fer peuvent donc être fortement suspectées entre ces deux UCYN. La différence des habitats d'origine (côtier ou hauturier) de ces organismes peut être écartée. En effet, les organismes océaniques sont mieux adaptés aux faibles concentrations en nutriments que les organismes côtiers (Sunda et Huntsman 1995). De ce fait, l'UCYN côtière devrait être plus impactée par la diminution des concentrations en fer, or c'est le phénomène inverse qui est observé. Les différences entre les réponses de *C. watsonii* et *Cyanothece* face à la limitation en fer pourraient alors venir du fait qu'elles n'appartiendraient pas au même groupe d'UCYN (respectivement UCYN-B et UCYN-C). Ainsi, ces cyanobactéries auraient pu développer différentes stratégies d'adaptation à la limitation en fer ou différents mécanismes d'acquisition du fer, avec par exemple la diminution du biovolume sur toute la gamme de concentrations en Fe chez *Cyanothece* sp, ce qui pourrait expliquer l'homogénéité des taux de fixation de N_2 normalisés par la biomasse (COP) observée par Berman-Frank et al. (2007).

Les UCYN-A ont un diamètre de 0.7 à 1 µm (Goebel et al. 2007), plus petit que celui de *C. watsonii*, ce qui entraîne un rapport S/V plus grand chez les UCYN-A. En conséquence, les UCYN-A possèdent de meilleures capacités d'acquisition du fer que les UCYN-B. De plus, les UCYN-A, diazotrophes photo-hétérotrophes, ne possèdent pas de photosystème II (Zehr et al. 2007b) qui contient 3 à 4 atomes de fer (Raven 1990; Behrenfeld et Milligan 2013). Il est donc probable que les UCYN-A aient des besoins en fer moindres que ceux des UCYN photo-autotrophes comme *C. watsonii* ou plus largement les UCYN-B et C.

Des expériences d'enrichissement en fer (microcosmes) réalisées en Atlantique Tropical Nord-Est (Langlois et al. 2012) et Nord-Ouest (Turk-Kubo et al. 2012) confortent le postulat de différences en termes d'adaptation à la limitation en fer chez les UCYN car elles montrent des réponses contrastées au sein de la communauté des UCYN. L'expression du gène *nifH* des UCYN-B (Turk-Kubo et al. 2012) et leur abondance (copies *nifH*.L^{-1}) (Langlois et al. 2012) sont nettement stimulées par l'ajout de fer alors que qu'aucune réponse n'est observée chez les UCYN-A et seule une légère stimulation de l'abondance de UCYN-C a été observée au Nord-Est (Langlois et al. 2012). En revanche, dans le Pacifique Sud-Ouest, une stimulation de l'abondance (copies *nifH*.L^{-1}) des UCYN-A et de *C. watsonii* a été observée suite à un enrichissement en fer (Moisander et al. 2012). Ces réponses variables montre ainsi qu'il existe, dans le milieu naturel (i) une variabilité des besoins en fer au sein de la communauté des UCYN et (ii) une variabilité interbassin et à méso-échelle de l'impact de la limitation en fer au sein de la communauté des UCYN qui dépend probablement de la concentration en fer biodisponible et de la composition de la communauté des UCYN.

V.2. *C. watsonii* vs *T. erythraeum*

V.2.1. Comparaison en condition de non-limitation en fer

Les résultats obtenus ici permettent de comparer les caractéristiques physiologiques de *C. watsonii* et *T. erythraeum* cultivées en condition de non-limitation en fer (Tableau 1.V). Il en ressort que *C. watsonii* semble atteindre des taux de croissance plus élevés que ceux de *Trichodesmium* spp. Les rapports C/N sont distribués dans une gamme de valeurs assez semblable pour les deux organismes. Le rapport Chla/C est par contre nettement plus élevé chez *Trichodesmium erythraeum* ce qui pourrait être le reflet d'une synthèse accrue du photosystème I, contenant de la chl*a*. Cela permettrait alors la réduction d'oxygène en eau sous l'action de l'énergie lumineuse (réaction de Mehler) afin de protéger la nitrogénase des effets néfastes de l'oxygène produit durant la photosynthèse réalisée chez *Trichodesmium* au même moment que la fixation de N_2 (Milligan et al. 2007). Néanmoins, les capacités de fixation de CO_2 par unité de Chl*a* semblent meilleures chez *C. watsonii* qui possède moins de Chl*a* par unité de biomasse (Tableau 1.V).

Tableau 1.V. Synthèse bibliographique des données physiologiques mesurées pour des cultures de *Trichodesmium* spp. en conditions nutritives non-limitantes comparées à *C. watsonii* WH8501 en condition non-limitante. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écart-types associés.

Taux croissance j^{-1}	C/N mol:mol^{-1}	Chl*a*:C mg.mol^{-1}	fixation de CO_2 µgC.µgChla^{-1}.h^{-1}	fixation de N_2 mmolN.molC^{-1}.h^{-1}	fixation de N_2 molN.molChl*a*$^{-1}$.h^{-1}	Références	Espèce
0.12	12 (4)	290		0.5 (c)	2.6 (c)	Berman-Frank et al. 2001b; 2007	*T. erythraeum* IMS 101
			~3.6 (max)			Berman-Frank et al. 2001a	
0.49	6.2 (0.43)					Tuit et al. 2004	
0.25	6.2	157				Breitbarth et al. 2007	
0.35 (0.04)	5.1 (0.1)		1.25 (0.1)			Hutchins et al. 2007	
0.46 (0.01)	7.4 (0.8)	119 (2)	1.07 (0.01) (b)	3.4 (0.2) (d)	25.5 (1.6) (d)	Shi et al. 2012	
0.46 (0.08)	5.1 (0.1)	179 (a)				Bucciarelli et al. 2013	
0.12 – 0.16					0.2 - 40	LaRoche et Breitbarth 2005	*Trichodesmium* spp.
0.52 (0.03)	9.6 (0.5)	52 (5)	13.8 (2.5)	3.9 (0.7)	78.4 (5.5)	Cette étude	*C. watsonii* WH8501
0.14-0.54	5.2-10.5	74 (11)		0.6-5 (c)	34.5 (c)	Voir Tableau 1.II	*C. watsonii* WH8501

(a) Valeur recalculée en considérant une masse molaire de 893.5 g.mol^{-1} pour la Chl*a*
(b) Valeur recalculée à partir de la valeur de Chla/C donnée dans cette publication
(c) Mesure par réduction de l'acétylène
(d) Mesure du taux de fixation de N_2 par la méthode d'ajout du $^{15}N_2$ gazeux et ré-estimés selon Mohr et al. (2010b)

Les taux de fixation de N_2 par unité de COP de *C. watsonii* se trouvent dans la même gamme de valeur que ceux de *T. erythraeum* (Tableau 1.V). Par contre, lorsqu'ils normalisés par la chl*a* les taux de fixation de N_2 sont globalement plus faibles pour *Trichodesmium* spp. (Tableau 1.V). Cela est probablement dû au plus fort contenu en chl*a* chez *Trichodesmium* spp. comme expliqué ci-dessus. Afin de réaliser une meilleure comparaison en s'affranchissant des fortes variations de l'intensité des flux de fixation de N_2 au cours de la période nocturne (pour *C. watsonii*) ou diurne (pour *Trichodesmium* spp.), il faudrait connaître les flux intégrés sur chacune de ces périodes et normalisés par unité de biomasse, ce qui n'a jamais été publié pour *C. watsonii*. Cet exemple illustre donc la difficulté mise en jeu dans la comparaison physiologique d'organismes dont le métabolisme est soumis à un cycle nycthéméral, telles les cyanobactéries diazotrophes.

V.2.2. Comparaison de la réponse à la limitation en fer

De même qu'elles présentent des différences de caractéristiques physiologiques en condition de croissance optimale (Tableau 1.VI), nous allons voir que *T. erythraeum* et *C. watsonii* répondent également différemment à la limitation en fer. Les différences morphologiques de taille et les différentes périodes d'activité de fixation de N_2 (*i.e.* le jour pour *T. erythraeum* et la nuit pour *C.*

watsonii) vont induire des différences au niveau des besoins en fer et possiblement au niveau des stratégies d'acquisition du fer. Le manque de d'informations sur la biodisponibilité du fer dans les études sur la limitation en fer des cyanobactéries diazotrophes en culture rend difficile la comparaison quantitative entre les résultats obtenus ici pour *C. watsonii* avec ceux précédemment publiés pour *Trichodesmium* spp. Mais deux études portant sur la cyanobactérie filamenteuse *T. erythraeum* IMS101 ont été menées au LOCEAN, dans des conditions de culture similaires à celles de *C. watsonii* (intensité lumineuse, température, milieu de culture, pH et concentrations en fer et EDTA) (Bucciarelli et al. 2013; Rochelle-Newall et al. 2014). Nous allons ainsi pouvoir comparer pour la première fois les réponses observées pour *T. erythraeum* avec celles obtenues ici pour *C. watsonii*.

Tout comme *C. watsonii*, la croissance de *T. erythraeum* est contrôlée par la disponibilité du fer (Figure 1.20, Tableau 1.VI). La diminution de la concentration en Fe de 400 à 5 nM induit une diminution du taux de croissance plus marquée chez *T. erythraeum* (3.1 fois) que chez *C. watsonii* (2.3 fois) (Tableau 1.VI). **L'impact de la limitation en fer sur la croissance est donc plus fort chez *T. erythraeum* que chez *C. watsonii*.**

Tableau 1.VI. Réponses physiologiques à la limitation en fer de *C. watsonii* WH8501 (Croco, valeurs en gras, cette étude) et de *T. erythraeum* IMS101 (Tricho) pour des conditions de culture similaires. La concentration d'EDTA dans les milieux de culture est de 2 µM. Tous les paramètres ont été mesurés en phase exponentielle de croissance. Le facteur de diminution correspond à la valeur obtenue pour la plus forte concentration en Fe divisée par la valeur obtenue pour la plus faible concentration en Fe, excepté pour les taux de fixation de N_2 et de CO_2 (valeur à Fe = 103.3 nM divisée par la valeur à 5.3 nM de Fe). Le rapport C/N chez *C. watsonii* est significativement identique entre les deux concentrations extrêmes en Fe présentées ici.

Fe (nM)	5 (a)	8 (b)	13 (a)	100 (a)	400 (b)	facteur de diminution
µ (j^{-1})	**0.23 (0.01)**	**0.26 (0.02)**	**0.34 (0.04)**	**0.51 (0.03)**	**0.52 (0.03)**	**Croco (-2.3)**
	0.15 (0.04)	0.13 (0.06)	0.23 (0.00)	0.34 (0.03)	0.46 (0.08)	Tricho (-3.1)
Volume (μm^3)	**nd**	**nd**	**4.7 (0.9)**	**nd**	**8.4 (2.6)**	**Croco (-1.8)**
	nd	5020 (241)	nd	nd	14855 (317)	Tricho (-3)
C/N (mol/mol)	**8.9 (0.3)**	**8.8 (0.6)**	**10.2 (0.4)**	**8.4 (0.7)**	**9.6 (0.5)**	**Croco (=)**
	8.0 (0.6)	8.1 (1.1)	6.6 (0.2)	5.4 (0.2)	5.1 (0.1)	Tricho (+ 1.6)
Chl*a*/C (mmol/mol)	**0.04 (0.00)**	**0.03 (0.01)**	**0.04 (0.00)**	**0.06 (0.01)**	**0.06 (0.01)**	**Croco (-1.5)**
	nd	0.03 (0.01)	nd	nd	0.2 (0.03)	Tricho (-6.7)
CO_2 Fix $ngC.\mu gC^{-1}.h^{-1}$	**31.6 (3.3)**	**39.1 (2.3)**	**52.0 (4.1)**	**41.0 (8.4)**	**55.0 (2.7)**	**Croco (-1.3)**
	26.5*	nd	29.1*	94.6*	nd	Tricho (-3.6)
N2 Fix ($mmolN.mmolgC^{-1}.h^{-1}$)	**2.8 (0.5)**	**2.1 (0.3)**	**nd**	**5.8 (0.9)**	**3.9 (0.7)**	**Croco (-2.1)**
	0.3 (0.1)	nd	0.6 (0.2)	1.7 (0.2)	nd	Tricho (-5.7)

(a) Rochelle-Newall et al. (2014) pour Tricho
(b) Bucciarelli et al. (2013) pour Tricho
* Production primaire totale – production primaire dissoute
nd : non déterminé

La distribution des taux de croissance de *T. erythraeum* en fonction des concentrations en Fe suit également une distribution de Monod (Figure 1.20), ce qui a permis de déterminer les 2 paramètres de croissance, $K_{\mu Fe}$ et μ_{max}. Il a été observé pour *C. watsonii* un μ_{max} plus fort que pour *T. erythraeum* (0.54 ± 0.01 et 0.44 ± 0.03 j^{-1} respectivement), ce qui traduit bien des différences métaboliques entre ces deux organismes, en condition de non-limitation. Il a été observé un $K_{\mu Fe}$ de 6.95 ± 0.66 nM pour *C. watsonii*, soit 2 fois inférieur à celui de *T. erythraeum* cultivé dans les mêmes conditions (13.9 ± 3.3 nM, calculé à partir de Bucciarelli et al. (2013) et Rochelle-Newall et al. (2014)) (Tableau 1.VII). De même que pour *C. watsonii*, il a été possible d'estimer le $K_{\mu Fe'}$ pour *T. erythraeum* IMS101 pour chaque concentration en Fe' à partir des valeurs de Bucciarelli et al. (2013) et Rochelle-Newall et al. (2014) inférieures à la limite de solubilité de Fe' (Fe' = 0.69, 0.30 et 0.26 nM) selon l'équation 1.2. Nous obtenons ainsi un $K_{\mu Fe'}$ moyen de 0.68 ± 0.34 nM pour *T. erythraeum*, soit également ~2 fois supérieur à celui de *C. watsonii* (Tableau 1.VII). Cela indique que ***C. watsonii* est plus adaptée aux environnements pauvres en fer que *T. erythraeum*.**

Tableau 1.VII. Récapitulatif des paramètres de Monod (μ_{max}, $K_{\mu Fe}$ et $K_{\mu Fe'}$) pour *C. watsonii* WH8501 et *T. erythraeum* IMS101.

	C. watsonii WH8501	*T. erythraeum* IMS101
μ_{max} (j^{-1})	0.54 ± 0.01	0.44 ± 0.03
$K_{\mu Fe}$ (nM)	6.95 ± 0.66	13.9 ± 3.3
$K_{\mu Fe'}$ (nM)	0.38 ± 0.11	0.68 ± 0.34

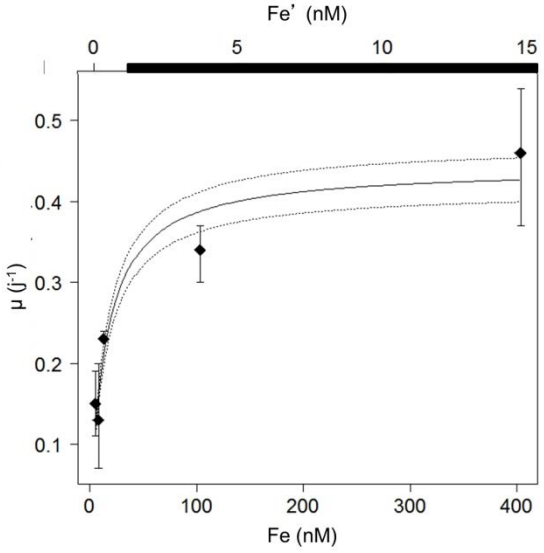


Figure 1.20. Taux de croissance moyen (μ, en j^{-1}) de *T. erythraeum* IMS101 en fonction des concentrations en Fe et Fe' (nM) d'après Bucciarelli et al. (2013) et Rochelle-Newall et al. (2014). Les barres d'erreur représentent les écart-types associés. Le trait plein représente la régression non-linéaire de Monod (calculée à partir de Fe) et ses écart-types associés en pointillé La zone noire représente la région de potentielle précipitation des hydroxydes de fer(III).

T. erythraeum effectue aussi une stratégie de diminution de volume en condition de limitation en fer. Néanmoins, le volume de ces ceux cyanobactéries n'est pas affecté de la même manière avec une diminution plus forte chez *T. erythraeum* (Tableau 1.VI). Les rapports C/N ne varient pas de la même façon chez les deux organismes, avec une augmentation chez *T. erythraeum* quand les concentrations en Fe diminuent alors qu'il n'y a pas de tendance marquée chez *C. watsonii*. Cette augmentation de C/N est attribuée à la plus forte variation du taux de fixation de N_2 par rapport au taux de fixation de CO_2 chez *T. erythraeum* (Rochelle-Newall et al. 2014). En effet, une différence majeure est observée pour les taux de fixation de N_2 normalisés par la biomasse (COP), qui diminuent 5 fois pour *T. erythraeum* et 2.1 fois pour *C. watsonii* pour une diminution de Fe de 100 à 5 nM. Enfin le rapport Chl*a*/C de *T. erythraeum* est plus fortement diminué en

condition de limitation en fer, ce qui est cohérant avec le plus fort impact de cette limitation sur les taux de fixation de CO_2 (Tableau 1.VI).

En condition de non-limitation en fer, le biovolume de *T. erythraeum* (~ 14855 µm^3, (Bucciarelli et al. 2013)), est largement supérieur à celui de *C. watsonii* (8.4 µm^3), ce qui induit un rapport S/V plus fort chez *C. watsonii* (S/V = 2.4, Figure 1.10B) que chez *T. erythraeum* (S/V~0.55, Ridame, comm. pers.; Berman-Frank et al. 2007). Les petites cellules, telles que *C. watsonii* possèdent donc un rapport S/V plus favorable pour l'absorption des nutriments, dont le fer (Hudson et Morel 1990; Sunda et Huntsman 1995). Elles sont donc mieux adaptées à de plus faibles concentrations en fer, ce qui peut en partie expliquer pourquoi *C. watsonii* est moins fortement impactée par la limitation en fer que la cyanobactérie filamenteuse *T. erythraeum*. En effet, Berman-Frank et al. (2007) ont montré une utilisation du fer par unité de biomasse (FUE, 'Iron utilization efficiency') plus efficace pour des cellules présentant des rapports S/V plus forts (telle *Cyanothece* WH8904) que pour des cellules présentant des S/V plus faibles (telle *T. erythraeum*). De plus, *C. watsonii* effectue une fixation de N_2 nocturne (Tuit et al. 2004; Mohr et al. 2010a) avec synthèse et dégradation journalière des enzymes métalliques impliquées dans la photosynthèse (certaines protéines du PSI et les cytochromes b6 et c550) et dans la fixation de N_2 (les deux complexes protéiques de la nitrogénase), de façon coordonnée à leur utilisation (Figure 1.21) (Saito et al., 2011).

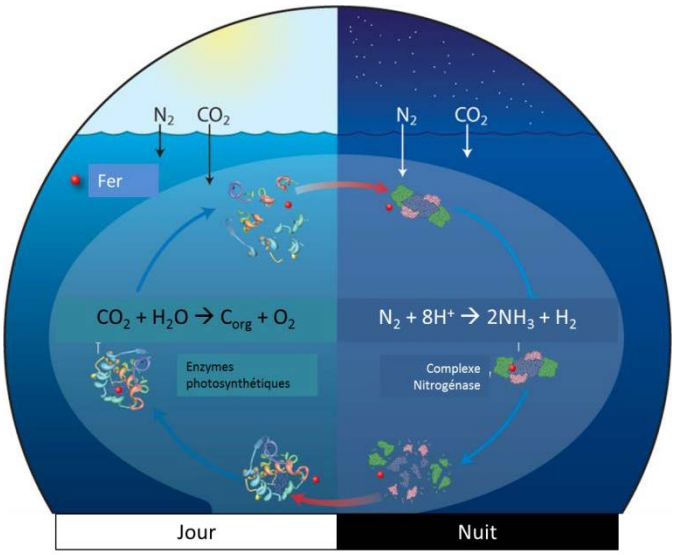


Figure 1.21. Stratégie de conservation du fer effectuée par *C. watsonii*. D'après M. Saito, WHOI. Les flèches rouges représente le transfert des molécules de fer libérées par les enzymes photosynthétiques et réutilisées par le complexe nitrogénase ou inversement.

Cette stratégie de conservation du fer permet de recycler quotidiennement le fer contenu dans ces enzymes et conduit à réduire jusqu'à 40 % les besoins en fer de *C. watsonii* (Saito et al. 2011). *T. erythraeum* n'utilise probablement pas cette stratégie, ou du moins pas aussi efficacement que *C. watsonii* puisqu'elle effectue à la fois la photosynthèse et la fixation de N_2 de jour. La ferrédoxine, protéine fer-soufre, utilisée pour le transport d'électrons dans la photosynthèse est également un donneur d'électrons efficace pour la nitrogénase chez *T. erythraeum* (LaRoche et Breitbarth 2005). Chez les cyanobactéries, en condition de carence en fer, la flavodoxine, protéine dépourvue de fer, agit comme un donneur d'électrons pour la nitrogénase alternativement à la ferrédoxine (Ferreira et Straus 1994), comme précédemment rapporté pour *T. erythraeum* (Chappell et Webb 2010). Cependant, chez *C. watsonii*, la forte abondance nocturne de flavodoxine, même en condition de non-limitation en fer, apparaît être une adaptation pour la réduction de la demande cellulaire en fer (Saito et al. 2011). **Toutes ces caractéristiques physiologiques de *C. watsonii,* récemment observées, supportent donc l'hypothèse de faibles besoins en fer, comparés à la cyanobactérie diazotrophe filamenteuse *T. erythraeum***. Cela est en accord avec les plus forts rapports cellulaires Fe/C observés en condition de non-limitation pour *T. erythraeum* (Fe/C compris entre 69 et 87 µmol:mol (Berman-Frank et al. 2001b; Tuit et al. 2004)) par rapport à ceux de *C. watsonii* (Fe/C = 16 $\mu mol.mol^{-1}$ (Tuit et al. 2004)). L'ensemble de ces résultats explique donc la meilleure adaptation de *C. watsonii* par rapport à *T. erythraeum* aux environnements pauvres en fer.

VI. Conclusions et influence du fer sur la biogéographie des cyanobactéries diazotrophes en milieu naturel

Nous avons quantifié pour la première fois l'impact de la biodisponibilité en fer sur la croissance, le volume et l'activité photosynthétique et de diazotrophie d'une UCYN océanique, en mettant en évidence une réponse dépendant du degré de limitation. La photosynthèse (fixation de CO_2) permettant de fournir de l'énergie pour alimenter la fixation de N_2, ces deux processus de fixation sont étroitement liés. La réponse cellulaire doit donc être considérée globalement car une limitation en nutriment, tel que le fer, va affecter le métabolisme entier de la cellule en impliquant des rétroactions croisées.

L'observation d'un impact significatif de la biodisponibilité en fer sur l'activité de fixation de N_2 de *C. watsonii* contribue à **l'amélioration des connaissances concernant le contrôle du fer sur le cycle du N dans les régions tropicales et subtropicales. Ces résultats viennent compléter ceux de précédentes études** ayant permis de mettre en évidence une modification du protéome de *C. watsonii* induite par une limitation en fer, avec notamment l'expression d'une protéine particulière spécifique du stress en fer (IdiA), supposée jouer un rôle dans l'absorption du fer (Webb et al. 2001). Plus récemment, Saito et al. (2011) ont étudié le protéome complet de *C. watsonii* et mis en évidence une dépendance de l'expression de certaines protéines à la disponibilité en fer (Saito et al. 2011 Supp.). Ces auteurs ont montré, lors d'une diminution de la biodisponibilité du fer, l'intensification de l'expression d'une protéine (Cwat5294) pouvant être mise en jeu dans un mécanisme de concentration du carbone. Celle-ci faciliterait le transport du HCO_3^- et du CO_2 à l'intérieur des cellules afin d'augmenter la concentration du carbone autour d'une enzyme catalysant la fixation intracellulaire du CO_2 (la RuBisCO ou ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Badger et al. 2006). Saito et al. (2011) ont également observé que la diminution de la disponibilité du fer induisait un doublement dans l'abondance de la RuBisco et une augmentation (20 fois) de l'abondance d'une enzyme impliquée dans la synthèse d'hydrates de carbone (fructose bi-phosphate aldolase). Ces auteurs en concluent que les cellules subissant un stress en fer tendent à effectuer une fixation de carbone plus efficace. Ils vont même plus loin, en suggérant qu'en conditions de carence en fer, l'augmentation de l'expression de ces protéines impliquées dans la fixation intracellulaire de C permettrait une excrétion de matériel extracellulaire organique, dans le but de stimuler la croissance de bactéries hétérotrophes productrices de sidérophores ce qui faciliterait l'absorption du fer par les cyanobactéries (Amin et al. 2009). Cependant, il n'a pas été mis en évidence chez *C. watsonii* de gènes impliqués dans la biosynthèse de récepteurs pour le transport de sidérophores similaires à

ceux retrouvés chez les bactéries (Hopkinson et Morel 2009). Il en est de même chez *T. erythraeum* mais il a été montré que des colonies isolées de *Trichodesmium* spp. dans l'Atlantique subtropical pouvaient assimiler du fer lié à différents types de sidérophores, possiblement grâce aux bactéries hétérotrophes présentes au sein de colonies (Achilles et al. 2003). Il pourrait ainsi exister chez les cyanobactéries marines des voies alternatives, non connues à ce jour, d'acquisition du fer lié à des sidérophores. Les constantes conditionnelles de stabilité de l'EDTA avec le Fe(III)' étant proche de celles des ligands naturels de type sidérophore ($\log K^{cond}_{FeEDTA}$ ~ 8.5 à 17.6 (Hudson et al. 1992), $\log K^{cond}_{FeL}$ ~ 12, avec L un ligand organique naturel de type sidérophore (Barbeau et al. 2003)), ce type de système d'acquisition du fer a pu avoir lieu dans nos cultures. Ces précédentes observations et les résultats obtenus ici mettant en évidence une réduction du biovolume afin de maintenir une croissance maximale montrent donc **la capacité de *C. watsonii* à s'adapter aux conditions de limitation en fer.** De plus, étant donné que la croissance et les activités de fixation de N_2 et CO_2 de *C. watsonii* sont fortement dépendantes de la biodisponibilité en fer, **les apports atmosphériques de poussières désertiques, constituant la source majeure de fer à l'océan ouvert de surface (Jickells et al. 2005), pourraient contrôler son abondance et son activité physiologique.**

D'après les résultats présentés, nous pouvons dire que dans l'océan les UCYN sont susceptibles d'être limitées par le fer et ce dans une moindre mesure que les cyanobactéries diazotrophes filamenteuses, telles que *Trichodesmium* sp. Cela implique donc un contrôle du fer sur la biogéographie des cyanobactéries diazotrophes, ce qui est en accord avec les observations de différentes niches écologiques pour *Crocosphaera* et *Trichodesmium* dans le milieu naturel. Campbell et al. (2005) ont observé, dans le Pacifique Sud-Ouest, que les UCYN assimilées à *C. watsonii* sont dominantes aux stations océaniques (concentrations en dFe < 0.06 nM), alors que *Trichodesmium* spp. dominent les stations côtières plus riches en fer (0.5 nM). Ces auteurs ont attribué cette distribution relative à la biodisponibilité en fer, plus importante en région côtière. Du fait du manque de données concernant les UCYN, la paramétrisation de la fixation de N_2 dans les modèles biogéochimiques est principalement basée sur les caractéristiques de *Trichodesmium* (*e.g.* (Moore et al. 2004; Coles et Hood 2007). Ces modèles pourraient alors être améliorés par l'ajout d'un compartiment UCYN puisqu'elles semblent se développer dans des niches écologiques plus vastes que *Trichodesmium* spp.. De plus, nos résultats confortent l'idée que les besoins en fer et/ou les stratégies d'acquisition du fer sont variables au sein de la communauté des UCYN (UCYN-A, *Crocosphaera* et *Cyanothece*). **La biodisponibilité de ce**

micronutriment pourrait alors expliquer en partie du moins la variabilité spatiale de la composition de la communauté des UCYN. Ainsi, **les cyanobactéries fixatrices de N_2 ne doivent pas être considérées comme un seul groupe dans les modèles biogéochimiques globaux ou régionaux.** Il serait pertinent de considérer différents types d'UCYN dans les modèles biogéochimiques de biogéographie des diazotrophes tel que celui de Monteiro et al. (2010) ou Dutkiewicz et al. (2012). Dans ces modèles, les besoins en fer des UCYN simulés sont représentés par un $K_{\mu Fe}$, déterminé à partir de données expérimentales obtenues pour *Trichodesmium* et des cyanobactéries unicellulaires non diazotrophes (*Prochlorococcus* ou *Synechococcus*). Dans ce contexte, les données obtenues dans notre étude vont permettre d'**améliorer la paramétrisation de la fixation de N_2 et de la distribution des UCYN dans les modèles biogéochimiques**.

Chapitre 2

Impact d'une pluie saharienne sur la croissance et l'activité de *C. watsonii* cultivée en condition de limitation en fer

I. Importance biogéochimique des apports atmosphériques de fer à l'océan ouvert

Il existe plusieurs sources de fer à l'océan impactant des régions différentes avec des intensités contrastées.

Apports fluviaux

Les apports fluviaux constituent une source majeure de fer total en milieu côtier, mais seul ~0.2 % de ce fer se trouve sous forme dissoute (Poulton et Raiswell 2002). De plus seulement ~10 % de ce fer atteint finalement l'océan, le reste étant piégé dans les estuaires suite à des mécanismes d'agréation et de précipitation importants dans ces zones (de Baar et de Jong 2001). Cette source de fer est donc restreinte principalement à la zone côtière et impacte peu l'océan ouvert.

Apports sédimentaires

Les apports en fer total liés à la remise en suspension des sédiments des marges continentales ne sont pas exclusivement réservés au milieu côtier et peuvent être transportés sur de grandes distances grâce à des phénomènes physiques tels que les tourbillons (Johnson et al. 2005) ou l'advection horizontale rapide (Lam et Bishop 2008). Les mécanismes de remontée d'eau profonde (upwelling) permettent un apport de fer dissous d'origine sédimentaire à l'océan de surface dans certaines régions (Bruland et al. 2005; Moore et Braucher 2008). Enfin, le sillage des îles peut également constituer une source non-négligeable de fer dissous à l'océan de surface, comme cela a récemment été montré au niveau des îles Kerguelen dans l'océan Austral par Blain et al. (2008).

Apports hydrothermaux

Les sources hydrothermales (ou fumeurs) libèrent également de grandes quantités de fer (Elderfield et Schultz 1996), dont une partie peut atteindre la surface de l'océan côtier ou ouvert sous forme dissoute (Tagliabue et al. 2010). Mais cet apport est majoritairement restreint aux régions dont l'activité hydrothermale est importante (proche de l'Islande par exemple, mais aussi dans une moindre mesure dans l'océan Austral) et il ne contribuerait que à 3 % des concentrations globales de fer dissous dans l'océan de surface (Tagliabue et al. 2010).

Apports atmosphériques

Les apports atmosphériques d'origine éolienne représentent, à l'échelle globale, la principale source de fer total pour les eaux de surface hauturières (Duce et Tindale 1991; Jickells et al. 2005). Une large majorité du fer total atmosphérique (95 %) est contenue dans les poussières d'origine désertique, les 5 % restant provenant d'aérosols issus de combustion (fossile ou feu de biomasse) (Luo et al. 2008; Mahowald et al. 2009). Les poussières désertiques sont transportées par voie atmosphérique sur de longues distances depuis leurs zones de production dans les régions arides et semi-arides, tels les déserts du Sahara, de Chine, de la péninsule arabique, d'Australie ou de la Patagonie (Maher et al. 2010, Figure 2.1).

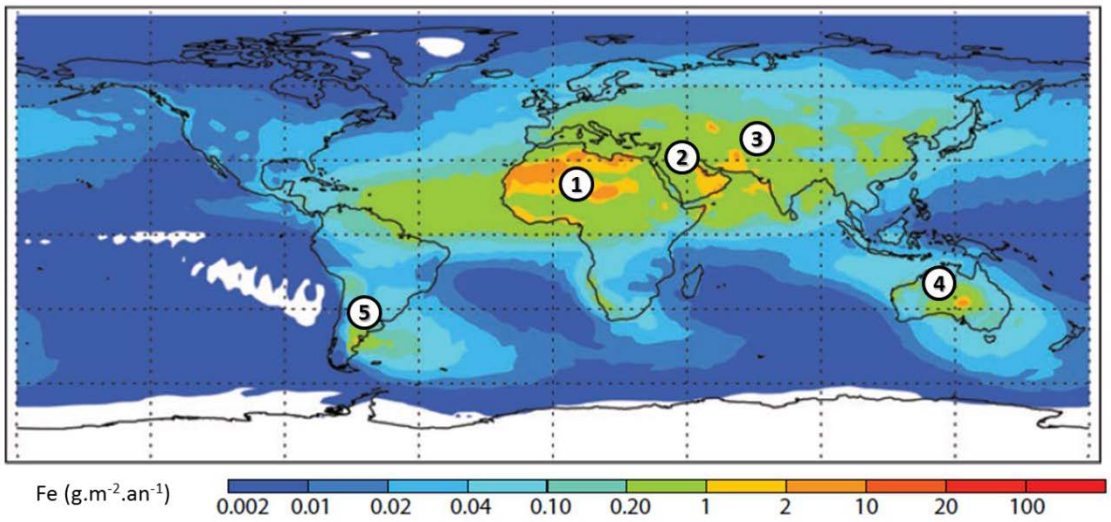


Figure 2.1. Flux annuel de dépôts de fer total atmosphérique à la surface des continents et océans en $g.m^{-2}.an^{-1}$. Les principales sources désertiques de poussières atmosphériques sont identifiées : 1. Sahara, 2. Péninsule Arabique, 3. Désert de Chine, 4. Australie et 5. Patagonie. D'après Mahowald et al. (2009) (avec la permission d'Elsevier licence n°3403190241807) et Maher et al. (2010).

Les aérosols se déposent à l'océan par dépôt sec dû à la chute gravitaire et surtout par dépôt humide *via* les précipitations (30 à 95 % des dépôts, (Jickells et Spokes 2001)). Les poussières désertiques contiennent en moyenne 3.5 % de fer (Jickells et al. 2005) et il a été estimé un apport annuel global à l'océan ouvert par voie atmosphérique de 12 à 16 Tg de fer total (Jickells et al. 2005; Luo et al. 2008) et de 0.26 Tg de dFe (Johnson et Meskhidze 2013). Les zones tropicales de l'hémisphère nord sont les plus impactées par les apports désertiques en fer du fait de la prédominance des continents dans cet hémisphère. Le désert du Sahara constitue la principale source de fer atmosphérique (Figure 2.1 et 2.2). La majorité des dépôts

atmosphériques de fer a donc lieu dans l'océan Atlantique Nord et en mer Méditerranée qui se trouvent sous l'influence des vents des côtes nord africaines (Figure 2.1) (Mahowald et al. 2009). L'Atlantique Nord reçoit alors 43 % du dépôt total de poussières à l'océan (Jickells et al. 2005) et ~60 % du dépôt total de fer atmosphérique à l'océan (Mahowald et al. 2009).

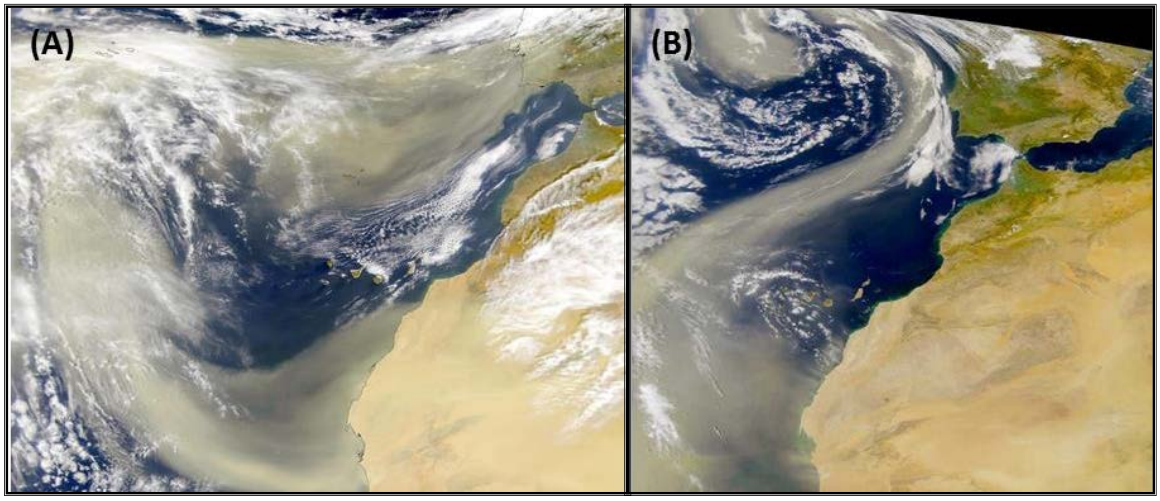


Figure 2.2. Photos satellites d'un panache atmosphérique de poussières sahariennes au-dessus de l'océan Atlantique Nord. Evènements du 28 février 2000 (A) et du 13 février 2001 (B).Images seawifs, NASA.

Il existe dans l'océan des zones particulières appelées zones HNLC pour « High Nutrient Low Chlorophyll », au sein desquelles la biomasse du phytoplancton et la production primaire sont faibles en dépit de fortes concentrations en nitrates et phosphates. Les trois principales zones HNLC sont situées dans le Pacifique équatorial, le Pacifique subarctique et l'océan Austral. Ces zones sont également caractérisées par de faibles concentrations de dFe, de l'ordre 0.1 à 0.3 nM (Bowie et al. 2001; Nishioka et al. 2001; Sedwick et al. 2002) et il a été montré que c'est le fer qui limite le développement phytoplanctonique dans ces régions (*e.g* Martin et Fitzwater 1988; Martin et al. 1990; Boyd et al. 2000; Gervais et al. 2002; Tsuda et al. 2003). En effet, ces zones sont peu soumises aux dépôts atmosphériques (Jickells et al. 2005) (Figure 2.1). Durant le dernier maximum glaciaire (-18000 ans), le dépôt atmosphérique de poussières éoliennes dans l'océan austral aurait été 20 fois plus élevé qu'actuellement (Mahowald et al. 1999). L'apport résultant en fer aurait permis de stimuler la production primaire dans l'océan Austral (Martin 1990), contribuant ainsi à la diminution de 80 ppm de la pCO_2 lors de cette période (Sigman et Boyle 2000). Une autre hypothèse à la diminution de la pCO_2 lors du dernier maximum glaciaire a été proposée par Falkowski (1997) : les apports atmosphériques élevés auraient permis de stimuler la fixation de N_2 dans les zones LNLC, ce qui aurait alors entraîné une augmentation du stock de

N nouveau et donc de la production nouvelle permettant d'intensifier la pompe biologique. Ces exemples illustrent le rôle clé des apports atmosphériques de fer sur le climat *via* leur impact sur la productivité phytoplanctonique et également sur la fixation océanique de N_2. Falkowski (1997) a également suggéré que la limitation de la fixation de N_2 par le fer pourrait avoir un impact considérable sur la pompe biologique de carbone dans l'océan actuel. Les faibles concentrations en dFe dans l'océan de surface (< ~1 nM (Toulza et al. 2012)) pourraient limiter la fixation de N_2 dans les régions peu soumises aux apports atmosphériques d'origine désertique comme dans l'Atlantique (sub)tropical sud où les taux de fixation de N_2 et l'abondance de *Trichodesmium* spp. sont faibles (Moore et al. 2009). A l'inverse, dans l'Atlantique tropical Nord fortement soumis aux apports sahariens, les taux de fixation et abondances de *Trichodesmium* spp. sont nettement plus élevés et corrélés à la concentration de dFe ambiante (Wu et al. 2000; Moore et al. 2009). Malgré leur importance biogéochimique majeure, les interactions entre le fer atmosphérique et le réseau tropique océanique et plus particulièrement entre le fer atmosphérique et la fixation de N_2, sont mal connues.

L'objectif ici est donc d'**étudier la réponse de *C. watsonii* à un apport de fer issu de la dissolution de poussières désertiques afin de déterminer si un tel apport est susceptible de libérer du fer biodisponible pour cette UCYN**. Pour cela, des cultures de *C. watsonii* limitées en fer ont été fertilisées par une pluie saharienne simulée représentative d'un apport atmosphérique naturel.

Les résultats principaux de cette étude feront l'œuvre une publication prochainement soumise à Limnology and Oceanography : V. Jacq, C. Ridame, S. L'Helguen, F. Kaczmar, K. Desboeufs : Impact of atmospheric iron from Saharan dust on the growth and activity of the UCYN-B *Crocosphaera watsonii* : a culture experiment. (in prep).

II. Synthèse de la pluie désertique: simulation d'un dépôt humide de poussières sahariennes

Pour ces expériences en cultures, nous avons choisi de simuler un dépôt humide car la solubilité du fer issu des poussières désertiques est plus forte lors d'un tel apport comparé à un dépôt sec (par exemple 14 % pour les dépôts humides contre 0.01 % pour un dépôt sec en mer de Sargasses (Jickells 1999)).

II.1. Le choix des poussières et de la charge particulaire de la pluie simulée

Les poussières utilisées pour la synthèse de la pluie simulée proviennent de la fraction fine (inférieure 20 µm, tamisage à sec réalisé au LISA) de sols collectés au Niger, une région source d'aérosols désertiques transportés vers l'océan Atlantique tropical et subtropical Nord (Figure 2.3). Cette fraction est représentative de la fraction dite aérolisable, c'est-à-dire pouvant être transportée sur de longues distances par voie atmosphérique (Marticorena et Bergametti 1995).

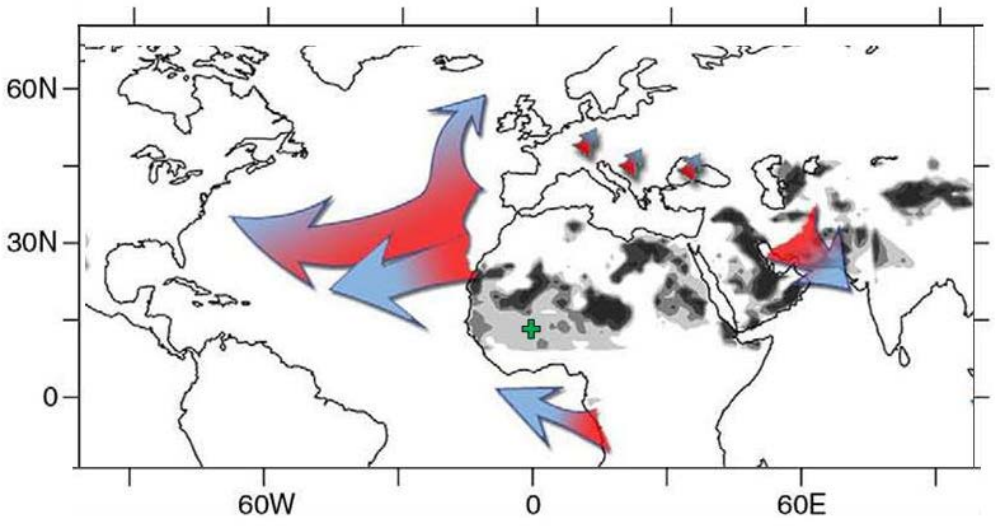


Figure 2.3. Distribution des différentes sources de poussières atmosphériques et de leurs principales trajectoires de transports (flèches dont la taille n'est représentative ni de la distance de transport, ni de son ampleur). La croix verte indique la localisation de la source des poussières utilisées ici (13.31° N, 2.38°E, Niger). D'après Maher et al. (2010) (avec la permission d'Elsevier licence n°3403190241807).

La taille des particules dans l'atmosphère diminue au fur et à mesure qu'elles s'éloignent de la zone source du fait de taux de déposition plus élevé pour les particules les plus grosses (Duce et

al. 1991). En effet, il a été observé une diminution du diamètre maximum des poussières sahariennes aéroportés d'environ 30 µm au niveau des côtes ouest africaines à 1 à 3 µm dans les Caraïbes (Baker et Jickells 2006). La fraction fine de sols utilisée pour notre expérience (< 20 µm) correspond à la fraction de taille des aérosols collectés dans l'Atlantique central (56.10^{-3} à 18 µm, Buck et al. 2010a), elle est donc représentative de la granulométrie des aérosols sahariens collectés dans le milieu naturel.

La charge particulaire de la pluie simulée a été fixée à 250 $mg.L^{-1}$, représentative des concentrations naturelles en particules désertiques observées dans des pluies sahariennes collectées en Mer Méditerranée, comprises entre 5 et 8 000 $mg.L^{-1}$ (Ridame et Guieu 2002). Il est possible d'effectuer un traitement d'évapo-condensation des poussières, mimant artificiellement les processus ayant lieu naturellement lors du transport dans l'atmosphère mais mettant en jeu l'utilisation d'HNO_3 (Desboeufs et al. 2001; Guieu et al. 2010). Nous avons alors choisi de ne pas utiliser de poussières ayant subi des cycles d'évapo-condensation du fait de la libération de nitrates à l'issu de ce processus (Ridame et al. 2014) pouvant potentiellement inhiber les activités de fixation de N_2.

II.2. Caractérisation chimique et minéralogique des poussières

Les poussières utilisées ici contiennent en moyenne 3.1 ± 0.2 % de fer (en masse), 0.03 ± 0.01 % de phosphore (Paris et al. 2011) et 0.22 ± 0.01 % de N (Ridame comm. Pers.) (Tableau 2.I). La minéralogie des poussières utilisées a également été déterminée par Paris et al. (2011) qui montrent une quantité relative de fer sous forme d'(hydr)oxydes (goethite et hématite) équivalente à 70 % du fer total qu'elles contiennent, les 30 % étant principalement sous forme d'illite (Paris et al. 2011; Paris et Desboeufs 2013). L'illite est la seule argile contenant du fer identifiée dans les sols du Sahara utilisés dans les mesures de dissolution du fer de Paris et al. (2011). Ces auteurs ont montré que 95 % du fer soluble contenu dans la fraction fine de sols du Niger résulte de la dissolution du fer contenu dans l'Illite et que cette dissolution n'est pas liée à la présence d'hydroxydes. Néanmoins, ces poussières du Niger présentent une solubilité du fer maximale parmi les autres poussières sahariennes qu'ils ont étudiées, probablement due à leur plus fort contenu en Illite, qui n'a malheureusement n'a pu être quantifié pour aucune des poussières utilisées dans leur étude. Cette solubilité importante du fer a conduit notre choix à se porter vers ces poussières.

Tableau 2.I. Composition chimique (en % massique) de la fraction fine de sols utilisée pour l'enrichissement des cultures de *C. watsonii*. Les valeurs en noir sont données en % et les valeurs en gris en ppm (1 ppm = 0.0001 %).

Elément	Fe %	N %	P %	Mn %	Cu ppm	Mo ppm
%	3.1 (0.2) [a]	0.22 (0.01)[b]	0.03 (0.01)[a]	0.06 (0.01) [a]	13.5 (1.7)[c]	5.4 (0.9)[c]

[a] Paris et al. (2011) [b] Ridame (comm. pers.) [c] Desboeufs (comm. pers.)

II.3. Le choix du ligand organique du fer

L'oxalate est le ligand organique du fer prédominant dans les eaux de pluie naturelles (Sempéré et Kawamura 1996; Hegg et al. 2002) ainsi que dans les aérosols retrouvés dans l'atmosphère au-dessus des océans Pacifique (Kawamura et Usukura 1993; Kawamura et Sakaguchi 1999) et Atlantique (Baboukas et al. 2000; Johansen et al. 2000). Ce composé organique peut être d'origine biologique (Saydam et Senyuva 2002), anthropique (Kawamura et Kaplan 1987) ou encore résulter de processus chimiques internes aux nuages (Warneck 2003). En effet, des réactions d'oxydation de composés organiques présents dans les nuages (tels l'acide glycoxylique, l'acide glycolique, le glycolaldéhyde, le glyoxal ou le méthylglyoxal) peuvent conduire à la synthèse d'oxalate lors des processus d'évapo-condensation. L'oxalate est reconnu comme l'un des ligands organiques atmosphériques ayant les plus fortes affinités avec le fer ($\log K_{ox}^{Fe^{2+}}$ = 4.2, $\log K_{ox}^{Fe^{3+}}$ = 9.4 (Okochi et Brimblecombe 2002)). Ce ligand permet d'augmenter fortement la solubilité du fer dans les pluies (Paris et al. 2011; Johnson et Meskhidze 2013) (Figure 2.4).

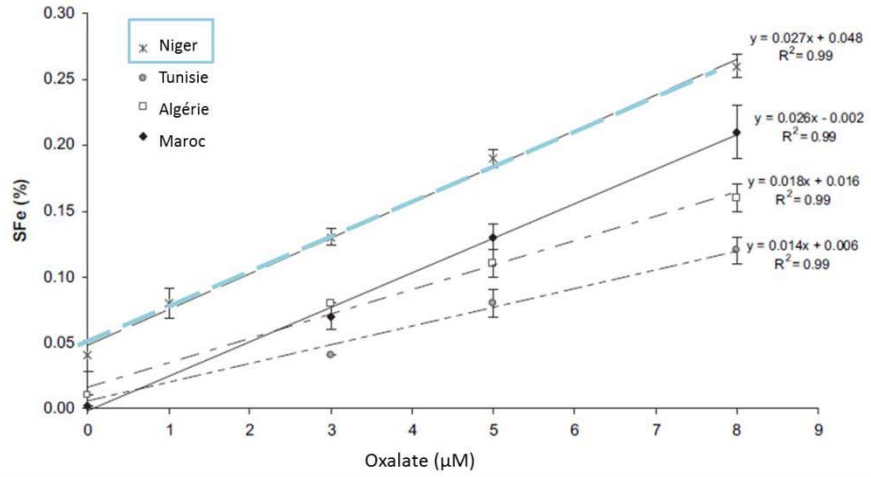


Figure 2.4. Solubilité du fer (SFe, en %) contenu dans des fractions fines de sols issues de différentes régions sahariennes en fonction de la concentration en oxalate dans des pluies artificielles. D'après Paris et al. (2011) (avec la permission d'Elsevier licence n° 3403190441227).

Afin de recréer des conditions de spéciation du fer proches de celles d'une pluie naturelle et d'augmenter la solubilité du fer, 1 µM d'oxalate a été rajouté à la pluie simulée. Nous avons ainsi fait le choix d'utiliser dans la pluie simulée un complexant organique naturel du fer : l'oxalate, à une concentration représentative des concentrations dans les eaux de pluies naturelles (de 0.1 à 5 µM (Sempéré et Kawamura 1996 ; Hegg et al. 2002; Avery et al. 2006)). La concentration utilisée ici (1 µM) permet de ne pas modifier de façon trop importante les conditions de culture (apport d'oxalate via la pluie simulée de 20 nM, soit 10 % de la concentration initiale dans le milieu, section III.3) tout en permettant d'augmenter la dissolution du fer (Figure 2.4). D'après les travaux de Paris et al. (2011) pour une charge particulaire de 15 $mg.L^{-1}$, une telle concentration d'oxalate, à un pH initial de 4.7 et pour un temps de contact d'1h, permet la dissolution de 0.08 ± 0.01 % du fer contenu dans les poussières du Niger utilisées ici, au lieu de 0.04 ± 0.01 % en l'absence de ligands (Figure 2.4). Ces poussières contenant 3.1 % de fer, **la concentration en dFe résultante dans la pluie simulée serait alors théoriquement de 111 nM pour une charge particulaire de 250 $mg.L^{-1}$.**

II.4. Préparation de la pluie saharienne

La pluie saharienne simulée a été préparée au laboratoire, sous hotte à flux laminaire, selon les conditions « ultra-propres » décrites dans le chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire, section I » et selon le protocole présenté Figure 2.5. Pour cela, 498.9 ml d'eau

ultra-pure ont été acidifiés à pH 4.7, pH médian des eaux de pluie (Desboeufs et al. 2005), par l'ajout d'acide sulfurique (H_2SO_4 de qualité suprapur®). Cet acide a été choisi car c'est l'un des agents acidifiants retrouvés typiquement dans l'atmosphère (Fuzzi 1994). A cette solution a ensuite été ajouté de l'oxalate (solution mère à 2 mM préparée à partir de sel de sodium d'oxalate: $C_2Na_2O_4$ de qualité « > 99.99 % trace metal basis », Sigma-Aldrich®) pour atteindre une concentration finale de 1 µM d'oxalate dans la pluie. Enfin, 125.4 mg de poussières issues la fraction fine des sols du Niger ont été ajoutés, conduisant ainsi à une charge particulaire de 251 $mg.L^{-1}$. Le temps de contact entre les poussières et la solution a été fixé à une heure, le pourcentage maximum de dissolution du fer étant atteint après 40 minutes de contact (Desboeufs et al. 1999). La pluie simulée a été préparée dans une bouteille en polycarbonate et laissée à la lumière naturelle pendant toute l'heure de contact, avec une agitation manuelle régulière environ toutes les 10 minutes. Elle a ensuite été filtrée sur une membrane en polycarbonate de porosité 0.2 µm à l'aide d'un kit de filtration en polysulfone. La filtration de la pluie est nécessaire afin d'éviter tout phénomène éventuel de (ré)adsorption des éléments dissous (dFe, phosphates…) sur les particules (Ridame et al. 2003; Bonnet et Guieu 2004; Wagener et al. 2010), a fortiori si la charge particulaire est élevée, comme c'est le cas ici.

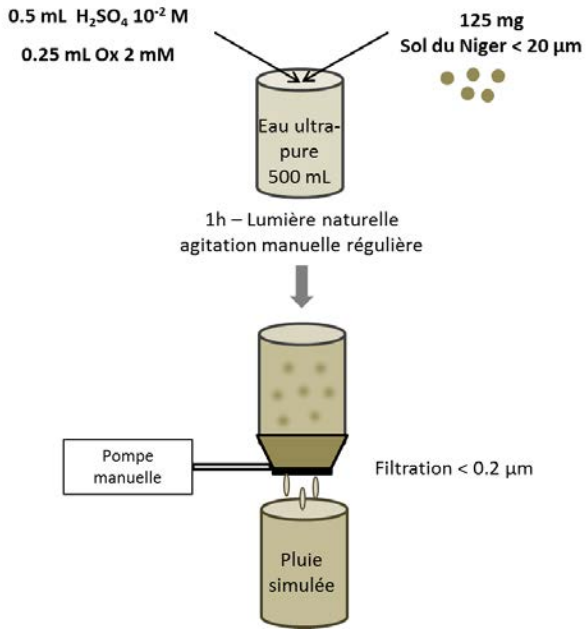


Figure 2.5. Protocole de préparation de la pluie simulée. Ox : Oxalate.

II.5. Les mesures dans la pluie artificielle

Le pH initial dans la pluie a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre Orion 3 star Thermo®. Les concentrations en phosphates ont été déterminées dans la pluie filtrée selon le protocole présenté dans le chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire,- section V.4. Les concentrations en métaux traces ont été mesurées par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES, Perkin Elmer® optima 3000 XL) par Karine Desboeufs (LISA) selon la méthode publiée par Desboeufs et al. (2003). Les limites de détection sont de 2.7 nM pour le Co, 3.1 nM pour le Cu, 1.3 nM pour le Fe, 0.2 nM pour le Mn et 5.5 nM pour le Ni. Les concentrations en nitrates (NO_3^-), sulfates (SO_4^{2-}), oxalate ($C_2O_4^{2-}$) et l'ammonium (NH_4^+) ont été déterminées par chromatographie ionique (850 Professional IC1, Metrohm®), par Karine Desboeufs (LISA), selon un protocole décrit dans Paris (2011)). Les limites de détection sont de 0.32 µM pour les nitrates et de 1.36 µM pour l'oxalate.

III. Mise en place des cultures pour l'étude de la réponse de *C. watsonii* à l'apport d'une pluie artificielle

III.1. Protocole de préparation du milieu de culture et purification sur résine chelex®

Afin de pouvoir cultiver *C. watsonii* dans un milieu fortement limitant en fer, il a été nécessaire de pouvoir diminuer la concentration finale en Fe dans le milieu en s'affranchissant de la contamination résiduelle de 3.3 nM (voir chapitre 1, section II.1). Pour cela, le milieu de culture YBCII a été purifié à l'aide d'une résine échangeuse d'ions chelex® (Chelex 100, Biorad) (Price et al. 1989; Sunda et al. 2005). Le protocole présenté par Price et al. (1989) et Sunda et al. (2005) a été complété afin d'être adapté à la culture de cyanobactéries diazotrophes. En effet une des étapes de préparation de la résine nécessite l'utilisation de NH_4OH pouvant mener à la libération de NH_4^+ dans le milieu. Ainsi, après avoir suivi toutes les étapes de conditionnement de la résine (Price et al. 1989; Sunda et al. 2005), celle-ci a été abondamment rincée avec au moins 2L d'eau ultra-pure afin d'éluer tous les NH_4^+ potentiellement présents. Le milieu a été préparé en dissolvant tous les sels et le $NaHCO_3$ dans de l'eau ultra-pure (Chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire », Tableau I) puis le pH a été mesuré (pH = 8.0). Le pH de la résine a été ajusté à celui du milieu à purifier. Pour cela ~500 mL de milieu ont été passés sur la résine (~2 $mL.min^{-1}$ à l'aide d'une pompe péristaltique) puis éliminés. Dès l'atteinte d'un pH de 8.0 le milieu purifié a pu être récupéré dans une bouteille en polycarbonate propre. Le pH du milieu a été régulièrement contrôlé en sortie afin d'assurer le maintien d'un pH de 8.0. Une fois la quantité de milieu nécessaire purifiée, les vitamines (qui ne sont pas purifiées sur la résine (Price et al. 1989)) et les métaux traces (excepté le fer) préalablement stérilisés par filtration ('filtre seringue' en polyethersulfone (PES) de porosité 0.2 µm (Minisart®)) ont été ajoutés. Une solution mère de phosphates (20 mM) a été purifiée en parallèle sur une deuxième résine, puis ajoutée au milieu « chélexé » afin d'obtenir une concentration finale en phosphates de 20 µM. Ce milieu a ensuite été stérilisé par filtration sur un filtre d'acétate de cellulose de porosité 0.46 ± 0.2 µm (cartouche filtrante Sartorius®) préalablement rincé à l'HCl suprapur® dilué (~1% en volume). L'étape d'autoclavage réalisée pour les expériences du chapitre 1 (chapitre 1 section II.1) a été éliminée ici à cause la contamination potentielle en fer qu'elle pourrait engendrer. Afin de vérifier l'absence de contamination en fer dans le milieu purifié, des mesures de concentration de dFe dans le milieu YBCII « chelexé » et stérilisé sans fer, agent complexant ni phosphates ont été réalisées. Pour cela nous avons utilisé une méthode colorimétrique avec détection par spectrométrie UV-Vis à l'aide d'une LWCC (liquid Waveguide Capillary Cells) avec un chemin optique d'1m, ce qui permet d'obtenir des limites de détection relativement basses

(1.2 nM pour le dFe total ici), couplée à un spectromètre JAZ® (Ocean Optic[3]). Le protocole adapté à l'eau de mer a été mis en place au laboratoire par Camille Bernard, stagiaire en école d'ingénieur (Bernard 2013), basé sur le protocole déjà existant pour le mesure du dFe dans les eaux de pluie (Willey et al. 2000; Kieber et al. 2005). **La concentration en dFe dans le milieu est indétectable (< 1.2 nM) après la purification**. Le fer et son agent complexant (l'oxalate) ont été ajoutés la veille des repiquages et le milieu a été laissé 24h à température ambiante dans le noir pour équilibrage.

III.2. L'utilisation de l'oxalate comme agent complexant du fer dans le milieu de culture

L'agent chélateur du fer utilisé dans le milieu de culture n'est plus l'EDTA mais l'oxalate, ligand utilisé pour la préparation de la pluie artificielle. L'EDTA est un ligand du fer de plus forte affinité que l'oxalate car il possède quatre groupes carboxyles permettant la complexation avec le fer, contrairement à l'oxalate qui n'en contient que deux (Sunda, comm. pers.). Les constantes de complexation entre le fer et l'oxalate ne sont pas connues dans l'eau de mer, mais dans l'eau douce elles sont plus faibles que pour l'EDTA : $\log K_{ox}^{Fe^{2+}}$ = 4.2 et $\log K_{ox}^{Fe^{3+}}$ = 9.4 (Okochi et Brimblecombe 2002) ; $\log K_{EDTA}^{Fe^{2+}}$ = 16.1 à 23.7 et $\log K_{EDTA}^{Fe^{3+}}$ = 27.7 à 37.7 selon la forme considérée (FeEDTA, FeHEDTA, FeOHEDTA ou $Fe(OH)_2EDTA$) (Sigg et al. 2006). L'oxalate et le fer forment des complexes FeOx ou $Fe(Ox)_2$, majoritairement hydrolysés dans l'eau de mer (Sunda, comm. pers.). Ainsi, en présence d'EDTA dans le milieu, lors de l'ajout de la pluie simulée le complexe Fe-EDTA se serait préférentiellement formé et aurait empêché la complexation avec l'oxalate apporté par cette pluie. De plus, cette modification du milieu YBCII par rapport à la composition présentée Tableau I (chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire» section III), consistant à utiliser l'oxalate au lieu de l'EDTA comme agent complexant du fer a ainsi permis d'être en présence d'un ligand retrouvé dans le milieu naturel (Steinberg et Bada 1984; Tedetti et al. 2006).

Il n'a pas été possible de déterminer la concentration en Fe' en présence d'oxalate dans le milieu de culture, les constantes de complexation du Fe et de l'oxalate dans l'eau de mer n'ayant jamais été publiées. Néanmoins nous savons que le complexe Fe(III)-oxalate est soumis à un cycle photochimique d'oxydo-réduction intense en présence de lumière (Figure 2.6, Sunda, comm. pers.). Au cours de ce cycle, le Fe(III)-Ox est réduit en Fe(II)' et l'oxalate est oxydé en CO_2. Par la

[3] http://www.oceanoptics.com/products/jaz.asp

suite le Fe(II)', s'il n'est pas consommé immédiatement, est rapidement ré-oxydé en Fe(III)' par l'oxygène présent dans l'eau de mer. Ce Fe(III)' est donc à nouveau disponible pour reformer un complexe avec de l'oxalate libre présent dans le milieu et subir à nouveau ce cycle photochimique d'oxydo-réduction, mais il peut également être assimilé par les cellules. De plus, l'oxalate peut former des complexes de surface avec le fer particulaire qui est présent dans le milieu sous forme d'hydroxydes de fer. Ces complexes peuvent également subir le cycle photochimique décrit ci-dessus, ce qui conduirait à une dissolution nette des hydroxydes (Sunda comm. pers.). Ces cycles photochimiques ont donc pour effet d'augmenter la concentration, à l'équilibre, des formes biodisponibles Fe(II)' (si absorbées immédiatement) et surtout Fe(III)'.

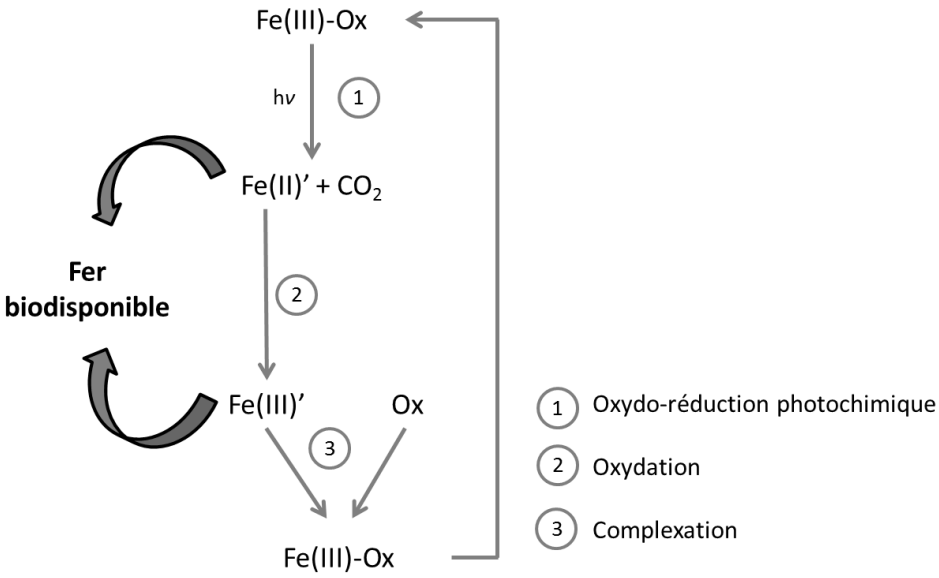


Figure 2.6. Schéma conceptuel résumant le cycle photochimique des complexes Fe(III)-oxalate (Fe(III)-Ox) dans l'eau de mer. Ox représente l'oxalate sous forme non complexé dans le milieu. D'après Sunda, comm. pers.

III.3. Les expériences préliminaires en présence de fer et oxalate

L'abondance de *C. watsonii* en culture acclimatée à différentes concentrations de fer et d'oxalate a été suivie (majoritairement par Céline Dimier-Hugueney anciennement post-doctorante au laboratoire). Les taux de croissance de chacune de ces cultures sont présentées Tableau 2.II et Figure 2.7.

Tableau 2.II. Taux de croissance de *C. watsonii* cultivée en présence de différentes concentrations en Fe et oxalate (Ox).

Fe (nM)	Ox (nM)	μ (j^{-1})	Ecart-type
0.1	100	0.05	0.02
0.5	100	0.12	0.05
1	100	0.21	0.05
3.3	100	0.36	0.01
1	200	0.31	0.02
2	200	0.38	0.05
5	200	0.43	0.09
10	200	0.48	0.08

Si l'on compare ces résultats avec les taux de croissance obtenus en présence d'EDTA (chapitre 1, Annexe 1), on observe que **pour une concentration en Fe donnée *C. watsonii* atteint un taux de croissance plus élevé en présence d'oxalate** (Figure 2.7) (par exemple pour 3.3 nM de Fe : 0.36 ± 0.01 j^{-1} en présence d'oxalate et 0.20 ± 0.03 en présence d'EDTA). En se basant sur cette réponse biologique, nous pouvons alors en conclure qu'il y aurait plus de fer biodisponible pour *C. watsonii* en présence d'oxalate qu'en présence d'EDTA. Nous pouvons supposer que ceci est le résultat d'une concentration en Fe' plus forte en présence d'oxalate qu'en présence d'EDTA pour une concentration en Fe donnée. En effet, bien que les constantes de complexation du fer et de l'oxalate ne soient pas connues dans l'eau de mer, nous pouvons supposer qu'elles sont plus faibles que celles du fer et l'EDTA par analogie avec celles connues dans l'eau douce indiquées plus haut. Cela conduirait donc à augmenter les concentrations en Fe'. Mais nous devons également prendre en compte une potentielle utilisation, du moins partielle, du complexe fer-oxalate *via* des mécanismes d'adsorption et dissolution du complexe à la surface des cellules, comme cela a déjà été montré pour le complexe Fe-EDTA chez des eucaryotes (Shaked et al. 2005, figure 1.18). Enfin la biodisponibilité de l'oxalate lui-même reste également inconnue à ce jour.

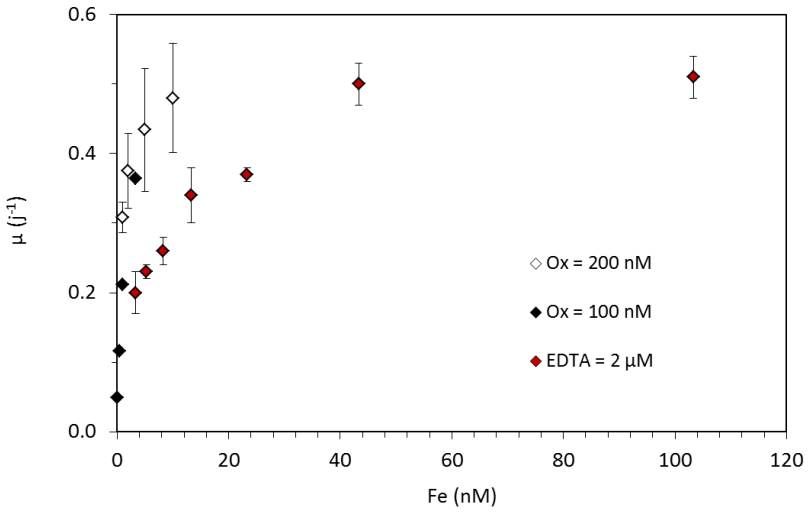


Figure 2.7. Taux de croissance moyens de *C. watsonii* cultivée en présence de fer et d'oxalate (points noirs : 100 nM d'oxalate, points blancs : 200 nM d'oxalate) ou d'EDTA (2µM, Chapitre 1; points rouges). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types associés.

En utilisant le $K_{\mu Fe'}$ défini « chapitre 1 – section III.2 » (0.38 ± 0.11 nM), nous pouvons estimer les concentrations en Fe' de chacune des cultures présentées Tableau 2.II à partir de leur taux de croissance selon l'équation 2.1, réarrangée à partir de celle du modèle de Monod:

$$[Fe'] = K_{\mu Fe'} \times \frac{\mu}{\mu_{max} - \mu} \qquad \text{(équation 2.1)}$$

avec : $\boldsymbol{\mu_{max}}$ le taux de croissance maximum obtenu à partir du modèle de Monod et des concentrations en Fe pour les cultures en présences d'EDTA (chapitre 1, section III.2).

Les valeurs ainsi obtenues (Tableau 2.III) sont comprises entre 0.04 ± 0.02 et 1.50 nM Fe'. Ces valeurs montrent que pour une concentration en Fe donnée (1 nM), l'augmentation de la concentration en oxalate (de 100 à 200 nM) permet d'augmenter la concentration en Fe' (Tableau 2.III), ce qui est l'inverse de ce qui peut être observé en présence d'EDTA. En effet Sunda et Huntsman (2003) obtiennent expérimentalement des valeurs de Fe(III)' plus faibles lorsque la concentration d'EDTA est augmentée (de 8 à 35 µM) pour une concentration en Fe constante (9 nM). Cette augmentation du Fe' lors d'une augmentation de la concentration en oxalate résulte probablement du cycle photochimique subit par le complexe fer-oxalate présenté Figure 2.6.

Tableau 2.III. Concentrations en Fe' calculées pour différentes concentrations en Fe et oxalate. Les lignes bleues correspondent à une concentration en Fe identique mais des concentrations différentes en oxalate.

Fe (nM)	Ox (nM)	Fe' (nM)	Ecart-type
0.1	100	0.04	0.02
0.5	100	0.11	0.06
1	100	0.26	0.09
3.3	100	0.80	0.05
1	200	0.52	0.09
2	200	0.68	0.07
5	200	0.63	nd
10	200	1.50	nd

nd : non déterminé (n = 1)

Nous avons choisi d'utiliser une culture en présence de 2nM de Fe et 200 nM d'oxalate pour tester la réponse à une pluie désertique car ce traitement représente le meilleur compromis entre une limitation en fer des cellules (μ = 0.38 ± 0.05 j^{-1}: inférieur au µmax de 0.54 j^{-1} et significativement différent ($p < 0.05$) des μ obtenus en présence de 2µM d'EDTA et 43.3, 103.3 et 403.3 nM de Fe, chapitre 1) et une biomasse suffisante pour pouvoir effectuer plusieurs prélèvements dans un volume de culture de 2L (volume maximal de culture réalisable au laboratoire) tout en étant au-dessus des limites de détection propres à chacun des appareils de mesures des différents paramètres. Cette concentration, en excès par rapport au fer présent dans le milieu, est ~ 2 fois plus élevée que les très rares concentrations rapportées pour le milieu marin. Steinberg et Bada (1984) ont mesuré des valeurs d'environ 100 nM à 75 m de profondeur dans l'océan Pacifique Est. Plus récemment, Tedetti et al. (2006) ont mesuré des concentrations de 13.71 ± 2.03 $\mu g.L^{-1}$ (soit 102 ± 15 nM) à 5 m de profondeur, à la station DYFAMED[4] située en Méditerranée nord occidentale.

Enfin, ces expériences de suivi d'abondance ont été très utiles du fait de la fragilité des cellules cultivées en présence d'oxalate et de la sensibilité de la réponse, ayant causé à deux reprises l'échec de l'expérience malgré un long travail de préparation (plusieurs semaines à plusieurs mois).

[4] DYnamique des Flux de mAtière en MEDiterranée, http://www.obs-vlfr.fr/sodyf/

III.4 Enrichissement des cultures de *C. watsonii* par la pluie artificielle : protocole expérimental.

Des cellules provenant de la culture contant 5.3 nM de Fe et 2 µM d'EDTA (chapitre 1, section I.2.) ont été repiquées dans du milieu YBCII « chelexé » contenant 2 nM de Fe et 200 nM d'oxalate. Les cellules ont été acclimatées à ce nouveau milieu pendant plus de 20 générations avant la réalisation de notre expérience. Le protocole de cette expérience, spécifiquement conçue au laboratoire afin de déterminer si du fer biodisponible pour *C. watsonii* peut être libéré dans une pluie saharienne, est présenté Figure 2.8. Les grandes lignes de cette expérience sont les suivantes (les temps (T) sont donnés en jours par rapport à l'ajout de pluie:

- à T-1: Repiquage de 6 cultures de *C. watsonii* à raison de 200mL d'inoculum dans 1800 mL de milieu de culture.
- à T0: Ajout de la pluie simulée dans 3 des 6 cultures (notées '+ Pluie') à raison de 2 %, soit 40 mL de pluie dans les 2L de culture, les 3 autres servant alors de contrôle.
- de T3 à T5 : Prélèvements pour les mesures des différents paramètres permettant d'étudier la réponse de *C. watsonii*, excepté l'abondance qui a été suivie durant les 18 jours de l'expérience.
- à T9 ('Contrôle') ou T15 ('+ Pluie') : Expériences complémentaires (détaillées dans la section I.7) permettant de déterminer si l'arrêt de la croissance dans les traitements 'Contrôle' et '+ Pluie' est provoqué par une déficience en fer.

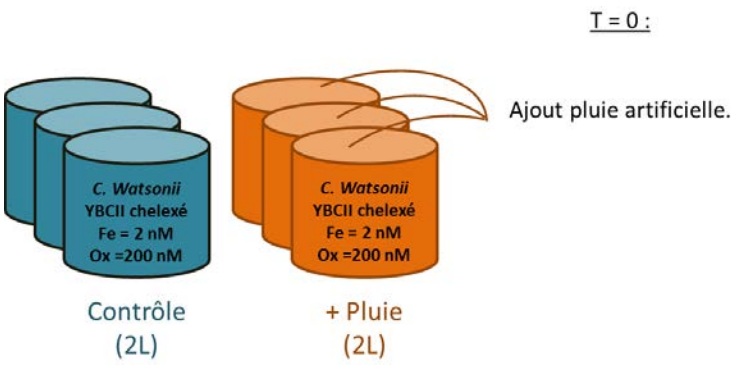


Figure 2.8. Protocole expérimental pour l'étude de la réponse de *C. watsonii* limitée en fer (2 nM de Fe + 200 nM d'oxalate (Ox)) à un dépôt humide de poussières sahariennes.

L'ajout de 40 mL de pluie dans 2L de culture aurait conduit à une concentration finale théorique de poussières de 5 $mg.L^{-1}$ si la pluie n'avait pas été filtrée. Cet apport correspond à un enrichissement en poussières causé par un fort événement saharien, de 50 $g.m^{-2}$ mélangé de manière homogène dans une couche d'eau de 10 m. Des observations et des travaux de modélisation ont montré des taux de déposition de poussières de 10 à 50 $mg.m^{-2}$ dans l'Atlantique tropical et subtropical Nord-Est, à l'échelle de l'évènement (Neuer et al. 2004; Mahowald et al. 2005). Un évènement saharien extrême pourrait alors causer, sur 10 m de profondeur, un enrichissement identique à celui simulé dans les cultures de *C. watsonii*. Le fer étant le seul élément appauvri dans le milieu de culture utilisé ici, l'interprétation des résultats sera basée sur le fait que seul un apport en fer biodisponible issu de la dissolution des poussières sahariennes dans la pluie peut générer une réponse physiologique chez *C. watsonii*.

Le pH dans les cultures n'a presque pas varié au cours de la phase exponentielle de croissance (mois de 0.2 unité de pH) Figure 2.9), ce qui limite son impact sur la spéciation du fer dans l'eau de mer et indique l'absence d'une limitation par le carbone inorganique dissous. Ces mesures permettent également de montrer qu'il n'y a pas eu d'influence significative de l'ajout de la pluie sur le pH des cultures.

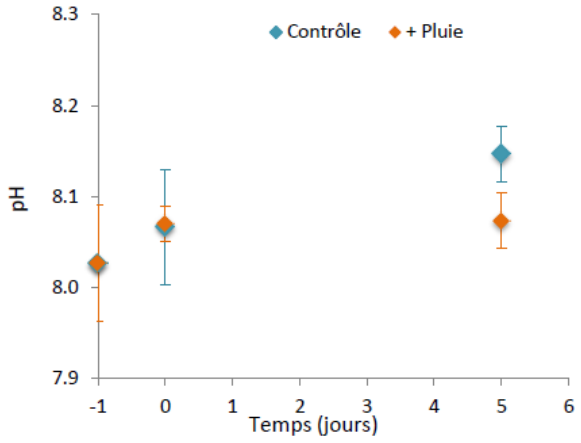


Figure 2.9. pH moyen mesuré dans les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' en début et fin de phase exponentielle de croissance. La valeur à T-1 correspond au pH moyen des milieux de culture avant repiquage.

III.5. Paramètres et processus mesurés dans les cultures

La réponse de *C. watsonii* a été évaluée en mesurant l'abondance cellulaire, ce qui a permis de déterminer une réponse en termes de croissance de la culture. Les contenus cellulaires en C, N et

chl*a*, ainsi que les taux de fixation de N_2 et de CO_2 ont également été mesurés. Ces cinq paramètres ont été mesurés durant la phase exponentielle de croissance (de T3 à T6), selon les méthodes présentées chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire». Les concentrations en phosphates (voir chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire» section V.4.) ont été mesurées dans le milieu au moment de l'ajout de la pluie simulée et au début de la phase stationnaire de croissance.

Le volume cellulaire a également été déterminé au cours de la phase exponentielle de croissance (de T3 à T6), selon une méthode différente de celle présentée au chapitre 1. Ici, des échantillons de 2mL ont été prélevés durant la période lumineuse (8h après le début de cette période). 200 µL de formaldéhyde à 20 % en volume ont été ajoutés et les échantillons ont immédiatement été placés dans le noir à 4°C durant 10min puis congelés à -80°C. La mesure du volume cellulaire a été effectuée à l'aide d'un Counter Coulter (Beckman, Multisizer 3) en collaboration avec Amélie Talec et Sophie Rabouille (LOV, UPMC).

Afin de tester l'impact du fixateur utilisé ici, 6 échantillons de 2 mL ont été prélevés dans des cultures en présence de 100 nM de Fe et 2 µM d'EDTA. Pour deux d'entre eux, 200 µL de formaldéhyde à 20 % en volume ont été ajoutés et les échantillons ont immédiatement été placés dans le noir à 4°C durant 10 min puis congelés à -80°C. Pour deux autres échantillons aucun fixateur n'a été utilisé et afin de pouvoir conserver les cellules ils ont été plongés 1 min dans l'azote liquide (méthode dite du « flashfreezing ») avant congélation immédiate à 80°C. Enfin pour les 2 échantillons restant, 200 µL de formaldéhyde à 20 % en volume ont été ajoutés puis les échantillons ont été plongés 1 min dans l'azote liquide et immédiatement congelés à -80°C. Ce dernier traitement a permis de déceler un éventuel effet du « flashfreezing » sur la taille des cellules. La mesure du volume cellulaire a également été effectuée à l'aide du Counter Coulter (Beckman, Multisizer 3) au LOV (UPMC). Bien que l'utilisation de duplicats n'ai pas permis de réaliser des comparaisons statistiques, des volumes similaires (12.64 ± 0.91 μm^3 en moyenne) ont été mesurés dans tous ces échantillons, ce qui indique que **l'utilisation du formaldéhyde comme agent fixateur n'a potentiellement pas eu d'effet sur la taille des cellules**.

III.6. Tests statistiques

Afin de comparer les valeurs moyennes de chacun des paramètres obtenus en phase exponentielle entre les cultures 'Contrôle' et '+Pluie', un test t de Student a été effectué, après vérification de l'égalité des variances à l'aide d'un test de Fisher (avec $\alpha = 0.05$ pour les 2 tests). Pour l'abondance cellulaire il a été nécessaire de comparer des valeurs à plusieurs pas de temps, ce qui a fait rentrer en compte l'influence du temps. Pour cela, une ANOVA à 2 facteurs et à mesure répétée a été réalisée suivie de tests t de comparaison 2 à 2 avec méthode de Holm pour l'ajustement de la *p*-value. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel libre R (R core team 2013).

III.7 Expérience d'ajout d'une pluie simulée sans poussières

Afin de vérifier qu'aucun des composants utilisés pour la préparation de la pluie (eau ultra-pure, oxalate et H_2SO_4), excepté les poussières, n'a eu une influence sur la croissance de *C. watsonii* et qu'aucune contamination en fer n'a eu lieu au cours de cette préparation, une expérience d'ajout de pluie sans poussières a été menée en parallèle de l'expérience principale. Pour cela, une pluie sans poussières a été préparée selon le même protocole que pour la pluie artificielle, excepté l'ajout de poussières. Six réplicats de cultures de *C. watsonii* (Fe = 2 nM et Ox = 200 nM) dans un volume de 30 mL ont été mis en place ; 1 jour après le repiquage, 2 % de la pluie sans poussières ont été ajoutés dans 3 réplicats (noté 'pluie SP'), les 3 autres ont servi de contrôle (noté 'Contrôle 2') (Figure 2.10). L'abondance de ces cultures a été suivie durant 1 semaine (de T-1 à T+5 jours).

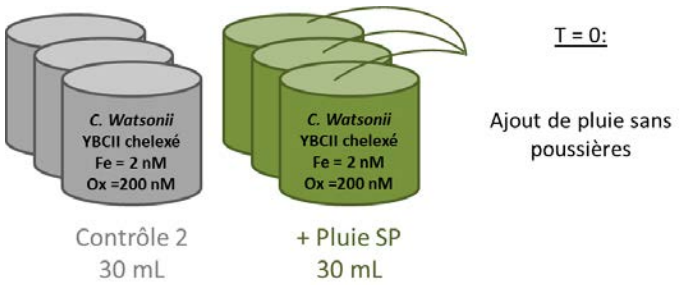


Figure 2.10. Schéma du protocole de l'expérience d'ajout de pluie sans poussières.

L'ajout de la pluie sans poussières n'a eu aucun impact sur l'abondance de *C. watsonii* ($p > 0.05$ pour tous les temps) (Figure 2.11). Les taux de croissance des cultures sans et avec ajout de pluie sans poussières, respectivement de 0.31 ± 0.02 et 0.28 ± 0.04 j^{-1}, sont identiques ($p > 0.05$). De plus, le taux de croissance du 'Contrôle 2' (Volume de culture = 30 ml) et du 'Contrôle' (Volume de culture = 2 L ; µ = 0.30 ± 0.01, section IV. 1) sont également identiques ($p > 0.05$). **Il n'y a donc pas eu d'influence sur la croissance de *C. watsonii* des composés autre que les poussières utilisés pour la préparation de la pluie artificielle**

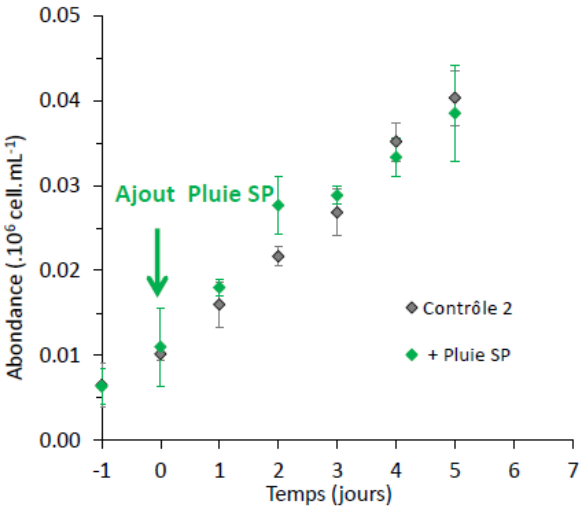


Figure 2.11. Abondances moyennes de *C. watsonii* dans les cultures 'Contrôle 2' (Fe = 2nM et Ox= 200 nM) et '+ Pluie SP' (ajout de pluie sans poussières).

III.8. Les ajouts de fer en fin de croissance

Afin de déterminer si l'arrêt de la croissance dans les traitements 'Contrôle' et '+ Pluie' est provoqué par une carence en fer, des expériences d'ajouts de Fe + oxalate en fin de phase de croissance ont été effectués selon le protocole présenté Figure 2.12 (similaire à celui des expériences complémentaires du chapitre 1, section II.7.). L'utilisation initiale de bouteilles de culture de 2L a néanmoins imposé une contrainte supplémentaire : il a fallu déterminer si le transfert des cellules dans un petit flacon (60 mL) pouvait avoir une quelconque influence sur l'évolution de l'abondance de *C. watsonii* (il a été observé plusieurs fois, au cours du travail de laboratoire mené dans le cadre de cette thèse, que le volume du flacon pouvait, dans le cas de

cultures très limitées en présence d'oxalate, influer sur l'abondance de *C. watsonii*). Pour chacun des trois réplicats de chaque traitement, un aliquote (30 mL) a été transféré dans un flacon de 60 ml et un aliquote a été transféré dans un flacon de 60 ml puis enrichi en Fe (2.2 nM) + oxalate (20 nM). L'abondance de ces cultures, ainsi que de celles restantes dans les bouteilles de 2L a été suivie pendant quelques jours après l'ajout.

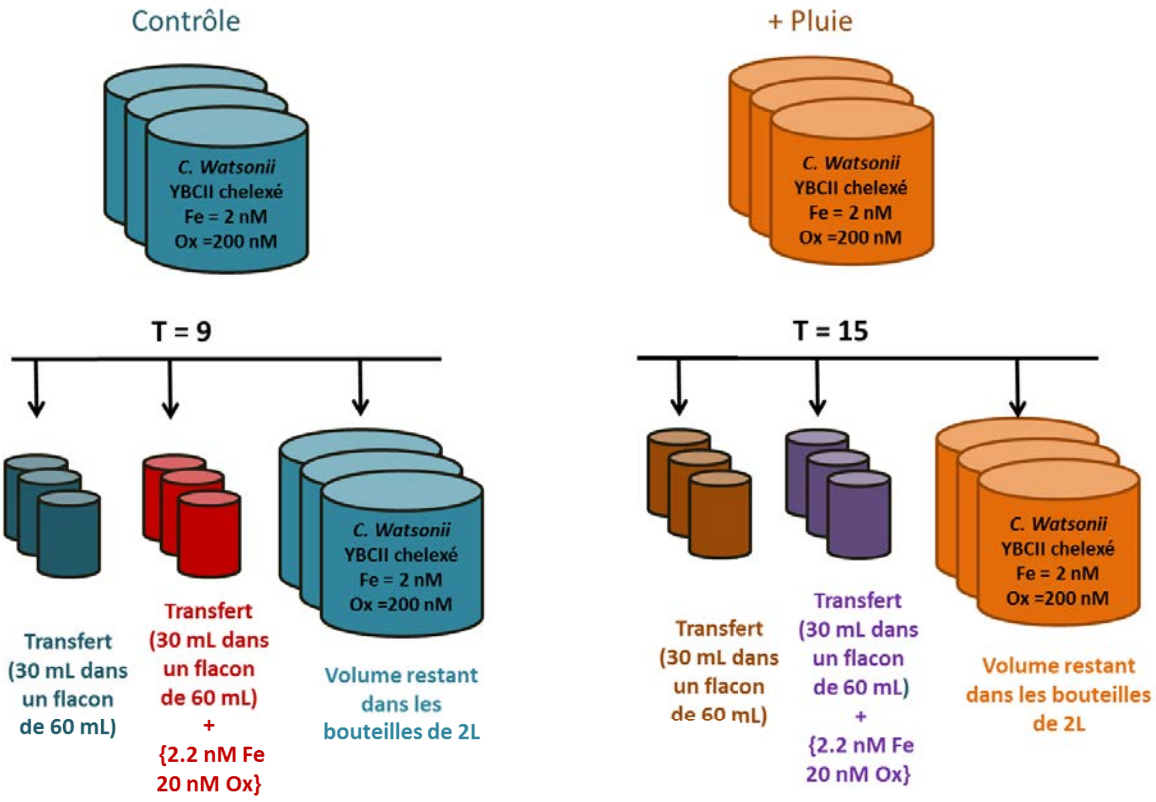


Figure 2.12. Expériences complémentaires d'ajouts de Fe + oxalate en fin de phase de croissance.

IV. Composition de la pluie saharienne simulée

La concentration moyenne en dFe dans la pluie artificielle (filtrée) est légèrement supérieure à celle attendue (138 nM au lieu de 111 nM calculée théoriquement dans la section II.3), ce qui correspond à un **pourcentage de dissolution du fer contenu dans les poussières de 0.10 ± 0.02 %** (calculé selon les équations 2.2 et 2.3 ci-dessous) (Tableau 2.IV). Cette valeur est équivalente à celle précédemment observée par Paris et al. (2011) avec 1 µM d'oxalate, dans les mêmes conditions et pour une charge particulaire de 15 $mg.L^{-1}$ (0.08 ± 0.01 %, Figure 2.4). Dans ces mêmes conditions mais pour une charge particulaire de 20 $mg.L^{-1}$ et seulement 0.1 µM d'oxalate, Chever (2009) a obtenu un pourcentage de dissolution plus faible, de 0.05 ± 0.01 %. **L'ajout de pluie dans les cultures a donc conduit à un apport théorique de 2.7 nM de dFe**, si l'on considère qu'il n'y a pas eu de phénomènes de précipitation du fer. Les concentrations en cobalt (dCo) et nickel (dNi) dissous dans la pluie sont indétectables et de faibles concentrations en cuivre dissous (dCu) ont été mesurées. Enfin, il y a eu dissolution de 4.8 % du phosphore total contenu dans les poussières (Tableau 2.IV), ce qui est en accord avec les résultats de Ridame et Guieu (2002). Cela a conduit à un ajout de 2.3 nM, représentant 0.01 % de la concentration de phosphates initialement présente dans le milieu (20 µM).

Les pourcentages de dissolution d'un élément X ($\%_X$) ont été obtenus en calculant dans un premier temps $\mathbf{X_{Niger}}$ (en nM) la concentration totale de l'élément X si 100 % du contenu des poussières du Niger en cet élément X était dissous, selon :

$$X_{Niger} = \frac{Pc \times X_{\%} \times 1.10^{6}}{MM \times 100} \quad \text{(équation 2.2)}$$

avec : **Pc** la charge particulaire en $mg.L^{-1}$, $\mathbf{X_{\%}}$ le contenu en % massique de l'élément X considéré et **MM** la masse molaire de cet élément en $g.mol^{-1}$.

Le pourcentage de dissolution $\%_X$ a ensuite été calculé selon :

$$\%_X = \frac{[X]_{Pluie} \times 100}{X_{Niger}} \quad \text{(équation 2.3)}$$

avec : $\mathbf{[X]_{pluie}}$ la concentration en nM de l'élément X mesurée dans la pluie artificielle.

Tableau 2.IV. Concentrations en éléments dissous dans la pluie simulée (les valeurs indiquées correspondent aux moyennes pour les 3 réplicats échantillonnés avec leur écart-type entre parenthèses) et pourcentage de dissolution du Cu, Fe, Mn, P et N contenus dans les poussières.

Elément	dCu (nM)	dFe (nM)	dMn (nM)	PO_4^{3-} (nM)	SO_4^{2-} (µM)	NH_4^+ (µM)
Concentration	2.5 (1.2)	138 (30)	447 (7)	117 (17)	10.8 (0.7)	1.8 (0.1)
% dissolution	4.6 (2.3)	0.10 (0.02)	16.3 (0.3)	4.8 (0.7)	nd	4.5 (0.4)

nd. Non déterminé

Les concentrations en nitrates (NO_3^-) sont indétectables dans la pluie simulée mais il a été mesuré 1.8 ± 0.1 µM d'ammonium (NH_4^+), conduisant à un ajout de 35 nM dans les cultures. D'après Dekaezemacker et Bonnet (2011) un ajout de 200 nM de NH_4^+ n'induit pas d'inhibition de la fixation de N_2 de *C. watsonii* WH8501. **L'apport de NH_4^+ associé à la pluie n'a donc a priori pas influencé la réponse mesurée ici en termes de taux de fixation de N_2.** Les concentrations en SO_4^{2-} correspondent à celles issues de l'ajout de 0.5 mL d'H_2SO_4 à 10^{-2} M dans les 500 mL de pluie simulée. Les concentrations en oxalate étaient inférieures à la limite de détection de la chromatographie ionique (1.33 µM) qui est supérieure à la concentration ajoutée (1 µM)

V. Effet de l'apport d'éléments dissous issu d'une pluie saharienne sur la physiologie de C. watsonii limitée en fer

V.1. Abondance et croissance

Une augmentation significative de l'abondance cellulaire dans la culture '+pluie' comparée au contrôle est observée 2 jours après l'ajout de la pluie, puis pendant les 17 jours de suivi de l'abondance. (Figure 2.13).

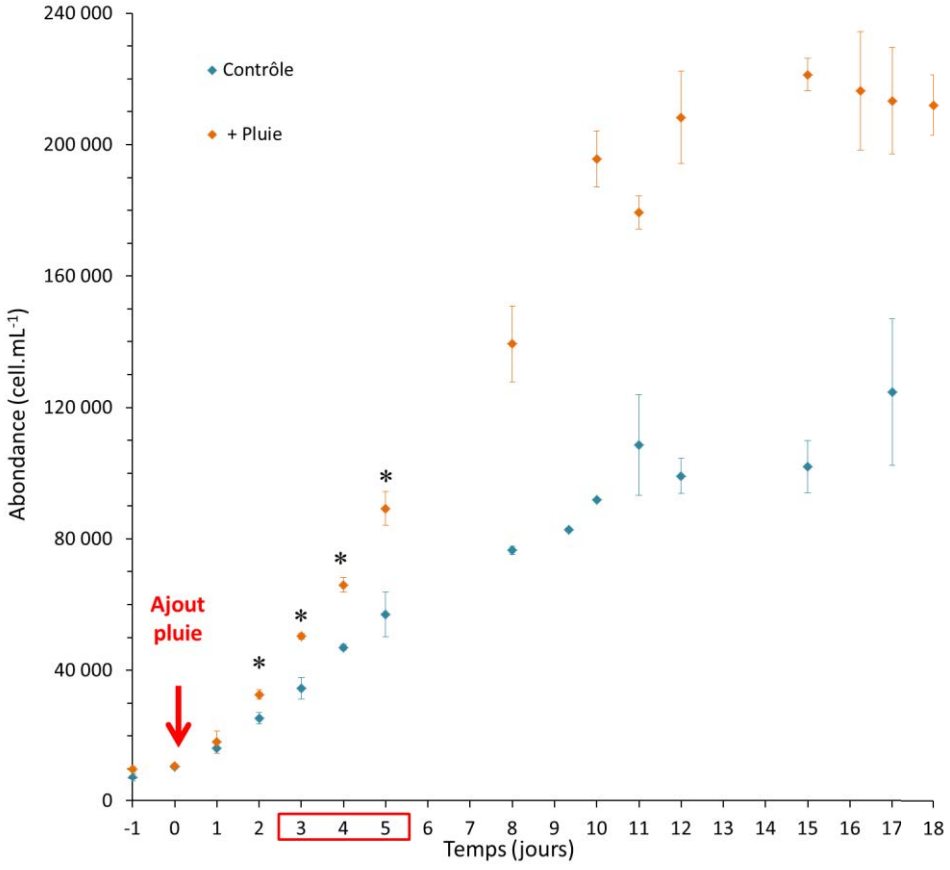


Figure 2.13. Abondances moyennes de *C. watsonii* cultivée en condition de limitation en fer (Fe = 2nM complexé à 200 nM d'oxalate) sans ('Contrôle') ou avec ajout d'une pluie saharienne simulée ('+ Pluie') en fonction du temps depuis l'ajout. La région encadrée correspond aux 3 jours pendant lesquels ont été effectués les prélèvements pour les mesures des paramètres permettant de caractériser la réponse physiologique de *C. watsonii*. Une étoile indique une abondance moyenne significativement différente dans les cultures '+ Pluie' par rapport aux cultures 'Contrôle' pour un temps donné, au cours de la phase exponentielle.

Les logarithmes népériens des abondances en fonction du temps indiquent que la phase exponentielle de croissance a duré 5 jours dans les deux traitements (de T0 à T5, Figure 2.14). **L'apport de fer atmosphérique a entraîné une augmentation significative** ($p < 0.05$) **de 44 % du taux de croissance moyen**, passant de 0.30 ± 0.07 j^{-1} dans le contrôle à 0.43 ± 0.01 j^{-1} dans le traitement '+ Pluie' (Tableau 2.V).

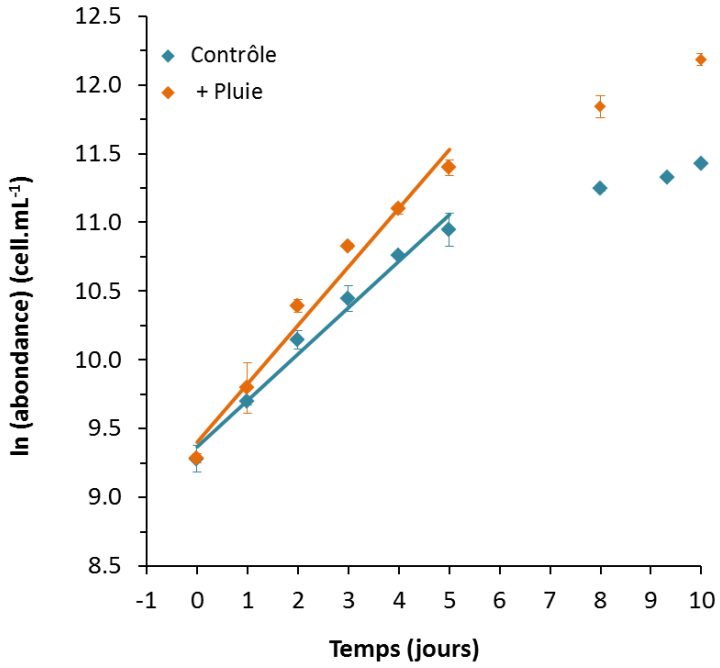


Figure 2.14. Logarithmes népériens des abondances moyennes de *C. watsonii* dans les cultures 'Contrôle' (2 nM de Fe et 200 nM d'oxalate) et '+ Pluie'.

Tableau 2.V. Taux de croissance (μ) pour chaque réplicat des cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' avec les écart-types et les coefficients de corrélation associés à la régression linéaire ainsi que les taux de croissance moyens et leurs écart-types associés.

Réplicats	μ j^{-1}	Ecart type*	R^2	μ moyen j^{-1}	Ecart type
Contrôle 1	0.33	0.03	0.97		
Contrôle 2	0.34	0.01	1.00	**0.30**	0.07
Contrôle 3	0.22	0.01	0.98		
+ Pluie 1	0.44	0.04	0.97		
+ Pluie 2	0.41	0.03	0.98	**0.43**	0.01
+ Pluie 3	0.43	0.04	0.97		

*Ecart-type associé à la régression linéaire

V.2. Facteur responsable de l'arrêt de la croissance

Les concentrations en phosphates en début de phase stationnaire sont respectivement de 19.9 ± 0.1 et 19.2 ± 0.2 µM pour les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie'. Ce n'est donc pas une carence en phosphate qui a entrainé l'arrêt de la croissance dans les deux traitements. L'ajout de Fe chélaté à de l'oxalate en début de phase stationnaire (μ = 0.09 ± 0.03 et 0.09 ± 0.01 dans les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' respectivement) a entraîné une reprise de la croissance dans chaque traitement, avec des taux de croissance dans les cultures 'Contrôle' et '+Pluie' (Figures 2.15 et 2.16) respectivement de 0.31 ± 0.02 j^{-1} et de 0.32 ± 0.05 j^{-1} et significativement identiques (p > 0.05). **C'est donc bien une carence en fer dans les cultures qui a provoqué l'arrêt de la croissance.**

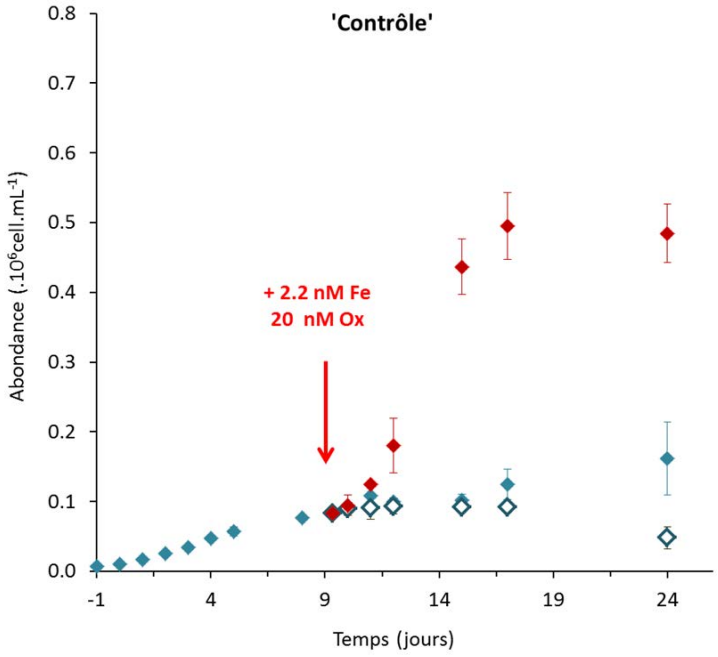


Figure 2.15. Abondance cellulaire dans le traitement 'Contrôle' transféré dans flacons de 60ml (symbole bleu ouvert), dans les bouteilles de 2L (symbole bleu plein) et après ajout de Fe en début de phase stationnaire (en rouge) (voir détails section III.8).

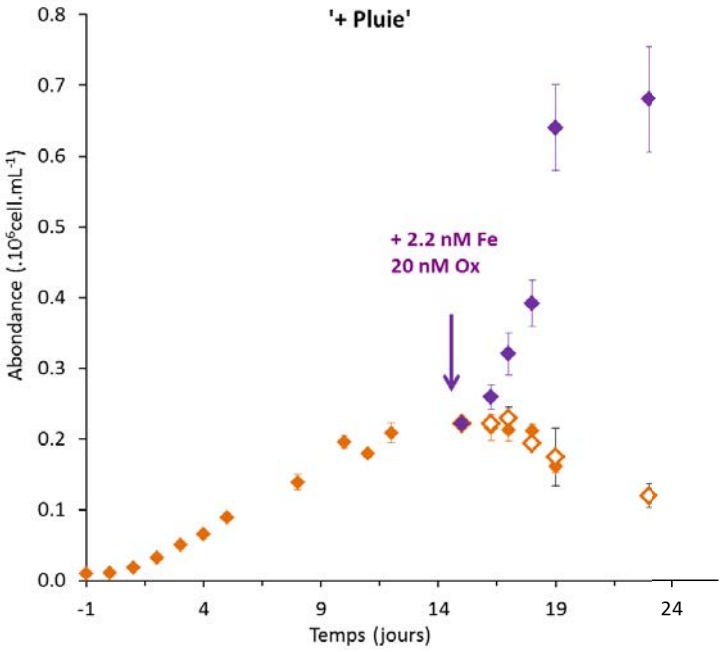


Figure 2.16. Abondance cellulaire dans le traitement 'Contrôle' transféré dans flacons de 60ml (symbole orange ouvert), dans les bouteilles de 2L (symbole orange plein) et après ajout de Fe en début de phase stationnaire (en violet) (voir détails section III.8).

Si l'on compare le temps nécessaire à la réponse suite à l'ajout de fer, il n'a été observé une reprise de la croissance qu'au bout de 2 jours dans les cultures 'Contrôle', alors qu'elle est observée au bout d'une journée dans les cultures '+ Pluie' malgré l'ajout plus tardif au cours de la phase stationnaire. Cela atteste donc d'un meilleur état physiologique des cellules dans les cultures '+Pluie' malgré l'arrêt de la croissance.

V.3. Volume cellulaire

L'ajout de la pluie n'as pas impacté le volume cellulaire de *C. watsonii* ($p > 0.05$), qui est de 7.97 ± 0.29 µm^3 dans les cultures 'Contrôle' et de 7.80 ± 0.50 µm^3 dans les cultures '+Pluie'. Ces volumes correspondent à un rapport S/V de 2.42 ± 0.03 µm^{-1} et 2.44 ± 0.05 µm^{-1} respectivement, significativement identiques ($p > 0.05$).

V.4. Contenus en C, N et Chl*a*

Une **diminution significative des contenus cellulaires en C** de 18 % **et N** de 24 % a été observée dans le traitement '+ Pluie' (Tableau 2.VI) et ce malgré des concentrations en COP et NOP par litre plus fortes dans les cultures '+ Pluie'. L'abondance cellulaire a donc augmenté plus fortement que les concentrations en COP et NOP dans les cultures.

Concernant le rapport moyen C/N, une très légère augmentation (significative, p = 0.0003) a été observée dans le traitement '+ Pluie' par rapport au contrôle, de 6.2 ± 0.2 à 6.6 ± 0.3 mol.mol^{-1} (Tableau 2.VI). Par contre, il n'a été observé aucun impact significatif de l'ajout de la pluie simulée sur les contenus cellulaires moyens en chl*a* (p = 0.1), respectivement de 9.7 ± 1.6 et 8.5 ± 1.1 fgChl*a*.cell^{-1} pour les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' (Tableau 2.VI). De même, le rapport Chl*a*/C obtenu dans les cultures '+Pluie' n'est pas significativement différent de celui des cultures 'Contrôle' (Tableau 2.VI).

Tableau 2.VI. Contenus cellulaires moyens en C, N et rapports C/N pour des échantillons prélevés de jour et de nuit, contenus cellulaires moyens en Chl*a* et rapport Chl*a*/C et contenus en C, N et Chl*a* par µm^3 pour les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie'. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écart-types associés. Un nombre d'étoiles différent correspond à des valeurs significativement différentes entre le jour et la nuit pour un paramètre et une condition donnés. S signifie une différence significative entre les traitements 'Contrôle' et '+ Pluie' et NS l'absence de différence significative (α = 0.05).

	Contenu en C		Contenu en N		C/N	Contenu en Chla		Chla/C	
	fmolC.cell^{-1}	fmolC.µm^{-3}	fmolN.cell^{-1}	fmolN .µm^{-3}	mol.mol^{-1}	fgChl*a*.cell^{-1}	fgChl*a*.µm^{-3}	fg.pmol^{-1}	
Contrôle	403 (30)*	52 (3)	65 (5)*	8.4 (0.4)	6.2 (0.2)*	9.7 (1.6)	1.3 (0.2)	22 (2)	*jour*
+ Pluie	331 (30)**	44 (3)	49 (6)**	6.6 (0.7)	6.6 (0.3)*	8.5 (1.1)	1.1 (0.1)	24 (4)	
statistiques	*S*	*S*	*S*	*s*	*S*	*NS*	*NS*	*NS*	
Contrôle	413 (31)*	nd	70 (5)*	nd	5.7 (0.2)**	nd	nd	nd	*Nuit*
+ Pluie	326 (29)**	nd	53 (6)**	Nd	6.1 (0.3)**	nd	nd	nd	
statistiques	*S*		*S*		*S*				

nd : non déterminé

Le volume cellulaire ne variant pas entre les deux traitements, la normalisation des contenus cellulaires diurnes par µm^3 conduit également à des différences significatives entre les contenus en C et N par µm^3 et à une égalité statistique des contenus en Chl*a* par µm^3 (Tableau 2.VI).

V.5. Taux de fixation de N_2 et de CO_2

Les taux de fixation moyens de N_2 et de CO_2 par cellule et normalisés par unité de biomasse (chl*a* ou μm^3), ont tous été significativement impactés par l'ajout de la pluie simulée (Tableau 2.VII). La fixation de N_2 a été plus impactée que la fixation de CO_2 par l'ajout de la pluie simulée (augmentation d'un facteur 1.8 et 1.3 respectivement pour des taux par cellules ou 1.9 et 1.4 pour des taux normalisés par le volume cellulaire). La même tendance a été observée pour ces taux normalisés par la Chl*a*, (facteur 2.0 et 1.5 respectivement).

Tableau 2.VII. Taux de fixation moyens de N_2 et CO_2 par cellule, par unité de chl*a* et par μm^3 pour les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie'. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écart-types associés (n = 4 à 9). S signifie une différence significative entre les traitements 'contrôle' et '+ Pluie' et NS l'absence de différence significative ($\alpha = 0.05$).

	fixation de N_2			fixation de CO_2		
	fmolN.$cell^{-1}.h^{-1}$	fmolN.pgChl$a^{-1}.h^{-1}$	fmolN.$\mu m^{-3}.h^{-1}$	fmolC.$cell^{-1}.h^{-1}$	fmolC.pg.Chl$a^{-1}.h^{-1}$	fmolC.$\mu m^{-3}.h^{-1}$
Contrôle	0.37 (0.12)	41.9 (14.5)	0.05 (0.02)	8.8 (0.9)	1.0 (0.1)	1.1 (0.1)
+ Pluie	0.66 (0.12)	82.8 (21.2)	0.09 (0.01)	11.5 (0.6)	1.4 (0.2)	1.5 (0.1)
statistiques	*S*	*S*	*S*	*S*	*S*	*S*

VI. Du fer biodisponible libéré par les poussières sahariennes ? *C. watsonii* comme bio-indicateur

Le µ moyen du contrôle (0.30 ± 0.07 j^{-1}) est proche de celui obtenu précédemment (Tableau 2.II) pour 2nM de Fe et 200 nM d'oxalate. De plus, il est inférieur au μ_{max} déterminé chapitre 1 (0.54 ± 0.01 j^{-1}) ce qui montre bien une limitation de la croissance de *C. watsonii*. Le μ moyen obtenu après ajout de la pluie (0.43 ± 0.01 j^{-1}) est également plus faible que le μ_{max} obtenu pour *C. watsonii* dans les conditions de culture du laboratoire (0.54 ± 0.01 j^{-1}, chapitre 1), ce qui signifie que **l'ajout de la pluie simulée n'a pas totalement levé la limitation en fer**.

A partir de ces taux de croissance et du $K_{\mu Fe'}$ calculé chapitre 1 section III.1 nous pouvons calculer le Fe' présent dans les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' selon l'équation 2.4 :

$$[Fe'] = K_{\mu Fe'} \times \frac{\mu}{\mu_{max} - \mu} \qquad \text{(équation 2.4)}$$

avec : $\boldsymbol{\mu}$ le taux de croissance moyen obtenu dans la culture 'Contrôle' ou '+ Pluie' et μ_{max} le taux de croissance maximum de *C. watsonii* déterminé à partir des cultures en présence de fer et EDTA (0.54 j^{-1}).

Les concentrations en Fe' ainsi calculées sont de 0.47 nM dans le contrôle et 1.43 nM dans le traitement '+ Pluie'. Nous pouvons donc estimer la concentration en Fe' issue de l'ajout de pluie (Fe' '+ Pluie' – Fe' 'Contrôle') comme égale à 0.96 nM ce qui représente 36 % du dFe théoriquement apporté par la pluie (2.7 nM). Lors d'expériences d'ajout d'une pluie artificielle, préparée à partir de la fraction fine de sols du Niger utilisée ici, dans de l'eau de mer naturelle réalisées dans le cadre de ses travaux de thèse, Fanny Chever (Chever 2009) a observé une précipitation immédiate dans l'eau de mer de 47 à 85 % du fer dissous dans la pluie. Mais pour son étude seulement 0.1 µM d'oxalate ont été ajoutés à la pluie (contre 1µM ici) et surtout la pluie a été ajoutée à une eau de mer naturelle, ne contenant pas de ligand du fer supplémentaires tels les 200 nM d'oxalate présent dans notre milieu de culture. Les concentrations en dFe dans les cultures avant et après ajout de la pluie n'ont pas été mesurées, nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'éventuelle précipitation du dFe issu de la pluie bien que nous pouvons fortement suspecter l'absence de ce phénomène du fait de la complexation du fer au 200 nM d'oxalate présents dans le milieu de culture.

Notre calcul issu du modèle de Monod ne prend pas en compte les différences de biodisponibilité du fer dissous. La fraction fine de sols du Niger est constituée de ~7.3 % de

matière organique (Paris et Desboeufs 2013), mais leur dissolution ne libère pas de composés carboxyliques solubles tels l'oxalate (Desboeufs, comm. pers.). Néanmoins, cette matière organique pourrait être constituée de produits issus de la dégradation de débris organiques présents dans les sols suite à des feux de biomasse ou à la présence passée de végétation (Eglinton et al. 2002; Gelencsér et al. 2002) ainsi que d'acides humiques ou fulviques (Desboeufs comm. Pers.) pouvant augmenter la dissolution du fer, du moins dans l'eau de pluie (Paris et Desboeufs 2013). Des réactions à partir de ces précurseurs conduisant à la formation de composés organiques possiblement chélateurs du fer ont alors pu avoir lieu dans la pluie simulée ou dans le milieu de culture. Mais ceci reste largement hypothétique car ces processus sont très peu connus et restent encore à étudier. Cependant, si le complexe fer-ligand est assimilable par *C. watsonii*, ce type de complexation augmenterait la biodisponibilité du fer présent dans les cultures. Enfin, l'hypothèse d'une excrétion de matière organique comprenant des ligands du fer, de type sidérophores, par *C. watsonii* afin d'assimiler le fer issu de la pluie renforce cette notion de biodisponibilité du fer dissous non contenu dans la fraction Fe'. Ici encore, le manque actuel de données ne permet pas de conclure sur la biodisponibilité du fer issu de la dissolution des poussières sahariennes. Il serait pertinent de déterminer l'impact d'un apport atmosphérique sur cette production de ligand organique afin de mieux appréhender l'influence de ces apports sur la réponse des UCYN. Néanmoins, l'observation d'une réponse de *C. watsonii* indique qu'une partie au moins du fer libéré par les poussières dans la pluie simulée est restée biodisponible dans l'eau de mer. ***C. watsonii* peut alors être considérée comme un bio-indicateur de la biodisponibilité du fer issu des poussières sahariennes.**

La fait que la phase stationnaire soit atteinte au bout de 10 jours dans les cultures '+ Pluie' signifie que la totalité du Fe biodisponible a été consommée ou n'est plus sous forme biodisponible à ce moment-là. Les vitesses d'assimilation du fer pourraient permettre de déterminer la quantité de fer consommé par les cellules dans la culture, du moins durant la phase exponentielle, puisque c'est au cours de cette phase que ce paramètre est généralement déterminé. Cependant, ces vitesses n'ont jamais été mesurées chez *C. watsonii*.

VII. La réponse physiologique de C. watsonii à l'apport d'une pluie saharienne simulée.

Les taux de fixation de N_2 et de CO_2 par cellules et par μm^3 dans les cultures 'Contrôle' sont proches des valeurs obtenues pour des concentrations en Fe inférieures à 5nM (+ 2µM d'EDTA) et les valeurs des contenus en chl*a* se trouvent dans la gamme des valeurs obtenues entre Fe = 3.3 nM et Fe = 13. 3nM (+ 2µM d'EDTA) (annexe 2). Cela montre encore une fois l'augmentation de la biodisponibilité du fer en présence d'oxalate par rapport à la présence d'EDTA. Les contenus en C (par cellules et par μm^3) sont proches de ceux obtenus en condition de limitation modérée en présence d'EDTA, ce qui conduit à un rapport Chl*a*/C plus élevé également. Le volume cellulaire est lui aussi plus proche de celui obtenu en condition de limitation modérée (Annexe 1). Cela étant il est à noter que deux méthodes différentes ont été utilisées pour sa détermination et surtout que deux fixateurs différents ont été utilisés (Glutharaldehyde pour les expériences du chapitre 1 et formaldéhyde ici). Et enfin les contenus en N (par cellule et par μm^3) sont plus forts que ceux obtenus en condition de non limitation en présence d'EDTA (Annexe 2).

Lors de l'ajout de la pluie, correspondant à un ajout de 2.7 nM de fer, dont une partie au moins est biodisponible, il a été observé une stimulation des processus de fixation de N_2 et de CO_2. Ceci s'explique par le fait que le fer est un élément indispensable à la constitution des enzymes majeures mises en jeu dans ces deux processus (la nitrogénase pour la fixation de N_2 et les cytochromes pour la photosynthèse). La stimulation des taux de croissance et de fixation de N_2 et CO_2 après ajout de pluie artificielle montre que ***C. watsonii*** **a pu internaliser et mettre à profit très rapidement (3 jours maximum) le fer issu des poussières sahariennes, afin d'augmenter la synthèse des enzymes nécessaires à la fixation de N_2 et de CO_2**. Une restauration, partielle ou complète, de l'expression des gènes codant pour les enzymes métalliques impliquées dans la fixation de N_2 et la photosynthèse a été précédemment observée chez *T. erythraeum* transférée dans un milieu riche en fer (Fe = 400 nM complexé avec 2 µM d'EDTA) après une courte période de carence en fer (Shi et al. 2007). Les résultats obtenus ici montrent que ***C. watsonii*** **est capable de rapidement restaurer, du moins partiellement, ses fonctions métaboliques, même après acclimatation pendant plus de 20 générations à un milieu carencé en fer**. De même que la fixation de N_2 est plus impactée que la fixation de CO_2 lors d'un stress en fer (chapitre 1, Jacq et al. (2014)), la fixation de N_2 est nettement plus stimulée par l'apport de fer: 2.3 fois plus en moyenne quelle que soit l'unité considérée. Par analogie avec l'impact d'une brusque carence en fer chez *T. erythraeum* (Shi et al. 2007), **l'impact immédiat de l'ajout de pluie sur la fixation de**

N_2 a probablement eu lieu via une régulation, mais **positive** ici, **de la transcription du gène *nifH***. Cette activation de la transcription est donc suivie par l'expression de ce gène, conduisant à la synthèse de la nitrogénase et ainsi à l'augmentation observée des taux de fixation de N_2. De plus, l'intensification des taux de fixation de CO_2 signifie un **accroissement de l'énergie disponible pour alimenter le processus de fixation de N_2**, très énergivore (Dron et al. 2012a; Großkopf et Laroche 2012) et permet ainsi de soutenir l'augmentation des taux de fixation de N_2.

La stimulation de la croissance de *C. watsonii* à l'échelle de la culture suite à l'ajout de pluie signifie qu'il y a eu augmentation de la vitesse de division cellulaire à l'échelle individuelle. En effet, il faut un temps de génération de 2.4 ± 0.7 j pour doubler la population des cultures 'Contrôle' durant la phase exponentielle de croissance et ce temps est réduit à 1.6 ± 0.0 j dans pour les cultures '+ Pluie'. Cette stimulation de la croissance peut donc être attribuée à l'augmentation de la fixation de CO_2 conduisant à une augmentation de la synthèse d'hydrates de carbone qui fournissent, lors de leur catabolisme *via* la respiration, l'énergie nécessaire à la division cellulaire (Behrenfeld et al. 2008). De plus, l'augmentation de la fixation de N_2 entraîne une augmentation de la quantité de N disponible pour la synthèse des molécules nécessaires à la division cellulaire, telles que les acides aminés et les protéines. Il est important de noter que **la réponse physiologique de *C. watsonii* lors de l'ajout de pluie, est celle de cellules acclimatées à un milieu carencé en fer et recevant un apport ponctuel de dFe**. Il s'agit donc d'une **réponse instantanée**, à court terme (5 jours, soit environ 2 générations).

Les contenus cellulaires en N et C ont diminué (environ -20 %) lors de l'ajout de pluie simulée malgré l'augmentation des taux de fixation de N_2 et de CO_2. Cela aurait pu être la conséquence d'une modification du cycle cellulaire avec globalement, dans les cultures '+Pluie', un nombre plus important de cellules se trouvant en début de cycle cellulaire, c'est-à-dire venant juste de se diviser, ce qui correspond à une division par deux des contenus de la cellule. Mais les mesures de volumes cellulaires effectuées sur un grand nombre de cellules (96 à 99 cellules mesurées par échantillons) ne montrent pas de différences significatives entre les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie'. La diminution des contenus cellulaire par μm^3 lors d'un apport en fer constitue une réponse opposée à la diminution des contenus par μm^3 en condition de limitation sévère en fer pour des cellules acclimatées. **L'ajout du facteur limitant entraîne donc des modifications physiologiques particulières**. La production primaire exprimée en j^{-1} a été calculée à partir du taux de fixation de CO_2 et du contenu cellulaire en C, ce qui a permis de déterminer le

pourcentage de carbone fixé photosynthétiquement et utilisé pour la croissance (voir chapitre 1, section IV.2.2). Les résultats obtenus (Tableau 2.VIII) montrent que dans les cultures 'Contrôle' et '+ Pluie' 100 % du C fixé photosynthétiquement serait dédié à la croissance. Cela suppose alors une excrétion de C et une respiration nulles, ce qui est très peu probable. Nous ne pouvons alors pas en tirer de conclusion afin d'expliquer la diminution des contenus cellulaire en C et N lors de l'ajout de pluie.

Tableau 2.VIII. Production primaire en j^{-1}, taux de croissance (µ, en j^{-1}) et pourcentage du C fixé par photosynthèse dédié à la croissance. Les écart-types associés sont indiqués entre parenthèses.

	'Contrôle'	'+ Pluie'
PP (j^{-1})	0.26 (0.02)	0.42 (0.04)
µ (j^{-1})	0.30 (0.07)	0.43 (0.01)
%	113 (25)	101 (5)

Les contenus cellulaires en chl*a* n'ont pas varié suite à l'ajout de pluie simulée, malgré l'augmentation des taux de fixation de CO_2, il en résulte donc une **augmentation significative des taux de fixation de CO_2 relativement à la quantité de chl*a*** de 1.0 ± 0.1 fmolC.fgChl*a*$^{-1}$.h^{-1} pour le contrôle à 1.4 ± 0.2 fmolC.fgChl*a*$^{-1}$.h^{-1} après ajout de pluie simulée. Cela traduit une **photosynthèse plus efficace lors de l'apport saharien**, puisque les cellules ont fixé plus de CO_2 par unité de chl*a*, donc pour une capacité d'absorption d'énergie lumineuse potentiellement équivalente. Mais ce résultat est à considérer avec précaution car la fluorescence des deux autres pigments photosynthétiques caractéristiques des cyanobactéries présents chez *C. watsonii*, la phycoérythrine et la phycocyanine (Fu et al. 2008), n'a pas été mesurée ici. L'amélioration de l'efficacité de photosynthèse après ajout de fer issu de la dissolution des poussières pourrait être due à une intensification de la synthèse de ces deux pigments.

VIII. Comparaison de la réponse de différents organismes phytoplanctoniques à un apport saharien : études en laboratoire et en milieu naturel

VIII.1. Phytoplancton non-diazotrophe : les diatomées

Lors d'une étude portant sur des cultures monospécifiques de diatomées Antarctiques (*Actinocyclus* sp. et *Thalassiosira* sp.) acclimatées à de faibles concentrations en Fe (0.07 nM de dans une eau de mer naturelle filtrée à 0.2 µm), Visser et al. (2003) ont observé, suite à des dépôts secs sahariens simulés à partir de deux types de sols d'origine différente, des réponses différentes en termes de croissance en fonction de l'espèce considérée mais également en fonction de la quantité résultante de fer dissous dans l'eau de mer dépendant du type de poussières ajoutées. Il serait alors intéressant de vérifier l'existence de telles différences concernant la réponse de *C. watsonii*, en effectuant l'expérience présentée ici à l'aide de poussières provenant de différentes sources.

La seule expérience connue d'ajout d'une pluie saharienne simulée, conduite dans le cadre du projet ANR BOA[5] lors des travaux de thèse de F. Chever (Chever 2009), a été réalisée à l'aide d'une pluie artificielle préparée à partir des poussières du Niger utilisées ici. L'ajout de cette pluie dans des cultures de diatomée (*T. oceanica*) acclimatées à des conditions de limitation en fer (Fe = 0.35 nM dans de l'eau de mer naturelle) a également entraîné une stimulation de la croissance de l'organisme étudié.

VIII.2. Les diazotrophes

VIII.2.1.*Trichodesmium* spp. : expériences en laboratoire

A ma connaissance, seulement 2 expériences d'enrichissement de cultures monospécifiques de diazotrophes avec des poussières désertiques (simulation d'un dépôt sec) ont été publiées ; elles portent sur la cyanobactérie diazotrophe filamenteuse *Trichodesmium* spp. (Rubin et al. 2011; Langlois et al. 2012). Rubin et al. (2011) ont observé un transport actif des poussières de la périphérie vers le centre de colonies naturelles de *Trichodesmium* spp., suivi de mécanismes d'adsorption et de dissolution des poussières à la surface des cellules leur permettant

[5] Biogéochimie du Fe à l'interface Océan-Atmosphère, PI G. Sarthou et K. Desboeufs

d'augmenter l'assimilation du fer. Mais ceci seulement pour des colonies naturelles et non pour des trichomes individuels. (Figure 2.17).

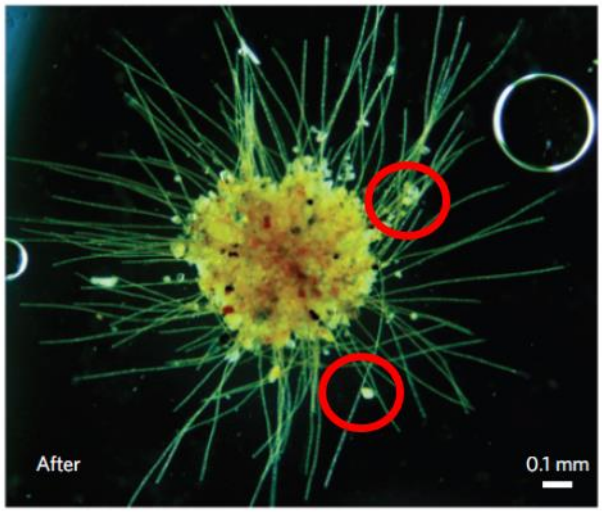


Figure 2.17. Photographie prise au microscope d'une colonie naturelle (« puff ») de *Trichodesmium* sp. ramenant en son centre des poussières désertiques (entourées en rouge). D'après Rubin et al. (2011) (avec la permission de Nature Publishing Group, licence n°3403190597240).

Langlois et al. (2012) ont observé la formation de colonies et une augmentation de l'abondance de *T. erythraeum* (basée sur l'abondance du gène *nifH*) lors d'ajout de poussières désertiques à des cultures de *T. erythraeum* limitées en fer (Fe et EDTA = 0 µM) mais non acclimatées à cette limitation. Ainsi, lors d'un dépôt sec de poussières sahariennes, du fer est biodisponible pour les cyanobactéries filamenteuses du genre *Trichodesmium* et nous avons montré que le fer dissous issu d'un dépôt humide est, au moins en partie, disponible pour l'UCYN-B *C. watsonii*. Ces deux cyanobactéries diazotrophes semblent répondre favorablement à un apport atmosphérique de fer saharien, il serait maintenant intéressant de savoir laquelle serait avantagée en cas de compétition pour la ressource. En effet, la plus petite taille des UCYN leurs donne un avantage pour l'assimilation du fer dissous (voir chapitre 1, section VI.2.2), mais *Trichodesmium* semble tirer profit de son mode de vie colonial pour assimiler du fer associé à des particules. Les expériences réalisées en milieu naturel permettent d'apporter des éléments de réponse à cette problématique.

VIII.2.2. Expériences en milieu naturel

Plusieurs expériences d'enrichissement du milieu naturel (microcosmes et mésocosmes) avec des poussières désertiques ont montré une nette stimulation de la fixation de N_2 en Méditerranée et dans l'Atlantique tropical Nord (Mills et al. 2004; Marañón et al. 2010; Ridame et al. 2011; Langlois et al. 2012; Ridame et al. 2013). Il ressort de ces expériences que l'apport de poussières permet de lever la limitation ambiante en P, Fe ou la co-limitation Fe-P de la fixation de N_2. De plus, les poussières désertiques, en plus d'être une source de P et/ou de Fe, seraient aussi une source de métaux traces potentiellement limitants de la fixation de N_2 (Ridame et al. 2011), tels le Mo, co-facteur de la nitrogénase (Tuit et al. 2004; Howard et Rees 2006), le Ni (Ho 2013), le Co (co-facteur de la vitamine B12, dont les diazotrophes en sont d'important producteurs (Bonnet et al. 2010)) ou encore le Zn, métal entrant en jeu dans la photosynthèse (Sunda 2012). L'étude de Langlois et al. (2012) a montré une stimulation de l'abondance des UCYN-B, telle *C. watsonii*, mais également des autres UCYN, ainsi que de *Trichodesmium* spp. et des protéobactéries, lors d'un ajout de 2 $mg.L^{-1}$ de poussières sahariennes. Dans l'Atlantique subtropical Nord, à proximité des îles Canaries, Benavides et al. (2013a) ont observé une augmentation de 86 à 92 % de l'abondance des diazotrophes unicellulaires (des quels sont probablement exclus les bactéries hétérotrophes d'après ces auteurs) en parallèle d'une diminution des taux de fixation associés à *Trichodesmium* spp*,* suite à un évènement saharien. Ces auteurs rapportent la présence de trichomes isolés, ce qui supporte le fait que les stratégies d'acquisition du fer présentées ci-dessus sont déterminantes pour la réponse d'un type de diazotrophe donné.

La réponse physiologique de *C. watsonii* observée ici permet donc d'appuyer les observations de terrain quant à la biodisponibilité du fer issu d'un apport saharien pour cette UCYN. Ces précédents résultats, ainsi que ceux de notre étude, montrent donc que **les poussières sahariennes libèrent du fer biodisponible pour le phytoplancton et qu'il est possible d'observer une réponse en conditions contrôlées en laboratoire**. **Nous présentons ici pour la première fois une réponse physiologique d'un organisme diazotrophe acclimaté à des conditions de limitation en fer basée sur l'observation de plusieurs paramètres et pour la première fois également, la réponse d'une UCYN.** Nos résultats permettent donc d'améliorer la compréhension de la réponse phytoplanctonique lors d'apport saharien dans le milieu naturel. Cela étant, en milieu naturel, plusieurs facteurs améliorent probablement la biodisponibilité du fer, telle la présence, dans l'eau de mer, de différents ligands organiques du fer (Gledhill et Buck 2012).

IX. Stimulation des UCYN-B à un apport saharien et conséquences biogéochimiques

IX.1. Interaction avec la communauté phytoplanctonique et microbienne

Les résultats de l'expérience présentée dans ce chapitre montrent donc une **réponse positive de *C. watsonii* en termes de processus de fixation de N_2 et de CO_2 et de croissance de la population lors d'un apport en fer issu de poussières sahariennes**. Cela signifie que dans les régions océaniques oligotrophes, où les concentrations en N sont suffisamment faibles pour limiter la production primaire et où les concentrations en fer limitent l'activité des cyanobactéries diazotrophes, un apport saharien pourrait favoriser, dans un premier temps, le développement des diazotrophes. *C. watsonii* excrète également de forte quantités de N récemment fixé (jusqu'à 66 %, Dron et al. 2012a), probablement sous forme de NOD et de NH_4^+, par analogie avec *Trichodesmium* spp. (Mulholland 2004). Cela constituerait donc un apport en N nouveau, ce qui pourrait lever la limitation en N du phytoplancton non-diazotrophe et stimuler alors la production nouvelle. Une réponse en termes de croissance et d'activité de *C. watsonii* pourrait également ainsi favoriser le développement d'une communauté hétérotrophe via l'excrétion de NOD (Figure 2.18). Ce NOD excrété peut également être reminéralisé en ammonium dans la couche euphotique par les bactéries hétérotrophes permettant de soutenir alors la production régénérée (Figure 2.18). Cela a été mis en évidence dans les eaux du plateau continental de Floride par Lenes et al. (2001) qui ont observé une efflorescence de *Trichodesmium* suite à un apport de poussières sahariennes, déclenchant la dégradation bactérienne du NOD excrété par *Trichodesmium*. Cela permettait donc de fournir du N nouveau disponible pour le développement du dinoflagellé *Gymnodinium breve* (Lenes et al. 2001). *C. watsonii* excrète des quantités importantes de C organique sous forme d'EPS (Dron et al. 2012b), qui pourraient être utilisées comme source de carbone par les bactéries hétérotrophes, mais également des quantités importantes de vitamine B12 pouvant stimuler la production phytoplanctonique (Bonnet et al. 2010). La stimulation du développement du phytoplancton, producteur primaire, permettrait alors une intensification de la pompe biologique de carbone mais couplée à une augmentation des rejets de CO_2 *via* l'intensification de la respiration bactérienne (Figure 2.18). Ce schéma complexe de la réponse du *biota* rend donc nécessaire la multiplication d'expériences telle celle présentée dans ce chapitre afin de comprendre la réponse en termes de pompe biologique de carbone. De plus, la réponse en termes de succession d'organismes est à considérer à court terme car elle est dépendante du faible temps de résidence du fer issu des apports atmosphériques dans la couche de surface (17 à 28 jours

dans l'Atlantique Nord-Est, Sarthou et al. 2003). Enfin, il est important de rappeler ici que les apports sahariens sont également une source potentielle de phosphates et d'azote. La réponse de l'écosystème dans sa globalité dépendra alors également de ces apports. Afin de caractériser ce scénario, le développement d'expériences *in-situ* prenant en compte l'ensemble de la communauté microbienne (Marañón et al. 2010), telles que les approches en mésocosmes (Guieu et al. 2010; Giovagnetti et al. 2013) s'avèrent alors nécessaires.

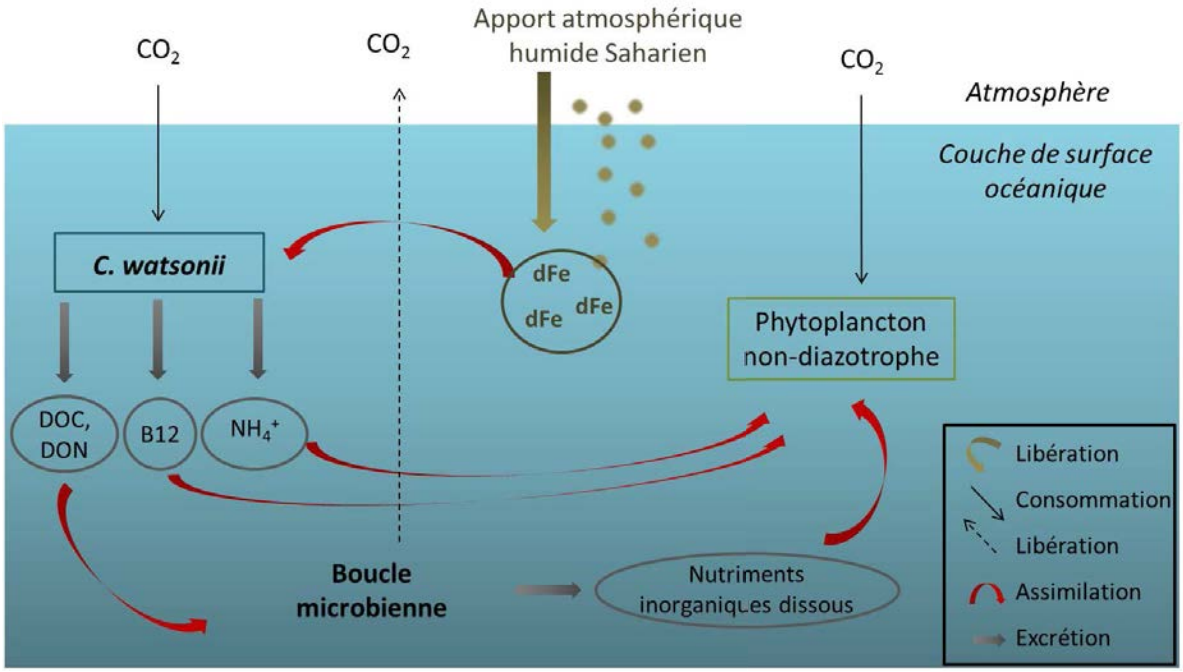


Figure 2.18. Schéma conceptuel de la réponse d'une communauté phytoplanctonique et microbienne suite à la stimulation de la croissance et de l'activité de *C. watsonii* par un apport atmosphérique saharien, dans un milieu oligotrophe où la production primaire serait limitée par l'azote.

IX.2. Impact des changements futurs sur la réponse à un apport saharien

Concernant les prévisions pour les années à venir, il existe de fortes incertitudes dans la variation de la taille des zones désertiques et ainsi dans la prédiction des flux des apports éoliens de poussières (Mahowald et al. 2005) avec une augmentation ou une diminution jusqu'à 50 % selon les 17 modèles du GIEC[6] utilisés par Mahowald (2007). Néanmoins, la moyenne de ces modèles prédit une hausse de la taille des zones désertiques nord africaines (dont le Sahara) associée à

[6] Groupe d'expert intergouvernemental sur l'évolution du Climat

une légère augmentation des apports éoliens de poussières provenant de cette zone (Mahowald 2007). De plus, les prévisions biogéochimiques associées aux modifications climatiques à venir prévoient une augmentation des températures de surface conduisant à une intensification de la stratification (Boyd et Doney 2003). Or en période de stratification, les apports atmosphériques sont la principale source de nutriments à la couche euphotique. Ainsi ce renforcement de la stratification va renforcer l'importance des apports atmosphériques. Il est donc important de comprendre leur influence sur chacun des compartiments du *biota* marin afin de mieux appréhender les changements à venir. Concernant les apports atmosphériques en fer, le paramètre majeur à prendre en compte lorsque l'on s'intéresse à leur impact biogéochimique est le contrôle la solubilité de cet élément issu des poussières désertiques. Les activités anthropiques ont conduit à l'augmentation des émissions de précurseurs acides (SO_2 et NO_x) (selon le rapport de l'IPCC 2001), entraînant l'augmentation de cette solubilité (SO_2 et NO_x), ce qui pourrait renforcer l'importance de cette source de fer et induire un bouleversement supplémentaire à l'échelle de la biosphère marine. *Trichodesmium* spp. pouvant assimiler du fer directement à partir de poussières désertiques (Rubin et al. 2011) et *C. watsonii* répondant à un apport en dFe issu de la dissolution de poussières sahariennes (cette étude), on peut alors prévoir une augmentation de l'abondance de ces deux organismes dans les zones soumises à de tels apports désertiques, comme l'Atlantique (sub)tropical Nord.

CHAPITRE 3

Distribution spatiale et facteurs de contrôle de la fixation de N_2 et de la production primaire dans l'Atlantique subtropical Nord : expériences en microcosmes

I. Contexte scientifique : l'océan Atlantique subtropical Nord, une zone oligotrophe soumise aux apports sahariens

La région subtropicale Nord de l'océan Atlantique constitue, comme tous les grands gyres centraux de l'Atlantique et du Pacifique, une zone LNLC majeure caractérisée par de faibles concentrations en nutriments et une faible biomasse algale (Figure 3.1).

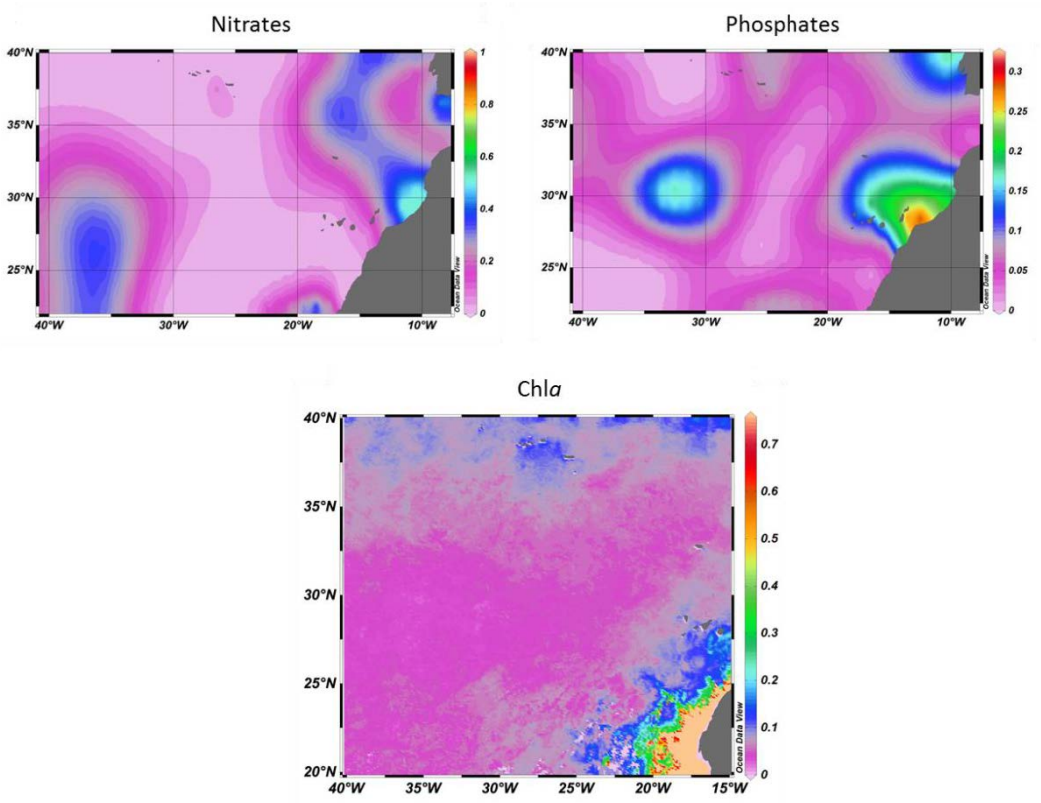


Figure 3.1. Climatologie des concentrations de surface en nitrates et phosphates pour le mois de Septembre (en µM, World Ocean Atlas 2009) et concentrations de surface en Chl*a* pour le mois de Septembre 2012 (en $mg.m^{-3}$, données du satellite MODIS).

La fixation de N_2 représente une source majeure d'azote nouveau dans la couche euphotique des régions oligotrophes tropicales et subtropicales de l'océan, en particulier dans l'Atlantique Nord (Karl et al. 2002; Mahaffey et al. 2005). Malgré les faibles concentrations en nitrates, représentant un avantage potentiel pour les diazotrophes, de faibles taux de fixation de N_2 ont été enregistrés dans l'Atlantique subtropical Nord : < 2 $nmolN.L^{-1}.j^{-1}$ en surface (Moore et al. 2009; Fernández et al. 2010; Agawin et al. 2013). Ces flux sont minimes comparés à ceux mesurés au niveau de l'Atlantique équatorial et tropical Nord (jusqu'à 20 $nmolN.L^{-1}.j^{-1}$ (Moore et al. 2009; Fernández et al. 2010; Subramaniam et al. 2013)). Les travaux de modélisation montrent également de plus faibles flux de

fixation de N_2 dans la partie subtropicale de l'Atlantique Nord, relativement à la partie tropicale (Coles et Hood 2007). Cela amène donc à s'interroger sur les facteurs de contrôle de ce processus en Atlantique subtropical Nord.

Dans l'Atlantique subtropical Nord-Est, il a été observé des concentrations de surface en dFe de 0.1 à 1 nM entre ~20° et 40 °N (Moore et al. 2009; Rijkenberg et al. 2012; Schlosser et al. 2014). Le fer, présent à des concentrations plus faibles que dans l'Atlantique tropical (Rijkenberg et al. 2012; Schlosser et al. 2014) est donc un facteur potentiellement limitant de la fixation de N_2 en Atlantique subtropical Nord-Est. Le long d'un transect dans l'Atlantique entre 40°N et 40°S (~30° O), Moore et al. (2009) ont observé une corrélation positive entre la fixation de N_2 et les concentrations en dFe. Les phosphates, présents en faibles concentrations en Atlantique subtropical Nord (Moore et al. 2009; Fernández et al. 2010; Schlosser et al. 2014), peuvent également représenter un facteur potentiel de limitation de la fixation de N_2. L'importance du P comme élément limitant (Sañudo-Wilhelmy et al. 2001) ou co-limitant avec le fer (Mills et al. 2004) de la fixation de N_2 dans l'Atlantique Nord a été montrée, mais en région tropicale seulement. Récemment, un schéma contrasté des limitations de l'activité des organismes diazotrophes a été observé dans l'océan Atlantique tropical, avec une limitation par le fer dans l'ouest de la région et une limitation par les phosphates à l'est, pour des latitudes comprises entre 10 et 15°N (Turk-Kubo et al. 2012). Plus au sud (< 11°N), la fixation de N_2 semble co-limitée par le fer et les phosphates (Mills et al. 2004b; Turk-Kubo et al. 2012). Cependant, les facteurs contrôlant la fixation de N_2 ont été peu étudiés dans l'Atlantique subtropical Nord.

L'Atlantique subtropical Nord présente une caractéristique particulière qui est le résultat de la combinaison de la circulation atmosphérique et de la proximité d'une zone aride importante : le désert du Sahara. En effet, il s'agit d'une des régions océaniques fortement impactée par les apports atmosphériques d'origine désertique (Jickells et al. 2005) (Figure 3.2). Prospero et al. (1996) ont estimé, en Atlantique subtropical Nord (entre 20 et 30° N et 20 à 40° O), des taux de dépôt de poussières compris entre 1 et 2 $Tg.an^{-1}$. Ces apports sont moins importants que dans la région tropicale de l'Atlantique Nord (~4 à 7 $Tg.an^{-1}$ entre 10 et 20° N pour les mêmes longitudes, Prospero et al. 1996). Globalement, les poussières du Sahara constituent une source importante de P (Ridame et Guieu 2002; Baker et al. 2010) et de Fe (*e.g.* Sarthou et al. 2003; Bonnet et Guieu 2004) pour les eaux de surface où elles se déposent.

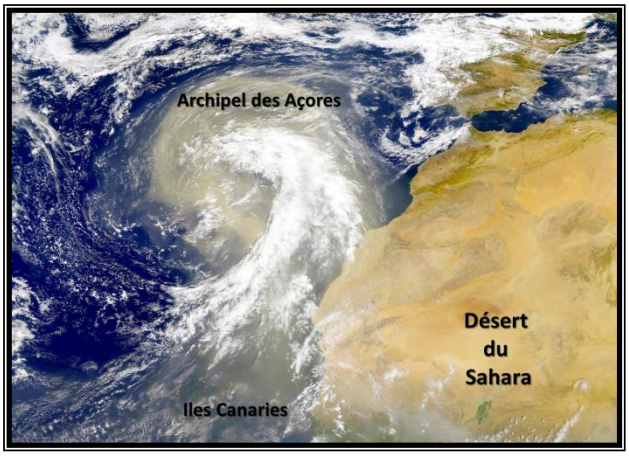


Figure 3.2. Image satellite d'un panache de poussières d'origine saharienne en Atlantique subtropical Nord est en Novembre 1998. Seawifs.

Le fer et les phosphates étant des facteurs de contrôle majeurs de la fixation de N_2, ces apports en région subtropicale pourraient favoriser la fixation de N_2 dans cette région de l'Atlantique où les concentrations de surface en phosphates et dFe sont faibles. Lors d'expériences en microcosmes, l'ajout de poussières sahariennes (sous forme de dépôt sec) a permis de lever la co-limitation Fe-P de la fixation de N_2 dans l'Atlantique tropical Nord (Mills et al. 2004). Dans la région subtropicale Nord, Marañón et al. (2010) ont également observé une stimulation de la fixation de N_2 suite à un ajout de poussières sahariennes (dépôt sec) en microcosmes, mais sans avoir identifié le facteur de limitation de la fixation de N_2. De plus, il a été montré que les poussières sahariennes pouvaient être une source d'un ou plusieurs éléments, autres que le fer ou les phosphates stimulant la fixation de N_2 en Méditerranée (Ridame et al. 2011). Il a été stipulé que cet ou ces éléments pourraient être un ou des métaux traces essentiels pour l'activité et la croissance des diazotrophes, comme par exemple le nickel dont le contrôle sur l'activité et la croissance de *T. erythraeum* a récemment été mis en évidence (Ho 2013).

Des mesures de production **primaire et de fixation de N_2** ont été réalisées dans la couche de surface du gyre subtropical de l'Atlantique Nord au cours de la campagne STRASSE dans le but d'évaluer **(i) leur variabilité spatiale à (sub)méso-échelle et (ii) la contribution de la fixation de N_2 à la production primaire ainsi qu'à la production nouvelle dans cette région oligotrophe**. Dans l'optique de mieux comprendre la variabilité spatiale de la fixation de N_2, nous avons réalisé des mesures de fixation de N_2 en période nocturne uniquement. Ceci nous a permis de **quantifier les contributions relatives des organismes dont les activités de fixation de N_2 sont soumises à un cycle nycthéméral**, telles les UCYN-B et C réalisant leur activité de diazotrophie la nuit ou *Trichodesmium* spp. et les UCYN-A fixant le N_2 le jour. Afin de mieux **caractériser les facteurs biogéochimiques de contrôle de la fixation de N_2 et de la production primaire ainsi que leur variabilité spatiale**, des expériences en microcosmes avec ajouts d'éléments potentiellement limitants (**P, Fe, métaux traces**) ont été réalisées. Enfin, en parallèle, nous avons réalisé des expériences en microcosmes avec apports sahariens simulés (sec ou humides) dans le but **d'étudier l'impact d'un apport saharien sur la production primaire et la fixation de N_2**.

Les résultats principaux de cette étude feront l'œuvre d'une publication prochainement soumise à Biogeosciences: Ridame C., Jacq V, Desboeufs K, L'Helguen S., Reverdin G and Pujo-Pay M. (in prep) N_2 fixation and primary production in the subtropical North Atlantic: distribution and responses to iron, phosphates, trace metals and Saharan dust enrichments.

II. La campagne STRASSE : objectifs et méthodologie

II.1. Objectifs du projet et localisation des zones d'intérêt

La campagne océanographique STRASSE[7] (SubTRopical Atlantic Surface Salinity Experiment), coordonnée par Gilles Reverdin (LOCEAN, UPMC), a permis la mise en place d'une partie du réseau d'observation du programme SPURS[8] (Salinity Processes in the Upper Ocean Regional Study), dont l'objectif central est l'étude du bilan à subméso-échelle de la salinité des eaux de surface subtropicales de l'Atlantique Nord. La part de la mission dédiée aux mesures biogéochimiques a été conduite en parallèle de ce projet principal afin d'élargir le champ des connaissances actuelles de cette région sur-salée. Elle concerne principalement les expériences présentées dans ce chapitre, réalisées par C. Ridame et moi même.

La campagne s'est déroulée à bord du N/O Thalassa (Ifremer, Genavir), du 16 août au 13 Septembre 2012. Parti de Las Palmas de Gran Canaria (Canaries), le navire a effectué un premier transect en direction du site principal d'étude visé lors de cette campagne : le cœur du gyre subtropical Nord de l'Atlantique (North Atlantic SubTropical Gyre, NASTG). Ce site a été échantillonné finement durant 20 jours avant un transect retour en direction de l'archipel des Açores (Figure 3.3).

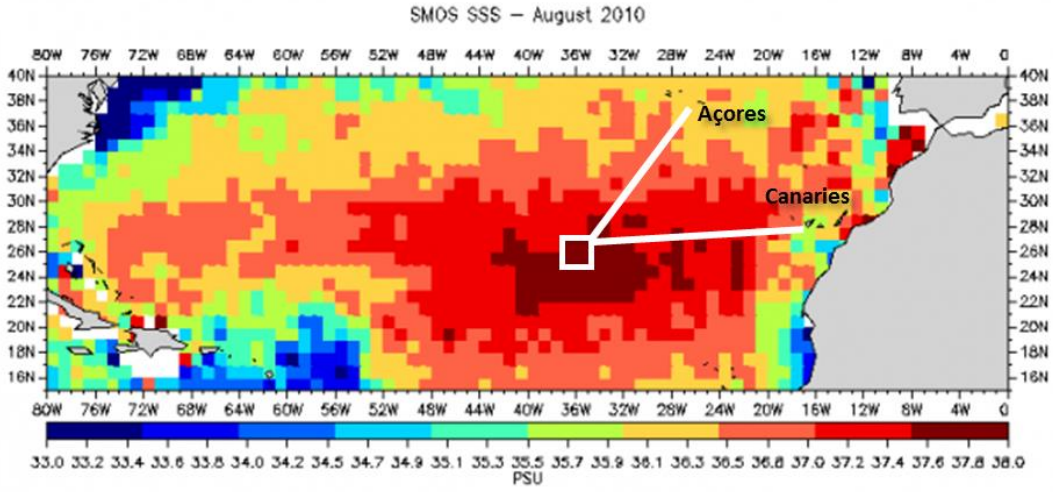


Figure 3.3. Salinité de surface de l'océan Atlantique subtropical Nord déduite des mesures SMOS (Soil Moisture and Ocean Salinity satellite) retraitées par l'Agence spatiale européenne (algorithme v5.5), pour le mois d'août 2010. © LOCEAN, Jacqueline Boutin. La zone représentée en blanc délimite les transects aller et retour et le site principal d'étude de la campagne STRASSE.

[7] http://www.locean-ipsl.upmc.fr/smos/spurs/

[8] http://www.insu.cnrs.fr/environnement/ocean-littoral/strasse-subtropical-atlantic-surface-salinity-experiment

Arrivé sur le site principal d'étude, un maillage a été effectué afin de déterminer les salinités de surface (SSS) dans le but de définir les 4 zones d'intérêt spécifique pour la campagne STRASSE, situées au niveau d'un filament de fortes salinités, en vue d'une analyse fine de ce type de structures subméso-échelles. Ce filament formait le bord Est d'un tourbillon anticyclonique présent au sud-ouest du site (non montré sur la Figure 3.4). Les 4 zones ont donc été choisies, en fonction de leurs caractéristiques hydrologiques par rapport à ce filament (Figure 3.4) :

- Z1 (du 26 au 30 août) : dans les eaux les moins salées du nord du filament de forte salinité, repéré au centre du maillage
- Z2 (du 30 août au 03 septembre) : dans le filament salé. Le filament qui se déplaçait vers le sud a été suivi jusqu'à 25.35°N.
- Z3 (du 03 au 06 septembre) : dans le gradient de salinité, à l'ouest du filament salé qui s'est déplacé vers l'est.
- Z4 (du 06 au 09 septembre) : dans les eaux moins salées au nord-est du site, éloignées des fronts de salinité.

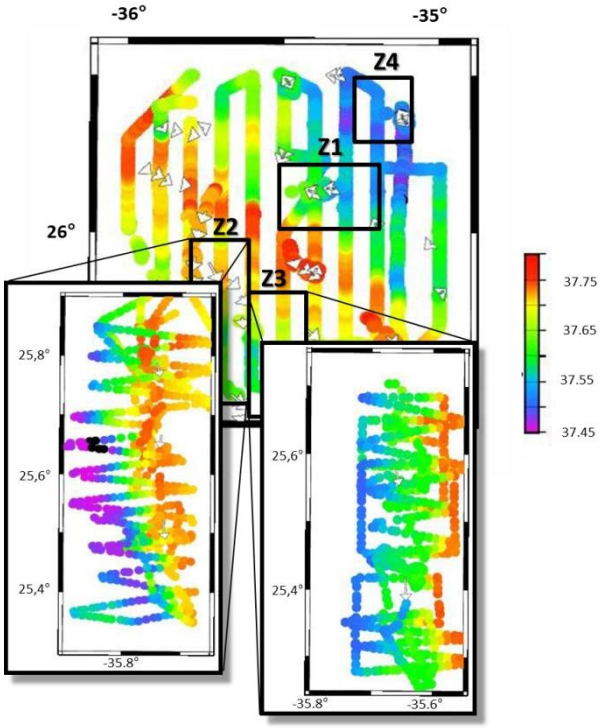


Figure 3.4. Trajectoire effectuée lors de la campagne STRASSE : sur la carte en fond la trajectoire du maillage du site principal d'étude de la campagne représenté par les mesures de salinités de surface du thermo-salinographe de la Thalassa, les flèches blanches représentent la direction du vent. Sur cette carte sont indiquées les 4 zones d'intérêt (Z1, Z2, Z3 et Z4). Les encarts correspondent au trajet effectué durant l'échantillonnage des zones 2 et 3 représenté par les mesures de salinité du thermo-salinographe de la Thalassa.

Tout au long de la campagne une rosette composée de 21 bouteilles de prélèvement Niskin® (General Oceanics, Miami, USA) a été mise à l'eau plusieurs fois par jour (94 stations en tout), avec

des prélèvements effectués de 1 à 3 fois par jour (matin, après-midi et soir) en vue de la caractérisation chimique (carbone inorganique dissous (DIC), oxygène dissous, éléments nutritifs), biologique (chl*a* et POC) et isotopique ($\delta^{13}C$ et $\delta^{18}O$) des eaux étudiées. Soixante-cinq des 94 stations CTD ont ainsi été échantillonnées sur 1000 à 2000m de profondeur. Les données présentées dans ce chapitre (températures, salinités de surface et concentrations en éléments nutritifs) sont uniquement celles issues des prélèvements réalisés l'après-midi (entre 14h et 17h TU excepté pour la station 27 : 19h).

Tout au long de la campagne nous avons effectué, dans la couche de surface, des mesures de production primaire et de fixation de N_2 (journalière sur 24h et nocturne sur 12h) permettant d'étudier la distribution spatiale de surface de ces processus à fine échelle. L'exploration à subméso-échelle des différentes zones nous a permis d'effectuer ces mesures sur tout le site afin d'établir l'existence de variations spatiales des processus biogéochimiques à cette échelle. En parallèle, nous avons également conduit des expériences en microcosmes en conditions dites « ultra-propres » avec ajouts de macro ou micronutriments et de poussières sahariennes afin de caractériser les facteurs de contrôle et la réponse à un apport atmosphérique saharien de ces deux processus. Cela a également permis de déterminer les potentielles variabilités à subméso-échelle de ces facteurs et réponses. Pour toutes ces expériences, tout le matériel a été lavé à l'acide selon le protocole décrit dans le chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire », section I, ou à bord en cas de réutilisation, avec de l'HCl suprapur®.

II.2. Localisation des stations pour la mesure des paramètres biogéochimiques (fixation de N_2 et production primaire) et les expériences en microcosmes

Les taux de fixation journalier de N_2 ainsi que la production primaire ont été mesurés en triplicats pour chaque station du transect aller et retour (excepté la dernière station : station 94) et quotidiennement sur le site d'intérêt (soit 25 mesures en triplicats au total) (Figure 3.5). Pour 16 de ces stations (Figure 3.5) nous avons mesuré en parallèle les taux de fixation nocturne de N_2 attribués aux UCYN (excepté les UCYN-A) et/ou aux diazotrophes hétérotrophes. Enfin, les expériences en microcosmes avec ajout de macronutriments (phosphates), micronutriments (Fe ou autres métaux traces) ou de poussières sahariennes (sous forme de dépôt sec ou humide) ont été réalisées 3 fois sur le transect aller, 1 fois par zone d'intérêt (sauf pour la Z1 : 2 fois) et 1 fois sur le transect retour (Figure 3.5), soit 9 expériences au total.

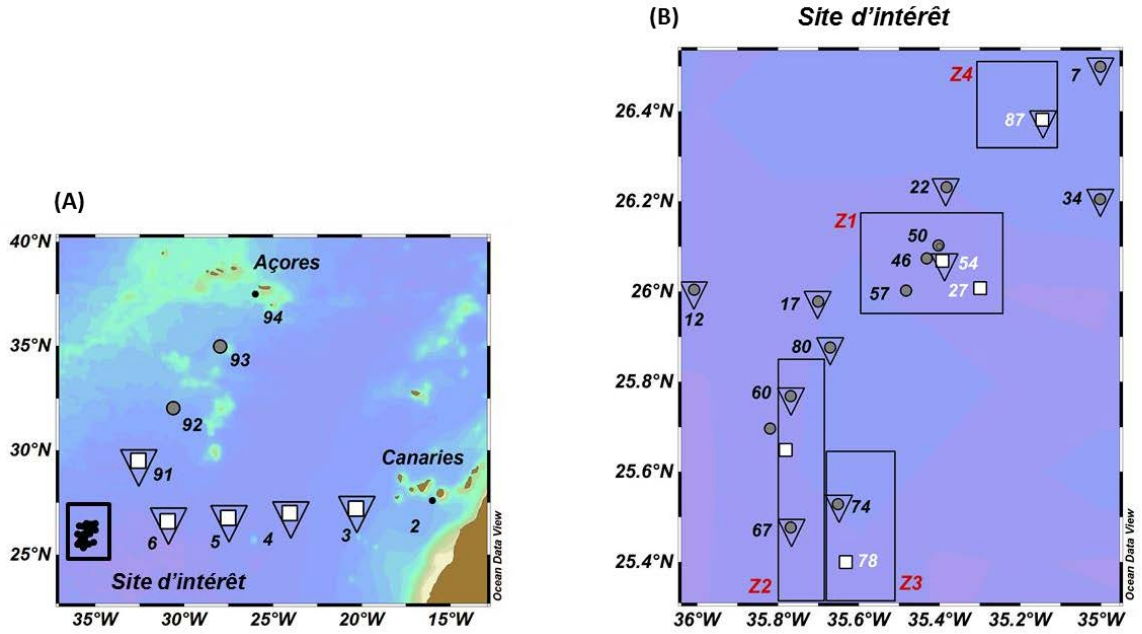


Figure 3.5. Stations des transects aller et retour (A) et du site d'intérêt (B) où ont été effectuées des mesures de production primaire et de fixation de N_2 seules (rond gris), des mesures de fixation de N_2 nocturnes (triangle noir) et des expériences en microcosmes avec enrichissements (carré blanc). Pour le site d'intérêt, les 4 zones d'études (Z1, Z2, Z3 et Z4) de la campagne STRASSE ont été encadrées. Le fond de carte représente la bathymétrie (Ocean Data View).

II.3. Distribution de surface de la production primaire et de la fixation de N_2

II.3.1. Production primaire et fixation de N_2 journalière

Les mesures de production primaire et des taux de fixation de N_2 journalières ont été effectuées simultanément dans les mêmes bouteilles grâce à la technique du double marquage ^{13}C et $^{15}N_2$. De l'eau de mer a été prélevée dans l'après-midi (entre 15h et 18h TU) à 10 m de profondeur, dans la couche de surface mélangée (SML, surface mixed layer), à l'aide de bouteilles Niskin®. Cette eau a ensuite été transférée dans des bouteilles en polycarbonate de 2.3 L préalablement rincées 3 fois avec l'eau échantillonnée. Lorsque les valeurs de fluorescence de la chl*a* mesurées avec le fluorimètre montée sur la rosette étaient très faibles (données non montrées ici) des bouteilles de 4.5L ont été utilisées (stations 46, 50, 54, 57 et 60).

Les bouteilles (2.3 ou 4.5 L) ont été remplies entièrement en prenant soin de ne laisser aucune bulle d'air et fermées à l'aide de bouchons munis d'un septum. Des ajouts de 2.5 ou 5 ml de $^{15}N_2$ (98.3 % eurisotop) et de 1 ou 2mL de ^{13}C (99 % eurisotop) ont été effectués dans les bouteilles de 2.3 ou 4.5 L respectivement. Les bouteilles ont ensuite été agitées vigoureusement afin de réduire la taille de la bulle de $^{15}N_2$. Une précédente inter-comparaison des taux de fixation mesurés avec ajout de $^{15}N_2$

gazeux pour des incubations dans 2.3 et 4.5L a montré des taux du même ordre de grandeur pour ces deux volumes (coefficient de variation de 15 %, Ridame et al. 2013). Les ajouts de ^{13}C et de $^{15}N_2$ ont conduit à un enrichissement de 8.5 % en C et théoriquement de 10.2 % en N_2. Cet enrichissement en N_2 est probablement surestimé du fait de la lente dissolution du $^{15}N_2$ dans l'eau de mer (Mohr et al. 2010b; Wilson et al. 2012). De nombreux facteurs tels que la température, le volume et le temps d'incubation ou encore la composition de la communauté phytoplanctonique diazotrophe influent sur cette surestimation en milieu naturel (Großkopf et al. 2012; Wilson et al. 2012). Ainsi, il n'existe pas de facteur de conversion permettant de ré-estimer la quantité de $^{15}N_2$ dissous dans 2.3 ou 4.5 L d'eau de mer naturelle incubée durant 12 ou 24h. Les ré-estimations effectuées pour les expériences sur culture présentées dans les chapitres 1 et 2 ne peuvent pas être effectuées ici, car elles sont basées sur des incubations réalisées en laboratoire dans un volume de ~130 mL. Or, l'augmentation du volume d'incubation et donc l'augmentation du volume de gaz $^{15}N_2$ réduisent la dissolution du gaz $^{15}N_2$ (mais dans une moindre mesure que le temps d'incubation) (Mohr et al. 2010b). Ainsi, tout en étant conscients que les taux de fixation mesurés ici sont probablement sous-estimés, nous avons choisi de ne pas les ré-estimer. L'éventuelle détermination d'un facteur de ré-estimation précis pourra alors permettre aux futurs investigateurs de convertir nos données mesurées.

Les bouteilles enrichies en ^{13}C et $^{15}N_2$ ont ensuite été incubées pendant 24h à température *in-situ* dans des bacs alimentés en continu avec de l'eau de mer pompée en surface (Figure 3.6A). Ces incubateurs, placés sur le pont avant du bateau, étaient recouverts d'un filtre permettant de simuler l'intensité lumineuse à la profondeur échantillonnée (54 % de la lumière incidente sauf aux stations 3 et 4 : 36 %). Le choix du pourcentage d'atténuation lumineuse a été basé sur les mesures quotidiennes de PAR à 10m à l'aide d'un radiomètre Trios® (A. Cauvin, comm. pers.). Au bout de 24h, l'eau de mer incubée a été intégralement filtrée (Figure 3.6B) à une pression inférieure à 200 mbar sur filtre GF/F grillés (8h à 450°C), ensuite stocké au congélateur à -25°C. Les teneurs en COP et NOP ainsi que les enrichissements de la matière particulaire en ^{13}C et ^{15}N ont été mesurés par Stéphane l'Helguen selon la méthode décrite chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire» section V.3. Puis les taux de fixation de N_2 et de CO_2 ont été calculés toujours selon la méthode présentée dans le chapitre « Méthodologie des expériences en culture au laboratoire» section V.3.

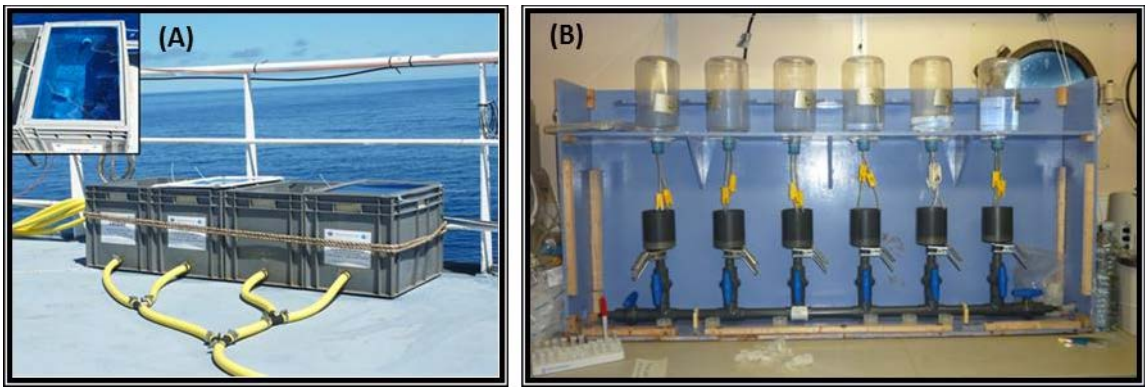


Figure 3.6. (A) Les incubateurs sur le pont avant du bateau avec une alimentation continue en eau de mer de surface. (B) Rampe de filtration utilisée à bord pour la filtration de l'eau incubée.

II.3.2. Fixation de N_2 nocturne

En parallèle des prélèvements décrits ci-dessus, des prélèvements de 2.3 L (excepté pour les stations 46, 60 et 91 : 4.5 L) ont été effectués dans les mêmes bouteilles Niskin® (à 10m de profondeur) afin de mesurer la fixation nocturne de N_2. Les bouteilles ont été placées dans les incubateurs immédiatement après le prélèvement ; l'ajout de $^{15}N_2$ a été effectué à la tombée de la nuit et la filtration au lever du jour. Chacune de ces incubations a également été réalisée en trois réplicats. La différence entre les taux de fixation de N_2 mesurés sur 24h et les taux de fixation de N_2 nocturnes obtenus pour un jour donné permet d'obtenir la fixation de N_2 de jour, attribuée aux filamenteux, aux UCYN-A et/ou aux bactéries hétérotrophes.

II.4. Expériences en microcosmes avec ajouts d'éléments nutritifs et poussières sahariennes

Au cours de ces expériences, nous avons travaillé en conditions dites « ultra-propres » afin d'éviter toute contamination potentielle des échantillons. L'eau de mer a été prélevée à l'aide de bouteilles Go-Flo® (General Oceanics, Figure 3.7) spécialement adaptées aux travaux sur les métaux traces (ces bouteilles nous ont été prêtées par Géraldine Sarthou, LEMAR, IUEM, Brest). Ces bouteilles totalement exemptes de métal et montées sur un câble en kevlar, ont été mises à l'eau fermées. Sous l'effet de la pression, elles s'ouvrent à environ 10 m de profondeur, puis sont refermées par l'envoi d'un messager en téflon. Une fois remontées sur le pont, les deux extrémités des bouteilles ont immédiatement été protégées par des sacs en plastique puis elles ont été emmenées dans le laboratoire. L'eau de mer a ensuite été recueillie sous hotte à flux laminaire (classe 100) à l'aide d'un

tuyau en Teflon® et toutes les manipulations décrites ci-dessous ont été effectuées sous hotte à flux laminaire.

Le protocole expérimental utilisé lors de ces expériences d'enrichissement est décrit Figure 3.7. L'eau de mer a été prélevée entre 13h et 17h30 TU. Des bouteilles en polycarbonate de 2.3 L ont été remplies avec ~2L d'eau de mer puis, des ajouts de phosphates (P), de fer (Fe), d'un mélange de métaux (Mn, Zn, Co, Mo, Cu et Ni), seuls ou combinés, ont été effectués. De plus, nous avons réalisé des ajouts de poussières sahariennes sous forme de dépôt sec (1 expérience, station 5) ou de pluies simulées (Tableau 3.I). Un traitement sans aucun ajout a servi de contrôle et tous les traitements ont été réalisés en triplicats. Une fois les ajouts effectués, le volume dans les bouteilles a été complété avec la même eau de mer en prenant soin de ne laisser aucune bulle d'air, puis les bouteilles ont été fermées à l'aide de bouchons munis d'un septum.

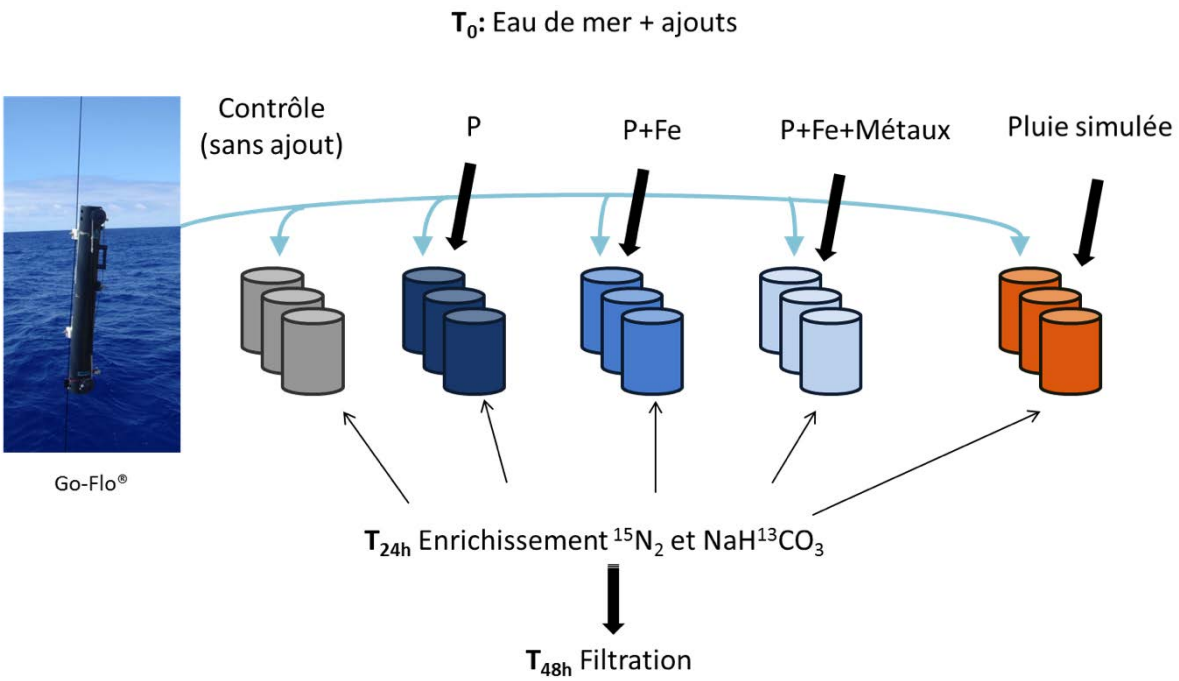


Figure 3.7. Protocole expérimental des expériences d'incubation avec ajouts d'éléments potentiellement limitants. Prélèvement d'eau de mer à 10 m dans les bouteilles Go-Flo® (photo) et ajout de P (phosphates), P+Fe (phosphates + fer), P+Fe+Métaux ou poussières sahariennes sous forme de dépôt humide (exemple d'ajouts pour les stations 63, 78, 87 et 91).

Le fer ($FeCl_3$) et les phosphates (PO_4^{3-}) et ont été ajoutés afin d'obtenir des concentrations finales respectives de 2 nM et 435 nM (sauf à la station 91 où une erreur dans l'ajout de phosphates a entraîné une concentration finale de 4.3 µM) (Tableau 3.I). Un mélange de 6 métaux a été ajouté, seul ou combiné à un ajout de P+Fe ; les concentrations finales de ces métaux sont présentées Tableau 3.II.

Tableau 3.I. Concentrations finales en macro et micronutriments dans les microcosmes, charge particulaire des poussières ajoutées sous forme de dépôt sec et quantité de pluie simulée ajoutée (dépôt humide) en % du volume des microcosmes pour chaque expérience.

Station	Eléments nutritifs (nM) ajoutés					Poussières atmosphériques	
	P	Fe	Métaux	P+Fe	P+Fe+Métaux	dépôt sec (mg L^{-1})	dépôt humide
3	435						
4						2.36	
5	435			435 2			
27	435	2	M_{final} †		435 2 M_{final} †		
54	435			435 2			2 % -pluie Niger non EC ou 2 % pluie Tunisie EC
63	435			435 2	435 2 M_{final} †		2 %-pluie Niger non EC
78	435			435 2	435 2 M_{final} †		2 %-pluie Niger non EC
87	435			435 2	435 2 M_{final} †		2 %-Niger non EC
91 *	4348			4348 2	4348 2 M_{final} †		2 %-Niger non EC

† M_{final} : Concentrations ajoutées en métaux traces. Cf. tableau 3.II.
* Station 91 : Erreur dans l'ajout de phosphate : ajout d'une solution 10 fois plus concentrée

Tableau 3.II. Concentrations finales dans les microcosmes des différents métaux ajoutés (M_{final}).

Métal	Mn ($MnCl_2$)	Zn ($ZnSO_4$)	Co ($CoCl_2$)	Mo (Na_2MoO_4)	Cu ($CuSO_4$)	Ni ($NiSO_4$)
M_{final} (nM)	5.0	2.0	0.5	76.8	1.0	3.0

Cinq pluies (notées 'pluie Niger') ont été préparées à bord, le jour des expériences, à partir des mêmes poussières (poussières du Niger non évapo-condensées) et selon le même protocole que pour la pluie artificielle utilisée dans les expériences sur culture présentées Chapitre 2, exceptée la charge particulaire qui était ici de 100 mg.L^{-1}. La composition de ces poussières est présentée Tableau 3.III. La pluie, après filtration (0.2 µm), a été ajoutée dans les bouteilles à raison de 2 % (soit 45 mL dans 2.3L d'eau de mer, Tableau 3.I). Un traitement supplémentaire a été réalisé à la station 54 avec une pluie (notée 'pluie Tunisie') simulée à partir d'une fraction fine (< 20 µm) de poussières évapo-condensées collectées en Tunisie (voir détail dans Guieu et al. 2010; Ridame et al. 2013, Desboeufs et al. 2014) (Tableau 3.I et 3.III). Le processus d'évapo-condensation met en jeu l'utilisation de HNO_3 (Desboeufs et al. 2001; Guieu et al. 2010) ce qui entraîne une augmentation du contenu en N des poussières. Ainsi les poussières de Tunisie contiennent 1.19 ± 0.05 % de N (Guieu et al. 2010; Ridame et al. 2013). Par comparaison, les poussières non évapo-condensées du Niger ne contiennent que 0.22 ± 0.01 % de N (Ridame, comm. pers).

Tableau 3.III. Composition chimique des fractions fines (< 20 µm) de sols utilisées ici (Niger, non évapo-condensées (non-EC) et Tunisie évapo-condensée (EC)). Les valeurs en noir sont données en % et les valeurs en gris en ppm (1 ppm = 0.0001 %).

Elément	N %	P %	Fe %	Mn %	Co ppm	Cu ppm	Mo ppm
Poussières Niger - non EC	0.22 (0.01)[a]	0.03 (0.01)[b]	3.1 (0.2)[b]	0.06 (0.01)[b]	nd	13.5 (1.7)[c]	5.4 (0.9)[c]
Poussières Tunisie - EC	1.19 (0.05)[d]	0.045 (0.015)[d]	2.31 (0.04)[d]	0.035 (0.005)[e]	8.4 (3.0)[e]	15.5 (2.7)[e]	0.7 (0.2)[e]

nd. Non déterminé [a]Ridame (comm. pers.) [b]Paris et al. (2011) [c]Desboeufs (comm. pers.) [d]Ridame et al. (2013) [e]Desboeufs et al.(2014)

Dans chaque pluie filtrée (0.2 µm), des triplicats de 30 mL ont été prélevés dans des flacons en HDPE puis acidifiés avec 300 µL de HNO_3 suprapur® pour l'analyse des éléments traces par ICP-AES (Perkin Elmer® optima 3000 XL), en collaboration avec Karine Desboeufs (LISA). Les concentrations finales en métaux dissous dans les pluies et dans les microcosmes suite à l'ajout de pluie seront donc présentées respectivement dans les sections VI.1.1 et VI.1.3. De plus, 25 mL ont été prélevés et conditionnés dans des flacons en verre en présence de thymol (afin d'éviter un éventuel développement bactérien) pour la détermination des concentrations des ions nitrates et oxalates dans la pluie par analyse en chromatographie ionique (850 Professional IC1, Metrohm®, Karine Desboeufs, LISA) selon un protocole décrit dans Paris (2011).

A la station 5, les poussières non évapo-condensées du Niger ont directement été ajoutées dans les microcosmes à une concentration finale de 2.36 $mg.L^{-1}$ afin de simuler un dépôt sec (Tableau 3.I). Cette concentration finale dans les microcosmes est équivalente aux concentrations théoriques de poussières dans les microcosmes suite à l'ajout des pluies artificielles (45 mL de pluie dans 2.3L), si celles-ci n'avaient pas été filtrées (soit ~2 $mg.L^{-1}$). Un tel ajout correspond à un enrichissement en poussières causé par un fort événement saharien, de 20 $g.m^{-2}$, mélangé de manière homogène dans une couche d'eau de 10 m (cette charge particulaire a également été utilisée dans les expériences de Mills et al. 2004 et Marañón et al. 2010). Des observations et des travaux de modélisation ont montré des taux de dépôt de poussières de 10 à 50 $mg.m^{-2}$ dans l'Atlantique tropical et subtropical Nord-Est, à l'échelle de l'évènement (Neuer et al. 2004; Mahowald et al. 2005). Ces évènements peuvent donc causer, sur 10 m de profondeur, un enrichissement similaire aux dépôts de poussières que nous avons simulés.

Une fois les ajouts réalisés et le volume complété à 2.3 L, les bouteilles ont été placées dans les incubateurs sur le pont et les enrichissements en ^{13}C (1 ml) et $^{15}N_2$ (2.5ml) ont été effectués au bout de 24 h d'incubation. 24 h après ces enrichissements en ^{13}C et $^{15}N_2$, soit au bout de 48 h d'incubation, l'eau de mer a été intégralement filtrée à une pression inférieure à 200 mbar sur filtre GF/F grillés (8h à 450°C), ensuite stocké au congélateur à -25°C. Puis les taux de fixation de N_2 et de CO_2 ont été déterminés comme décrit ci-dessus (section II.3.1).

II.5. Autres paramètres d'intérêt

II.5.1. Paramètres hydrologiques

A chaque station des profils verticaux de température et de salinité ont été effectués sur toute la colonne d'eau (de 0 à 1000 ou 2000 m) avec une sonde CTD Seabird® SBE 9 montée sur la rosette.

II.5.2. La Chlorophylle a

Les prélèvements ont été réalisés à bord par Héloïse Lavigne (LOV, UPMC) et les mesures par Joséphine Ras (LOV, UPMC). Des échantillons (2.7 L d'eau de mer) ont été prélevés dans la couche de surface, à 10m de profondeur, puis filtrés sur des filtres GF/F. Ces filtres ont ensuite été stockés dans de l'azote liquide jusqu'au moment de leur analyse en laboratoire. Après extraction dans de l'éthanol la chl*a* a été analysée par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography, Agilent technologies 1100 series) selon la méthode détaillée dans Ras et al. (2008).

II.5.3. Les éléments nutritifs majeurs

Des échantillons d'eau de mer (60 mL) ont été prélevés sur toute la colonne d'eau dans des flacons en polypropylène préalablement lavés à l'HCl dilué (1N) et rincés 3 fois à l'eau de mer, puis immédiatement congelés à -25°C. Les analyses ont été réalisées par Mireille Pujo-Pay au LOMIC (Observatoire Océanologique de Banyuls, UPMC) par colorimétrie selon Aminot et Kérouel (2007) à l'aide d'un autoanalyseur Seal-Bran & Luebbe AA3 HR. Les limites de détection sont de 0.02 µM pour les nitrates + nitrites (notés NOx), 0.01 µM pour les phosphates et 0.05 µM pour les silicates.

II.5.4. Les métaux dissous

Des échantillons d'eau de mer ont été prélevés et filtrés (< 0.2 µm) en conditions ultra-propres à toutes les stations où ont été réalisées les expériences en microcosmes. Ces échantillons, acidifiés à 1 % (HCl suprapur®), ont été stockés au laboratoire en vue de la mesure des concentrations en dMn,

dCo, dFe, dNi, dCu et dZn par ICP-MS (spectrométrie de masse avec source Plasma à couplage inductif) avec pré-concentration à l'aide d'une résine Nobias-chelate PA1 (Biller et Bruland 2012). Au jour de la publication de cette thèse, ces mesures n'ont pas encore été effectuées.

II.6. Traitement statistique

Une fois l'homoscedasticité validée à l'aide d'un test de Bartlett, il a été réalisé une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Fisher pour la comparaison deux à deux (α=0.05). Lorsque l'homoscedasticité n'a pas été validée, elle a été vérifiée pour les valeurs transformées en logarithme et les ANOVA ont été réalisées à partir de ces valeurs transformées. Tous ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel XLstat®. Afin de tester la corrélation significative entre deux paramètres, après avoir vérifié la normalité des deux échantillons, nous avons effectué un test sur le coefficient de corrélation de Pearson. Si la normalité n'a pas été significative (α = 0.05) pour au moins un des échantillons, nous avons alors effectué un test sur le coefficient de corrélation de Spearman (non paramétrique). Ces tests ont été réalisés avec le logiciel R (R core team 2013).

III. Caractéristiques hydrologiques et biogéochimiques

Durant toute la campagne, la colonne d'eau était stratifiée, avec une profondeur de couche de mélange inférieure à 50 m, si l'on se base sur le fort gradient des anomalies potentielles de densité (Figure 3.8).

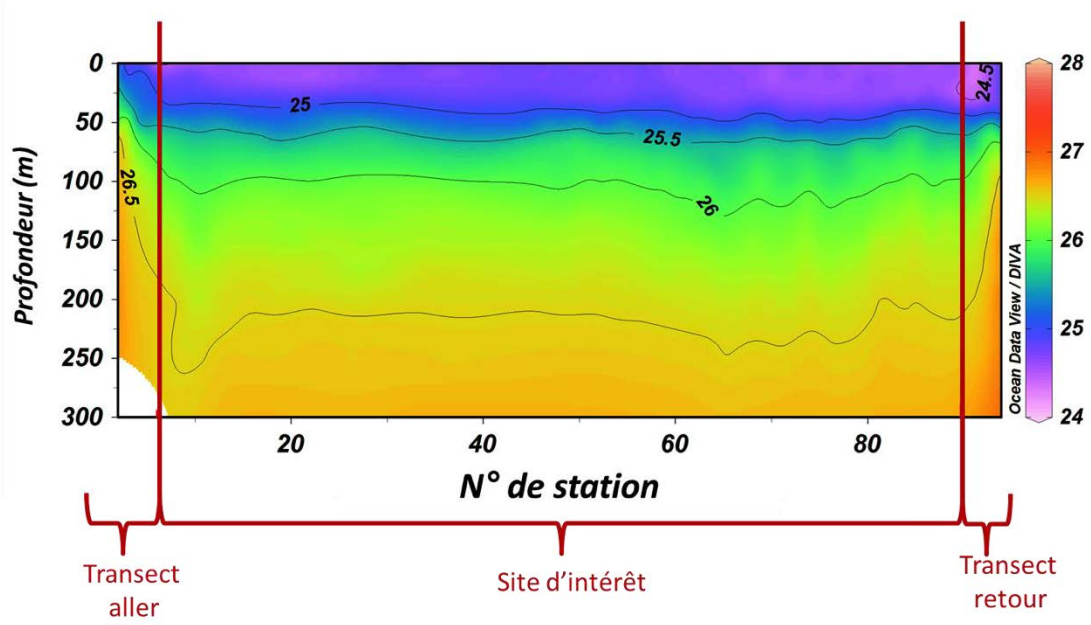


Figure 3.8. Anomalies potentielles de densité ($kg.m^{-3}$) des 300 premiers mètres de la colonne d'eau en fonction des numéros des stations CTD échantillonnées durant la campagne STRASSE. Pour le site d'intérêt, cette figure représente ainsi la variabilité temporelle et non spatiale de ce paramètre.

Un fort gradient de salinité est-ouest a été observé, avec des salinités maximales (37.75) au niveau du NASTG, représentant le site d'intérêt de la campagne (Figure 3.9A). De même, un gradient de température de surface a été observé depuis les Canaries ou les Açores vers le site d'intérêt, avec des températures augmentant de ~22.7 °C à proximité des îles jusqu'à des températures homogènes comprises entre 26.5°C et 27.6°C sur tout le site d'intérêt (Figure 3.9B).

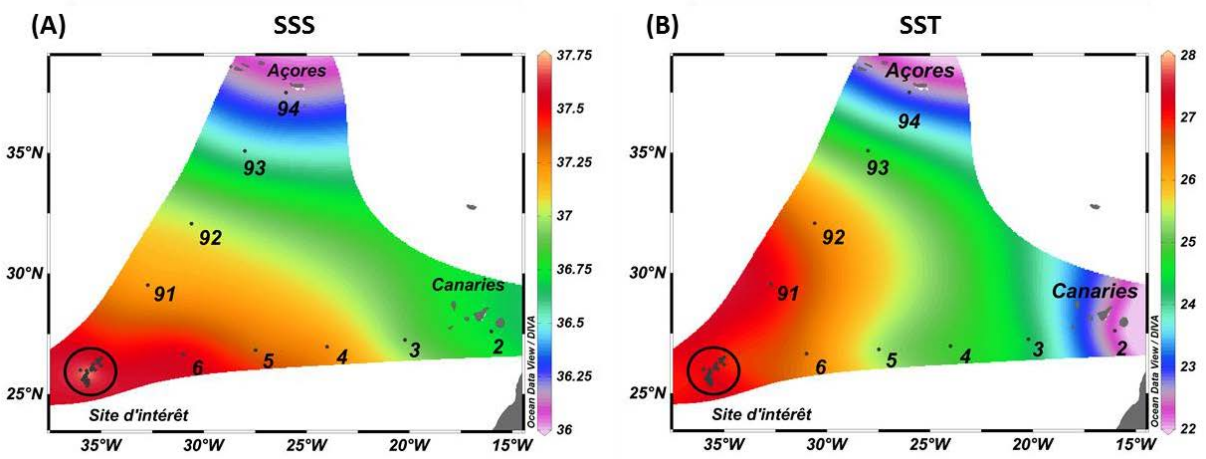


Figure 3.9. (A) Salinité et (B) température de surface (SSS et SST). Les points noirs représentent la localisation des stations CTD. Sur les figures sont indiqués les n° des stations des transects aller (2 à 6) et retour (91 à 94), ainsi que la position du site d'intérêt de la campagne, au niveau du gyre sur-salé de l'Atlantique subtropical Nord.

En surface (10 m), les concentrations en phosphates, NOx et silicates sont faibles à toutes les stations échantillonnées (< 0.10 µM pour les phosphates, < 0.11 µM pour les NOx et < 0.80 µM pour les silicates) (Tableau 3.IV) et sur toute la profondeur de la SML (~50 m de profondeur, données non présentées ici). La valeur maximale du rapport NOx/phosphates est de 4, soit inférieure au rapport de Redfield de 16/1 (Redfield 1958). Ces faibles concentrations en nutriments, typiques des zones LNLC, sont en accord avec les faibles concentrations en chl*a* en surface (10m) mesurées durant toute la campagne, comprises entre 21.9 $ng.L^{-1}$ et 85.4 $ng.L^{-1}$ (Tableau 3.IV). Les valeurs de concentrations en nutriments correspondent aux données précédemment publiées pour cette zone (Mather et al. 2008; Fernández et al. 2012; Agawin et al. 2013; Benavides et al. 2013b; 2013c; Schlosser et al. 2014) et les concentrations en chl*a* sont plus faibles que celles précédemment mesurées en surface pour une région correspondant au transect aller (de 190 à 770 $ng.L^{-1}$ en hiver (Agawin et al. 2013) et de 150 à 200 $ng.L^{-1}$ en automne (Fernández et al. 2012)). Enfin, les rapports C/N mesurés dans la matière organique particulaire sont compris entre 7.6 et 10.7 $mol.mol^{-1}$ (~8.5 ± 1.1 $mol.mol^{-1}$ en moyenne ; données non présentées), ce qui est légèrement supérieur au rapport de Redfield (106/16, Redfield, 1958).

.

Tableau 3.IV. Caractéristiques hydrologiques et biogéochimiques des eaux de surface (10m). Les valeurs indiquées en italique correspondent à des mesures effectuées entre 4 et 5 m de profondeur.

	N° Station	Coordonnées	SST (°C)	SSS (psu)	PO_4^{3-} µM	NOx µM	NOx/PO_4^{3-} mol.mol^{-1}	H_4SiO_4 µM	Chl*a* ng.L^{-1}	PP mgC.m^{-3}.j^{-1}	N_2 Fix nmolN.L^{-1}.j^{-1}	Ajouts
Transect aller	**2**	27.60° N – 16.02° O	22.6	36.69	0.08	0.03	0.4	0.5	101.8	nd	nd	
	3	27.25° N – 20.22° O	24.3	36.91	0.03	<LD	--	0.5	85.4	6.23 (0.80)	1.11 (0.18)	P
	4	26.97° N – 24.00° O	24.8	37.24	0.05	0.04	0.92	0.5	57.7	2.11 (0.20)	0.24 (0.12)	P
	5	26.83° N – 27.48° O	25.4	37.33	0.04	<LD	--	0.6	58.9	1.48 (0.67)	0.24 (0.06)	P, dépôt sec Niger
	6	26.65° N – 31.00° O	26.5	37.54	0.02	0.04	1.56	0.7	21.9	2.35 (0.95)	0.20 (0.09)	
Site d'intérêt	**7**	26.50° N – 35.00° O	27.2	37.55	0.03	0.02	0.76	0.7	47	2.56 (0.82)	0.65 (0.15)	
	12	26.00° N – 36.00° O	*27.3*	*37.63*	*0.01*	*<LD*	--	*0.6*	68.8	4.02 (0.98)	0.36 (0.18)	
	17	25.98° N – 35.70° O	27.5	37.71	<LD	0.11	--	0.4	47	2.43 (1.04)	0.27 (0.16)	
	22	26.23° N – 35.38° O	27.3	37.56	0.02	<LD	0.89	0.6	36.9	1.70 (0.29)	0.13 (0.04)	
	27	26.01° N – 35.30° O	27.0	37.57	0.03	nd	nd	0.6	38.6	1.30 (0.26)	0.32 (0.03)	P, Fe, M, P+Fe+M
	34	26.20° N – 35.00° O	26.9	37.55	0.10	0.05	0.51	0.6	31.8	2.25 (0.51)	0.38 (0.21)	
	46	26.07° N – 35.43° O	26.9	37.62	0.03	0.11	3.29	0.4	49.2	nd	0.31 (0.18)	
	50	26.10°N – 35.40° O	26.9	37.66	0.05	0.04	0.67	0.8	48.1	1.83 (0.74)	0.12 (0.00)	
	54	26.07° N – 35.40° O	27.2	37.67	0.01	<LD	--	0.6	42.7	2.07 (0.57)	0.20 (0.05)	P, P+Fe, pluie Niger, pluie Tunisie
	57	26.02°N – 35.48° O	*26.9*	*37.65*	nd	nd	nd	nd	70.9	1.17 (0.27)	0.49 (0.13)	
	60	25.77° N – 35.77° O	27.5	37.75	nd	nd	nd	nd	nd	1.80 (0.45)	0.34 (0.05)	
	63	25.65°N – 35.78° O	*27.5*	*37.74*	*0.03*	*0.03*	*0.79*	*0.6*	63.6	2.81 (0.53)	0.72 (0.15)	P, P+Fe, P+Fe+M, pluie Niger
	67	25.48° N – 35.77° O	27.3	37.72	0.04	<LD	--	0.6	67.2	1.80 (0.26)	0.52 (0.37)	
	70	25.70°N – 35.82° O	27.2	37.52	0.04	0.09	2.29	0.5	nd	1.44 (0.25)	nd	
	74	25.53°N – 35.65° O	27.3	37.65	0.01	0.05	3.86	0.6	nd	3.82 (0.53)	0.66 (0.23)	
	78	25.45°N – 35.67° O	27.2	37.59	0.03	<LD	--	0.6	81.4	4.05 (0.19)	0.68 (0.01)	P, P+Fe, P+Fe+M, pluie Niger
	80	25.88°N – 35.67° O	27.3	37.74	0.02	<LD	--	0.6	43.7	2.06 (0.13)	0.28 (0.15)	
	87	26.38°N – 35.15° O	27.2	37.59	0.04	<LD	--	0.5	74.6	2.36 (0.71)	0.42 (0.18)	P, P+Fe, P+Fe+M, pluie Niger
Transect retour	**91**	29.52°N – 37.72° O	27.3	37.20	0.02	0.08	4.00	0.5	30.6	2.15 (0.17)	0.20 (0.07)	P, P+Fe, P+Fe+M, pluie Niger
	92	32.07°N – 30.60° O	26.3	37.03	0.03	<LD	--	0.5	nd	1.65 (0.26)	0.21 (0.08)	
	93	35.08°N – 28.00° O	24.7	36.53	0.02	<LD	--	0.4	65.7	nd	0.34 (0.09)	

<LD : inférieures à la limite de détection (PO_4^{3-} : 0.01 µM, NO_2^- + NO_3^- : 0 .02 µM et H_4SIO_4 : 0.05 µM)
nd : non déterminé

IV. Distribution de surface de la production primaire et de la fixation de N_2 - implications biogéochimiques

IV.1. Distribution spatiale de la fixation de N_2 et de la production primaire

Il a été observé une **faible production primaire durant toute la campagne STRASSE** (de 1.17 ± 0.27 à 6.23 ± 0.80 mgC.m^{-3}.j^{-1}, Tableau 3.IV, Figure 3.10A), ce qui est caractéristique des régions oligotrophes que sont les grands gyres subtropicaux (Moore et al. 2008; Morel et al. 2010). Au vu des rapports NOx/phosphates inférieurs à 4, **la production primaire est potentiellement limitée par le N en surface à toutes les stations. Les taux de fixation de N_2 sont également faibles** (de 0.12 à 1.11 nmolN.L^{-1}.j^{-1}, Figure 3.10B), ce qui est en accord avec les faibles taux précédemment mesurés dans cette zone en surface selon la même technique de mesure (ajout de $^{15}N_2$ gazeux) (< 1 nmolN.L^{-1}.j^{-1} en automne ou au printemps (Moore et al. 2009; Fernández et al. 2010). Agawin et al. (2013) ont effectué des mesures en surface, selon la méthode de réduction de l'acétylène, pour une région correspondant au transect aller et ont mis en évidence des taux de fixation de N_2 plus faibles en été (0.62.10^{-3} nmolNL^{-1}.j^{-1}) mais équivalents en hiver (0.02 à 1.88 nmolNL^{-1}.j^{-1}) à ceux mesurés durant la campagne STRASSE.

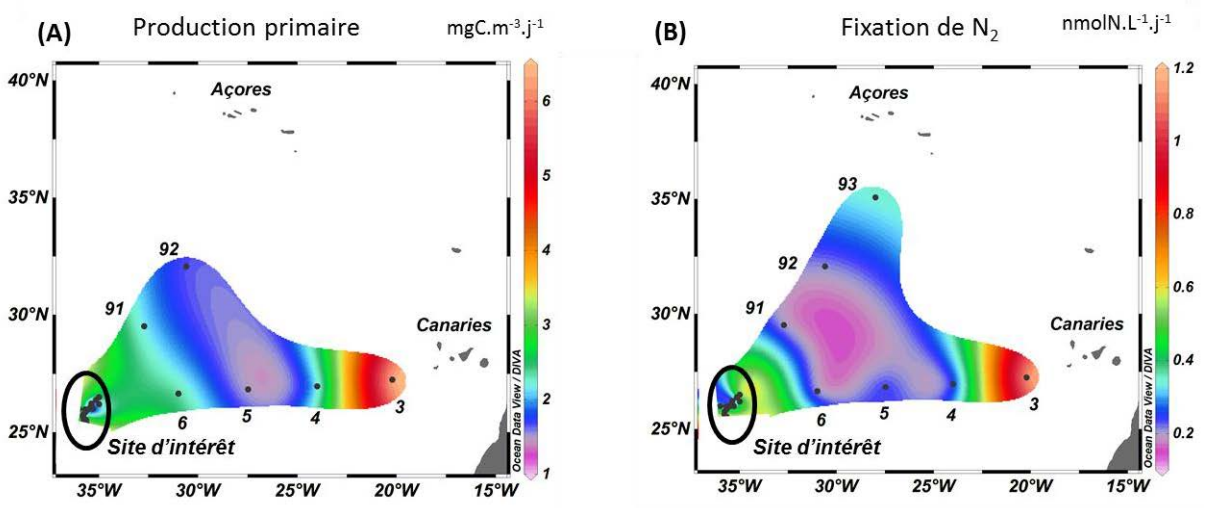


Figure 3.10. (A) Production primaire (en mgC.m^{-3}.j^{-1}) et (B) fixation de N_2 (en nmolN.L^{-1}.j^{-1}). Le site d'intérêt de la campagne, au centre du NASTG, est entouré en noir.

Les valeurs maximales de production primaire (6.23 ± 0.80 mgC.m^{-3}.j^{-1}) et de fixation de N_2 (1.11 ± 0.18 nmolN.L^{-1}.j^{-1}) ont été observées à la station la plus proche des Canaries, là où la concentration en chl*a* était maximale (85.4 ng.L^{-1}) et ce malgré des concentrations en NOx et phosphates proches

des limites de détection (Tableau 3.IV). Les plus fortes concentrations en phosphates observées à la station 2, plus proche des Canaries (0.08 µM, Tableau 3.IV), peuvent expliquer cette tendance. **La production primaire et les taux de fixation de N_2 plus élevés à la station 3 pourraient être liés à un apport en phosphates en provenance du plateau des Canaries** (Figure 3.1), **advectés via le courant des Canaries, comme précédemment observé par Johnson et al. (2006).** Au moment de l'échantillonnage, ces phosphates auraient alors été consommés par les producteurs primaires et/ou les cyanobactéries diazotrophes. Il a ensuite été observé une **diminution de la concentration en Chl*a*, de la production primaire et de la fixation de N_2 entre la station 3 et le site d'intérêt**, avec de faibles concentrations en phosphates relativement constantes sur tout le transect et des concentrations en NOx très faibles ou indétectables et constantes également (Tableau 3.IV). Une diminution de la fixation de N_2 d'est en ouest pour cette région a déjà été observée au printemps par Mouriño-Carballido et al. (2011).

L'exploration à fine échelle du cœur du NASTG nous a permis de mettre en évidence des variations de l'activité phytoplanctonique à subméso-échelle (Figure 3.11). Bien qu'il n'ait pas été observé de différences en termes de concentrations en nutriments en surface (phosphates, NOx et silicates, Tableau 3.IV), des variations de concentrations de chl*a* et de production primaire à 10m ont été relevées, avec de plus fortes valeurs à Z3 (Figure 3.11 A-B) et des taux de fixation de N_2 plus forts ont été observés aux Z2 et Z3 (Figure 3.11 B-C).

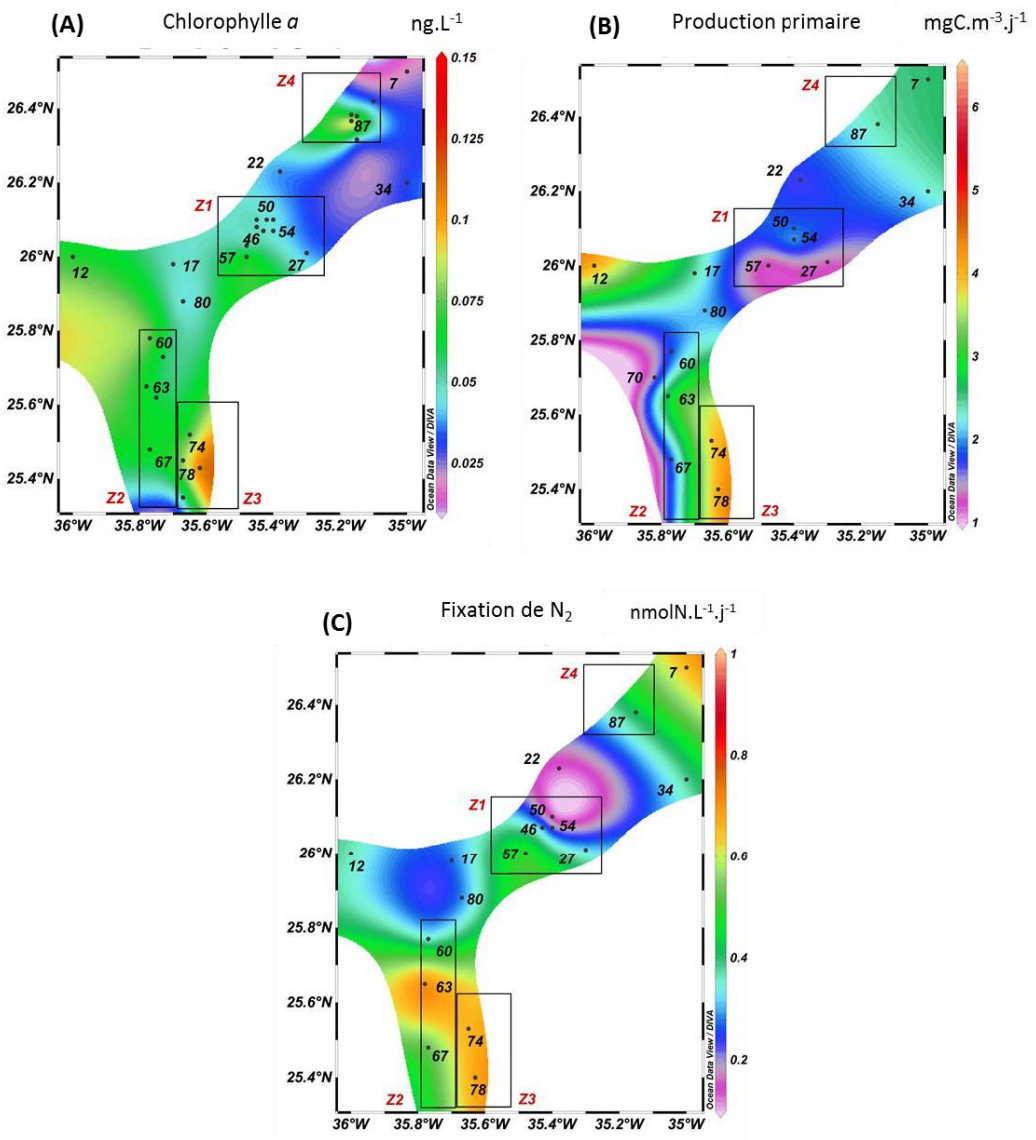


Figure 3.11. (A) Concentrations en chl*a* (ng.L^{-1}), (B) production primaire (en mgC.m^{-3}.j^{-1}) et (C) fixation de N_2 (en nmolN.L^{-1}.j^{-1}) en surface (10 m de profondeur) pour le site d'intérêt. Les quatre zones d'intérêt de la campagne (Z1, Z2, Z3 et Z4) sont indiquées.

Les différences observées en Z3 peuvent être reliées à la circulation de surface à subméso-échelle, mise en évidence par les différences de SSS. Entre Z2 et Z3, des différences non négligeables de SSS ont été observées (Figure 3.12). Les données d'altimétrie obtenues durant la campagne ont permis de voir que, au moment du déplacement du bateau de la Z2 vers la Z3, les eaux moins salées formant un tourbillon anticyclonique au sud-ouest de la zone au moment de l'échantillonnage de Z2 (Figure 3.12A) se sont décalées vers l'est avec une advection d'eaux provenant du sud, expliquant les plus faibles SSS en Z3 (Figure 3.12B). Ce déplacement n'est pas visible sur les reconstructions effectuées à partir de données satellites (ex : satellite MODIS, projet AQUARIUS, NASA®) car il s'agit d'une structure très dynamique (G. Reverdin comm. pers.).

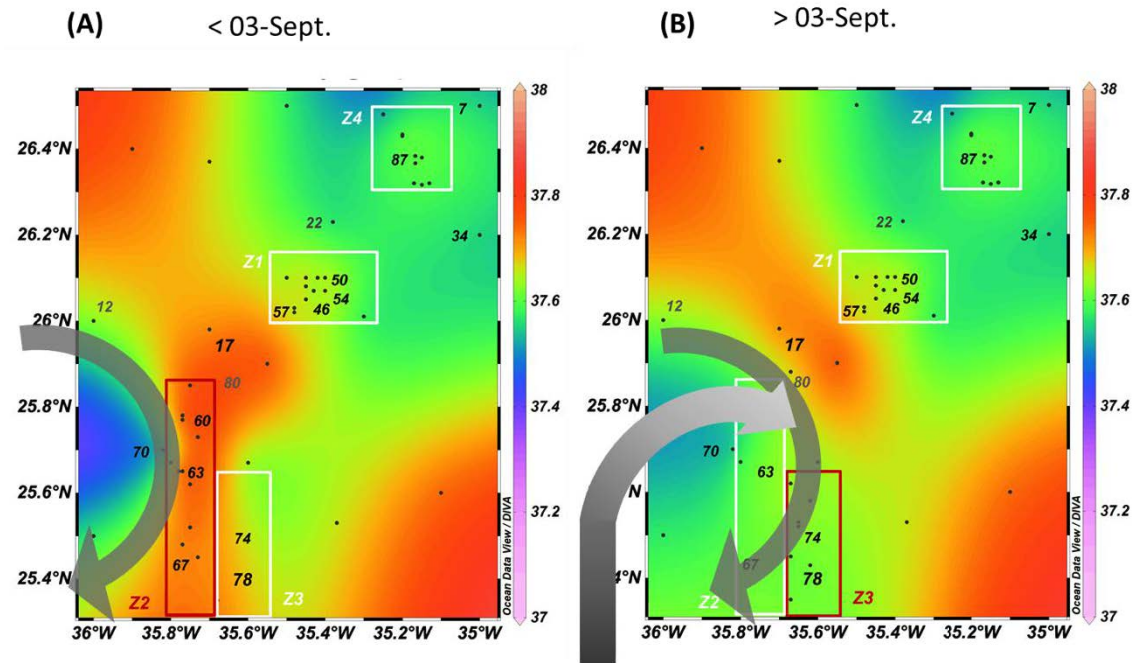


Figure 3.12. Salinité des eaux de surface dans la zone d'intérêt de la campagne STRASSE. (A) avant le 3 Septembre 2012, durant l'échantillonnage de la zone 2 (Z2) et (B) à partir du 3 septembre 2012 au soir, durant l'échantillonnage de la zone 3 (Z3). Les flèches grises indiquent le tourbillon anticyclonique situé au sud-ouest de la zone, advecté par des eaux venant du sud et décalé vers l'est (B).

Les concentrations en phosphate et NOx sont toujours très faibles en Z3 (Tableau 3.IV) elles n'expliquent donc pas les valeurs plus élevées en chl*a*, production primaire et fixation de N_2 observées dans cette zone. Cela étant, les eaux provenant du sud auraient pu avoir une composition nutritive légèrement différente, avec par exemple des concentrations en dFe plus élevées et ainsi permettre une activité de fixation de CO_2 et de N_2 plus importante.

IV.2. Fixation de N_2 nocturne et diurne

La mesure des taux de fixation nocturne peut permettre d'apporter une information sur la composition de la communauté diazotrophe puisque les UCYN-B et C effectuent une fixation de N_2 exclusivement nocturne contrairement aux filamenteux tel *Trichodesmium* spp. et aux UCYN-A, effectuant une fixation de N_2 exclusivement diurne. Concernant les cyanobactéries hétérotrophes, Church et al. (2005b) ont observé l'absence d'une périodicité nycthémérale claire dans l'expression du gène *nifH* des gamma-protéobactéries dans le Pacifique Nord. De plus, Langlois et al. (2005 et 2008) ont montré, au printemps, l'absence de bactéries hétérotrophes dans l'Atlantique subtropical Nord-Est (pour une zone correspondant à la zone de la campagne STRASSE). Ainsi, nous pouvons considérer la fixation de N_2 des bactéries hétérotrophes diazotrophes comme un « bruit de fond » permanent qui n'influerait pas sur les variabilités jour/nuit observées. De plus ces organismes semblent plutôt se développer à de plus grandes profondeurs (Langlois et al. 2005) sous la couche euphotique et dans les zones de minimum d'oxygène (Hewson et al. 2007; Bonnet et al. 2013). Néanmoins, la fixation de N_2 de ces organismes reste à ce jour très peu étudiée et l'amélioration future de nos connaissances à ce sujet pourra permettre d'évaluer la contribution des organismes hétérotrophes diazotrophes à la fixation globale de N_2 que nous négligeons aujourd'hui dans les bilans globaux et régionaux.

Une différence nette de contribution de la fixation de N_2 nocturne à la fixation de N_2 journalière a été observée entre la station la plus proche des Canaries (station 3) et les autres (Figure 3.13). Cela suggère donc un potentiel changement de l'espèce dominante au sein de la communauté diazotrophe lorsque l'on s'éloigne de la côte vers l'ouest. La faible contribution de la fixation de N_2 nocturne (~14 % de la fixation de N_2 journalière) à la station 3 indiquerait une domination d'espèces fixant le N_2 de jour, telles *Trichodesmium* spp. et/ou les UCYN-A, avec la présence potentielle de bactéries diazotrophes hétérotrophes. Cependant, nous n'avons pas noté visuellement la présence de *Trichodesmium* spp. à la station 3. Les eaux de la station 3, plus froides (24.3° C, Figure 3.9B) et légèrement plus mélangées (Figure 3.8) pourraient être moins propices au développement de *Trichodesmium* spp. (Capone et al. 1997), dont la température optimale de croissance est de 27°C (Breitbarth et al. 2007), ce qui conforte notre postulat Les UCYN-A en revanche ont été observées à plusieurs reprises à de plus faibles températures que *Trichodesmium* spp. (Langlois et al. 2008; Moisander et al. 2010). La fixation de N_2 de jour, qui représente 86 % de la fixation de N_2 journalière à la station 3 (Figure 3.13), serait donc plutôt associée aux UCYN-A ou aux bactéries hétérotrophes.

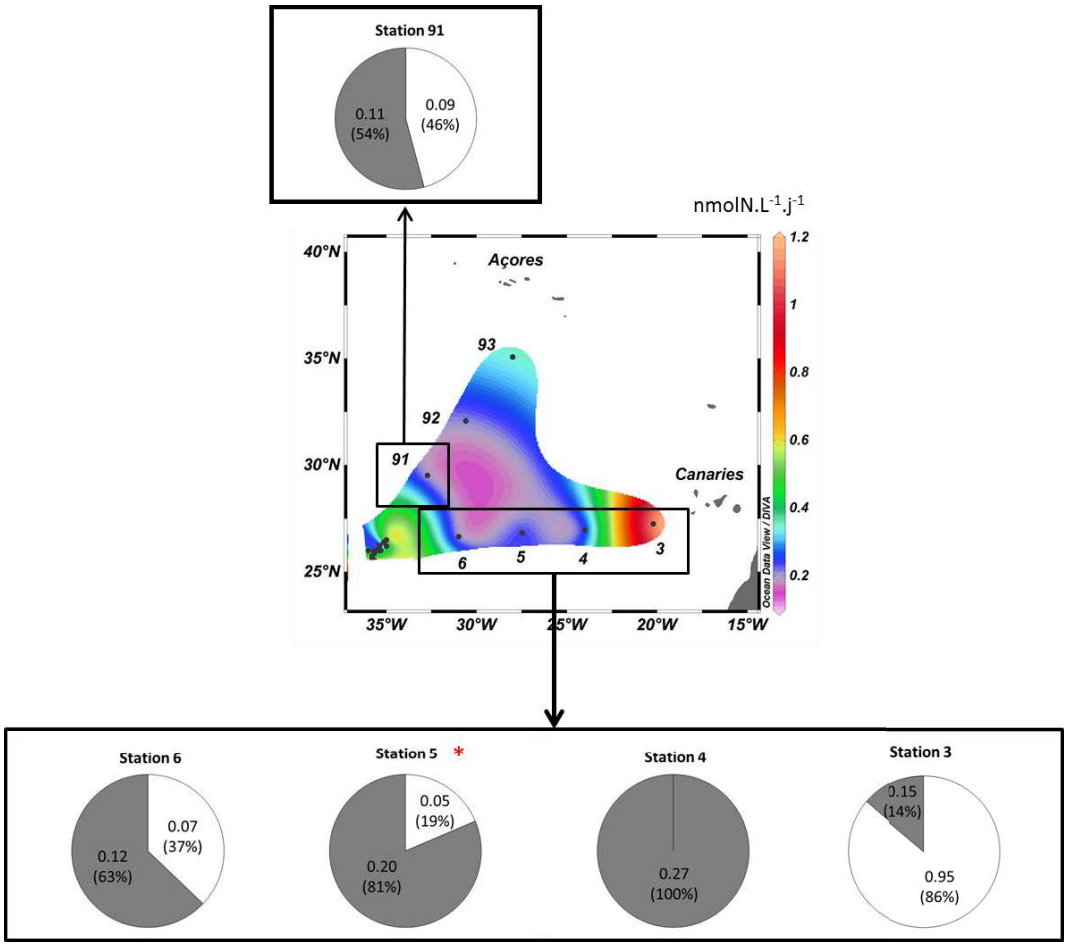


Figure 3.13. Position des stations du transect aller (stations 3 à 6) et retour (stations 91 à 93) sur fond de carte représentant les taux de fixation de N_2 à 10 m de profondeur. Les diagrammes secteurs représentent les taux de fixation en période nocturne (zone grise) et diurne (zone blanche); sur les diagrammes sont indiquées les valeurs de ces taux en nmolN.L^{-1}.j^{-1} ainsi que leur contribution à la fixation de N_2 journalière en %. L'étoile rouge correspond à l'observation de *Trichodesmium* spp. dans les prélèvements.

Un peu plus à l'ouest (station 4), la totalité de la fixation de N_2 est réalisée la nuit. Les UCYN-B et C et/ou les cyanobactéries hétérotrophes domineraient alors la communauté diazotrophe à cette station. Cela est cohérent avec le fait que les UCYN-A, photo-hétérotrophes, sont dépendantes d'une source de C organique, leur développement serait alors limité par la plus faible production primaire à cette station 4 (figure 3.10A). Puis, **à partir de la station 5 nous avons noté visuellement la présence de *Trichodesmium* spp. Cet organisme serait alors responsable, au moins en partie, de la fixation de N_2 de jour, conjointement aux UCYN-A et aux bactéries hétérotrophes potentiellement présentes.** Au printemps, Langlois et al. 2008 ont observé une domination des UCYN-A avec la présence de quelques filamenteux (comprenant les genres *Trichodesmium* et *Katagnymene*) et de gamma-protéobactéries pour une région correspondant aux stations 4 à 6 du transect aller. La contribution de la fixation de N_2 diurne à la fixation de N_2 journalière augmente, à partir de la station

5, d'est en ouest jusqu'au site d'intérêt (Figure 3.13). Lors d'une campagne effectuée en février 2007 (SST ~20°C), Agawin et al. (2013) ont relevé la présence de *Trichodesmium* spp. en faible abondance (< 12 000 trichomes.m^{-3}) pour des stations correspondant aux stations 3, 4 et 5 de notre transect aller, avec également une augmentation de l'abondance d'est en ouest (de 4 000 à 12 000 trichomes.m^{-3}). Globalement, (Benavides et al. 2013c) ont mis en évidence, en hiver, des taux de fixation de N_2 associés aux diazotrophes unicellulaires (fraction < 10 µm comprenant à la fois des cyanobactéries et des bactéries hétérotrophes) plus important dans l'Atlantique subtropical Est relativement à l'ouest du bassin,.

Pour la station 91, située plus au nord, des taux de fixation similaires ont été mesurés pour les périodes nocturne et diurne. Nous n'avons pas noté visuellement la présence de *Trichodesmium* spp. dans ces eaux. Ainsi, la contribution journalière pourrait être attribuée aux UCYN-A ou aux bactéries hétérotrophes pour cette station.

Au niveau du site d'intérêt, la contribution des fixateurs de N_2 nocturnes à la fixation de N_2 journalière est assez importante, avec 49 ± 24 % de la fixation de N_2 journalière effectuée de nuit (Figure 3.14). Nous avons observé des colonies de trichomes regroupés en «puff» et surtout en «tuft» (~ 1 à 2 colonies.L^{-1}) à toutes les stations du site d'intérêt, excepté la 12 et la 17. Cela indique donc une contribution des cyanobactéries diazotrophes filamenteuses à la fixation de N_2 diurne. En effet, les conditions de faible vent durant la campagne et les températures de surface relativement élevées sur le site (comprises entre 26.9 et 27.5 °C) semblaient optimales pour leur développement. Des variabilités spatiales à (sub)méso-échelle ont également été observées avec une contribution majoritaire de la fixation diurne de N_2 (de 60 à 78 %) aux stations situées au nord-est du site (stations 7 et 34) et au sud (stations 67 et 74), où les taux de fixation de N_2 sont les plus élevés (Figure 3.14). Les contributions les plus fortes de la fixation de N_2 nocturne ont par contre été enregistrées aux stations du centre du site (stations 17, 22, 54, 80 et 87) présentant les taux de fixation de N_2 les plus faibles (Figure 3.14). Il existe ainsi une corrélation significative entre les taux de fixation de N_2 journaliers et la contribution de la fixation de N_2 nocturne (R^2 = 0.50, p = 0.01). Par contre, aucune corrélation significative entre la production primaire et la contribution des fixateurs de N_2 nocturne n'a été mise en évidence (R^2 = 0.03 p = 0.27).

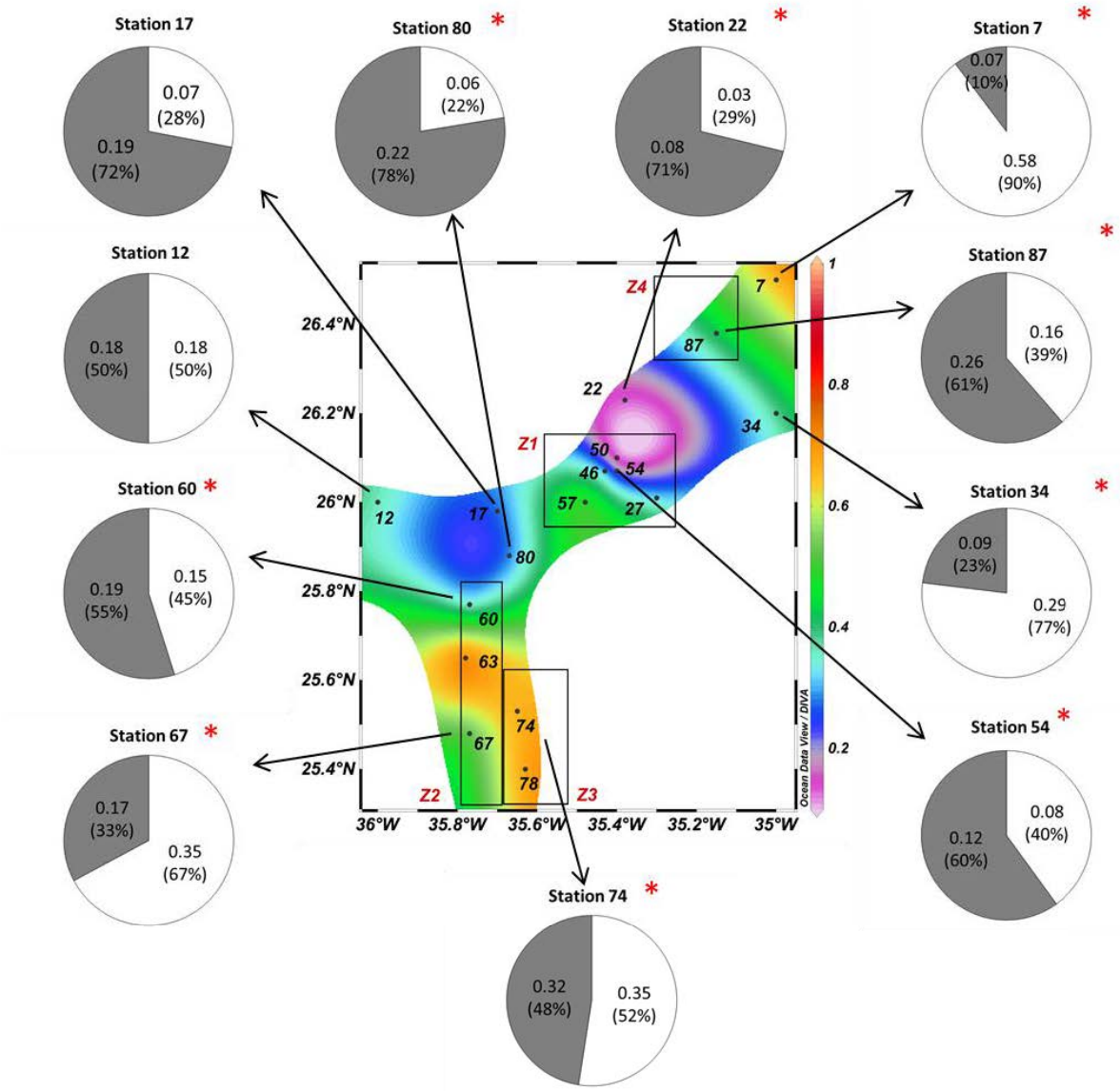


Figure 3.14. Localisation des stations du site d'intérêt avec les 4 zones (Z) encadrées sur fond de carte représentant les taux de fixation de N_2 à 10 m de profondeur. Les diagrammes secteurs représentent les taux de fixation de N_2 en période nocturne (zone grise) et diurne (zone blanche); sur les diagrammes sont indiquées les valeurs de ces taux en nmolN.L^{-1}.j^{-1} ainsi que leur contribution à la fixation de N_2 journalière. Les étoiles rouges correspondent aux stations où ont été observées visuellement des colonies de *Trichodesmium* spp. dans les prélèvements.

IV.3. Contribution de la fixation de N_2 à la production primaire

Globalement, pour toutes les stations échantillonnées, **il existe une corrélation faible mais significative entre la fixation de N_2 et la production primaire** (R^2 = 0.56, p = 0.01, Figure 3.15), **avec de plus forts taux de fixation de N_2 aux stations où la production primaire est la plus forte**[9]. Dans l'océan Atlantique tropical, de forts taux de fixation de N_2 associés à de forts taux de production primaire ont été reliés à la présence de *Trichodesmium* spp. (Mouriño-Carballido et al. 2011).

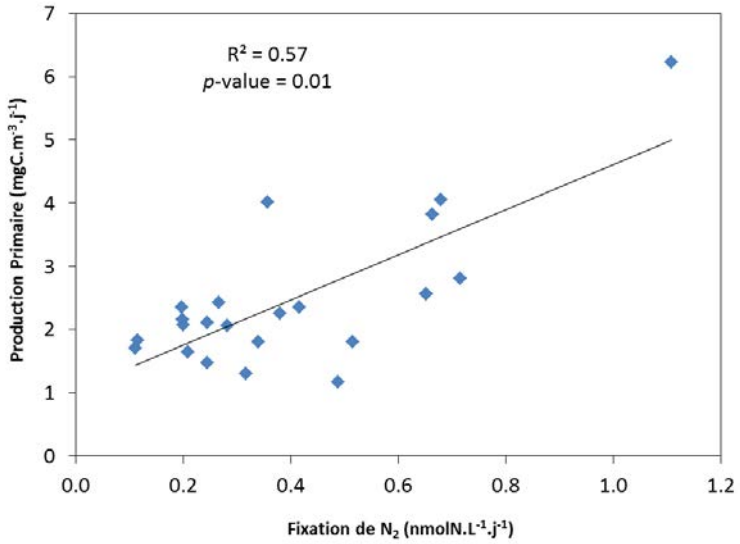


Figure 3.15. Relation entre la production primaire et la fixation de N_2 pour toutes les stations. La ligne noire représente la régression linéaire, avec son équation et coefficient de corrélation indiqués sur le graphique.

En utilisant les rapports C/N mesurés dans la matière particulaire organique, il a été déterminé une **contribution directe de la fixation de N_2 à la production primaire très faible sur toute la zone**, comprise entre 1 et 4 %. Ces estimations se trouvent dans la gamme de celles effectuées en Septembre dans la zone oligotrophe que constitue la mer Méditerranée (Rahav et al. 2013) et sont plus faibles que la contribution de *Trichodesmium* spp. à la production primaire précédemment observée dans l'Atlantique tropical (de 7.9 à 47 %, Carpenter et al. 2004). Dans notre étude, **les organismes diazotrophes photo-autotrophes, dont *Trichodesmium* spp. observé visuellement, ne sont donc pas les producteurs primaires dominants.** De plus, nous n'avons pas observé de lien entre la présence de *Trichodesmium* spp. (autotrophe) et la contribution de la fixation de N_2 à la production primaire et aucune corrélation (R^2 = 0.04, p = 0.44) entre la fixation de N_2 nocturne,

[9] Si l'on exclue la station 3 potentiellement soumise à l'influence des nutriments en provenance du plateau des Canaries et où les taux de fixation de N_2 et la production primaire sont plus élevé, on observe aussi une corrélation significative mais avec une p-value plus forte (p = 0.04 et R^2 = 0.28).

pouvant être associée aux UCYN-B et –C (autotrophes) et la contribution de la fixation de N_2 à la production primaire. **La faible corrélation que nous avons observée entre la production primaire et les taux de fixation de N_2** (Figure 3.15) **n'est donc pas uniquement due à l'autotrophie des organismes diazotrophes.**

Il a été montré par Rahav et al. (2013) que cette corrélation positive existe aussi pour des systèmes dominés par des organismes diazotrophes hétérotrophes (UCYN-A et gamma-protéobactéries) (Church et al. 2009; Halm et al. 2012), qui semblent être présents dans notre région d'étude, particulièrement aux stations 3, 6, 12, 17 ou 91 où les taux de fixation de N_2 diurne représentent de 28 à 86 % de la fixation de N_2 journalière, mais où *Trichodesmium* spp. n'a pas été observé visuellement (section IV.2.). Ces organismes hétérotrophes requièrent une source de carbone organique fournie par les producteurs primaires. Dans un système oligotrophe où la forte stratification permet le maintien de la matière dissoute dans la couche de surface peu profonde, la communauté diazotrophe serait dominée par les des organismes hétérotrophes, non limités par le N, comme précédemment observé dans le gyre Pacifique Sud (Halm et al. 2012). Ainsi, bien que nous ne disposions pas d'assez d'éléments pour déterminer la composition exacte de la communauté diazotrophe ni l'espèce diazotrophe dominante dans notre étude, **nous pouvons poser l'hypothèse que la corrélation entre la production primaire et la fixation de N_2 est, au moins en partie, le reflet de l'utilisation, par les organismes diazotrophes hétérotrophes, du DOC produit par les producteurs primaires**.

IV.5. Contribution de la fixation de N_2 à la production nouvelle

Nous avons estimé la production nouvelle à partir d'un *f*-ratio, qui correspond au rapport entre la production nouvelle et la production primaire, égal à 0.1 pour le NASTG (Varela et al. 2005) et pour la région est de l'Atlantique subtropical Nord (Benavides et al. 2013b). A partir de ces valeurs de production nouvelle et des rapports élémentaires C/N dans la matière organique particulaire, nous avons estimé la contribution directe de la fixation nette de N_2 (mesurée ici) à la production nouvelle. Cette contribution varie de 7 à 41 %, (17 ± 8 % en moyenne pour toute la campagne). Ces valeurs sont largement plus élevées que la contribution mesurée par Benavides et al. (2013b) en été (< 1 %) au Nord-Est des îles Canaries, où la production nouvelle est plus élevée (~2.02 $mgC.m^{-3}.h^{-1}$). En mesurant à la fois la fixation de N_2 nette et brute au nord des îles Canaries, Benavides et al. (2011) ont estimé que 60 % de la fixation brute de N_2 est libérée sous forme de N dissous. A partir de cette estimation, nous avons calculé que le N libéré contribue à alimenter de 10 à 61 % de la production

nouvelle (25 ± 13 % en moyenne pour toute la campagne). Cette contribution déterminée en condition de forte stratification (Figure 3.8) est considérablement plus élevée que celle déterminée par Mouriño-Carballido et al. (2011) (2 ± 2 %) pour la même région, mais au printemps, avec des eaux plus mélangées. Nous avons ainsi mis en évidence **une contribution considérable de la fixation de N_2 à la production nouvelle dans les eaux peu productives et très stratifiées de l'Atlantique subtropical Nord-Est.**

V. Elément limitant la production primaire et la fixation de N_2

V.1. Transect aller et retour

V.1.1. Transect aller : des Canaries au centre du NASTG

Aux stations 3, 4 et 5 la production primaire et la fixation de N_2 sont toutes deux significativement stimulées par l'ajout de phosphates (facteur 1.5 à 3.9), avec des réponses plus marquées de la fixation de N_2 par rapport à la production primaire aux stations 3 et 4 (Figure 3.16). **Dans cette région de l'Atlantique subtropical Nord-Est, la production primaire et la fixation de N_2 sont donc limitées par les phosphates et il y a probablement compétition entre les photo-autotrophes diazotrophes et non diazotrophes pour les ressources phosphatées.** Il a été observé une évolution spatiale de l'intensité des réponses de la production primaire et dans une moindre mesure de la fixation de N_2, avec un accroissement du facteur d'augmentation d'est en ouest, des Canaries vers le NASTG (Figure 3.16) et ce malgré des concentrations en phosphates (silicates et NOx) homogènes pour ces 3 stations (Tableau 3.IV). A la station 2 (plus proche des îles Canaries) les concentrations en phosphates étaient par contre légèrement plus élevées (0.08 µM) que sur le reste du transect (entre 0.02 et 0.05 µM) (Tableau 3.IV). Le gradient observé dans la stimulation de la production primaire suite à l'ajout de phosphates entre les îles Canaries et le NASTG (Figure 3.16) pourrait alors être la conséquence d'une **limitation en phosphates qui s'accroît d'est en ouest, du fait d'un apport en phosphates en provenance du plateau des Canaries**.

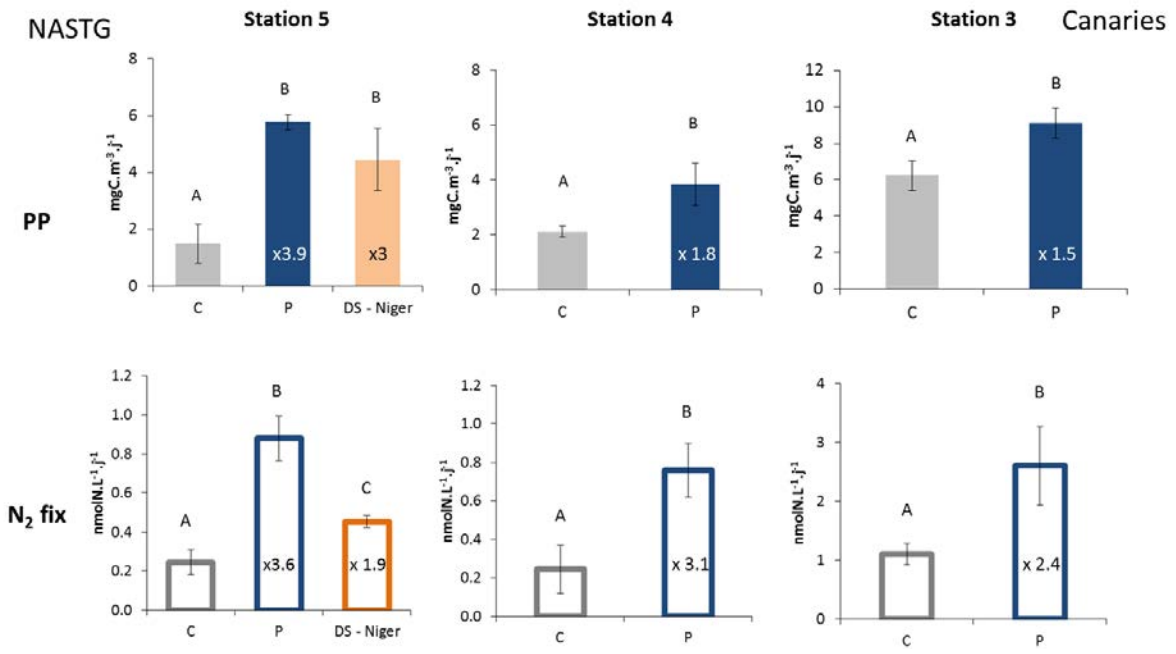


Figure 3.16. Production primaire (PP) et fixation de N_2 (N_2 fix) moyennes dans les microcosmes contrôle (C) et 48 h après ajout de phosphates (P) ou de poussières du Niger sous forme de dépôt sec (DS-Niger) pour les stations du transect aller (stations 3, 4 et 5) des îles Canaries vers le gyre subtropical de l'Atlantique nord (NASTG). Différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (p < 0.05). Le facteur d'augmentation est indiqué sur les graphiques.

En supposant un rapport molaire C/P de 106/1 (Redfield 1958), l'apport en P nécessaire pour soutenir l'augmentation observée de la production primaire dans le traitement avec ajout de phosphates est compris entre 1.4 nM (station 4) et de 3.4 nM (station 5). De même, en supposant un rapport N/P de 16/1 chez les organismes diazotrophes, l'apport en P nécessaire pour expliquer l'augmentation de fixation de N_2 dans le traitement avec ajout de phosphates varie de 0.03 nM (station 4) à 0.09 nM (station 3). Ainsi les 435 nM de phosphates ajoutés n'ont pas été consommés intégralement, ce qui n'est pas surprenant au vu des faibles concentrations de NOx (< 0.04 nM, Tableau 3.IV). **L'ajout de phosphates a ainsi probablement pu conduire le système vers une production primaire limitée par le N**. Concernant la fixation de N_2 nous ne disposons pas d'éléments permettant de déterminer le facteur devenu limitant après l'ajout de phosphates.

Les données satellites d'épaisseur optique d'aérosols mettent en évidence un évènement saharien ayant eu lieu quelques jours avant la campagne (Figure 3.17). La présence de nuages (zones grises sur la Figure 3.17) peut indiquer un dépôt humide de ces poussières sahariennes. Du fait de leur contenu élevé en fer (*e.g.* Jickells et al. 2005) cet apport aurait pu conduire à des concentrations de surface en

dFe permettant de soutenir la croissance des diazotrophes lors de notre ajout artificiel de phosphates.

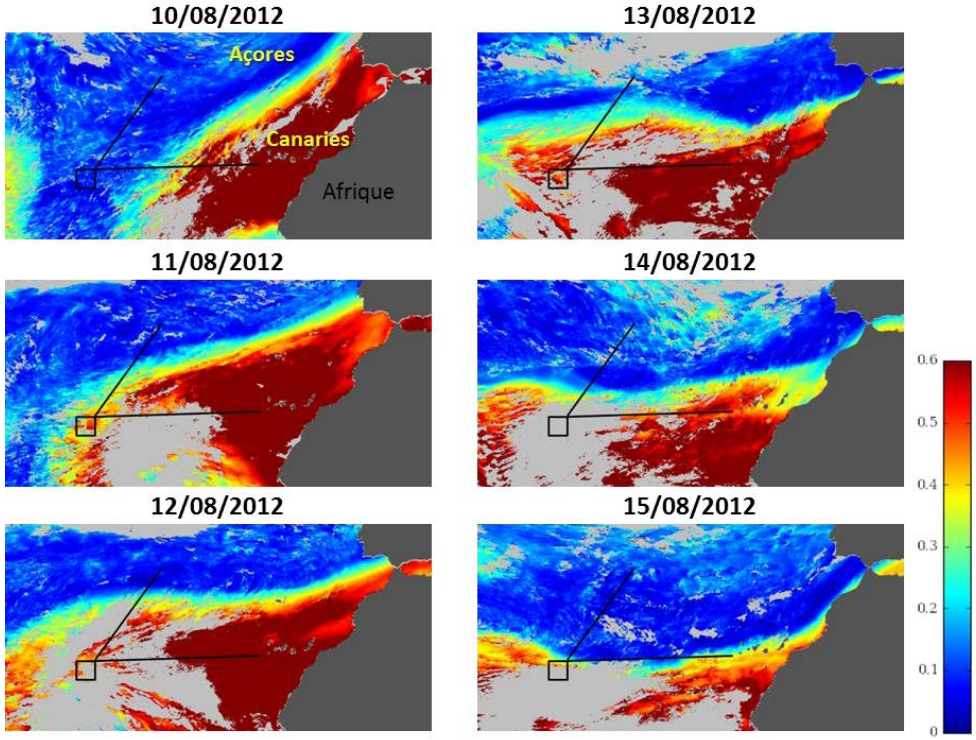


Figure 3.17. Images satellite (MSG/SEVIRI) de l'épaisseur optique des aérosols (sans dimension) entre les 10 et 15 août 2012, au-dessus de la zone de la campagne STRASSE représentée par le tracé noir sur les cartes. Les zones grises correspondent à la présence de nuages. Source : http://www.icare.univ-lille1.fr/browse/ consulté le 20-01-2014.

V.1.2. Transect retour : du centre du NASTG aux Açores

A la station du transect retour (station 91) la production primaire n'a pas été stimulée lors d'un ajout de phosphates seuls mais elle a augmenté de 1.5 à 2.2 fois lors d'ajouts de phosphates combinés à du fer ou à du fer et d'autres métaux traces (Figure 3.18). Cela pourrait traduire soit une limitation de la production primaire par le fer, soit une co-limitation fer-phosphates. L'ajout de phosphates seuls ou combinés à du fer et d'autres métaux traces a permis une légère stimulation de la fixation de N_2 (~1.7 fois, Figure 3.18). L'observation de taux de fixation de N_2 significativement identiques lors de l'ajout de fer et de métaux traces combinés aux phosphates peut indiquer l'absence d'une potentielle limitation par un métal trace (Fe ou autre) induite par l'ajout de phosphates. Mais cela peut également être le reflet d'une compétition pour le fer entre les organismes phytoplanctoniques non-diazotrophes et diazotrophes. En effet, la production primaire semble limitée ou co-limitée par

le fer à cette station. Les besoins en fer des diazotrophes étant plus élevés (Kustka et al. 2003b), ces derniers auraient été désavantagés et n'auraient pas bénéficié de l'ajout de fer une fois la limitation de la fixation de N_2 par les phosphates levée.

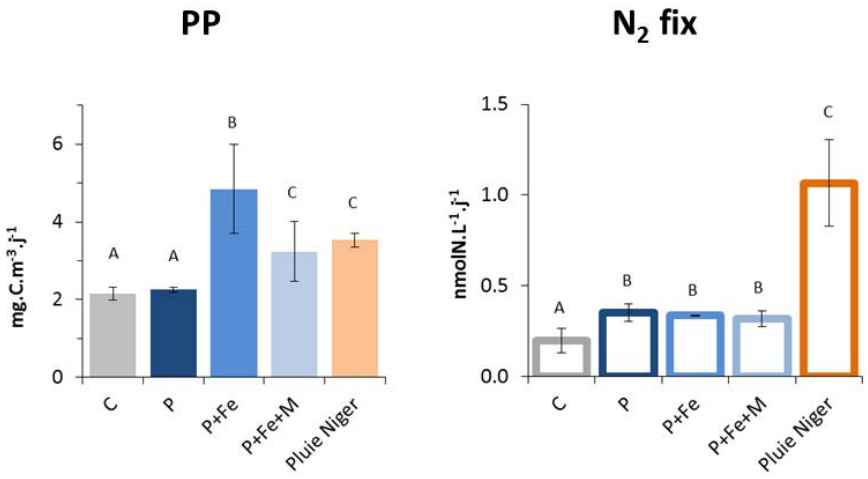


Figure 3.18. Production primaire (PP) et fixation de N_2 (N_2 fix) moyennes dans les microcosmes sans ajout (C) et 48h après ajout de nutriments inorganiques (P: phosphates, Fe : fer, M : mélange de métaux) ou de pluie saharienne (poussières du Niger) pour la station 91. Différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0.05$).

V.2. Des réponses contrastées au cœur du NASTG

Les expériences d'incubation avec ajouts d'éléments nutritifs menées dans la zone d'intérêt au cœur du NASTG ont montré des réponses contrastées à subméso-échelle.

V.2.1. Zones 1 et 4

La limitation en phosphates de la production primaire a été mise en évidence pour les stations 27, 54 et 87 des zones 1 et 4 situées au nord du front salé. En effet, à ces stations, l'ajout de phosphates seuls ou combinés aux fer et/ou métaux traces a stimulé la production primaire de 1.6 à 4.0 fois (Figure 3.19). A la station 27 (Z1), un ajout de fer seul a également stimulé la production primaire de manière équivalente à l'ajout de phosphates. Ceci pourrait être la conséquence d'une réponse d'espèces phytoplanctoniques différentes pour chacun des enrichissements, mais qui n'est pas discriminée par la mesure de production primaire globale effectuée ici. A cette même station, l'ajout d'autres métaux seuls n'a par contre eu aucune influence sur la production primaire (Figure 3.19). Aux stations 27 et 87, l'ajout de métaux traces en plus des phosphates n'a pas permis une

stimulation plus importante du processus. Il en est de même pour les ajouts de fer en plus des phosphates aux stations 54 et 87. **Il ne semble donc pas y avoir de limitation de la production primaire par les métaux traces dans les zones 1 et 4** et pas de limitation par le fer aux stations 54 et 87**.**

La réponse en termes de fixation de N_2 lors de l'ajout de phosphates seuls aux stations 27 et 87 montre une limitation de ce processus par les phosphates. A la station 27, de même que pour la production primaire, il a été observé une stimulation de la fixation de N_2 lors d'un ajout de fer seul et aucune augmentation lors d'un ajout de métaux seuls (Figure 3.19). **La stimulation d'organismes diazotrophes différents, ayant des besoins et des stratégies d'acquisition différentes au regard du Fe et des phosphates** pourrait expliquer cette réponse observée. Nous n'avons aucune information concernant la composition de la communauté diazotrophe à cette station car nous n'avons pas effectué de mesures de fixation de N_2 nocturne. Néanmoins, la contribution relativement importante des fixateurs de N_2 nocturnes dans toute la zone (Figure 3.14) et l'observation visuelle de *Trichodesmium* spp. à cette station 27 (~1 colonie par L sous forme de « tuft ») montrent la présence de différents types d'organismes diazotrophes et ainsi appuient l'hypothèse d'une réponse spécifique selon le type d'organisme considéré. Pour la station 54 en revanche, la fixation de N_2 n'est ni contrôlée par la disponibilité en phosphates, ni par celle du fer, l'ajout de ces nutriments n'ayant entraîné aucune réponse (Figure 3.19). La proximité avec la station 27 conduit alors à s'interroger sur une variabilité à subméso-échelle des facteurs de contrôle de la fixation de N_2 pouvant être due à une variation de la composition de la communauté diazotrophe entre les stations. Enfin, à la station 87 (Z4), l'ajout de métaux combinés aux phosphates et au fer a mené à une augmentation significativement plus forte de la fixation de N_2 que celle observée après les ajouts de phosphates et de phosphates + fer. **La stimulation de la fixation de N_2 par l'ajout de phosphate aurait conduit le système vers une limitation de la fixation de N_2 par un ou plusieurs métaux traces autres que le fer**. Cela n'est par contre pas le cas à la station 27 où l'apport de métaux associés au fer au aux phosphates a conduit à une réponse similaire à l'apport de phosphates seuls.

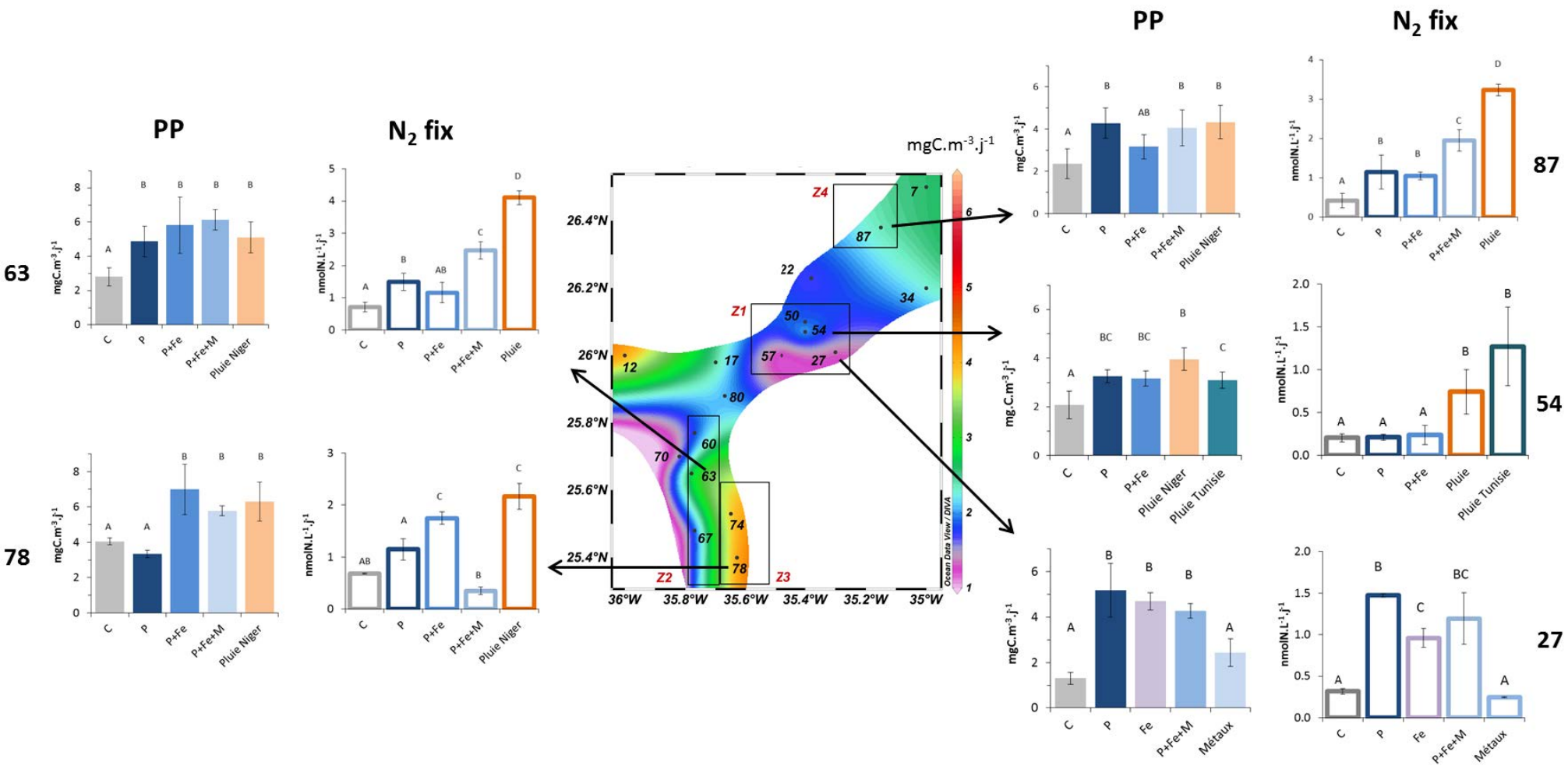


Figure 3.19. Production primaire (PP) et fixation de N_2 (N_2 fix) moyennes dans les microcosmes sans ajout (C) et 48h après ajout de nutriments inorganiques (P : phosphates Fe : dFe, M : mélange de métaux) ou de pluie saharienne pour les 4 zones du site d'intérêt (stations 27, 54, 63, 78 et 87) ; les différentes stations sont situées sur une carte présentant la production primaire à 10 m de profondeur (en $mgC.m^{-3}.j^{-1}$). Différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0.05$).

V.2.2. Zones 2 et 3

Les facteurs de contrôle de la production primaire aux stations des Z2 (station 63) et Z3 (station 78), situées au sud du front salé sont différents. A la station 63 la production primaire a été stimulée de la même façon (~2 fois) suite à l'ajout de phosphates seuls ou combinés avec du fer ou du fer et des métaux traces (Figure 3.19). **C'est donc la disponibilité en phosphates qui limite la production primaire à la station 63.** En revanche, pour la station 78 (Z3) correspondant aux eaux advectés du sud (Figure 3.12) et présentant une productivité plus élevée (Figure 3.11B), l'ajout de phosphates seuls n'a pas permis de stimuler la production primaire alors que l'ajout combiné de phosphates et de fer a entraîné une intensification d'1.7 fois. Ces réponses suggèrent **soit une limitation par le fer, soit une co-limitation fer-phosphates pour la station 78.** Enfin, il n'y a pas eu d'influence des métaux traces autres que le fer sur la production primaire à cette station (Figure 3.19).

Les limitations nutritives de la fixation de N_2 aux stations 63 et 78 sont en premier lieu les mêmes que celles de la production primaire (limitation en phosphates pour la station 63 et phosphates ou co-limitation fer phosphates pour la station 78). Par contre, **à la station 63, la levée de la limitation en phosphates lors de l'ajout de phosphates a conduit au même phénomène que celui observé à la station 87 (Z4), à savoir l'apparition d'une limitation par un ou plusieurs métaux traces** (Figure 3.19). Concernant les taux de fixation de N_2 significativement identiques à ceux du traitement contrôle lors de l'ajout de phosphates + fer + métaux traces à la station 78, l'explication la plus probable serait un oubli ou une erreur lors de l'ajout de phosphates dans ces traitements.

Ces variabilités spatiales du facteur limitant de la production primaire ou de la fixation de N_2 peuvent être le reflet de communautés phytoplanctoniques ou de concentrations en micronutriments différentes entre les eaux du sud et du tourbillon présent au sud-ouest du site (station 78) et dans les eaux du filament salé (station 63). En effet, la dynamique de ce type de circulation de surface à méso-échelle génère une hétérogénéité des concentrations en nutriments et peut ainsi jouer un rôle important dans la distribution des organismes phytoplanctoniques (Levy et Martin 2013).

VI. Impact des apports atmosphériques désertiques sur la production primaire et la fixation de N_2

VI.1. Composition des pluies simulées et apports résultants en macro et micronutriments dans les microcosmes

VI.1.1. Composition chimique des pluies simulées

Les concentrations dissoutes en cobalt (Co), cuivre (Cu), molybdène (Mo) et nickel (Ni) sont indétectables dans les pluies filtrées, quelle que soit les fractions fines de sols utilisées pour leur préparation (Niger non évapo-condensées ou Tunisie évapo-condensées). La composition des pluies préparées à partir de la fraction fine de sols du Niger (charge particulaire de 100 $mg.L^{-1}$) est très reproductible entre les 5 expériences réalisées durant la campagne (Tableau 3.V). Le pourcentage de dissolution des éléments contenus dans les poussières a été calculé pour chacune des pluies selon les équations 2.2 et 2.3 du chapitre 2. Le pourcentage de dissolution du fer mesuré ici (0.03 ± 0.01 %, Tableau 3.V) est plus faible que celui obtenu pour la pluie artificielle préparée à partir des mêmes poussières que celles utilisées dans les expériences du chapitre 2 (0.10 ± 0.02 %) avec une charge particulaire de 250 $mg.L^{-1}$. Ceci peut être attribué à la faible proportion de lumière naturelle dans le laboratoire où ont été préparées les pluies à bord (Shi et al. 2012).

Tableau 3.V. Concentrations en éléments dissous (dFe, dmétaux, P et NO_3^-) dans les pluies filtrées préparées à partir de la fraction fine de sols du Niger non évapo-condensée (Niger - non EC) ou de la fraction fine de sols de Tunisie évapo-condensée (Tunisie – EC). Sur les lignes bleues sont indiqués les pourcentages de dissolution de ces éléments dans chacune des 2 pluies, calculées à partir des données du Tableau 3.III.

Station	Pluie	dFe (nM)	dMn (nM)	P (nM)	NO_3^- (µM)	dV (nM)	dZn (nM)	Ox (µM)
54	Niger - non EC	24.7 (2.8)	132.4 (1.8)	37.4 (7.1)	<0.32	< 3.6	8.7 (0.1)	0.83
63	Niger – non EC	19.4 (1.2)	136.3 (3.0)	53.2 (5.0)	<0.32	< 3.6	nd	0.91
78	Niger –non EC	11.7 (0.6)	114.2 (2.4)	31.6 (0.7)	<0.32	< 3.6	5.7 (0.2)	0.89
87	Niger – non EC	14.1 (0.3)	127.9 (3.7)	32.6 (2.0)	<0.32	< 3.6	2.7 (0.2)	0.98
91	Niger – non EC	17.4 (0.8)	135.5 (0.8)	38.0 (2.2)	<0.32	< 3.6	nd	0.78
Moyenne pluie Niger – non EC		**16.9 (4.5)**	**129.2 (8.6)**	**38.6 (8.7)**	**<0.32**	**< 3.6**	**5.7 (2.6)**	**0.88**
54	**Tunisie - EC**	**18.6 (1.4)**	**12.1 (0.3)**	**317.6 (4.1)**	**74.11**	**5.2 (1.5)**	**5.6 (0.3)**	**4.2**
% dissolution moyen pluies Niger non - EC		0.03 (0.01)	11.7 (0.6)	3.9 (0.8)	<0.01	nd	nd	
% dissolution moyen pluies Tunisie - EC		0.04 (0.00)	1.8 (0.1)	21.1 (0.3)	87.2	nd	nd	

VI.1.2. 'pluie Niger' non évapo-condensée vs 'pluie Tunisie' évapo-condensée

Les deux types de fractions de sols libèrent des quantités équivalentes de dFe et de dZn (Tableau 3.V). Par contre, les poussières évapo-condensées de Tunisie libèrent une quantité de P plus importante que les poussières non évapo-condensées du Niger. Le pourcentage de dissolution moyen du P des poussières tunisiennes est équivalent à celui précédemment mesuré par K. Desboeufs : 27.3 ± 3.7 %, pour une charge particulaire de 30 $mg.L^{-1}$ (Desboeufs, comm. pers.). De grandes différences de concentrations en nitrates et oxalate sont également observées du fait de l'utilisation de HNO_3 et d'oxalate dans les cycles d'évapo-condensation (Guieu et al. 2010). La forte libération de nitrates par les poussières tunisiennes évapo-condensées a également été montrée par Ridame et al. (2014). Seule la fraction fine de sols de Tunisie évapo-condensée libère des quantités de dV quantifiables (Tableau 3.V), mais son contenu en V n'étant pas connue nous n'avons pas pu calculer de pourcentage de dissolution pour cet élément. Enfin, les poussières non-évapo-condensées nigériennes représentent une source plus importante de dMn que les poussières tunisiennes évapo-condensées.

VI.1.3. Apports dans les microcosmes

Ces différences de composition entre les 'pluies Niger' et la 'pluie Tunisie' entraînent alors des apports différents dans les microcosmes où ont été ajoutées ces pluies (respectivement notés '+ pluie Niger' et '+ pluie Tunisie') (Tableau 3.VI).

Tableau 3.VI. Concentrations (en nM) en éléments dissous ajoutés dans les microcosmes via les ajouts de pluies préparées à partir de la fraction fine de sols du Niger non évapo-condensée (Niger - non EC) ou de la fraction fine de sols de Tunisie évapo-condensée (Tunisie – EC) et des ajouts de phosphates, fer ou du mélange de métaux (ligne grisée). Pour les pluies Niger non EC les valeurs sont données pour chacune des 5 stations où ont été effectués ces ajouts, puis en moyenne pour les 5 stations.

Station	Pluie	dFe	dMn	dV	dZn	P	NO_3^-	Ox
54	Niger - non EC	0.48 (0.06)	2.59 (0.04)	<0.07*	0.17 (0.00)	0.73 (0.14)	<6.3*	16.2
63	Niger – non EC	0.38 (0.02)	2.67 (0.06)	<0.07*	nd	1.04 (0.10)	<6.3*	17.9
78	Niger –non EC	0.23 (0.01)	2.23 (0.05)	<0.07*	0.11 (0.00)	0.62 (0.01)	<6.3*	17.4
87	Niger – non EC	0.28 (0.01)	2.50 (0.07)	<0.07*	0.05 (0.00)	0.64 (0.04)	<6.3*	19.1
91	Niger – non EC	0.34 (0.02)	2.65 (0.02)	<0.07*	nd	0.74 (0.04)	<6.3*	15.2
Moyenne pluie Niger –non EC		**0.33 (0.09)**	**2.53 (0.17)**	**<0.07***	**0.11 (0.05)**	**0.75 (0.17)**	**< 6.3***	**17.2 (1.5)**
54	Tunisie –EC	0.36 (0.03)	0.24 (0.01)	0.12 (0.02)	0.11 (0.01)	6.21 (0.08)	1450	82.3
Ajouts P, dFe et mélange de métaux		2	5	na	2	435	na	na

*déterminées à partir des limites de détections en ICP-AES et chromatographie ionique et de l'ajout de 2 % de pluie ans les microcosmes
na : non ajouté

Les apports en nitrate, P et oxalate sont plus importants dans les microcosmes enrichis avec la 'pluie Tunisie' alors que les apports en Mn sont plus importants pour les 'pluies Niger'. Les deux types de pluie ont par contre apporté des quantités de dFe et de dZn similaires (Tableau 3.VI). Enfin toutes ces concentrations sont inférieures à celles dues à l'ajout de fer, de phosphates et de métaux.

VI.2. Impact d'un dépôt sec sur la production primaire et la fixation de N_2

A la station 5, l'ajout de poussières du Niger sous forme de dépôt sec a permis de stimuler la production primaire (x 3) et la fixation de N_2 (x 1.9) (Figure 3.16), ce qui confirme que **les poussières sahariennes sont une source de P qui peut lever la limitation en phosphates de la production primaire et de la fixation de N_2**. Les poussières utilisées (du Niger) contenant 0.03 % de P (Paris et al. 2011) et en admettant un pourcentage de dissolution du P de 12 % pour une charge particulaire de 2.36 $mg.L^{-1}$ (valeur obtenue par Ridame et Guieu (2002) pour la dissolution de 5 mgL^{-1} de poussières avec des temps de contact entre 6 h et 1 semaine), on peut estimer l'apport en P suite à l'ajout de poussière à 2.74 nM. En supposant un rapport molaire C/P de 106/1 (Redfield 1958), l'apport en P nécessaire pour soutenir l'augmentation observée de la production primaire est de 2.33 nM dans le traitement + dépôt sec. De même, en supposant un rapport N/P de 16/1 chez les organismes diazotrophes, l'apport de P nécessaire pour expliquer l'augmentation de la fixation de N_2 est de 0.013 nM. La consommation théorique de P dans les microcosmes '+ dépôt sec' est donc proche de la concentration apportée par les poussières. L'ajout de P *via* le dépôt sec a ainsi levé la limitation en phosphates de la production primaire et a probablement conduit le système vers une limitation en N du fait des très faibles concentrations ambiantes en NOx (Tableau 3.IV). Cet apport *via* le dépôt sec a bénéficié à la fois aux organismes phytoplanctoniques non diazotrophes et diazotrophes, en compétition vis-à-vis de cette ressource nutritive.

VI.3. Impact d'un dépôt humide sur la production primaire et la fixation de N_2

Pour les stations où nous avons mis en évidence une limitation de la production primaire par les phosphates (54, 63 et 87, Figure 3.19), nous avons observé une stimulation de la production primaire de la même intensité dans les traitements '+ pluie Niger' et '+ pluie Tunisie' (pour la station 54) que lors de l'ajout de 435 nM de phosphates (Figure 3.19). Les concentrations de P

apportées par les pluies Niger (~0.75 nM) sont inférieures aux concentrations théoriquement nécessaires à l'augmentation de la production primaire obtenues en se basant sur un rapport C/P de 106/1 (Redfield 1958), soit entre ~1.5 et 1.8 nM de P. Néanmoins, cette valeur du rapport C/P du phytoplancton n'est pas strictement égale à la valeur théorique de 106/1 et les observations montrent une variation de 35/1 à 221/1 dans la matière particulaire marine (Geider et La Roche 2002). L'observation d'une augmentation identique de la production primaire suite aux ajouts de pluies et de phosphates montre ainsi que **les 'pluies Niger' ont apporté suffisamment de P pour lever la limitation en phosphates de la production primaire, de même que la 'pluie Tunisie'** qui apporte 6.21 nM de P. L'observation d'une stimulation identique dans les traitement '+ phosphates' et '+ pluie Tunisie' malgré la différence importante de concentration en P apportée (Tableau 3.VI) indique que suite à l'ajout de 'pluie Tunisie', de la même façon que dans le traitement '+ phosphates', **une fois la limitation en phosphates levée un autre élément est devenu limitant**. Il pourrait s'agir du N compte tenu des faibles concentrations en NOx mesurées à ces stations (Tableau IV). Mais cette hypothèse reste discutable. En effet, la pluie Tunisie constitue une source significative de nitrates (1.45 µM, Tableau 3.VI) et malgré cet apport en plus de celui de P, cette pluie n'a pas induit une réponse plus marquée de la production primaire. Un autre facteur est donc entré en jeu, mais les données dont nous disposons ne permettent pas de conclure sur sa nature. A la station 78, où la production primaire est limitée par le fer ou co-limitée par le fer et les phosphates, il a été observé une stimulation de la même intensité lors d'ajouts de phosphates et fer combinés ou de pluie Niger (Figure 3.19). Cela indique que malgré un apport moins important de fer *via* la pluie (0.23 ± 0.01 nM) que lors de l'ajout artificiel (2 nM), **la pluie préparée à partir des poussières du Niger est une source de fer biodisponible, apporté en quantité suffisante pour lever la limitation en fer ou la co-limitation fer-phosphates de la production primaire.**

Une stimulation de la fixation de N_2 suite aux ajouts de 'pluies Niger' ou 'pluie Tunisie' a été observée pour toutes les stations du centre du NASTG. Ces pluies ont donc permis de lever la limitation en phosphate de la fixation de N_2 aux stations 63 et 87. De plus, la stimulation de la fixation de N_2 à ces stations suivant les ajouts de pluies est significativement plus forte que celle due aux ajouts combinés de phosphates et de métaux traces (Figure 3.19) et ce malgré des concentrations en métaux traces apportées par la pluie plus faibles que lors des ajouts artificiels (Tableau 3.VI). Cela suggère alors une **meilleure biodisponibilité des métaux apportés par la pluie. Ce phénomène peut être attribuée à l'apport d'~17 nM d'oxalate** *via* la pluie Niger (Tableau 3.VI). En effet, ce composé présent naturellement dans les pluies (*e.g.* Hegg et al. 2002) peut former des complexes avec le fer (voir chapitre 2) ou le Zn par exemple (Stanley et Byrne

1990). **A la station 78, de même que pour la production primaire, l'ajout de pluie Niger a permis de lever la limitation en fer ou la co-limitation fer-phosphates de la fixation de N_2 (Figure 3.19).**

La réponse observée à la station 54 uniquement lors d'un ajout de pluie simulée (Figure 3.19), pourrait révéler la présence, dans les pluies, d'un métal autre que le fer exerçant initialement un contrôle sur les taux de fixation de N_2. Une autre hypothèse, plus probable au vue des faibles concentrations en phosphates, serait une **co-limitation par les phosphates et un autre métal trace**. Cette réponse à un ajout de pluie simulée est la même que celle observée en Méditerranée centrale par Ridame et al. 2011.

L'ajout d'une pluie simulée préparée à partir de poussières évapo-condensées ('Pluie Tunisie') montre que **les nitrates apportés via cette pluie (1.5 µM, Tableau 3.VI) n'inhibent pas la fixation de N_2.** Cela a précédemment été observé lors d'expériences en mésocosmes en Méditerranée (Ridame et al. 2013). Holl et Montoya (2005) ont montré que des concentrations en nitrates à partir de 0.5 µM pouvaient réduire de 50 % la fixation de N_2 chez *T. erythraeum* en culture, alors que Dekaezemacker et Bonnet (2011) ont mis en évidence l'absence de cette inhibition chez *C. watsonii.* L'augmentation des taux de fixation de N_2 à la station 54 lors de l'ajout de la pluie simulée préparée à l'aide de poussières évapo-condensées aurait alors stimulé la croissance des UCYN, telle *C. watsonii*, et non celle des cyanobactéries diazotrophes filamenteuses telle *T. erythraeum*.

VI.4. Les métaux trace comme facteurs de contrôle de la production primaire et de la fixation de N_2

Il a été montré récemment que le nickel (Ni) peut limiter la fixation de N_2 chez *T. erythraeum* (Ho 2013). **L'ajout de ~2 nM de Ni via le mélange de métaux pourrait alors être responsable de l'augmentation des taux de fixation de N_2 observés** à la station 87. Le zinc (Zn) a été suspecté comme élément pouvant co-limiter la croissance phytoplanctonique dans l'Atlantique Nord-Ouest, du fait de ses très faibles concentrations (Wu et al. 2000; Shaked et al. 2006). En Atlantique Nord-Est, Ellwood et Van Den Berg (2000) ont également mesuré de faibles concentrations de surface en Zn dissous (de 0.3 à 2 nM). Ce métal est contenu dans l'anhydrase carbonique, une enzyme impliquée dans le transport et la fixation de CO_2 à l'intérieur de la cellule (Badger et Price 1994) mais également dans l'alcaline phosphatase, une enzyme permettant l'acquisition de P organique (Sunda 2012). Le rôle du Zn dans le métabolisme des

organismes diazotrophes est à ce jour inconnu, mais **la réponse obtenue à la station 87 suite à l'apport de 2 nM de Zn *via* le mélange de métaux laisse à penser qu'il pourrait être un facteur de contrôle de la fixation de N_2 en Atlantique subtropical Nord-Est**. Les 'pluies Niger' utilisées ont apporté des concentrations en manganèse de 2.53 ± 0.17 nM (Tableau 3.VI). **Le Mn** est un métal entrant en jeu dans la composition du PSII (Sunda, 2012), il **peut donc être suspecté comme facteur contrôlant le développement du phytoplancton photo-autotrophe.** Le cobalt (Co) peut également jouer un rôle important chez le phytoplancton. En effet, il entre dans la composition de la vitamine B12 (Raux et al. 2000) nécessaire au fonctionnement de plusieurs enzymes impliquées dans des processus métaboliques majeurs (*e.g.* Ludwig et Matthews 1997; Banerjee et Ragsdale 2003; Croft et al. 2006). Récemment, Bonnet et al. (2010) ont montré que *C. watsonii* est un producteur de vitamine B12 important à l'échelle des communautés phytoplanctoniques et que cette production n'est pas inhibée en l'absence de nitrates. Cela pourrait entraîner des besoins en Co importants chez cette UCYN et faire de ce métal un facteur de contrôle de la croissance et l'activité de la fixation océanique de N_2. **L'ajout de 0.5 nM de Co *via* le mélange de métaux pourrait alors être responsable de la stimulation de la fixation de N_2 à la station 78**. Enfin, une limitation de la fixation de N_2 par le molybdate (Mo), qui entre dans la composition de la nitrogénase, est peu probable du fait de ses concentrations relativement fortes dans l'océan (Collier 1985). A ce jour nous pouvons seulement poser des hypothèses, car nous n'avons pas de mesures de concentrations de ces métaux dans la couche de surface.

VII. Conclusion

Nos résultats ont donc permis de mettre en évidence des variations (i) à méso-échelle de la production primaire et des taux de fixation de N_2 entre le bord est du bassin Atlantique subtropical Nord (îles des Canaries) et le NASTG et (ii) à subméso-échelle au sein du NASTG. Les contributions relatives de la fixation de N_2 diurne et nocturne présentaient également des variations à (sub)méso-échelle, ce qui pourrait être le fait de changements d'organisme dominant la communauté diazotrophe, notamment entre les Canaries et le NASTG.

Nous avons observé une très faible contribution de la fixation de N_2 à la production primaire mais mis en évidence une contribution considérable de la fixation de N_2 à la production nouvelle dans cette région oligotrophe en conditions forte de stratification. De plus, nos résultats pourraient indiquer la présence de bactéries diazotrophes hétérotrophes, ce qui n'a jamais été rapporté pour cette région. Il serait alors intéressant de déterminer leur abondance et leur activité.

Au vue des réponses obtenues lors des expériences en microcosmes avec enrichissement en éléments nutritifs, les limitations de la fixation de N_2 et de la production primaire présentent un schéma de répartition spatiale complexe, avec des variations à subméso-échelle. De plus, les expériences d'ajouts de métaux traces, jamais réalisées dans cette région, ont permis de révéler l'existence de facteurs de contrôle de la fixation de N_2 autre que le fer et les phosphates en zone oligotrophe. Les ajouts de pluies sahariennes et le dépôt sec simulé ont entraîné une stimulation significative de la production primaire à toutes les stations. Cela signifie que les apports sahariens ayant lieu au niveau du NASTG permettent de lever les limitations en phosphates ou fer de la production primaire dans cette région. Nous avons également montré l'impact d'apports sahariens de types humide et sec sur les activités de fixation de N_2 dans l'océan Atlantique subtropical nord, déjà observé dans cette région mais seulement pour une station explorée par Marañon et al. (2010). Cela permet alors de compléter les connaissances actuelles sur le contrôle de la fixation de N_2 en zone oligotrophe soumise à des apports atmosphériques importants. De plus cette étude a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le rôle pouvant être exercé par les métaux traces sur l'activité phytoplanctonique et plus particulièrement celle des diazotrophes.

Conclusions

et

perspectives

Synthèse des principaux résultats

La fixation biologique de N_2 est un processus présentant un intérêt biogéochimique majeur dans les cycles du C et du N. Elle joue un rôle primordial dans les eaux oligotrophes au sein desquelles elle constitue une source d'azote considérable pour le reste de la communauté phytoplanctonique non diazotrophe. La compréhension de ce processus implique de connaître ses facteurs de contrôle ; or il subsiste actuellement un manque de connaissances à ce sujet. Ce travail de thèse s'est donc articulé autour de cette problématique selon une approche expérimentale (en laboratoire et sur le terrain). Le rôle du fer dans le contrôle de la fixation de N_2 a été un sujet d'intérêt pour une grande partie de cette thèse puisqu'il est largement suspecté comme élément limitant la fixation de N_2. De plus, si un grand nombre d'études concernant les limitations en fer ont été conduites pour la cyanobactérie filamenteuse *Trichodesmium* spp., la limitation en fer chez les cyanobactéries diazotrophes unicellulaires (UCYN) récemment découvertes n'avait jamais été quantifiée. Ainsi, la première problématique à laquelle cette thèse a apporté des éléments de réponse est :

Quelle est la réponse physiologique d'une UCYN océanique à la limitation en fer ?

Afin d'élucider cette question, l'impact de la limitation en fer sur la croissance et l'activité de l'UCYN-B *C. watsonii* a été quantifié pour la première fois (Chapitre 1) grâce à des expérimentations sur des cultures monospécifiques. Cette approche s'est avérée nécessaire puisqu'elle permet de s'affranchir de la compétition potentielle pour la ressource avec un autre organisme ainsi que du schéma complexe d'interactions entre plusieurs facteurs limitants. Il a été mis en évidence un impact de la limitation en fer sur la croissance, la composition (contenus cellulaires en C, N et chl*a*) et les activités de fixation du N_2 et du CO_2 de *C. watsonii*. La réduction du volume cellulaire a mis en lumière une adaptation de cette UCYN à la limitation en fer avec deux réponses distinctes en fonction du degré de limitation. (i) En condition de limitation modérée en fer, grâce à la réduction de leur taille, les cellules peuvent maintenir un taux de croissance et des taux de fixation de N_2 et de CO_2 et des contenus en C, N et chl*a* par unité de volume maximums . (ii) En condition de limitation sévère en fer, cette diminution de la taille des cellules ne semble plus possible et la réponse physiologique observée est une diminution progressive des contenus et des taux de fixation de N_2 et de CO_2 par unité de volume,

accompagnée de taux de croissance plus faibles. Ce chapitre de thèse et l'article qui lui est associé (Jacq et al. 2014, Annexe 1) sont donc une contribution à la connaissance actuelle des UCYN. Enfin, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence le fait que la cyanobactérie diazotrophe filamenteuse *T. erythraeum* est moins adaptée que l'UCYN *C. watsonii* à des environnements pauvres en fer. Il est donc essentiel de différencier les différents types de diazotrophes lorsque l'on s'intéresse aux facteurs de contrôle de la fixation de N_2.

Les poussières sahariennes apportées à l'océan par voie atmosphérique constituent une source majeure de fer pour les eaux de surface des régions (sub)tropicales de l'Atlantique Nord, habitat naturel des UCYN du genre *Crocosphaera* (Langlois et al. 2008; Moisander et al. 2010). Une fois l'impact de la limitation en fer sur la physiologie de *C. watsonii* mis en évidence, il nous est alors paru pertinent de s'intéresser à l'impact d'un apport atmosphérique de fer sur la croissance et l'activité d'une UCYN limitée en fer. Cela a ainsi conduit à apporter des éléments de réponse à cette deuxième problématique :

Le fer libéré par les poussières sahariennes est-il biodisponible pour *C. watsonii* et quel impact peut-il avoir sur l'abondance et la physiologie de cette UCYN limitée en fer ?

Afin de traiter cette question, une expérience en culture a été mise en place dans le but de déterminer les effets de l'apport de fer dissous libéré par une pluie saharienne artificielle sur la croissance, la taille, les activités de fixation de N_2 et de CO_2 ainsi que sur la composition (C, N et Chl*a*) de *C. watsonii* acclimatée à la limitation en fer (chapitre 2). L'originalité supplémentaire de cette expérience a été l'utilisation dans le milieu de culture artificiel d'un ligand du fer présent dans le milieu naturel et apporté par la pluie saharienne : l'oxalate. L'apport saharien a entraîné une stimulation du taux de croissance et des taux de fixation de N_2 et de CO_2 de *C. watsonii* limitée en fer, ce qui traduit un apport de fer biodisponible assimilable par les cellules. *C. watsonii* a donc rapidement mis à profit cet apport ponctuel de fer dissous pour la réalisation des processus métaboliques. Ces résultats contribuent à la compréhension des interactions entre le fer atmosphérique et le réseau trophique océanique et plus particulièrement les UCYN, afin de mieux définir le contrôle exercé par les apports atmosphériques de fer désertique sur le processus de fixation de N_2.

Enfin le dernier volet de cette thèse a permis d'étudier les facteurs de contrôle de la fixation de N_2 en milieu naturel, dans une zone oligotrophe soumise à d'importants apports atmosphériques de poussières désertiques mais dans laquelle les taux de fixation de N_2 sont faibles. Des travaux expérimentaux ont ainsi été menés durant la campagne STRASSE en Atlantique subtropical Nord, dans le but de répondre à plusieurs questions :

Quelle est la variabilité spatiale de la production primaire et de la fixation de N_2 en Atlantique subtropical Nord ? Quelle est la contribution de la fixation de N_2 à la production nouvelle?

Quelle est la contribution de la fixation nocturne de N_2 à la fixation journalière de N_2 dans cette région?

Quels sont les éléments limitants la fixation de N_2 et la production primaire ? Quel est l'impact d'un dépôt atmosphérique d'origine saharienne sur la production primaire et la fixation de N_2?

Les expériences en microcosmes présentées dans le chapitre 3 ont permis de mettre en évidence un schéma de distribution spatiale de la production primaire et des taux de fixation de N_2 complexe avec des variations significatives à méso-échelle. Il en ressort également une faible contribution de la fixation de N_2 à la production primaire dans toute la région explorée mais une contribution considérable de la fixation de N_2 à la production nouvelle dans ces eaux peu productives et très stratifiées. Nous avons observé une contribution variable des taux de fixation de N_2 nocturnes à la fixation journalière de N_2 d'est en ouest ce qui traduit un changement de l'espèce dominante au sein de la communauté diazotrophe. Tout d'abord, nous avons mis en évidence une diminution brusque de la contribution des organismes fixant le N_2 uniquement la journée, tel *Trichodesmium* spp. où les UCYN-A, suivie d'une ré-augmentation progressive jusqu'au au cœur du gyre subtropical de l'Atlantique Nord où il a été observé une contribution équivalente des taux de fixation diurnes et nocturnes (essentiellement attribués aux UCYN-B et C). Ces expériences montrent une production primaire et une fixation de N_2 majoritairement limitées par les phosphates. Les métaux traces, tels Co, Cu, Ni, Mn, Mo ou Zn sont rarement pris en compte comme facteur de limitation de la production primaire et de la fixation de N_2. Nous avons observé, lors de certaines expériences en microcosmes, une stimulation plus importante de la fixation de N_2 suite à l'ajout de ces métaux combinés à des phosphates ou lors d'un dépôt

saharien simulé, que lors d'un ajout de phosphates seuls. Le rôle des poussières éoliennes désertiques sur la levée d'une potentielle limitation par un de ces métaux traces reste actuellement un sujet novateur et très peu étudié. De plus, nous avons mis en évidence des variations spatiales à subméso-échelle des facteurs de contrôle de la production primaire et de la fixation de N_2 pouvant être dues à une variation de la composition des communautés phytoplanctoniques et diazotrophes. Les expériences que nous avons menées en Atlantique subtropical Nord permettent alors d'élargir les connaissances sur les facteurs de contrôle de la fixation de N_2 et de les comparer à ceux limitant la production primaire. Ces résultats permettent également d'apporter des informations sur le rôle joué par les apports atmosphériques d'origine saharienne sur cette limitation nutritive.

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse participent à la réflexion globale sur le processus de fixation de N_2 en milieu océanique et apportent des informations menant à identifier les mécanismes responsables des interactions entre les cycles biogéochimiques du fer, de l'azote et du carbone. Ce travail a donc conduit à de nouvelles interrogations scientifiques et certaines questions restent encore en suspens.

La première, liée à la chimie complexe du fer dans l'eau de mer n'a toujours pas bénéficié d'explications claires à ce jour : quelle est la fraction de fer réellement biodisponible dans l'eau de mer et est-elle différente en fonction de l'espèce phytoplanctonique considérée?

Nos résultats ont montré des différences physiologiques chez *C. watsonii* en milieu artificiel en présence de plusieurs concentrations théoriques en Fe' supérieures à la limite de solubilité de Fe' et de ce fait supposées identiques. Cela encourage fortement à poursuivre les recherches au sujet de la biodisponibilité du fer, mais également au niveau purement chimique afin de pouvoir déterminer de façon précise la solubilité du fer dans l'eau de mer dans des conditions données. Nos résultats sont une nouvelle étape dans la perspective d'appréhender la biodisponibilité du fer à partir d'une réponse biologique. Concernant *C. watsonii,* des expériences d'assimilation à court terme (quelques heures) nécessitant la mise en œuvre d'un outil radioactif, le ^{55}Fe ou le ^{59}Fe, permettraient de déterminer les vitesses d'absorption du fer en conditions de limitation et

ainsi de calculer la quantité de fer utilisée par les cellules durant leur phase de croissance, représentant la quantité de fer biodisponible dans le milieu.

Ce ne sont pas les mêmes problématiques qui se posent lorsque l'on s'intéresse à un système artificiel en présence d'EDTA ou naturel en présence du 'pool' total de matière organique. Dans le premier cas, la question qui ressort des résultats présentés dans le chapitre 1 pourrait être formulée de cette façon : La fraction Fe' est-elle réellement la seule forme biodisponible de fer, ou le phytoplancton est-il capable d'assimiler du fer sous forme colloïdale ou particulaire ? La connaissance des mécanismes d'acquisition du fer chez *C. watsonii*, encore inconnus à ce jour, permettrait d'apporter des éléments de réponse à cette question. Une étude au niveau moléculaire caractérisant les différents transporteurs impliqués dans les processus d'internalisation du fer s'avère alors nécessaire.

En milieu naturel, se pose la question de la production de ligands organiques tels les sidérophores, les porphyrines ou les polysaccharides et de l'assimilation du fer complexé à ce type de molécules. Une expérience a été mise en place au cours de cette thèse afin de déterminer et de comparer la croissance de *C. watsonii* en culture en présence de fer complexé à l'un ou l'autre de ces ligands et en l'absence d'EDTA. Mais elle n'a pas pu être menée à son terme pour cause de difficultés dans la détermination de la fraction réellement biodisponible du fait du manque de connaissances concernant la biodisponibilité du fer complexé à ces ligands. Une approche intéressante serait de mesurer les taux d'assimilation du fer complexé à différents ligands organiques naturels à l'aide d'isotopes du fer. Cependant, elle n'a pu être réalisée au laboratoire du fait de la nécessité actuelle d'utiliser des isotopes radioactifs (^{55}Fe ou ^{59}Fe). Une piste de travail futur serait de mettre en place des expériences présentant moins de contraintes expérimentales en utilisant l'isotope stable du fer ^{57}Fe dont on pourrait suivre l'évolution temporelle des concentrations afin de déterminer la quantité de fer consommée dans le milieu en présence ou non de certains ligands organiques. Une expérience de ce type a déjà été réalisée par Buck et al. (2010b) qui ont suivi durant 15 jours la croissance phytoplanctonique en parallèle à l'évolution des concentrations en ^{57}Fe complexé à différents ligands organiques ajoutés dans des microcosmes (dans l'océan Austral) afin de mettre en évidence la biodisponibilité du fer complexé à ces différents ligands.

Une deuxième perspective de travail est liée à l'amélioration de notre connaissance de l'UCYN *C. watsonii* et plus particulièrement du contrôle exercé par la disponibilité en fer sur cet organisme. Les besoins en fer de *C. watsonii* sous différentes conditions de limitation en fer ne sont pas quantifiés à ce jour. La détermination des contenus intracellulaires en fer et des rapports Fe/C

fait partie du travail envisagé à la suite de cette thèse dans le cadre du projet MODIF (Développement d'un MOdèle numérique du phytoplancton DIazotrophe (*Crocosphaera sp.*) et de sa limitation en Fer) auquel je participe jusqu'au 31 août 2014, dans le cadre de mon contrat actuel d'attachée temporaire d'enseignement et de recherche (ATER). Le but de ce projet est de modéliser la réponse de *C. watsonii* face à la limitation en fer. Pour cela, un modèle numérique du métabolisme des UCYN sera utilisé, ce qui permettra de quantifier l'impact des conditions environnementales, telles les concentrations en Fe, sur la croissance de ces organismes. Ce modèle, actuellement en cours de développement par Giovanni ALOISI (LOCEAN, UPMC), utilise la « Dynamic Energy Budget Theory (DEB, Kooijman 2009)) ». Cette théorie du métabolisme décrit l'acquisition et l'utilisation d'énergie et de nutriments et permet de simuler les taux de croissance, la composition élémentaire et la taille des cellules en fonction d'un forçage physico-chimique. Il peut ainsi être appliqué aux conditions naturelles de différentes régions océaniques pour apporter des informations nouvelles concernant le contrôle de la distribution des UCYN. Les paramètres biologiques de ce modèle seront contraints avec les résultats issus de mes travaux de thèse montrant que la diminution de la biodisponibilité du fer induit une diminution de la croissance ainsi que des taux de fixation de N_2 et CO_2 chez *C. watsonii* en culture.

Il serait intéressant de continuer l'étude des limitations en fer des espèces de cyanobactéries diazotrophes unicellulaires nouvellement découvertes afin d'élucider les différences en termes de biogéographie de ces organismes. Par exemple, l'isolation récente d'une UCYN-C en océan ouvert (Taniuchi et al. 2012) pourra permettre de comparer les réponses des UCYN-B et des UCYN-C face à la limitation en fer. De plus, les expériences en culture réalisées à ce jour révèlent des particularités entre les différents genres de cyanobactéries diazotrophes (*e.g. Trichodesmium* ou *Crocosphaera*) dans la réponse physiologique face à limitation en fer. Nous pouvons alors nous demander s'il existe des différences entre les diverses souches d'une même espèce, telle les diverses souches de *C. watsonii* isolées à ce jour, qui présentent des différences morphologiques. Cela conduit ainsi à se demander s'il existe des différences en termes de réponse lors d'un apport externe de fer, tel un apport saharien.

Agawin et al. (2007) ont réalisé des cultures continues plurispécifiques de phytoplancton diazotrophe et non-diazotrophe limité par la lumière et la disponibilité en azote dans le but d'étudier la compétition entre différents organismes face à ces conditions environnementales. Des recherches complémentaires à l'étude des cultures monospécifiques de cyanobactéries diazotrophes limitées en fer, telle celle présentée dans le chapitre 1, pourraient être envisagées

avec la mise en place d'expériences de compétition entre des organismes phytoplanctoniques diazotrophes et non-diazotrophes similaires à celle d'Agawin et al. (2007) mais en condition de limitation en fer. De même, la compétition entre différentes cyanobactéries diazotrophes pour l'accès au fer issu de dépôt atmosphérique pourrait être étudiée à l'aide de ce type de cultures continues. Néanmoins ce travail demande une phase importante de développement méthodologique afin d'adapter la culture continue aux conditions ultra-propres qui sont nécessaires à l'étude des limitations en fer en milieu marin. Les différences en termes d'acquisition du fer doivent être confirmées avec l'étude fine des mécanismes d'acquisition de chacun de ces organismes. Concernant *C. watsonii*, une approche protéomique, telle celle mise en place par Saito et al. (2011) couplée à la réponse physiologique à une large gamme de concentration en fer permettrait d'explorer et de comprendre plus en détail l'impact de la limitation en fer sur le métabolisme de cet organisme phytoplanctonique dont l'importance biogéochimique est maintenant reconnue, mais dont le fonctionnement reste encore très mal connu.

Enfin, nous avons observé en Atlantique subtropical Nord des variations à subméso-échelle des réponses de la production primaire et des taux de fixation de N_2 suite aux enrichissements en nutriments pouvant être liées à la méso-échelle de surface (Lévy 2008), avec la présence de tourbillons très dynamiques, peu ou mal contraints par les reconstructions issues de données satellites. De nouvelles approches de modélisation permettent d'aller vers une explication de ces phénomènes et il en ressort une nécessité d'explorer le rôle de la subméso-échelle sur la diversité écologique du phytoplancton qui semble influencée par ces interactions (Lévy et al. 2013).

Tout cela pourrait alors apporter des éléments de réponse quant aux variabilités spatiales des facteurs de contrôle de la fixation de N_2 dans l'optique de comprendre les interactions mises en jeu afin de mieux contraindre le cycle du N présentant encore à ce jour un bilan non équilibré entre les gains (fixation de N_2) et les pertes (dénitrification et anammox).

Références bibliographiques

Achilles, K.M., Church, T.M., Wilhelm, S.W., Luther, G.W.I., Hutchins, D.A. (2003) Bioavailability of iron to *Trichodesmium* colonies in the western subtropical Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr*. 48, 2250–2255. doi:10.4319/lo.2003.48.6.2250

Agawin, N.S.R., Rabouille, S., Veldhuis, M.J.W., Servatius, L., Hol, S., Overzee, H.M.J. Van, Huisman, J., Agawin, N.S.R., van Overzee Harriët M, J. (2007) Competition and facilitation between unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria and non-nitrogen-fixing phytoplankton species. *Limnol. Oceanogr.* 52, 2233–2248.

Agawin, N.S.R., Tovar-Sanchez, A, de Zarruk, K.K., Duarte, C.M., Agusti, S. (2013) Variability in the abundance of *Trichodesmium* and nitrogen fixation activities in the subtropical NE Atlantic. *J. Plankton Res.* 35, 1126–1140. doi:10.1093/plankt/fbt059

Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Ku, F.C. (2009) Photolysis of iron – siderophore chelates promotes bacterial – algal mutualism *PNAS* 106, 17071–17076. doi:10.1073pnas.0905512106

Aminot, A., Kérouel, R. (2007) Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu Ifremer ed., 188 pp.

Avery, B.G., Kieber, R.J., Witt, M., Willey, J.D., 2006. Rainwater monocarboxylic and dicarboxylic acid concentrations in southeastern North Carolina, USA, as a function of air-mass back-trajectory. *Atmos. Environ*. 40, 1683–1693. doi:10.1016/j.atmosenv.2005.10.058

Baboukas, E.D., Kanakidou, M., Mihalopoulos, N. (2000). Carboxylic acids in gas and particulate phase above the Atlantic Ocean. *J. Geophys. Res*. 105, 14459–14471.

Badger, M.R., Price, G.D. (1994) The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol*. Biol. 45, 369–392. doi:10.1146/annurev.pp.45.060194.002101

Badger, M.R., Price, G.D., Long, B.M., Woodger, F.J. (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO_2 concentrating mechanism. *J. Exp. Bot*. 57, 249–265. doi:10.1093/jxb/eri286

Baker, A.R., Jickells, T.D. (2006) Mineral particle size as a control on aerosol iron solubility. *Geophys. Res. Lett.* 33, L17608. doi:10.1029/2006GL026557

Baker, A.R., Lesworth, T., Adams, C., Jickells, T.D., Ganzeveld, L. (2010) Estimation of atmospheric nutrient inputs to the Atlantic Ocean from 50°N to 50°S based on large-scale field sampling: Fixed nitrogen and dry deposition of phosphorus. *Global Biogeochem. Cycles* 24, GB3006. doi:10.1029/2009GB003634

Banerjee, R., Ragsdale, S.W. (2003) The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem*. 72, 209–247. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161828

Barbeau, K., Rue, E.L., Trick, C.G., Bruland, K.W., Butler, A. (2003) Photochemical reactivity of siderophores produced by marine heterotrophic bacteria and cyanobacteria based on characteristic Fe (III) binding groups. *Limnol. Oceanogr*. 48, 1069–1078.

Behrenfeld, M.J., Halsey, K.H., Milligan, A.J. (2008) Evolved physiological responses of phytoplankton to their integrated growth environment. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 363, 2687–2703. doi:10.1098/rstb.2008.0019

Behrenfeld, M.J., Milligan, A.J. (2013) Photophysiological expressions of iron stress in phytoplankton. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 5, 217–246. doi:10.1146/annurev-marine-121211-172356

Benavides, M., Agawin, N.S.R., Arístegui, J., Ferriol, P., Stal, L.J. (2011)Nitrogen fixation by *Trichodesmium* and small diazotrophs in the subtropical northeast Atlantic. *Aquat. Microb. Ecol.* 65, 43–53. doi:10.3354/ame01534

Benavides, M., Arístegui, J., Agawin, N.S.R., López Cancio, J., Hernández-León, S. (2013a) Enhancement of nitrogen fixation rates by unicellular diazotrophs vs. *Trichodesmium* after a dust deposition event in the Canary Islands. *Limnol. Oceanogr.* 58, 267–275. doi:10.4319/lo.2013.58.1.0267

Benavides, M., Arístegui, J., Agawin, N.S.R., Álvarez-Salgado, X.A., Álvarez, M., Troupin, C. (2013b) Low contribution of N_2 fixation to new production and excess nitrogen in the subtropical northeast Atlantic margin. *Deep Sea Res. Part I* 81, 36–48. doi:10.1016/j.dsr.2013.07.004

Benavides, M., Bronk, D.A., Agawin, N.S.R., Pérez-Hernández, M.D., Hernández-Guerra, A., Arístegui, J. (2013c) Longitudinal variability of size-fractionated N_2 fixation and DON release rates along 24.5°N in the subtropical North Atlantic. *J. Geophys. Res. Ocean.* 118, 3406–3415. doi:10.1002/jgrc.20253

Berman-Frank, I., Lundgren, P., Chen, Y.B., Küpper, H., Kolber, Z., Bergman, B., Falkowski, P. (2001a) Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. Science. 294, 1534–1537. doi:10.1126/science.1064082

Berman-Frank, A.I., Cullen, J.T., Shaked, Y., Sherrell, R.M., Falkowski, P.G. (2001b) Iron availability, cellular iron quotas, and nitrogen fixation in *Trichodesmium*. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1249–1260.

Berman-Frank, I.A., Quigg, A., Finkel, Z. V, Irwin, A.J., Haramaty, L. (2007) Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* 52, 2260–2269.

Bernard, C. (2013) Rapport de stage de fin de seconde année. LOCEAN, UPMC

Biegala, I., Raimbault, P. (2008) High abundance of diazotrophic picocyanobacteria (<3 µm) in a Southwest Pacific coral lagoon. *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 45–53. doi:10.3354/ame01185

Biller, D. V., Bruland, K.W. (2012) Analysis of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in seawater using the Nobias-chelate PA1 resin and magnetic sector inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Mar. Chem.* 130-131, 12–20. doi:10.1016/j.marchem.2011.12.001

Blain, S., Sarthou, G., Laan, P. (2008) Distribution of dissolved iron during the natural iron-fertilization experiment KEOPS (Kerguelen Plateau, Southern Ocean). *Deep Sea Res. Part II* 55, 594–605. doi:10.1016/j.dsr2.2007.12.028

Bonnet, S., Guieu, C. (2004) Dissolution of atmospheric iron in seawater. *Geophys. Res. Lett.* 31, L03303 doi:10.1029/2003GL018423

Bonnet, S., Biegala, I.C., Dutrieux, P., Slemons, L.O., Capone, D.G. (2009) Nitrogen fixation in the western equatorial Pacific: Rates, diazotrophic cyanobacterial size class distribution, and biogeochemical significance. *Global Biogeochem. Cycles* 23, GB3012. doi:10.1029/2008GB003439

Bonnet, S., Webb, E.A., Panzeca, C., Karl, D.M., Capone, D.G., San, S.A. (2010). Vitamin B 12 excretion by cultures of the marine cyanobacteria *Crocosphaera* and *Synechococcus*. *Limnol. Oceanogr*. 55, 1959–1964. doi:10.4319/lo.2010.55.4.1959

Bonnet, S., Dekaezemacker, J., Turk-Kubo, K.A., Moutin, T., Hamersley, R.M., Grosso, O., Zehr, J.P., Capone, D.G. (2013) Aphotic N_2 fixation in the eastern tropical South pacific ocean. *Plos one* 8, e81265. doi:10.1371/journal.pone.0081265

Bopp, L., Le Quéré, C. (2009) Ocean carbon cycle, in: Le Quéré, C., Saltzman, E.S. (Eds.), Surface Ocean - Lower Atmosphere Processes. American Geophysical Union, Washington, D. C., pp. 181–195. doi:10.1029/2008GM000780

Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M.G., Newton, W.E. (2010) Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 529–551. doi:10.1128/MMBR.00033-10

Bowie, A.R., Maldonado, M.T., Frew, R.D., Croot, P.L., Achterberg, E.P., Mantoura, R.F.C., Worsfold, P.J., Law, C.S., Boyd, P.W. (2001) The fate of added iron during a mesoscale fertilisation experiment in the Southern Ocean. *Deep Sea Res. Part II* 48, 2703–2743. doi:10.1016/S0967-0645(01)00015-7

Boyd, P.W., Doney, S.C. (2003) The impact of climate change and feedback processes on the ocean carbon cycle, in: Fasham, M.J.R. (Ed.), Ocean Biogeochemistry: A Synthesis of the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS). Berlin, pp. 157–193.

Boyd, P.W., Watson, a J., Law, C.S., Abraham, E.R., Trull, T., Murdoch, R., Bakker, D.C., Bowie, A. R., Buesseler, K.O., Chang, H., Charette, M., Croot, P., Downing, K., Frew, R., Gall, M., Hadfield, M., Hall, J., Harvey, M., Jameson, G., LaRoche, J., Liddicoat, M., Ling, R., Maldonado, M.T., McKay, R.M., Nodder, S., Pickmere, S., Pridmore, R., Rintoul, S., Safi, K., Sutton, P., Strzepek, R., Tanneberger, K., Turner, S., Waite, A., Zeldis, J. (2000) A

mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. Nature 407, 695–702. doi:10.1038/35037500

Brauer, V.S., Stomp, M., Rosso, C., van Beusekom, S. A M., Emmerich, B., Stal, L.J., Huisman, J. (2013) Low temperature delays timing and enhances the cost of nitrogen fixation in the unicellular cyanobacterium *Cyanothece*. *ISME J.* 7, 2105–2015. doi:10.1038/ismej.2013.103

Breitbarth, E., Oschlies, A., LaRoche, J. (2007) Physiological constraints on the global distribution of *Trichodesmium* – effect of temperature on diazotrophy. *Biogeosciences* 4, 53–61. doi:10.5194/bg-4-53-2007

Breitbarth, E., Wohlers, J., Kläs, J., LaRoche, J., Peeken, I. (2008) Nitrogen fixation and growth rates of *Trichodesmium* IMS-101 as a function of light intensity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 359, 25–36. doi:10.3354/meps07241

Bruland, K.W., Rue, E.L., Smith, G.J., DiTullio, G.R. (2005) Iron, macronutrients and diatom blooms in the Peru upwelling regime: brown and blue waters of Peru. *Mar. Chem.* 93, 81–103. doi:10.1016/j.marchem.2004.06.011

Bucciarelli, E., Ridame, C., Sunda, W.G., Dimier-Hugueney, C., Cheize, M., Belviso, S. (2013) Increased intracellular concentration of DMSP and DMSO in iron-limited oceanic phytoplankton *Thalassiosira oceanica* and *Trichodesmium erythraeum*. *Limnol. Oceanogr.*58, 1667–1679 doi:10.4319/lo.2013.58.5.1667

Buck, C.S., Landing, W.M., Resing, J. A (2010a) Particle size and aerosol iron solubility: A high-resolution analysis of Atlantic aerosols. *Mar. Chem.* 120, 14–24. doi:10.1016/j.marchem.2008.11.002

Buck, K.N., Selph, K.E., Barbeau, K. A (2010b) Iron-binding ligand production and copper speciation in an incubation experiment of Antarctic Peninsula shelf waters from the Bransfield Strait, Southern Ocean. *Mar. Chem.* 122, 148–159. doi:10.1016/j.marchem.2010.06.002

Campbell, L., Carpenter, E.., Montoya, J.P., Kustka, A.B., Capone, D.G. (2005) Picoplankton community structure within and outside a *Trichodesmium* bloom in the southwestern Pacific ocean. *Vie milieu* 55, 185–195.

Capone, D.G., Zehr, J. P., W., Paerl, H.W., Bergman, B., Carptenter, J.E. (1997) *Trichodesmium*, a Globally Significant Marine Cyanobacterium. *Science* 276, 1221–1229. doi:10.1126/science.276.5316.1221

Capone, D.G. (2000) The marine nitrogen cycle, in: Kirchman, L. (Ed.), Microbial Ecology of the Ocean. Wiley, New-York, pp. 455–493.

Capone, D.G., Burns, J.A., Montoya, J.P., Subramaniam, A., Mahaffey, C., Gunderson, T., Michaels, A.F., Carpenter, E.J. (2005) Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 19, GB2024. doi:10.1029/2004GB002331

Carpenter, E.J., Janson, S. (2001) *Anabaena gerdii* sp nov., a new planktonic filamentous cyanobacterium from the South Pacific Ocean and Arabian Sea. *Phycologia* 40, 105–110.

Carpenter, E.J., Subramaniam, A., Capone, D.G. (2004) Biomass and primary productivity of the cyanobacterium *Trichodesmium* spp. in the tropical N Atlantic ocean. *Deep Sea Res. Part* I 51, 173–203. doi:10.1016/j.dsr.2003.10.006

Chappell, P.D., Webb, E.A. (2010) A molecular assessment of the iron stress response in the two phylogenetic clades of *Trichodesmium*. *Environ. Microbiol.* 12, 13–27. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02026.x

Chen, Y.-B., Zehr, J.P., Mellon, M. (1996) Growth and nitrogen fixation of the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. IMS 101 in defined media: Evidence for a circadian rhythm. *J. Phycol.* 32, 916–923. doi:10.1111/j.0022-3646.1996.00916.x

Chever, F. (2009) « Spéciation du fer en milieu océanique, interactions avec le phytoplancton ». Thèse de doctorat, Université de Brest.

Chisholm, S.W. (2000) Oceanography: Stirring in the Southern Ocean. *Nature* 407, 685–687. doi:10.1038/35037696

Church, M., Jenkins, B., Karl, D., Zehr, J. (2005a) Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Stn Aloha in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 3–14. doi:10.3354/ame038003

Church, M.J., Short, C.M., Jenkins, B.D., Karl, D.M., Zehr, J.P. (2005b) Temporal Patterns of Nitrogenase Gene (*nifH*) Expression in the Oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol* 71, 5362–5370. doi:10.1128/AEM.71.9.5362

Church, M.J., Mahaffey, C., Letelier, R.M., Lukas, R., Zehr, J.P., Karl, D.M. (2009) Physical forcing of nitrogen fixation and diazotroph community structure in the North Pacific subtropical gyre. *Global Biogeochem. Cycles* 23, GB2020. doi:10.1029/2008GB003418

Coles, V.J., Hood, R.R. (2007) Modeling the impact of iron and phosphorus limitations on nitrogen fixation in the Atlantic Ocean. *Biogeosciences* 4, 455–479. doi:10.5194/bg-4-455-2007

Collier, R.W. (1985) Molybdenum in the Northeast Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 30, 1351–1354. doi:10.4319/lo.1985.30.6.1351

Codispoti, L.A., Brandes, J.A., Christensen, J.P., Devol, A.H., Naqvi, S.W.A., Paerl, H.W. and Yoshinari, T. (2001) The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets : Moving targets as we enter the anthropocene ? *Sci. Mar.* 65 : 85-105

Codispoti, L.A. (2007) An oceanic fixed nitrogen sink exceeding 400 $Tg.a^{-1}$ vs the concept of homeostasis in the fixed-nitrogen inventory. *Biogeoscience* 4, 233-253. do:10.519/bg-4-233-2007

Croft, M.T., Warren, M.J., Smith, A.G. (2006) Algae need their vitamins. *Eukaryot. Cell* 5, 1175–1183. doi:10.1128/EC.00097-06

Dandonneau, Y., Neveux, J. (2002) An assessment of biases in fluorometric estimates of chlorophyll and pheophytin concentration in seawater, by reference to fluorescence spectral characteristics of main chlorophyllous pigments and large scale sampling. *Notes des activités instrumentales de l'Institut Pierre Simon Laplace* Note n°18.

De Baar, H.J.W., de Jong, J.T.M. (2001) Distributions, Sources and Sinks of Iron in Seawater, in: Turner, D.R., Hunter, K.A. (Eds.), The Biogeochemistry of Iron in Seawater. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 123–253.

Dekaezemacker, J., Bonnet, S. (2011) Sensitivity of N_2 fixation to combined nitrogen forms (NO_3^- and NH_4^+) in two strains of the marine diazotroph *Crocosphaera watsonii* (Cyanobacteria). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 438, 33–46. doi:10.3354/meps09297

Delwich, C.C. (1970) The nitrogen cycle. *Sci. Am.* 223, 136–146. doi:10.1038/scientificamerican0970-136

Desboeufs, K. V, Losno, R., Vimeux, F., Cholbi, S. (1999) The pH-dependent dissolution of wind-transported*. J. Geophys. Res.* 104, 21287–21299.

Desboeufs, K. V, Losno, R., Colin, J.L. (2001) Factors influencing aerosol solubility during cloud processes. *Atmos. Environ*. 35, 3529–3537.

Desboeufs, K. V, Losno, R., Colin, J.L. (2003). Figures of merit of pneumatic and ultrasonic sample introduction systems in inductively coupled plasma-multichannel-based emission spectrometry in an ultra-clean environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 567–573. doi:10.1007/s00216-002-1725-9

Desboeufs, K. V, Sofikitis, A., Losno, R., Colin, J.L., Ausset, P. (2005) Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. *Chemosphere* 58, 195–203. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.02.025

Desboeufs, K., Leblond, N., Wagener, T., Nguyen, E.B., Guieu, C. (2014) Chemical fate and settling of mineral dust in surface seawater after atmospheric deposition observed from dust seeding experiments in large mesocosms. *Biogeosciences Discuss.* 11, 4909–4947. doi:10.5194/bgd-11-4909-2014

Deutsch, C., Sarmiento, J.L., Sigman, D.M., Gruber, N., Dunne, J.P. (2007) Spatial coupling of nitrogen inputs and losses in the ocean. *Nature* 445, 163–167. doi:10.1038/nature05392

Dron, A., Rabouille, S., Claquin, P., Le Roy, B., Talec, A., Sciandra, A. (2012a) Light-dark (12:12) cycle of carbon and nitrogen metabolism in *Crocosphaera watsonii* WH8501: relation to the cell cycle. *Environ. Microbiol.* 14, 967–81. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02675.x

Dron, A., Rabouille, S., Claquin, P., Chang, P., Raimbault, V., Talec, A., Sciandra, A. (2012b) Light : dark (12:12 h) quantification of carbohydrate fluxes in *Crocosphaera watsonii*. *Aquat. Microb. Ecol.* 68, 43–55. doi:10.3354/ame01600

Duce, R.A., Tindale, N.W. (1991) Atmospheric transport of iron and its deposition in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1715–1726.

Duce, R.A., Liss, P.S., Merrill, J.T., Atlas, E.L., Buat-Menard, P., Hicks, B.B., Millertl, J.M., Prospero, J.M., Arimoto, R., Church, T.M., Ellis, W., Galloway, J.N., Hansen, L., Jickells, T.D., Knap, A.H., Reinhardt, K.H., Schneider, B., Soudine, A., Tokos, J.J., Tsunogai, S., Wollast, R., Zhou, M. (1991) The atmospheric input of trace metal species to the world ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 5, 193–259.

Dugdale, R.C., Goering, J.J. (1967) Uptake and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12, 196–206.

Dupouy, C., Neveux, J., Subramaniam, A., Mulholland, M.R., Montoya, J.P., Campbell, L., Carpenter, E.J., Capone, D.G. (2000) Satellite captures *Trichodesmium* blooms in the southwestern tropical pacific. *Eos, Trans. AGU* 81, 13–20.

Dutkiewicz, S., Ward, B.A., Monteiro, F., Follows, M.J. (2012) Interconnection of nitrogen fixers and iron in the Pacific Ocean: Theory and numerical simulations. *Global Biogeochem. Cycles* 26, GB1012. doi:10.1029/2011GB004039

Dyhrman, S.T., Chappell, P.D., Haley, S.T., Moffett, J.W., Orchard, E.D., Waterbury, J.B., Webb, E.A. (2006) Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature* 439, 68–71. doi:10.1038/nature04203

Dyhrman, S.T., Haley, S.T. (2006) Phosphorus Scavenging in the Unicellular Marine Diazotroph *Crocosphaera watsonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1452–1458. doi:10.1128/AEM.72.2.1452

Eglinton, T.I., Eglinton, G., Dupont, L., Sholkovitz, E.R., Montluçon, D., Reddy, C.M. (2002) Composition, age, and provenance of organic matter in NW African dust over the Atlantic *Ocean. Geochemistry Geophys. Geosystems* 3. doi:10.1029/2001GC000269

Ehrenreich, I.M., Waterbury, J.B., Webb, E.A. (2005) Distribution and Diversity of Natural Product Genes in Marine and Freshwater Cyanobacterial Cultures and Genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7401–7413. doi:10.1128/AEM.71.11.7401

Elderfield, H., Schultz, A. (1996) Mid-Ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci*. 24, 191–224. doi:10.1146/annurev.earth.24.1.191

Ellwood, M.J., Van Den Berg, C.M.G. (2000) Zinc speciation in the Northeastern Atlantic Ocean. *Mar. Chem*. 68, 295–306.

Eugster, O., Gruber, N. (2012) A probabilistic estimate of global marine N-fixation and denitrification. *Global Biogeochem. Cycles* 26, GB4013. doi:10.1029/2012GB004300

Falcón, L.I., Carpenter, E.J., Cipriano, F., Bergman, B., Capone, D.G. (2004) N_2 Fixation by Unicellular Bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans : Phylogeny and In Situ Rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 765–770. doi:10.1128/AEM.70.2.765

Falcón, L.I., Pluvinage, S., Carpenter, E.J. (2005) Growth kinetics of marine unicellular N_2-fixing cyanobacterial isolates in continuous culture in relation to phosphorus and temperature. *Mar. Ecol. Prog.* Ser. 285, 3–9.

Falkowski, P.G. (1997) Evolution of the nitrogen cycle and it's influence on the biological sequestration of CO_2 in the ocean. *Nature* 387, 272–275. doi:10.1038/246170a0

Falkowski, P.G., Laws, E.A., Barber, R.T., Murray, J.W. (2003) Phytoplankton and Their Role in Primary, New and Export Production, in: Fasham, M.J.R. (Ed.), Ocean Biogeochemistry. The Role of the Ocean Carbon Cycle in Global Change. Springer, Berlin, pp. 99–121. doi:10.1007/978-3-642-55844-3_5

Farnelid, H., Andersson, A.F., Bertilsson, S., Al-Soud, W.A., Hansen, L.H., Sørensen, S., Steward, G.F., Hagström, Å., Riemann, L. (2011) Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. *Plos one* 6, e19223. doi:10.1371/journal.pone.0019223

Fernández, A., Mouriño-Carballido, B., Bode, A., Varela, M., Marañón, E. (2010) Latitudinal distribution of *Trichodesmium* spp. and N_2 fixation in the Atlantic Ocean. Biogeosciences 7, 3167–3176. doi:10.5194/bg-7-3167-2010

Fernández, A., Graña, R., Mouriño-Carballido, B., Bode, A., Varela, M., Dominguez-Yanes, J.F., Escanez, J., de Armas, D., Manrañon, E. (2012) Community N_2 fixation and *Trichodesmium* spp. abundance along longitudinal gradients in the eastern subtropical North Atalntic. *ICES J. Mar. Sci.* doi:10.1093/icesjms/fss142

Ferreira, F., Straus, N.A. (1994) Iron deprivation in cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 6, 199–210.

Foster, R.A., Zehr, J.P. (2006) Characterization of diatom-cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. *Environ. Microbiol.* 8, 1913–1925. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01068.x

Foster, R. A, Kuypers, M.M.M., Vagner, T., Paerl, R.W., Musat, N., Zehr, J.P. (2011) Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. *ISME J.* 5, 1484–1493. doi:10.1038/ismej.2011.26

Fredriksson, C., Bergman, B. (1997) Ultrastructural characterisation of cells specialised for nitrogen fixation in a non-heterocystous cyanobacterium, *Trichodesmium* spp. *Protoplasma* 197, 76–85. doi:10.1007/BF01279886

Fu, F., Bell, P.R. (2003) Growth, N_2 fixation and photosynthesis in a cyanobacterium, *Trichodesmium* sp., under Fe stress. *Biotechnol. Lett.* 25, 645–649.

Fu, F.-X., Zhang, Y., Bell, P.R.F., Hutchins, D.A. (2005) Phosphate Uptake and Growth Kinetics of *Trichodesmium* (Cyanobacteria) Isolates From the North Atlantic Ocean and the Great Barrier Reef, Australia. *J. Phycol.* 41, 62–73. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04063.x

Fu, F., Mulholland, M.R., Garcia, N.S., Beck, A., Bernhardt, P.W., Warner, M.E., Sanudo-Wilhelmy, S.A., Hutchins, D.A. (2008) Interactions between changing pCO_2, N_2 fixation, and Fe

limitation in the marine unicellular cyanobacterium *Crocosphaera*. *Limnol. Oceanogr.* 53, 2472–2484.

Fu, F., Yu, E., Garcia, N.S., Gale, J., Luo, Y., Webb, E.A., Hutchins, D.A. (2014) Differing responses of marine N_2 fixers to warming and consequences for future diazotroph community structure. *Aquat. Microb. Ecol.* 72, 33–46. doi:10.3354/ame01683

Fuzzi, S. (1994) Clouds in the troposphere., in: Boutron, C.F. (Ed.), ERCA Topics in Atmospheric and Interstellar Physics and Chemistry. Les Ulis, France, pp. 291–308.

Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vorosmarty, C.J. (2004) Nitrogen cycles : past , present , and future. *Biogeochemistry* 70, 153–226.

Garcia, H.E., Locarnini, R.A., Boyer, T.P., Antonov, J.I., Zweng, M.M., Baranova, O.K., Johnson, D.R. (2010) NOAA Atlas NESDIS 71 WORLD OCEAN ATLAS 2009 Volume 4 : Nutrients (phosphate , nitrate , silicate), NOAA Atlas. ed. U.S. government Printing Office, Washington, D. C.

Garcia, N.S., Fu, F., Hutchins, D.A. (2013) Colimitation of the unicellular photosynthetic diazotroph *Crocosphaera watsonii* by phosphorus, light and carbon dioxide. *Limnol. Oceanogr.* 58, 1501–1512. doi:10.4319/lo.2013.58.4.1501

Geider, R., LaRoche, J. (2002) Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37, 1–17. doi:10.1017/S0967026201003456

Gelencsér, A., Hoffer, A., Krivacsy, Z., Kiss, G., Molnar, A., Mészaros, E. (2002) On the possible origin of humic matter in fine continental aerosol. *J. Geophys. Res.* 107, 4137. doi:10.1029/2001JD001299

Gervais, F., Riebesell, U., Gorbunov, M.Y. (2002) Changes in primary productivity and chlorophyll *a* in response to iron fertilization in the Southern Polar Frontal Zone. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1324–1335. doi:10.4319/lo.2002.47.5.1324

Giovagnetti, V., Brunet, C., Conversano, F., Tramontano, F., Obernosterer, I., Ridame, C., Guieu, C. (2013) Assessing the role of dust deposition on phytoplankton ecophysiology and succession in a low-nutrient low-chlorophyll ecosystem: a mesocosm experiment in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 10, 2973–2991. doi:10.5194/bg-10-2973-2013

Gledhill, M., Van Den Berg, M.G. (1994) Determination of complexation of iron(III) with natural organic complexing ligands in seawater using cathodic stripping voltammetry. Mar. Chem. 47, 41–54. doi:10.1016/0304-4203(94)90012-4

Gledhill, M., Buck, K.N. (2012) The organic complexation of iron in the marine environment: a review. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00069

Global Carbon Project 2013 : http://www.globalcarbonproject.org/ consulté le 21 Mars 2014

Goebel, N.L., Edwards, C.A., Church, M.J., Zehr, J.P. (2007) Modeled contributions of three types of diazotrophs to nitrogen fixation at Station ALOHA. *ISME J.* 1, 606–619. doi:10.1038/ismej.2007.80

Goebel, N.L., Edwards, C.A., Carter, B.J., Achilles, K.M., Zehr, J.P. (2008) Growth and carbon content of three different-sized diazotrophic cyanobacteria observed in the subtropical North Pacific. *J. Phycol.* 44, 1212–1220. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00581.x

Goebel, N.L., Turk, K.A., Achilles, K.M., Paerl, R., Hewson, I., Morrison, A.E., Montoya, J.P., Edwards, C.A., Zehr, J.P. (2010) Abundance and distribution of major groups of diazotrophic cyanobacteria and their potential contribution to N_2 fixation in the tropical Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol*. 12, 3272–3289. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02303.x

Großkopf, T., LaRoche, J. (2012) Direct and indirect costs of dinitrogen fixation in *Crocosphaera watsonii* WH8501 and possible implications for the nitrogen cycle. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00236

Großkopf, T., Mohr, W., Baustian, T., Schunck, H., Gill, D., Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Schmitz, R. a, Wallace, D.W.R., LaRoche, J. (2012) Doubling of marine dinitrogen-fixation rates based on direct measurements. *Nature* 488, 361–4. doi:10.1038/nature11338

Gruber, N. (2004) The marine nitrogen cycle and atmospheric CO_2, in: Follows, M., Oguz, T. (Eds.), Carbon-Climate Interactions. Wiley-Interscience, pp. 97–148.

Gruber, N. (2008) The Marine Nitrogen Cycle : Overview and Challenges, in: Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R., Carpenter, E.J. (Eds.), Nitrogen in the Marine Environment (second Edition). Elsevier, Burlington, pp. 1–50. doi:10.1016/B978-0-12-372522-6.00001-3

Guieu, C., Dulac, F., Desboeufs, K., Wagener, T., Pulido-Villena, E., Grisoni, J.-M., Louis, F., Ridame, C., Blain, S., Brunet, C., Bon Nguyen, E., Tran, S., Labiadh, M., Dominici, J.-M. (2010) Large clean mesocosms and simulated dust deposition: a new methodology to investigate responses of marine oligotrophic ecosystems to atmospheric inputs. *Biogeosciences* 7, 2765–2784. doi:10.5194/bg-7-2765-2010

Gundersen, K., Heldal, M., Norland, S., Purdie, D.A., Knap, A.H. (2002) Elemental C , N , and P cell content of individual bacteria collected at the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. *Limnol. Oceanogr*. 47, 1525–1530.

Halm, H., Lam, P., Ferdelman, T.G., Lavik, G., Dittmar, T., LaRoche, J., D'Hondt, S., Kuypers, M.M.M. (2012) Heterotrophic organisms dominate nitrogen fixation in the South Pacific Gyre. *ISME J.* 6, 1238–49. doi:10.1038/ismej.2011.182

Hama, T., Miyazaki, T., Ogawa, Y., Iwakuma, T., Takahashi, M., Otsuki, A., Ichimura, S. (1983) Measurement of photosynthetic production of a marine phytopklankton population using a stable ^{13}C isotope. *Mar. Biol.* 73, 31–36.

Hassler, C.S., Schoemann, V., Mancuso, C., Butler, E.C. V, Boyd, P.W. (2010) Saccharides enhance iron bioavailability to Southern Ocean phytoplankton. *PNAS*. doi:10.1073/pnas.1010963108

Hegg, D.A., Gao, S., Jonsson, H. (2002) Measurements of selected dicarboxylic acids in marine cloud water. *Atmos. Res.* 62, 1–10. doi:10.1016/S0169-8095(02)00023-6

Hewson, I., Moisander, P., Achilles, K., Carlson, C., Jenkins, B., Mondragon, E., Morrison, A., Zehr, J. (2007) Characteristics of diazotrophs in surface to abyssopelagic waters of the Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 46, 15–30. doi:10.3354/ame046015

Ho, T.-Y. (2013) Nickel limitation of nitrogen fixation in *Trichodesmium*. *Limnol. Oceanogr*. 58, 112–120. doi:10.4319/lo.2013.58.1.0112

Holl, C.M., Montoya, J.P. (2005) Interactions Between Nitrate Uptake and Nitrogen Fixation in Continuous Cultures of the Marine Diazotroph *Trichodesmium* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 41, 1178–1183. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00146.x

Hopkinson, B.M., Morel, F.M.M. (2009) The role of siderophores in iron acquisition by photosynthetic marine microorganisms. *Biometals* 22, 659–669. doi:10.1007/s10534-009-9235-2

Howard, J.B., Rees, D.C. (1996) Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem. Rev*. 96, 2965–2982.

Howard, J.B., Rees, D.C. (2006) How many metals does it take to fix N_2? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation. *PNAS* 103, 17088–17093. doi :10.1073pnas.0603978103

Hudson, R.J.M., Morel, F.M.M. (1990) Iron transport in marine phytoplankton : kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.* 35, 1002–1020.

Hudson, R.J.., Covault, D.T., Morel, F.M.. (1992) Investigations of iron coordination and redox reactions in seawater using ^{59}Fe radiometry and ion-pair solvent extraction of amphiphilic iron complexes. *Mar. Chem.* 38, 209–235. doi:10.1016/0304-4203(92)90035-9

Hunter, K.A., Boyd, P.W. (2007) Iron-binding ligands and their role in the ocean biogeochemistry of iron. *Environ. Chem.* 4, 221–232. doi:10.1071/EN07012

Hutchins, D.A., Witter, A.E., Butler, A., Iii, G.W.L. (1999) Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature* 400, 1–4.

Hutchins, D.A., Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M.E., Feng, Y., Portune, K., Bernhardt, P.W., Mulholland, M.R. (2007) CO_2 control of *Trichodesmium* N_2 fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnol. Oceanogr.* 52, 1293–1304. doi:10.4319/lo.2007.52.4.1293

Hutchins, D.A., Fu, F.-X., Webb, E.A., Walworth, N., Tagliabue, A. (2013) Taxon-specific response of marine nitrogen fixers to elevated carbon dioxide concentrations. *Nat. Geosci.* 6, 790–795. doi:10.1038/ngeo1858

Jacq, V., Ridame, C., L'Helguen, S., Kaczmar, F., Saliot, A. (2014) Response of the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* to iron limitation. *Plos one* 9, e86749. doi:10.1371/journal.pone.0086749

Jickells, T. (1999) The inputs of dust derived elements to the Sargasso Sea; a synthesis. *Mar. Chem.* 68, 5–14. doi:10.1016/S0304-4203(99)00061-4

Jickells, T.D., Spokes, L.J. (2001) Atmospheric Iron Inputs to the Oceans, in: Turner, D.R., Hunter, K. (Eds.), The Biogeochemistry of Iron in Seawater. Chichester, pp. 85–121.

Jickells, T.D., An, Z.S., Andersen, K.K., Baker, A. R., Bergametti, G., Brooks, N., Cao, J.J., Boyd, P.W., Duce, R.A., Hunter, K.A., Kawahata, H., Kubilay, N., LaRoche, J., Liss, P.S., Mahowald, N., Prospero, J.M., Ridgwell, A. J., Tegen, I., Torres, R. (2005) Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. *Science* 308, 67–71. doi:10.1126/science.1105959

Johansen, A.M., Siefert, R.L., Hoffmann, M.R. (2000) Chemical composition of aerosols collected over the tropical North Atlantic Ocean. *J. Geophys. Res.* 105, 15277–15312. doi:10.1029/2000JD900024

Johnson K. W., Miller, L.A., Sutherland, N.E., Wong, C.S. (2005) Iron transport by mesoscale Haida eddies in the Gulf of Alaska. *Deep Sea Res. Part II* 52, 933–953. doi:10.1016/j.dsr2.2004.08.017

Johnson, Z.I., Zinser, E.R., Coe, A., Mcnulty, N.P., Woodward, E.M.S., Chisholm, S.W. (2006) Niche Partitioning Among *Prochlorococcus* Ecotypes Along Ocean-Scale Environmental Gradients. *Science* 311, 1737–1740.

Johnson, M.S., Meskhidze, N. (2013) Atmospheric dissolved iron deposition to the global oceans: effects of oxalate-promoted Fe dissolution, photochemical redox cycling, and dust mineralogy. *Geosci. Model Dev.* 6, 1137–1155. doi:10.5194/gmd-6-1137-2013

Karl, D.M., Letelier, R.M., Hebel, D. V., Bird, D.F., Winn, C.D. (1992) *Trichodesmium* blooms and new nitrogen in the north Pacific Gyre, in: Carpenter, E.J., Capone, D.G., Rueter, J.G. (Eds.), Marine Pelagic Cyanobacteria: *Trichodesmium* and Other Diazotrophs. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Karl, D., Letelier, R., Tupas, L., Dore, J., Christian, J., Hebel, D. (1997) The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 388, 533–538.

Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., Capone, D., Carpenter, E.J., Letelier, R., Lipschultz, F., Paerl, H., Sigman, D., Stal, L.J. (2002) Dinitrogen fixation in the world 's oceans. *Biogeochemistry* 57/58, 47–98.

Kawamura, K., Kaplan, I.R.,1(987) Motor exhaust emissions as a primary source for dicarboxylic acids in Los Angeles Ambient Airt. *Environ. Sci. Technol.* 21, 105–110.

Kawamura, K., Usukura, K. (1993) Distributions of low molecular weight dicarboxylic acids in the North Pacific aerosol samples. *J. Oceanogr.* 49, 271–283. doi:10.1007/BF02269565

Kawamura, K., Sakaguchi, F. (1999) Molecular distributions of water soluble dicarboxylic acids in marine aerosols over the Pacific Ocean including tropics. *J. Geophys. Res.* 104, 3501. doi:10.1029/1998JD100041

Kieber, R.J., Skrabal, S. a, Smith, B.J., Willey, J.D. (2005) Organic complexation of Fe(II) and its impact on the redox cycling of iron in rain. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1576–83. doi:10.1021/es040439h

Kooijman, S.A.L.M. (2009) Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation, Cambridge University Press, New York

Küpper, H., Setlík, I., Seibert, S., Prásil, O., Setlikova, E., Strittmatter, M., Levitan, O., Lohscheider, J., Adamska, I., Berman-Frank, I. (2008) Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. New Phytol. 179, 784–98. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02497.x

Kustka, A.B., Sañudo-wilhelmy, S., Carpenter, E.J., Capone, D.G., Raven, J.A. (2003a) A revised estimate of the iron use efficiency of nitrogen fixation, with special reference to the marine cynobacterium *Trichodesmium* spp. (cyanophyta). J. Phycol. 39, 12–25.

Kustka, A.B., San, S.A., Carpenter, E.J., Sunda, W.G. (2003b) Iron requirements for dinitrogen- and ammonium-supported growth in cultures of *Trichodesmium* (IMS 101): Comparison with nitrogen fixation rates and iron : carbon ratios of field populations. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1869–1884.

Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B.M., Amann, R., Jørgensen, B.B., Jetten, M.S.M. (2005) Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *PNAS* 102, 6478–6483. doi:10.1073/pnas.0502088102

Lam, P.J., Bishop, J.K.B. (2008) The continental margin is a key source of iron to the HNLC North Pacific Ocean. *Geophys. Res. Lett.* 35. doi:10.1029/2008GL033294

Langlois, R.J., LaRoche, J., Raab, P.A. (2005) Diazotrophic Diversity and Distribution in the Tropical and Subtropical Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol*. 71, 7910–7919. doi:10.1128/AEM.71.12.7910

Langlois, R.J., Hümmer, D., LaRoche, J. (2008) Abundances and distributions of the dominant *nifH* phylotypes in the Northern Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1922–31. doi:10.1128/AEM.01720-07

Langlois, R.J., Mills, M.M., Ridame, C., Croot, P., LaRoche, J. (2012) Diazotrophic bacteria respond to Saharan dust additions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470, 1–14. doi:10.3354/meps10109

LaRoche, J., Breitbarth, E. (2005) Importance of the diazotrophs as a source of new nitrogen in the ocean. *J. Sea Res.* 53, 67–91. doi:10.1016/j.seares.2004.05.005

Le Moal, M., Collin, H., Biegala, I.C. (2011) Intriguing diversity among diazotrophic picoplankton along a Mediterranean transect: a dominance of rhizobia. *Biogeosciences* 8, 827–840. doi:10.5194/bg-8-827-2011

Lenes, J.M., Darrow, B.P., Cattrall, C., Heil, C.A., Callahan, M., Vargo, G.A., Byrne, R.H., Prospero, J.M., Bates, D.E., Fanning, K.A., Walsh, J.J. (2001) Iron fertilization and the *Trichodesmium* response on the West Florida shelf. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1261–1277.

Lévy, M. (2008) The modulation of biological production by oceanic mesoscale turbulence, in: Weiss, J.B., Provenzale, A. (Eds.), Transport in Geophysical Flow: Ten Years after, Lecture Notes in Physics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 219–261. doi:10.1007/978-3-540-75215-8

Lévy, M., Bopp, L., Karleskind, P., Resplandy, L., Ethe, C., Pinsard, F. (2013) Physical pathways for carbon transfers between the surface mixed layer and the ocean interior. *Global Biogeochem. Cycles* 27, 1001–1012. doi:10.1002/gbc.20092

Levy, M., Martin, a. P. (2013) The influence of mesoscale and submesoscale heterogeneity on ocean biogeochemical reactions. *Global Biogeochem. Cycles* 27, 1139–1150. doi:10.1002/2012GB004518

Lewis, B.L., Holt, P.D., Taylor, S.W., Wilhelm, S.W., Trick, C.G., Butler, A., Luther, G.W. (1995) Voltammetric estimation of iron (III) thermodynamic stability constants for catecholate siderophores isolated from marine bacteria and cyanobacteria. *Mar. Chem.* 50, 179–188.

Ludwig, M.L., Matthews, R.G. (1997) Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 269–313. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.269

Lundgren, P., Söderbäck, E., Singer, A., Carpenter, E.J., Bergman, B. (2001) *Katagnymene*: characterization of a novel marine diazotroph. *J. Phycol.* 37, 1052–1062. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.00192.x

Luo, C., Mahowald, N., Bond, T., Chuang, P.Y., Artaxo, P., Siefert, R., Chen, Y., Schauer, J. (2008) Combustion iron distribution and deposition. *Global Biogeochem. Cycles* 22. doi:10.1029/2007GB002964

Luo, Y.-W., Doney, S.C., Anderson, L.A., Benavides, M., Berman-Frank, I., Bode, A., Bonnet, S., Boström, K.H., Böttjer, D., Capone, D.G., Carpenter, E.J., Chen, Y.L., Church, M.J., Dore, J.E., Falcón, L.I., Fernández, A., Foster, R.A., Furuya, K., Gómez, F., Gundersen, K., Hynes, a. M., Karl, D.M., Kitajima, S., Langlois, R.J., LaRoche, J., Letelier, R.M., Marañón, E., McGillicuddy, D.J., Moisander, P.H., Moore, C.M., Mouriño-Carballido, B., Mulholland, M.R., Needoba, J.A., Orcutt, K.M., Poulton, a. J., Rahav, E., Raimbault, P., Rees, a. P., Riemann, L., Shiozaki, T., Subramaniam, A., Tyrrell, T., Turk-Kubo, K.A., Varela, M., Villareal, T.A., Webb, E.A., White, A. E., Wu, J., Zehr, J.P. (2012) Database of diazotrophs in global ocean: abundance, biomass and nitrogen fixation rates. *Earth Syst. Sci. Data* 4, 47–73. doi:10.5194/essd-4-47-2012

Luo, Y.-W., Lima, I.D., Karl, D.M., Deutsch, C. A., Doney, S.C., 2014. Data-based assessment of environmental controls on global marine nitrogen fixation. *Biogeosciences* 11, 691–708. doi:10.5194/bg-11-691-2014

Mahaffey, C., Michaels, A.F., Capone, D.G. (2005) The conundrum of marine N_2 fixation. *Am. J. sci.* 305, 546–595.

Maher, B. A., Prospero, J.M., Mackie, D., Gaiero, D., Hesse, P.P., Balkanski, Y. (2010) Global connections between aeolian dust, climate and ocean biogeochemistry at the present day and at the last glacial maximum. *Earth-Science Rev.* 99, 61–97. doi:10.1016/j.earscirev.2009.12.001

Mahowald, N., Kohfeld, K., Hansson, M., Balkanski, Y., Harrison, S.P., Prentice, I.C., Schulz, M., Rodhe, H. (1999) Dust sources and deposition during the last glacial maximum and current climate: A comparison of model results with paleodata from ice cores and marine sediments. *J. Geophys. Res. Atmos.* 104, 15895–15916. doi:10.1029/1999JD900084

Mahowald, N.M., 2007. Anthropocene changes in desert area: Sensitivity to climate model predictions. *Geophys. Res. Lett.* 34, L18817. doi:10.1029/2007GL030472

Mahowald, N.M., Baker, A.R., Bergametti, G., Brooks, N., Duce, R. A., Jickells, T.D., Kubilay, N., Prospero, J.M., Tegen, I. (2005) Atmospheric global dust cycle and iron inputs to the ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 19. doi:10.1029/2004GB002402

Mahowald, N.M., Engelstaedter, S., Luo, C., Sealy, A., Artaxo, P., Benitez-Nelson, C., Bonnet, S., Chen, Y., Chuang, P.Y., Cohen, D.D., Dulac, F., Herut, B., Johansen, A.M., Kubilay, N., Losno, R., Maenhaut, W., Paytan, A., Prospero, J.M., Shank, L.M., Siefert, R.L. (2009) Atmospheric iron deposition: global distribution, variability, and human perturbations. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 1, 245–278. doi:10.1146/annurev.marine.010908.163727

Marañón, E., Fernandez, A., Mouriño-Carballido, B., Martinez-Garci, S., Teira, E., et al. (2010) Degree of oligotrophy controls the response of microbial plankton to Saharan dust. *Limnol. Oceanogr*. 55, 2339–2352. doi:10.4319/lo.2010.55.6.2339

Marticorena, B., Bergametti, G. (1995) Modeling the atmospheric dust cycle: 1. Design of a soil-derived dust emission scheme. *J. Geophys. Res.* 100, 16415–16430. doi:10.1029/95JD00690

Martin, J.H., Fitzwater, S.E. (1988) Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature* 331, 341–343.

Martin, J.H., 1990. Glacial-interglacial CO_2 change: the iron hypothesis. *Paleoceanography* 5, 1–13.

Martin, J.H., Gordon, R.M., Fitzwater, S.E. (1990) Iron in Antarctic waters. *Nature* 435, 156–158.

Mather, R.L., Reynolds, S.E., Wolff, G. A., Williams, R.G., Torres-Valdes, S., Woodward, E.M.S., Landolfi, A., Pan, X., Sanders, R., Achterberg, E.P. (2008) Phosphorus cycling in the North and South Atlantic Ocean subtropical gyres. *Nat. Geosci.* 1, 439–443. doi:10.1038/ngeo232

Millero, F.J., Sotolongo, S., Izaguirre, M. (1987) The oxidation kinetics of Fe(II) in seawater. *Geochemica Cosmochim. acta* 51, 793–801.

Millero, F.J., Yao, W., Aicher, J. (1995) The speciation of Fe (II) and Fe (III) in natural waters. *Mar. Chem.* 50, 21–39.

Milligan, A.J., Berman-Frank, I., Gerchman, Y., Dismukes, G.C., Falkowski, P.G. (2007) Light-dependent oxygen consumption in nitrogen-fixing cyanobacteria plays a key role in nitrogenase protection. *J. Phycol.* 43, 845–852. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00395.x

Mills, M.M., Ridame, C., Davey, M., LaRoche, J., Geider, R.J. (2004) Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* 429, 292–4. doi:10.1038/nature02550

Mohr, W., Intermaggio, M.P., LaRoche, J. (2010a) Diel rhythm of nitrogen and carbon metabolism in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH8501. *Environ. Microbiol.* 12, 412–21. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02078.x

Mohr, W., Großkopf, T., Wallace, D.W.R., LaRoche, J. (2010b) Methodological underestimation of oceanic nitrogen fixation rates. *Plos one* 5, e12583. doi:10.1371/journal.pone.0012583

Mohr, W., Vagner, T., Kuypers, M.M.M., Ackermann, M., LaRoche, J. (2013) Resolution of Conflicting Signals at the Single-Cell Level in the Regulation of Cyanobacterial Photosynthesis and Nitrogen Fixation. *Plos one* 8, e66060. doi:10.1371/journal.pone.0066060

Moisander, P.H., Beinart, R.A., Hewson, I., White, A.E., Johnson, K.S., Carlson, C.A., Montoya, J.P., Zehr, J.P. (2010) Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N_2 fixation domain. *Science* 327, 1512–1514. doi:10.1126/science.1185468

Moisander, P.H., Zhang, R., Boyle, E.A., Hewson, I., Montoya, J.P., Zehr, J.P. (2012) Analogous nutrient limitations in unicellular diazotrophs and *Prochlorococcus* in the South Pacific Ocean. *ISME J*. 6, 733–44. doi:10.1038/ismej.2011.152

Monteiro, F.M., Follows, M.J., Dutkiewicz, S. (2010) Distribution of diverse nitrogen fixers in the global ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 24, GB3017. doi:10.1029/2009GB003731

Montoya, J.P., Voss, M., Kahler, P., Capone, D.G. (1996) A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N_2 fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 986–993.

Montoya, J.P., Holl, C.M., Zehr, J.P. (2004) High rates of N_2 fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430, 1027–1031. doi:10.1038/nature02744.1.

Moore, C.M., Mills, M.M., Langlois, R., Milne, A., Achterberg, E.P., LaRoche, J., Geider, R.J. (2008) Relative influence of nitrogen and phosphorus availability on phytoplankton physiology and productivity in the oligotrophic sub-tropical North Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 53, 291–305.

Moore, C.M., Mills, M.M., Achterberg, E.P., Geider, R.J., LaRoche, J., Lucas, M.I., McDonagh, E.L., Pan, X., Poulton, A.J., Rijkenberg, M.J.A., Suggett, D.J., Ussher, S.J., Woodward, E.M.S. (2009) Large-scale distribution of Atlantic nitrogen fixation controlled by iron availability. *Nat. Geosci*. 2, 867–871. doi:10.1038/ngeo667

Moore, J.K., Doney, S.C., Lindsay, K. (2004) Upper ocean ecosystem dynamics and iron cycling in a global three-dimensional model. *Global Biogeochem. Cycles* 18, GB4028. doi:10.1029/2004GB002220

Moore, J.K., Braucher, O. (2008) Sedimentary and mineral dust sources of dissolved iron to the world ocean. *Biogeosciences* 5, 631–656.

Moore, L.R., Post, A.F., Rocap, G., Chisholm, S.W. (2002) Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Limnol. Oceanogr.* 47, 989–996.

Morel, A., Claustre, H., Gentili, B. (2010) The most oligotrophic subtropical zones of the global ocean: similarities and differences in terms of chlorophyll and yellow substance. *Biogeosciences* 7, 3139–3151. doi:10.5194/bg-7-3139-2010

Morel, F.M.M., Kustka, A.B., Shaked, Y. (2008) The role of unchelated Fe in the iron nutrition of phytoplankton. *Limnol. Ocean.* 53, 400–404.

Mouriño-Carballido, B., Graña, R., Fernández, A., Bode, A., Varela, M., Domínguez, J.F., Escánez, J., de Armas, D., Marañón, E. (2011) Importance of N_2 fixation vs. nitrate eddy diffusion along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 56, 999–1007. doi:10.4319/lo.2011.56.3.0999

Moutin, T., Van Den B, B., Beker, B., Dupouy, C., Rimmelin, P., Le Bouteiller, A. (2005) Phosphate availability controls *Trichodesmium* spp. biomass in the SW Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 297, 15–21. doi:10.3354/meps297015

Mulholland, M.R., Floge, S., Carpenter, E.J., Capone, D.G. (2002) Phosphorus dynamics in cultures and natural populations of *Trichodesmium* spp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 239, 45–55. doi:10.3354/meps239045

Mulholland, M.R. (2004) Dinitrogen fixation and release of ammonium and dissolved organic nitrogen by *Trichodesmium* IMS 101. *Aquat. Microb. Ecol.* 37, 85–94. doi:10.3354/ame037085

Mulholland, M.R., Bernhardt, P.W. (2005) The effect of growth rate, phosphorus concentration, and temperature on N_2 fixation, carbon fixation, and nitrogen release in continuous cultures of *Trichodesmium* IMS101. *Limnol. Oceanogr.* 50, 839–849. doi:10.4319/lo.2005.50.3.0839

Murphy, J., Riley, J. (1962) A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 26, 31–36.

Needoba, J.A., Foster, R.A., Sakamoto, C., Zehr, J.P., Johnson, K.S. (2007) Nitrogen fixation by unicellular diazotrophic cyanobacteria in the temperate oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 52, 1317–1327. doi:10.4319/lo.2007.52.4.1317

Neuer, S., Torres-Padrón, M.E., Gelado-Caballero, M.D., Rueda, M.J., Hernández-Brito, J., Davenport, R., Wefer, G. (2004) Dust deposition pulses to the eastern subtropical North

Atlantic gyre: Does ocean's biogeochemistry respond? Global Biogeochem. Cycles 18, GB4020. doi:10.1029/2004GB002228

Nishioka, J., Takeda, S., Wong, C., Johnson, W. (2001) Size-fractionated iron concentrations in the northeast Pacific Ocean: distribution of soluble and small colloidal iron. *Mar. Chem.* 74, 157–179. doi:10.1016/S0304-4203(01)00013-5

Okochi, H., Brimblecombe, P. (2002) Potential trace metal-organic complexation in the atmosphere. *ScientificWorldJournal*. 2, 767–786. doi:10.1100/tsw.2002.132

Paris, R. (2011) Etude de l'impact de la complexation organique atmosphérique sur la solubilité du fer terrigène. Thèse de doctorat, Université Paris Diderot.

Paris, R., Desboeufs, K.V., Journet, E. (2011) Variability of dust iron solubility in atmospheric waters: Investigation of the role of oxalate organic complexation. *Atmos. Environ.* 45, 6510–6517. doi:10.1016/j.atmosenv.2011.08.068

Paris, R., Desboeufs, K. V. (2013) Effect of atmospheric organic complexation on iron-bearing dust solubility. *Atmos. Chem. Phys.* 13, 4895–4905. doi:10.5194/acp-13-4895-2013

Poulton, S.W., Raiswell, R. (2002) The low-temperature geochemical cycle of iron: from continental fluxs to marine sediment deposition. *Am. J. Sci.* 302, 774–805.

Price, N.M., Harrison, G.I., Hering, J.G., Hudson, R.J., Nirel, P.M. V., Palenik, B., Morel, F.M. (1989) Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium alquil. *Biol. Oceanogr.* 6, 443–461.

Prospero, A.J.M., Barrett, K., Church, T., Dentener, F., Duce, R.A., Galloway, J.N., Ii, L., Moody, J., Quinn, P. (1996) Atmospheric deposition of nutrients to the North Atlantic Basin. *Biogeochemistry* 35, 27–73.

Pustizzi, F., MacIntyre, H., Warner, M.E., Hutchins, D.A. (2004) Interaction of nitrogen source and light intensity on the growth and photosynthesis of the brown tide alga *Aureococcus anophagefferens*. *Harmful Algae* 3, 343–360. doi:10.1016/j.hal.2004.06.006

R core team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Rahav, E., Herut, B., Stambler, N., Bar-Zeev, E., Mulholland, M.R., Berman-Frank, I. (2013) Uncoupling between dinitrogen fixation and primary productivity in the eastern Mediterranean *Sea. J. Geophys. Res. Biogeosciences* 118, 195–202. doi:10.1002/jgrg.20023

Ras, J., Claustre, H., Uitz, J. (2008) Spatial variability of phytoplankton pigment distributions in the Subtropical South Pacific Ocean : comparison between in situ and predicted data. *Biogeosciences* 5, 353–369.

Raux, E., Schubert, H.L., Warren, M.J. (2000) Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1880–93.

Raven, J.A. (1988) The Iron and Molybdenum use efficiencies of Plant Growth with Different Energy, Carbon and Nitrogen Sources. *New Phytol.* 109, 279–287.

Raven, J.A. (1990) Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathway. *New Phytol.* 116, 1–18. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00505.x

Redfield, A.C. (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am. Sci.* 46, 205–221.

Richier, S., Macey, A.I., Pratt, N.J., Honey, D.J., Moore, C.M., Bibby, T.S. (2012) Abundances of iron-binding photosynthetic and nitrogen-fixing proteins of *Trichodesmium* both in culture and in situ from the North Atlantic. Plos one 7, e35571. doi:10.1371/journal.pone.0035571

Ridame, C., Guieu, C. (2002) Saharan input of phosphate to the oligotrophic water of the open western Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 47, 856–869.

Ridame, C., Moutin, T., Guieu, C. (2003) Does phosphate adsorption onto Saharan dust explain the unusual N/P ratio in the Mediterranean Sea? *Oceanol. Acta* 26, 629–634. doi:10.1016/S0399-1784(03)00061-6

Ridame, C., Le Moal, M., Guieu, C., Ternon, E., Biegala, I.C., L'Helguen, S., Pujo-Pay, M. (2011) Nutrient control of N_2 fixation in the oligotrophic Mediterranean Sea and the impact of Saharan dust events. *Biogeosciences* 8. doi:10.5194/bg-8-1-2011

Ridame, C., Guieu, C., L'Helguen, S. (2013) Strong stimulation of N_2 fixation in oligotrophic Mediterranean Sea: results from dust addition in large in situ mesocosms. *Biogeosciences* 7333–7346. doi:10.5194/bg-10-7333-2013

Ridame, C., Dekaezemacker, J., Guieu, C., Bonnet, S., L'Helguen, S., Malien, F. (2014) Phytoplanktonic response to contrasted Saharan dust deposition events during mesocosm experiments in LNLC environment. *Biogeosciences Discuss.* 11, 753–796. doi:10.5194/bgd-11-753-2014

Riemann, L., Farnelid, H., Steward, G.F. (2010) Nitrogenase genes in non-cyanobacterial plankton: prevalence, diversity and regulation in marine waters. *Aquat. Microb. Ecol.* 61, 235–247. doi:10.3354/ame01431

Rijkenberg, M.J.A., Steigenberger, S., Powell, C.F., van Haren, H., Patey, M.D., Baker, A.R., Achterberg, E.P. (2012) Fluxes and distribution of dissolved iron in the eastern (sub-) tropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 26. doi:10.1029/2011GB004264

Rochelle-Newall, E., Ridame, C., Dimier-Hugueney, C., L'Helguen, S. (2014) Impact of iron limitation on primary production (dissolved and particulate) and secondary production in cultured *Trichodesmium* sp. Aquat. Microb. Ecol. sous presse.

Roe, K.L., Barbeau, K., Mann, E.L., Haygood, M.G. (2012) Acquisition of iron by *Trichodesmium* and associated bacteria in culture. *Environ. Microbiol*. 14, 1681–95. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02653.x

Rubin, M., Berman-frank, I., Shaked, Y. (2011). Dust- and mineral-iron utilization by the marine dinitrogen-fixer *Trichodesmium*. *Nat. Geosci.* 4, 529–534. doi:10.1038/NGEO1181

Rue, E., Bruland, K. (1995) Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Mar. Chem.* 50, 117–138. doi:10.1016/0304-4203(95)00031-L

Rueter, J.G., Ohki, K., Fujita, Y. (1990) The effect of iron nutrition on photosynthesis and nitrogen fixation in cultures of *Trichodesmium* (cyanophyceae). *J. Phycol*. 26, 30–35.

Saito, M.A., Bertrand, E.M., Dutkiewicz, S., Bulygin, V. V, Moran, D.M., Monteiro, F.M., Follows, M.J., Valois, F.W., Waterbury, J.B. (2011) Iron conservation by reduction of metalloenzyme inventories in the marine diazotroph *Crocosphaera watsonii*. PNAS 108, 2184–2189. doi:10.1073/pnas.1006943108

Sañudo-Wilhelmy, S.A., Kustka, A.B., Gobler, C.J., Hutchins, D.A., Yang, M., Lwiza, K., Burns, J., Capone, D.G., Raven, J. a, Carpenter, E.J. (2001) Phosphorus limitation of nitrogen fixation by *Trichodesmium* in the central Atlantic Ocean. *Nature* 411, 66–69. doi:10.1038/35075041

Sarmiento, J.L., Gruber, N. (2006) Ocean Biogeochemical Dynamics. Princeton University Press

Sarthou, G., Baker, A.R., Blain, S., Achterberg, E.P., Boye, M., Bowie, A.R., Croot, P., Laan, P., Baar, H.J.W. De, Jickells, T.D., Worsfold, P.J. (2003) Atmospheric iron deposition and sea-surface dissolved iron concentrations in the eastern Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. I* 50, 1339–1352. doi:10.1016/S0967-0637(03)00126-2

Saydam, A.C., Senyuva, H.Z. (2002) Deserts : Can they be the potential suppliers of bioavailable iron ? *Geophys. Res. Lett.* 29, 18–20. doi:10.1029/2001GL013562

Schlosser, C., Klar, J.K., Wake, B.D., Snow, J.T., Honey, D.J., Woodward, E.M.S., Lohan, M.C., Achterberg, E.P., Moore, C.M. (2014) Seasonal ITCZ migration dynamically controls the location of the (sub)tropical Atlantic biogeochemical divide. *PNAS* 111, 1438–42. doi:10.1073/pnas.1318670111

Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Nayar, S., Sherman, L.A. (1994) Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J. Bacteriol.* 176, 1586–1597.

Schneider, C. a, Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089

Sedwick, P., Blain, S., Quéguiner, B., Griffiths, F., Fiala, M., Bucciarelli, E., Denis, M. (2002) Resource limitation of phytoplankton growth in the Crozet Basin, Subantarctic Southern Ocean. *Deep Sea Res. Part II* 49, 3327–3349. doi:10.1016/S0967-0645(02)00086-3

Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M., Dean, D.R. (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 701–722. doi:10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812

Sempéré, R., Kawamura, K. (1996) Low molecular weight dicarboxylic acids and related polar compounds in the remote marine rain samples collected from Western Pacific. *Atmos. Environ. 30*, 1609–1619. doi:10.1016/1352-2310(95)00436-X

Shaked, Y., Kustka, A.B., Morel, F.M.M. (2005) A general kinetic model for iron acquisition by eukaryotic phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 50, 872–882.

Shaked, Y., Xu, Y., Leblanc, K., Morel, F.M.M. (2006) Zinc availability and alkaline phosphatase activity in *Emiliania huxleyi*: Implications for Zn-P co-limitation in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 51, 299–309. doi:10.4319/lo.2006.51.1.0299

Shaked, Y., Lis, H. (2012) Disassembling iron availability to phytoplankton. *Front. Microbiol.* 3, 123. doi:10.3389/fmicb.2012.00123

Shi, D., Kranz, S.A., Kim, J., Morel, F.M.M. (2012) Ocean acidification slows nitrogen fixation and growth in the dominant diazotroph *Trichodesmium* under low-iron conditions *PNAS* 109. doi:10.1073/pnas.1216012109

Shi, T., Sun, Y., Falkowski, P.G. (2007) Effects of iron limitation on the expression of metabolic genes in the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *Environ. Microbiol.* 9, 2945–2956. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01406.x

Shi, T., Ilikchyan, I., Rabouille, S., Zehr, J.P. (2010) Genome-wide analysis of diel gene expression in the unicellular N_2-fixing cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH 8501. *ISME J.* 4, 621–32. doi:10.1038/ismej.2009.148

Shi, Z., Krom, M.D., Jickells, T.D., Bonneville, S., Carslaw, K.S., Mihalopoulos, N., Baker, A.R., Benning, L.G. (2012) Impacts on iron solubility in the mineral dust by processes in the source region and the atmosphere: *A review. Aeolian Res*. 5, 21–42. doi:10.1016/j.aeolia.2012.03.001

Sigg, L., Behra, P., Stumm, W. (2006) Chimie des milieux aquatiques, Dunod.

Sigman, D.M., Boyle, E.A. (2000) Glacial/interglacial variations in atmospheric carbon dioxide. *Nature* 407, 859–869.

Sohm, J.A., Mahaffey, C., Capone, D.G. (2008) Assessment of relative phosphorus limitation of *Trichodesmium* spp. in the North Pacific, North Atlantic, and the north coast of Australia. *Limnol. Oceanogr.* 53, 2495–2502. doi:10.4319/lo.2008.53.6.2495

Sohm, J.A., Edwards, B.R., Wilson, B.G., Webb, E.A. (2011) Constitutive extracellular polysaccharide (EPS) production by specific isolates of *Crocosphaera watsonii*. Front. Microbiol. 2, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2011.00229

Spungin, D., Berman-Frank, I., Levitan, O. (2014) *Trichodesmium*'s strategies to alleviate phosphorus limitation in the future acidified oceans. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.12424

Stal, L.J. (2009) Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? *Environ. Microbiol.* 11, 1632–1645. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00016.x

Stanley, J., Byrne, R. (1990) Inorganic complexation of Zinc (II) in seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54, 753–760. doi:10.1016/0016-7037(90)90370-Z

Steinberg, M., Bada, J.L. (1984) Oxalic , glyoxalic and pyruvic acids in eastern Pacific Ocean waters. *J. Mar. Res.* 42, 697–708.

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. (1972) A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bull. Fish. Res. BD. Can.

Subramaniam, A., Mahaffey, C., Johns, W., Mahowald, N. (2013) Equatorial upwelling enhances nitrogen fixation in the Atlantic Ocean. *Geophys. Res. Lett.* 40, 1766–1771. doi:10.1002/grl.50250

Sunda, W.G., Huntsman, S.A. (1995) Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Mar. Chem.* 50, 189–206. doi:10.1016/0304-4203(95)00035-P

Sunda, W.G., Huntsman, S.A. (1997) Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature* 390, 389–392.

Sunda, W.G., (2001) Bioavailability and bioaccumulation of iron in the seas, in: Turner, D.R., Hunter, K.A. (Eds.), The Biogeochemistry of Iron in Seawater. Wiley, Chichester, pp. 41–84.

Sunda, W.G., Huntsman, S.A. (2003) Effect of pH, light, and temperature on Fe–EDTA chelation and Fe hydrolysis in seawater. *Mar. Chem*. 84, 35–47. doi:10.1016/S0304-4203(03)00101-4

Sunda, W., Price, N., Morel, F. (2005) Trace metal ion buffers and their use in culture studies, in: Andersen, R.A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Acad. Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 35–63.

Sunda, W.G. (2012) Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00204

Tagliabue, A., Bopp, L., Dutay, J.-C., Bowie, A.R., Chever, F., Jean-Baptiste, P., Bucciarelli, E., Lannuzel, D., Remenyi, T., Sarthou, G., Aumont, O., Gehlen, M., Jeandel, C. (2010) Hydrothermal contribution to the oceanic dissolved iron inventory. *Nat. Geosci.* 3, 252–256. doi:10.1038/ngeo818

Takeda, S. (1998) Influence of iron availability on nutrient consumption ratio of diatoms in oceanic waters. *Nature* 393, 774–777.

Taniuchi, Y., Chen, Y.L., Chen, H.-Y., Tsai, M.-L., Ohki, K. (2012) Isolation and characterization of the unicellular diazotrophic cyanobacterium Group C TW3 from the tropical western Pacific *Ocean. Environ. Microbiol.* 14, 641–654. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02606.x

Tedetti, M., Kawamura, K., Charrière, B., Chevalier, N., Sempéré, R. (2006) Determination of low molecular weight dicarboxylic and ketocarboxylic acids in seawater samples. *Anal. Chem.* 78, 6012–6018. doi:10.1021/ac052226w

Thompson, A.W., Foster, R.A., Krupke, A., Carter, B.J., Musat, N., Vaulot, D., Kuypers, M.M.M., Zehr, J.P. (2012) Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* 337, 1546–1550. doi:10.1126/science.1222700

Thompson, A.W., Zehr, J.P. (2013) Cellular interactions: lessons from the nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.* 49, 1024–1035. doi:10.1111/jpy.12117

Toulza, E., Tagliabue, A., Blain, S., Piganeau, G. (2012) Analysis of the global ocean sampling (GOS) project for trends in iron uptake by surface ocean microbes. Plos one 7, e30931. doi:10.1371/journal.pone.0030931

Tripp, H.J., Bench, S.R., Turk, K.A., Foster, R.A., Desany, B.A., Niazi, F., Affourtit, J.P., Zehr, J.P. (2010) Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature* 464, 90–94. doi:10.1038/nature08786

Troussellier, M., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P. (1999) Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiol. Ecol*. 29, 319–330.

Tsuda, A., Takeda, S., Saito, H., Nishioka, J., Nojiri, Y., Kudo, I., Kiyosawa, H., Shiomoto, A., Imai, K., Ono, T., Shimamoto, A., Tsumune, D., Yoshimura, T., Aono, T., Hinuma, A., Kinugasa, M., Suzuki, K., Sohrin, Y., Noiri, Y., Tani, H., Deguchi, Y., Tsurushima, N., Ogawa, H., Fukami, K., Kuma, K., Saino, T. (2003) A mesoscale iron enrichment in the western subarctic Pacific induces a large centric diatom bloom. *Science* 300, 958–961. doi:10.1126/science.1082000

Tuit, C., Waterbury, J., Ravizza, G. (2004) Diel variation of molybdenum and iron in marine diazotrophic cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* 49, 978–990. doi:10.4319/lo.2004.49.4.0978

Turk-Kubo, K.A., Achilles, K.M., Serros, T.R.C., Ochiai, M., Montoya, J.P., Zehr, J.P. (2012) Nitrogenase (*nifH*) gene expression in diazotrophic cyanobacteria in the Tropical North Atlantic in response to nutrient amendments. *Front. Microbiol.* 3, 386. doi:10.3389/fmicb.2012.00386

Varela, M.M., Bode, A., Fernández, E., Gónzalez, N., Kitidis, V., Varela, M., Woodward, E.M.S. (2005) Nitrogen uptake and dissolved organic nitrogen release in planktonic communities characterised by phytoplankton size–structure in the Central Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. Part I* 52, 1637–1661. doi:10.1016/j.dsr.2005.03.005

Visser, F., Gerringa, L.J.A., Van Der Gaast, S.J., De Baar, H.J.W., Timmermans, K.R. (2003) The role of the reactivity and content of iron of aerosol dust on growth rates of two antarctic diatom species. *J. Phycol.* 39, 1085–1094.

Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B., Sprent, J.I. (2002) Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57, 1–45.

Wagener, T., Guieu, C., Leblond, N. (2010) Effects of dust deposition on iron cycle in the surface Mediterranean Sea: results from a mesocosm seeding experiment. *Biogeosciences* 7, 3769–3781. doi:10.5194/bg-7-3769-2010

Waite, D.T. (2001) in: Turner, P.J., Hunter, K. a (Eds.), The Biogeochemistry of Iron in Seawater. Wiley, Chichester, pp. 291–342.

Wang, W., Dei, R.C.H. (2003) Bioavailability of iron complexed with organic colloids to the cyanobacteria *Synechococcus* and *Trichodesmium*. *Aquat. Microb. Ecol.* 33, 247–259. doi:10.3354/ame033247

Warneck, P. (2003) In-cloud chemistry opens pathway to the formation of oxalic acid in the marine atmosphere. *Atmos. Environ.* 37, 2423–2427. doi:10.1016/S1352-2310(03)00136-5

Waterbury, J.B., Rippka, R. (1989) The order *Chroococcales*, in: Krieg, N.R., Holt, J.B. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3. pp. 1728–1746.

Webb, E.A., Moffett, J.W., Waterbury, J.B. (2001) Iron stress in open-ocean cyanobacteria identification of the IdiA protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5444–5452. doi:10.1128/AEM.67.12.5444

Webb, E.A., Ehrenreich, I.M., Brown, S.L., Valois, F.W., Waterbury, J.B. (2009) Phenotypic and genotypic characterization of multiple strains of the diazotrophic cyanobacterium, *Crocosphaera watsonii*, isolated from the open ocean. *Environ. Microbiol.* 11, 338–48. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01771.x

Weiss R.F. (1970) The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Res.* 17 :721-735.

Whittaker, S., Bidle, K.D., Kustka, A.B., Falkowski, P.G. (2011) Quantification of nitrogenase in *Trichodesmium* IMS 101: implications for iron limitation of nitrogen fixation in the ocean. *Environ. Microbiol. Rep*. 3, 54–58. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00187.x

Wilhelm, S.W., Trick, C.G. (1994) Iron-limited growth of cyanobacteria : Multiple siderophore production is a common response. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1979–1984.

Willey, J.D., Kieber, R.J., Eyman, M.S., Brooks Avery, G. (2000) Rainwater dissolved organic carbon: Concentrations and global flux. *Global Biogeochem. Cycles* 14, 139–148.

Wilson, S.T., Böttjer, D., Church, M.J., Karl, D.M. (2012) Comparative assessment of nitrogen fixation methodologies, conducted in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6516–6523. doi:10.1128/AEM.01146-12

Wu, J., Sunda, W., Boyle, E.A., Karl, D.M. (2000) Phosphate depletion in the western north Atlantic ocean. *Science* 289, 759–762.

Yogev, T., Rahav, E., Bar-Zeev, E., Man-Aharonovich, D., Stambler, N., Kress, N., Béjà, O., Mulholland, M.R., Herut, B., Berman-Frank, I. (2011) Is dinitrogen fixation significant in the Levantine Basin, East Mediterranean Sea? *Environ. Microbiol.* 13, 854–871. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02402.x

Zehr, J.P., Mellon, M.T., Zani, S. (1998) New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3444–3450.

Zehr, J.P., Waterbury, J.B., Turner, P.J., Montoya, J.P., Omoregie, E., Steward, G.F., Hansen, A., Karl, D.M. (2001) Unicellular cyanobacteria fix N_2 in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 412, 635–638. doi:10.1038/35088063

Zehr, J.P., Methe, B., Foster, R. (2005) New nitrogen-fixing microorganisms from the oceans: biological aspects and global implications, in: Wang, Y.P., Lin, M., Tian, Z., Elmerich, C., Newton, W.E. (Eds.), Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment Proceedings of the 14th International Nitrogen Fixation Congress. Springer, Dordrecht, pp. 361–365.

Zehr, J.P., Bench, S.R., Mondragon, E.A., McCarren, J., DeLong, E.F. (2007a) Low genomic diversity in tropical oceanic N_2-fixing cyanobacteria. *PNAS* 104, 17807–12. doi:10.1073/pnas.0701017104

Zehr, J.P., Montoya, J.P., Jenkins, B.D., Hewson, I., Mondragon, E., Short, C.M., Church, M.J., Hansen, A., Karl, D.M. (2007b) Experiments linking nitrogenase gene expression to nitrogen fixation in the North Pacific subtropical gyre. *Limnol. Oceanogr.* 52, 169–183. doi:10.4319/lo.2007.52.1.0169

Zehr, J.P., Bench, S.R., Carter, B.J., Hewson, I., Niazi, F., Shi, T., Tripp, H.J., Affourtit, J.P. (2008) Globally distributed uncultivated oceanic N_2-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. Science 322, 1110–1112. doi:10.1126/science.1165340

Zehr, J.P. (2011) Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 19, 162–73. doi:10.1016/j.tim.2010.12.004

Annexes

Annexe 1. Publication des résultats présentés dans le chapitre 1 :

Violaine Jacq, Céline Ridame, Stéphane L'Helguen, Fanny Kaczmar, Alain Saliot (2014) Response of the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* to iron limitation.

Plos one. Volume 9 - Issue 1:e86749

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

Response of the Unicellular Diazotrophic Cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* to Iron Limitation

Violaine Jacq[1]*, Céline Ridame[1], Stéphane L'Helguen[2], Fanny Kaczmar[1], Alain Saliot[1]

1 Université Pierre et Marie Curie, UMR LOCEAN -IPSL/CNRS/IRD/MNHN, Paris, France, **2** Université de Brest, CNRS/IRD, UMR 6539, LEMAR, OSU-IUEM, Plouzané, France

Abstract

Iron (Fe) is widely suspected as a key controlling factor of N_2 fixation due to the high Fe content of nitrogenase and photosynthetic enzymes complex, and to its low concentrations in oceanic surface seawaters. The influence of Fe limitation on the recently discovered unicellular diazotrophic cyanobacteria (UCYN) is poorly understood despite their biogeochemical importance in the carbon and nitrogen cycles. To address this knowledge gap, we conducted culture experiments on *Crocosphaera watsonii* WH8501 growing under a range of dissolved Fe concentrations (from 3.3 to 403 nM). Overall, severe Fe limitation led to significant decreases in growth rate (2.6-fold), C, N and chlorophyll *a* contents per cell (up to 4.1-fold), N_2 and CO_2 fixation rates per cell (17- and 7-fold) as well as biovolume (2.2-fold). We highlighted a two phased response depending on the degree of limitation: (i) under a moderate Fe limitation, the biovolume of *C. watsonii* was strongly reduced, allowing the cells to keep sufficient energy to maintain an optimal growth, volume-normalized contents and N_2 and CO_2 fixation rates; (ii) with increasing Fe deprivation, biovolume remained unchanged but the entire cell metabolism was affected, as shown by a strong decrease in the growth rate, volume-normalized contents and N_2 and CO_2 fixation rates. The half-saturation constant for growth of *C. watsonii* with respect to Fe is twice as low as that of the filamentous *Trichodesmium* indicating a better adaptation of *C. watsonii* to poor Fe environments than filamentous diazotrophs. The physiological response of *C. watsonii* to Fe limitation was different from that previously shown on the UCYN *Cyanothece* sp, suggesting potential differences in Fe requirements and/or Fe acquisition within the UCYN community. These results contribute to a better understanding of how Fe bioavailability can control the activity of UCYN and explain the biogeography of diverse N_2 fixers in ocean.

Citation: Jacq V, Ridame C, L'Helguen S, Kaczmar F, Saliot A (2014) Response of the Unicellular Diazotrophic Cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* to Iron Limitation. PLoS ONE 9(1): e86749. doi:10.1371/journal.pone.0086749

Editor: Douglas Andrew Campbell, Mount Allison University, Canada

Received July 19, 2013; **Accepted** December 15, 2013; **Published** January 21, 2014

Copyright: © 2014 Jacq et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by CNRS (http://www.cnrs.fr/) and University Pierre et Marie Curie (http://www.upmc.fr/) funding. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: violaine.jacq@locean-ipsl.upmc.fr

Introduction

In oligotrophic oceanic regions, bioavailable nitrogen (N) concentrations are sufficiently low that they set a constraint on primary productivity [1]. Diazotrophic cyanobacteria are not affected by N limitation due to their ability to use the dinitrogen (N_2) dissolved in oceanic surface waters as an alternative source of N. As N_2 represents an effectively unlimited resource of N, the N_2 fixation ability confers a major ecological advantage to diazotrophic cyanobacteria relative to non-diazotrophic phytoplankton in N depleted tropical and subtropical waters [2]. On a global scale, N_2 fixation represents the largest source of newly-fixed N to the open ocean (120 TgN yr^{-1} [3]), supporting a part of new primary production and influencing the N and carbon (C) cycles [4,5]. In the tropical and subtropical North Atlantic and Pacific oceans, N_2 fixation is estimated to support up to half of the new and export production [5,6], playing a key role in the uptake of atmospheric CO_2 by increasing the strength of the biological pump.

Among environmental factors constraining the distribution of diazotrophic cyanobacteria and the magnitude of N_2 fixation, iron (Fe) is widely believed to be a key controlling factor as the nitrogenase enzyme complex involved in intracellular N_2 reduction in NH_3 is Fe rich [7]. Furthermore, the high energetic cost of N_2 fixation imposes an additional Fe requirement for increase photosynthetic capacity [8,9]. The extremely low Fe solubility in oxic seawater [10] led to dissolved Fe (dFe) concentrations lower than about 1 nM in the open surface ocean [11–13], resulting in the potential limiting role of Fe for marine diazotrophic cyanobacteria. The effects of Fe limitation on the growth and N_2 fixation of the filamentous marine diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* sp. have been widely evidenced both in artificial [14–16] and natural [17] environments. *Trichodesmium* sp. had been assumed to be the dominant N_2-fixing organism in the open ocean [18,19] until the recent discovery of unicellular diazotrophic cyanobacteria (UCYN, including UCYN-A, -B and -C [20]). Field measurements have highlighted that N_2 fixation rates associated with UCYN probably equal or exceed those associated with *Trichodesmium* sp. at regional scale [4]. N_2 fixation rates associated with UCYN were estimated to be up to 75% of the total N_2 fixation rate in the equatorial Western Pacific under stratified conditions [21]. On a global scale, recent biogeochemical models attribute about 50% of the total oceanic N_2 fixation rate to

unicellular analogues [22]. Despite the biogeochemical importance of UCYN, their controlling factors remain poorly known. To date, only one open ocean UCYN species is available in culture: *Crocosphaera watsonii* (UCYN-B). Culture-based and field experiments have shown that light [23,24], temperature [24,25] and phosphorus [26–29] can control the growth of *Crocosphaera*, but the effects of Fe limitation on UCYN have been poorly investigated. The few studies conducted on the impact of Fe limitation on *C. watsonii* highlighted notable change in expression of several proteins under Fe stress [30,31]. Decreases in the N_2 fixation and growth rates of *C. watsonii* have been observed in one Fe-limited culture [32] and recent field enrichment experiments in the tropical Atlantic and Pacific have revealed that abundance of UCYN-B could be Fe limited in their natural habitats [27,28,33]. The response of *C. watsonii* to Fe limitation remains not fully characterized and needs to be quantified. In order to improve our knowledge and understanding of the impact of Fe limitation on UCYN, we conducted trace-metal clean culture experiments of *C. watsonii* WH8501 cultivated under a range of dFe concentrations to quantify for the first time the impact of Fe limitation on the growth, N_2 fixation rate, primary productivity, elemental contents, and cell size of an open ocean UCYN.

Materials and Methods

Culture experiments

All bottles and labware were thoroughly cleaned with suprapur HCl acid and ultra-pure water (>18.2 MΩ). All manipulations were conducted in a clean laboratory within a sterile laminar flow hood (class 100) using sterile and trace metal clean techniques. Batch cultures of *C. watsonii* WH8501 were grown in sterile polycarbonate bottles at 27.5°C, under a 12:12 h light:dark cycle at a light intensity of ~150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. The cells were cultivated in N free YBCII medium [34], prepared with Suprapur® quality salts and reagents and amended at different dFe concentrations. The medium contained phosphate (20 µM), vitamins (B_{12}, thiamine and biotin) and trace metals (Co, Mo, Cu, Zn and Mn). It was sterilized by autoclaving and 0.2 µm filtration. Cultures were gently mixed using orbital shakers to minimize cell sedimentation. Fe ($FeCl_3$) was added in triplicate cultures to obtain different final dFe concentrations ranging from 0 to 400 nmol.L^{-1} (nM) and was complexed with 2 µM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), a metal ion buffering agent. In order to quantify a potential Fe contamination, dFe was analysed in sterilized YBCII medium before Fe addition by flow injection with online preconcentration and chemiluminescence detection [35] at the LOV laboratory (Villefranche sur mer). A background concentration of 3.3 nM was found in the medium and was systematically included in our results. Consequently, the eight dFe concentrations in the triplicate cultures were 3.3, 5.3, 8.3, 13.3, 23.3, 43.3, 103.3 and 403.3 nM (Table 1). Cells were previously acclimated to these different Fe concentrations for a minimum of 35 generations. Flow cytometry measurements (LOMIC laboratory) showed that our cultures were not axenic and allowed the determination of the abundance and biovolume of bacteria [36]. Using a conversion factor between biovolume and C content of bacteria from [37], we found that the C content associated with bacteria represented on average [illegible]% of the total particulate organic carbon (POC) in the cultures. The initial pH in the cultures was 8.15 and variations between the beginning and the end of the growth phase were lower than 0.2 pH units, which avoided CO_2 limitation and pH effects on Fe chelation by EDTA [38].

All the parameters discussed in this study, except cell abundance, were determined during the exponential growth phase. Our results are reported as a function of dFe concentrations as well as dissolved inorganic Fe concentrations, hereafter referred to as Fe′ and representing hydrolysed forms of dFe, supposed to be the bioavailable forms of Fe in EDTA buffered artificial seawater [39,40]. Fe′ concentrations were computed from the Fe-EDTA complexation data in [38], taking into account influence of pH, light and temperature. The resulting estimated Fe′ concentrations in the media ranged from 0.16 to 20.16 nM. The 3 highest Fe′ concentrations (2.16, 5.16 and 20.16 nM) are invalid as they exceed the solubility limit for Fe with respect to ferric hydroxide precipitation, which is assumed to be ~1.5 nM based on experimental data from [38].

Cell abundance and growth rate

C. watsonii's abundance was monitored by daily cell counts with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 50i) using natural fluorescence of chlorophyll *a* (Chl *a*). These data were highly similar to those obtained by flow cytometry measurements (data not shown). Specific growth rates in the exponential phase were determined from linear regression of the logarithmic transformed cell abundance versus time.

Cell biovolume

C. watsonii cells were harvested in exponential phase, 2 hours after the beginning of the dark period, onto 0.4 µm polycarbonate membranes, and incubated overnight into a fixative with adjusted osmolarity (3% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate pH 7.4, NaCl 1.75%). Membranes were then washed, post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer with 1.75% NaCl, and then dehydrated with graded increasing concentrations of ethanol (50, 70, 96, 100%) and critical point dried (CPD 7501, Quorum Technologies). Finally, membranes were mounted on stubs, gold-sputtered (Scancoat Six, Edwards) and observed with a conventional SEM (Scanning Electron Microscope, Cambridge Stereoscan S260). Pictures were analysed with ImageJ software [41] in order to determine cell diameters and biovolumes. Due to experimental constraints, cell diameters and biovolumes were determined on four cultures (dFe = 3.3, 13.3, 43.3 and 403.3 nM).

Chlorophyll a

Culture samples were gently filtered (pressure<200 mbar) onto 0.7 µm glass microfiber filters (GF/F, Whatman©). Then, the filters were stored at −25°C. After extraction in 90% acetone [42], fluorescence of Chl *a* was measured at 670 nm on a Hitaschi F-4500 spectrofluorometer. Cellular Chl *a* content was calculated using the cell abundance at the day of sampling.

CO_2 fixation rate, N_2 fixation rate, C and N content

CO_2 fixation rates were determined using the ^{13}C-tracer addition method [43]. Seven hours after the beginning of the light period, subsamples of cultures (from 25 to 500 ml) were incubated during 3.5 h with a small addition of $NaH^{13}CO_3$ (99%, Eurisotop) in order to obtain a final enrichment of about 10 atom% excess. N_2 fixation rates were determined using the $^{15}N_2$ gas-tracer addition method [44]. Incubations for CO_2 and N_2 fixation were not performed simultaneously as *C. watsonii* perform a nocturnal N_2 fixation in order to avoid the inhibitory effects of oxygen on nitrogenase due to photosynthesis [45]. Briefly, 2 hours after the onset of the dark period, $^{15}N_2$ gas (98.3%, EURISOTOP) was added to sub-samples of cultures (from 45 to 630 ml) in polycarbonate bottles equipped with septum caps using a gas-tight

Table 1. Influence of dFe concentrations in the cultures on surface:volume ratio, elemental ratios, cellular and volume-normalized N_2 and CO_2 fixation rates of *C. watsonii* WH8501 (numbers in brackets represent standard deviation).

Media dFe (nM)	3.3	5.3	8.3	13.3	23.3	43.3	103.3	403.3
Surface:volume	3.1	ND	ND	2.9	ND	2.9	ND	2.4
(μm^2:μm^3)	(0.2)			(0.2)		(0.1)		(0.3)
C:N ratios	8.3	8.9	8.8	10.2	9.5	8.3	8.0	9.6
(mol:mol)	(0.5)	(0.3)	(0.6)	(0.4)	(0.9)	(0.3)	(0.8)	(0.5)
Chl *a*:C ratios	51.1	41.0	34.1	36.6	54.7	63.6	66.5	58.1
(µmol:mol)	(8.5)	(3.6)	(7.7)	(4.2)	(6.6)	(6.8)	(8.4)	(5.3)
N_2 fixation	7.2	ND	ND	ND	ND	53.2	ND	65.6
(amol N.μm^{-3}.h^{-1})	(1.2)					(7.3)		(22.2)
CO_2 fixation	1.2	ND	ND	3.1	ND	3.5	ND	3.9
(fmol C.μm^{-3}.h^{-1})	(0.2)			(0.6)		(0.5)		(1.3)

ND : No data.

doi:10.1371/journal.pone.0086749.t001

syringe, and bottles were incubated for 3.5 hours. $^{15}N_2$ tracer was added to obtain a final enrichment of the N_2 pool of about 10 atom% excess. After ^{13}C and $^{15}N_2$-incubations, samples were filtered onto pre-combusted 25 mm GF/F filters and filters were stored at −25°C. Prior to analysis, filters were dried at 40°C for 48 h. Particulate organic carbon (POC) and nitrogen (PON) concentrations as well as ^{13}C- and ^{15}N-enrichments were quantified with a mass spectrometer (Delta plus, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) coupled with an elemental analyser (Flash EA, ThermoFisher Scientific) via a type III-interface. Standard deviations were 0.009 µM and 0.004 µM for POC and PON, respectively and 0.0002 atom% and 0.0001 atom% for ^{13}C enrichment and ^{15}N enrichment, respectively. N_2 fixation rates were calculated by isotope mass balanced as described by [44]. Cellular C and N contents as well as molar C:N ratios were estimated using the POC and PON determined during the light period and the cell abundance measured at the day of sampling. Relative N_2 fixation was calculated as the rates of N_2 fixation in the different Fe treatments normalized by the mean rate in the Fe-replete treatment. Relative CO_2 fixation rates were determined using the same calculation.

Statistical analysis

After checking homoscedasticity using a Bartlett test, means were compared using a one-way ANOVA and a pairwise-t-test with the Holm method for *p*-value adjustment ($\alpha = 0.05$). In the case of heterogeneity of the variances, the tests were performed on the log-transformed data. The statistical tests, the Monod non-linear regression and derived growth parameters (maximum growth rate and half saturation constant for growth) were calculated using R software.

Results and Discussion

1. The global influence of Fe limitation

The growth rate of *C. watsonii* was highly dependent on dFe concentrations as shown by the 2.6-fold decrease ($p<0.05$) from 0.52 ± 0.03 d^{-1} under Fe-replete condition to 0.20 ± 0.03 d^{-1} for the lowest dFe concentration (Figure 1). The relationship between specific growth rate and dFe concentrations fits a Monod saturation function ($r^2 = 0.92$) with a maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.54 ± 0.01 d^{-1} and a half-saturation constant for growth with respect to dFe ($K_{\mu dFe}$) of 6.95 ± 0.66 nM dFe (Figure 1). Pictures of the cells grown under Fe repletion (dFe = 403.3 nM) and severe limitation (dFe = 3.3 nM) (Figure 2A, B) illustrated the dramatic 2.2-fold decrease in the cell size with decreasing dFe concentrations, from 8.4 ± 2.6 μm^3 to 3.8 ± 0.7 μm^3 (Figure 2C). The decrease in biovolume led to a significant increase in the surface to volume (S:V) ratio with Fe stress from 2.4 ± 0.3 μm^{-1} (dFe = 403.3 nM) to 3.1 ± 0.2 μm^{-1} (dFe = 3.3 nM) (Table 1). The mean cellular C and N contents in Fe-replete cultures (dFe = 403.3 nM) were 547 ± 25 fmolC.$cell^{-1}$ and 57 ± 5 fmolN.$cell^{-1}$, respectively (Figure 3A, B), resulting in a molar C:N ratio of 9.6 ± 0.5 (Table 1). Reducing dFe concentration to 3.3 nM induced a 3.8- and 3.3-fold decreases ($p<0.05$) in the cellular C and N contents, respectively. In all the cultures, C:N was higher than the Redfield ratio (106:16) and there was no correlation between the C:N ratio and dFe concentrations (Table 1). The cellular Chl *a* content strongly declined (4.1-fold, $p<0.05$) from 28 ± 3 fgChl*a*.$cell^{-1}$ to 6.7 ± 1.5 fgChl*a*.$cell^{-1}$ over the whole range of dFe concentrations (Figure 3C) and there was no clear correlation between dFe concentrations and the Chl*a*:C ratio (Table 1). Volume-normalized (V-normalized) C, N and Chl *a* contents decreased significantly between the 2 extreme dFe concentrations by ~1.8-fold ($p<0.05$; Figure 4). Over the range of dFe concentrations, cellular N_2 fixation rates declined by ~17-fold ($p<0.05$; Figure 5A) whereas cellular CO_2 fixation rates decreased by ~7-fold from 29.8 ± 2.1 fmolC.$cell^{-1}$.h^{-1} to 4.4 ± 0.4 fmolC.$cell^{-1}$.h^{-1} ($p<0.05$, Figure 5B). The decrease in V-normalized N_2 fixation rates between the two extreme dFe concentrations was much higher (9.1-fold) than that of the CO_2 fixation rates (3.3-fold) (Figure 5, Table 1).

Under Fe-replete conditions, the growth rate, biovolume, cellular N content and C:N ratio of *C. watsonii* reported here were in the range of published data for the WH8501 strain, and Chl*a*:C ratio was lower than the previously published one (Table 2). Cellular C content was higher than those reported in previous studies. CO_2 fixation rates were higher than those obtained by [50] in cultures having a considerably lower growth rate (Table 2). The growth rate obtained under Fe-replete conditions was close to that determined recently in the oligotrophic South Pacific for *C. watsonii* (0.61 d^{-1}, [33]). The N_2 fixation rates we reported are probably underestimated due to the use of the gas bubble enrichment method. Recently, it has been shown that this method may underestimate N_2 fixation rates relative to the enriched $^{15}N_2$ seawater method due to incomplete $^{15}N_2$ gas bubble equilibration

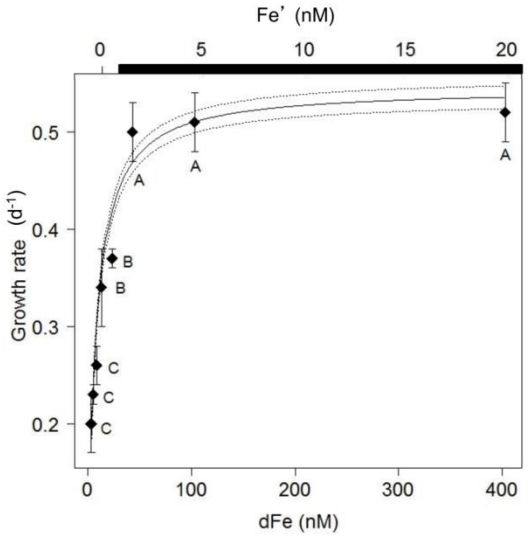


Figure 1. Growth rate of *C. watsonii* related to dFe and Fe′ concentrations. Error bars represent standard deviation; different letters correspond to statistically different means ($p<0.05$) and the black bar indicates the region of expected Fe hydroxide precipitation. The Monod regression, performed with dFe concentrations, is represented by the black line and standard deviation of regression by dotted lines.
doi:10.1371/journal.pone.0086749.g001

[51]. Based on data from these authors, the N_2 fixation rates measured during a short incubation of 3.5 h could be underestimated at least by 70%. However, despite this potential underestimation, the relative N_2 fixation rates should not have been affected.

2. Influence of the degree of Fe-limitation

2.1 Toward a moderate Fe deprivation (from Fe-replete condition to 43.3 nM dFe). Our results showed two distinct responses of *C. watsonii* depending on the degree of Fe limitation (Figure S1). Under a moderate Fe limitation, corresponding to a diminution of dFe concentrations by an order of magnitude, significant decreases in cellular contents (C, N and Chl *a*) and cellular N_2 and CO_2 fixation rates were observed. These decreases were associated with a ~2-fold reduction in biovolume ($p<0.05$), while the growth rate remained unchanged ($p>0.05$, Figure S1). The V-normalized C, N and Chl *a* contents as V-normalized N_2 and CO_2 fixation rates did not significantly change over this range of dFe concentrations ($p>0.05$, Figures 4 and 5). The decrease in the cellular contents and N_2 and CO_2 fixation rates can be attributed to the cell size reduction. A moderate Fe limitation induced a reduction of the cell volume which permitted to *C. watsonii* to maintain maximum C, N and Chl *a* contents as N_2 and CO_2-fixing activities, and hence to keep sufficient energy to sustain optimal growth rates. We suggest that the cell volume reduction of *C. watsonii* represents an adaptive strategy to decreasing Fe availability allowing to a decrease in Fe requirement and to an increase in the S:V ratio (Table 1) which provide an advantage for the Fe uptake by increasing the diffusion-limited uptake rate relative to cell demand [39]. Increase in S:V ratio as an adaptation to Fe limitation was previously evidenced for eukaryotic phytoplankton such as coccolithophores (*Emiliania huxleyi*) [52] and some

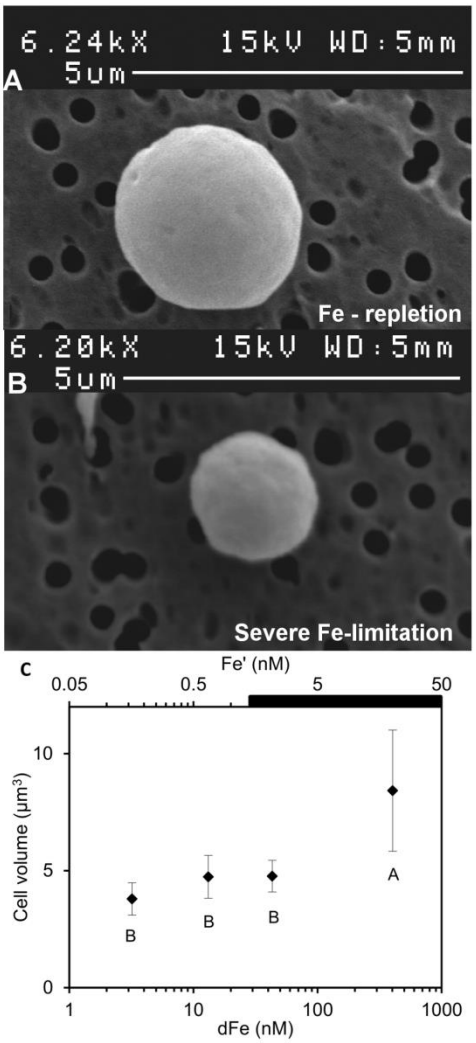


Figure 2. Influence of Fe availability on *C. watsonii* biovolume. Scanning electron microscopy photography of *C. watsonii* growing in (A) Fe-replete condition (dFe = 403.3 nM) and (B) severe Fe-limited condition (dFe = 3.3 nM). (C) Mean biovolume of *C. watsonii* related to dFe and Fe′ concentrations, in log scale. Error bars represent standard deviation; different letters correspond to statistically different means ($p<0.05$) and the black bar indicates the region of expected Fe hydroxide precipitation.
doi:10.1371/journal.pone.0086749.g002

diatoms (*Thalassosira weissflogii*, *Thalassiosira oceanica* [52] and *Chaetoceros dichaeta* [53]).

Under moderate Fe-limitation conditions, estimated Fe′ concentrations exceeded the solubility limit of Fe with respect to hydroxide precipitation and thus they were not expected to vary despite the reduction of dFe concentrations. Consequently, our observations of significant physiological changes under such conditions suggest that Fe′ was probably not the only available form of Fe for *C. watsonii*. First, we can suspect that Fe from colloidal and/or precipitated amorphous Fe hydroxides is bioavailable. Recently [54] observed that both natural and cultured *Trichodesmium* are able to take up Fe from ferrihydrite

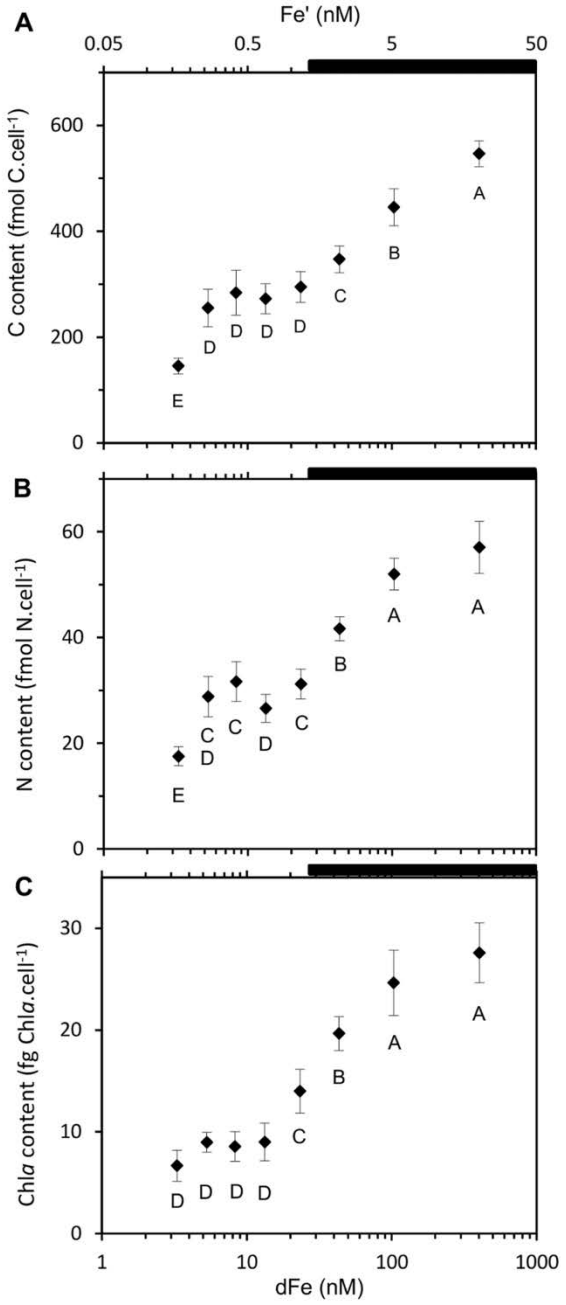


Figure 3. Influence of Fe availability on the elemental composition of *C. watsonii*. Mean cellular content of C (A), N (B) and Chl *a* (C) related to dFe and Fe′ concentrations, in log scale. Error bars represent standard deviation; different letters correspond to statistically different means ($p<0.05$) and the black bar indicates the region of expected Fe hydroxide precipitation.
doi:10.1371/journal.pone.0086749.g003

(an amorphous oxidized Fe hydroxide) via cell surface adsorption and biological mediated dissolution. [55] have shown that *Trichodesmium* and the non-diazotrophic unicellular cyanobacterium *Synechoccocus* were able to take up Fe bound to recently formed organic colloids, probably involving biological reduction of colloidal Fe, leading to highly soluble Fe(II) forms [40]. Additionally, *C. watsonii* could acquire Fe from bioreduction of the Fe-EDTA complex into Fe(II) at the cell surface, as the FeEDTA complex could not be transported across the cell membrane [56]. This acquisition strategy has already been shown for the diatom *T. weissflogii*, although reduction rates are widely lower than for Fe′ [56]. Based on our results, *C. watsonii* could be able to acquire Fe from other forms than Fe′ but its Fe uptake mechanisms to be characterized.

2.2 Toward a more severe Fe deprivation (from 43.3 nM to 3.3 nM dFe). When intensifying Fe deprivation, cellular contents (C, N and Chl *a*) and cellular N_2 and CO_2 fixation rates continued to decrease (Figure 3, 5, S1 A to E). Over this range of Fe concentrations, the growth rate dropped significantly ($p<0.05$, Figure 1) while the cell volume remained unchanged (Figure 2C, S1F) as well as the S:V ratio ($p>0.05$, Table 1). This indicates that the cells have reached a minimum volume, and thus a maximum S:V ratio, around 43.3 nM dFe. As a consequence, an ~2-fold decrease in V-normalized contents (C, N and Chl *a*) and a significant drop in V-normalized N_2 and CO_2 fixation rates were observed (Figure 4 and 5). Thus, under severe Fe limitation, the cellular composition and the efficiency of N_2 and CO_2 uptake were strongly affected and the cells were not able to produce sufficient energy to maintain an optimal growth.

In photoautotrophic cells, energy is provided as adenosine triphosphate (ATP) during respiration through the catabolism of carbohydrates produced during photosynthesis. Since a majority of redox metalloenzymes involved in this process are Fe rich proteins [30,57], a severe reduction in bioavailable Fe induced a lower efficiency in the photosynthetic activity, as depicted by the significant decrease of V-normalized CO_2 fixation rates and Chl *a* contents as it is the main light harvesting pigment involved in photosynthesis. Our results showed that V-normalized N_2 fixation rates were more affected by severe Fe limitation than CO_2 fixation rates, as illustrated by ~7.5 and ~3-fold decreases respectively from 43.3 to 3.3 nM dFe. The high Fe content of nitrogenase co-factors associated with the high energetic cost of biological N_2 fixation could explain this pattern. Indeed, recent studies reported that Fe deprivation leads to a down-regulation of nitrogenase expression in both cultured and *in situ Trichodesmium* [58,59]. This could also occur for *C. watsonii*, but it has been not yet evidenced. Additionally, N_2 fixation is the highest energy consuming process in the cell [48,49]. This process is fuelled by catabolism of carbohydrates accumulated during photosynthesis [60]. Thus, decreasing Fe bioavailability also affects the N_2 fixation rates through the photosynthetic deficiency.

3. Comparison of the response of C. watsonii to Fe limitation with other phytoplanktonic species

To date, only two species of UCYN are available in culture: one isolated from the open ocean (*C. watsonii*, UCYN-B [20]) and one from coastal waters (*Cyanothece* WH8904, UCYN-C [61]). A study from [62] has shown no influence of Fe limitation on N_2 fixation rates of *Cyanothece* WH8904 under a wide range of dFe concentrations (from 4 nM to 4 µM complexed with 20 µM EDTA). While the cell diameter of *C. watsonii* (2.5 µm, this study) and *Cyanothece* (~3 µm, determined from [62]) are close under Fe-repletion, differences in Fe requirements and/or Fe acquisition between both species can be strongly suspected. The uncultivated photoheterotrophic UCYN-A do not have photosystem II of the photosynthetic apparatus [63] which contains three Fe atoms [64], and are smaller (diameter<1 µm, [23]) than *C. watsonii*, suggesting

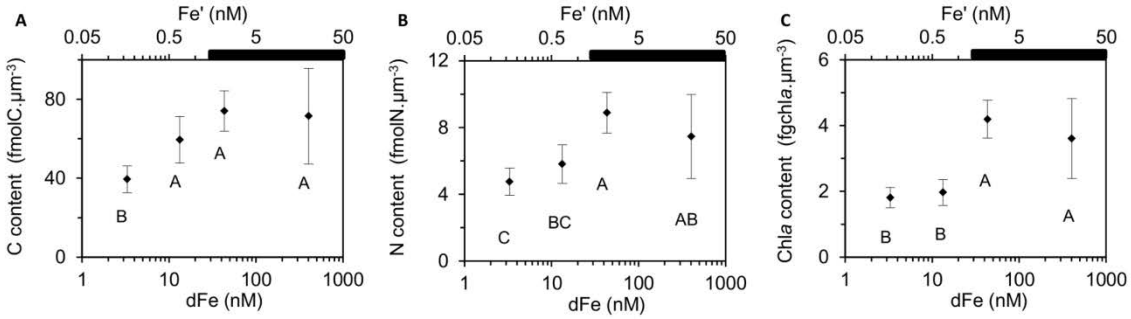


Figure 4. Influence of Fe availability on V-normalized contents. Mean V-normalized contents of C (A), N (B) and Chl *a* (C) of *C. watsonii* related to dFe and Fe′ concentrations, in log scale. Error bars represent standard deviation; different letters correspond to statistically different means ($p<0.05$) and the black bar indicates the region of expected Fe hydroxide precipitation.
doi:10.1371/journal.pone.0086749.g004

that the Fe requirements of UCYN-A are likely lower than those of *C. watsonii*. As a consequence, large differences in Fe requirements and/or Fe acquisition could exist within the UCYN community (UCYN-A, -B, -C). Bioassay experiments in the tropical North Atlantic have shown contrasted responses of UCYN activity to Fe additions. Fe addition stimulated the expression of the *nifH* gene (which encodes for the Fe component of the nitrogenase) from UCYN-B only in the western part, despite detectable dFe concentrations, while *nifH* expression from UCYN-A was not stimulated either in the Western or central part [28]. In the Eastern part, [27] observed a mesoscale variability with either UCYN-A or UCYN-B abundance stimulated by Fe addition for two close sites.

The $K_{\mu dFe}$ of *C. watsonii* was twice as low as that of *Trichodesmium erythraeum* IMS101 growing in the same conditions (13.9±3.3 nM calculated from [16, Ridame and Rochelle-Newall, unpublished data]), indicating that the growth of *C. watsonii* is less impacted by Fe limitation than that of the filamentous *Trichodesmium*. *T. erythraeum* display a much higher biovolume (~14855 μm^3 under Fe-replete conditions, [16]) than *C. watsonii* (8.4 μm^3), implying a S:V ratio of *T. erythraeum* lower (S:V~0.55 μm^{-1}, Ridame unpublished data; [62]) than that of *C. watsonii* (S:V = 2.4 μm^{-1}). The small biovolume and large S:V ratio provide to *C. watsonii* an advantage for Fe and other nutrients uptake. Furthermore, *C. watsonii* perform a nocturnal N_2 fixation [45,46] with a daily synthesis and degradation of Fe-containing proteins involved in photosynthesis and N_2 fixation, in coordination with their utilization [30]. This Fe recycling throughout the diel cycle leads to a reduction in the cellular Fe requirement of *C. watsonii* up to 40% [30]. As *T. erythraeum* perform both photosynthesis and N_2 fixation during the photoperiod, it probably does not employ this Fe conservation strategy to the extent used by *C. watsonii*. The Fe-rich ferredoxin, constitutively used in photosynthetic electron transport, is also an efficient electron donor for nitrogenase of *Trichodesmium* [65]. Under Fe limitation, extra Fe-free flavodoxin could be synthetized to act as an alternative electron donor instead of ferredoxin [66], as previously reported for *T. erythraeum* [67]. In contrast, no increase in flavodoxin in response to Fe stress was observed for *C. watsonii* [30]. The use of flavodoxin at night during N_2 fixation even under Fe replete conditions appears to be an adaptation that allows *C. watsonii* to reduce cellular Fe demand [30]. These physiological characteristics reveal a lower Fe requirements of *C. watsonii* than the filamentous *T. erythraeum*, which is consistent with a higher cellular Fe:C in *T. erythraeum*

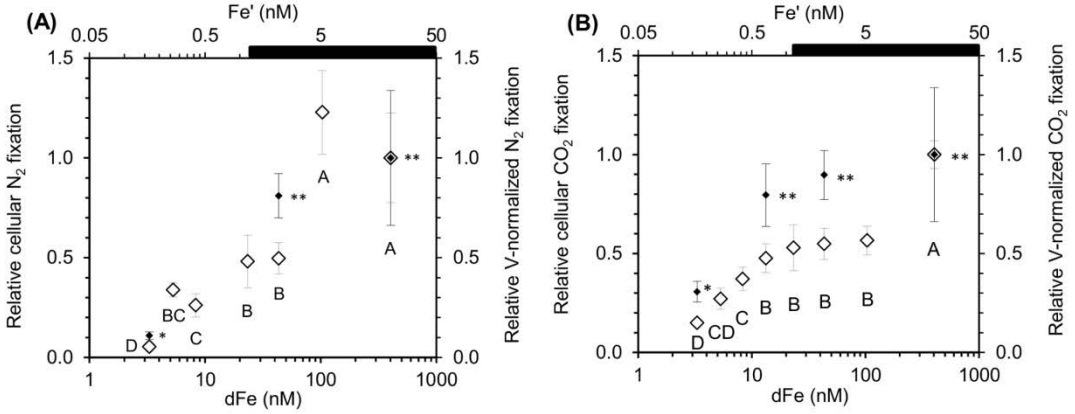


Figure 5. Influence of Fe availability on N_2 and CO_2 fixation rates of *C. watsonii*. (A) Relative N_2 fixation rates and (B) relative CO_2 fixation rates of *C. watsonii* related to dFe and Fe′ concentrations, in log scale. Open and filled symbols correspond to the rates per cell and V-normalized rates respectively. Error bars represent standard deviation; different letters and different numbers of star correspond to statistically different means ($p<0.05$) for cellular and V-normalized rates, respectively. The black bar indicates the region of expected Fe hydroxide precipitation.
doi:10.1371/journal.pone.0086749.g005

Table 2. Comparison of growth rate, biovolume, cellular contents, elemental ratio and CO_2 fixation rate of *C. watsonii* WH8501 cultivated under Fe-replete conditions (numbers in brackets represent standard deviation).

Growth rate	Biovolume	C content	N content	C:N	Chl *a*:C	CO_2 fixation rates	
d^{-1}	μm^3	fmolC.cell^{-1}	fmolN.cell^{-1}	mol:mol	µmol.mol	fmol^{1}C.cell^{-1}.h^{-1}	Ref.
0.46			6.9–29.6	8.8 (1.5)			[46]
0.47 (0.01)	4.2–65.4						[23]
				6.9 (0.2)	83 (12)		[31]
0.54	4.2–33.5						[25]
	12–13.6			8.5*			[45]
		500	80	5.2			[47]
0.2	8.2–10.4	140–220	18–40	8.8*			[48]
0.28 (0.02)		120–260	20–35	10.5*			[49]
0.14						~9	[50]
0.52 (0.03)	**8.4 (2.6)**	**547 (25)***	**57 (5)***	**9.6 (0.5)***	**58 (5)***	**29.8 (2.1)**	**This study**

*during light period.

doi:10.1371/journal.pone.0086749.t002

(from 69 to 87 µmol:mol^{-1} under Fe replete conditions [14,46]) compared to *C. watsonii* (16 µmol:mol^{-1}, [46]). Consequently, *C. watsonii* is likely better adapted to the poor Fe natural oceanic waters than *T. erythraeum*.

4. Oceanic relevance and biogeography of N_2 fixers

We quantified for the first time the impact of Fe bioavailability on the growth, cell size, N_2 fixation and photosynthesis of an open ocean UCYN, and demonstrated a physiological response depending on the degree of limitation. As photosynthesis (CO_2 fixation) provides energy for fuelling N_2 fixation, these two processes are tightly related. Thus, the cell response should be globally considered because nutrient limitation, such as Fe deprivation, affects cell metabolism and involves intractable feedbacks.

The quantification of the impact of Fe availability on the N_2 fixation rates of *C. watsonii* contributes to our knowledge about the control of Fe on the N cycle in the tropical and subtropical ocean. As both growth and N_2- and CO_2-fixing activities of *C. watsonii* are highly Fe-dependent, its abundance and activity could be controlled by the atmospheric deposition of aeolian dust which represents the major source of new Fe to the open ocean surface waters [68]. Hence, in the tropical and subtropical oligotrophic ocean, atmospheric Fe input could enhance new production and C export to the deep ocean, through the stimulation of the growth and activity of *C. watsonii*. Based on our findings, the oceanic UCYN like *C. watsonii* could be strongly Fe limited but at a lesser extent that the filamentous diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium*. Thus Fe bioavailability could control the biogeography of these two N_2 fixers. Indeed, in the South-Western Pacific [69] have observed that putative *Crocosphaera* cells were dominant at oceanic stations, while *Trichodesmium* dominated in the more Fe-rich coastal stations. They attributed this relative distribution to Fe availability since Fe is mainly supplied by coastal input in this region. Due to the lack of data about UCYN, parameterizations of N_2 fixation in regional and global ocean models are mostly based on characteristics of *Trichodesmium* sp. (e.g. [70,71]). Hence such biogeochemical models could be improved by the addition of a simulated UCYN, as they are expected to growth in larger niches than *Trichodesmium* regarding Fe availability. Moreover, our study supports the idea that within the UCYN community (UCYN-A, *Crocosphaera*, *Cyanothece*) Fe requirements and/or Fe acquisition may strongly vary, meaning that Fe bioavailability could partially explain variabilities in the UCYN community composition. Recent biogeochemical models focused on the biogeography of the N_2 fixers [22,72,73] consider, in addition to a *Trichodesmium* analogue, a UCYN analogue parameterized with growth parameters and cellular contents derived from *Trichodesmium* and non-diazotrophic picophytoplanktonic species. Within such UCYN pool, it could be relevant to consider different types of UCYN (UCYN-A, -B and –C). In this context, the parameters obtained in our study will help to improve the parameterization of N_2 fixation and UCYN distribution in biogeochemical models.

Supporting Information

Figure S1 Two distinct physiological responses of *C. watsonii* to Fe limitation. Cellular contents of C (A), N (B), Chl *a* (C), cellular N_2 (D) and CO_2 fixation rates (E) and growth rates (F) related to cell volume for 4 dFe concentrations (dFe = 3.3, 13.3, 43.3 and 403.3 nM). Error bars represent standard deviation. Different numbers of stars and different letters correspond to statistically different means for the cell volume and parameters listed above.
(TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Manon Tonnard and Benjamin Ledoux for helping with some data acquisition. We also thank Matthieu Bressac and Cécile Guieu (LOV, Villefranche sur Mer, France) for dFe measurements by FIA and Philippe Catala (ARAGO, OOB, Banyuls sur Mer, France) for analyses by flow cytometry. Michaël Trichet (Scanning Electron Microscopy service, FRE3595, UPMC, Paris, France) is acknowledged for the preparation of MEB samples and his help during MEB observation sessions. We are thankful to Hervé Rybarczyk (MNHN, Paris, France) for sharing his helpful knowledge on statistics and Bill Sunda (NOAA, US) for its precious help in the Fe′ calculation. Tamara Barriquand and Fauzi Mantoura are acknowledged for their careful proofreading. We are grateful to Sophie Bonnet (MIO, Marseille, France) for providing *Crocosphaera watsonii* WH8501 strain. We would like to thank the two anonymous reviewers for all their relevant comments which allow to improve and precise our works.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VJ CR. Performed the experiments: VJ CR SL FK. Analyzed the data: VJ CR. Contributed reagents/materials/analysis tools: VJ CR SL FK. Wrote the paper: VJ CR SL AS.

References

1. Capone DG (2000) Marine nitrogen cycle. In : Kirchman L, editor. Microbial ecology of the ocean. Wiley, New-York.
2. Karl DM, Letelier RM (2008) Nitrogen fixation enhanced carbon sequestration in low nitrate, low chlorophyll seascapes. Mar Ecol Prog Ser 364: 257–268. doi:10.3354/meps07547.
3. Gruber N (2008) The marine nitrogen cycle : overview and challenges. In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ, editors. Nitrogen in the marine environment (second edition). Elsevier.
4. Montoya JP, Holl CM, Zehr JP (2004) High rates of N2 fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. Nature 430: 1027–1031. doi:10.1038/nature02744.1.
5. Karl D, Letelier R, Tupas L, Dore J, Christian J, et al. (1997) The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. Nature 388: 533–538.
6. Gruber N, Sarmiento JL (1997) Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. Global Biogeochem Cy 11: 235–266.
7. Howard JB, Rees DC (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. Chem rev 96: 2965–2982.
8. Raven JA (1988) The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon and nitrogen sources. New Phytol 109: 279–287.
9. Kustka A, Sañudo-wilhelmy S, Carpenter EJ, Capone DG, Raven JA (2003) A revised estimate of the iron use efficiency of nitrogen fixation, with special reference to the marine cynobacterium Trichodesmium spp. (cyanophyta). J phycol 39: 12–25.
10. Johnson KS, Gordon RM, Coale KH (1997) What controls dissolved iron concentrations in the world ocean? Mar Chem 57: 137–161.
11. Sarthou G, Baker AR, Blain S, Achterberg EP, Boye M, et al. (2003) Atmospheric iron deposition and sea-surface dissolved iron concentrations in the Eastern Atlantic Ocean. Deep Sea Research I 50: 1339–1352. doi:10.1016/S0967-0637(03)00126-2.
12. Boyd PW, Ellwood MJ (2010) The biogeochemical cycle of iron in the ocean. Nat Geosci 3: 675–682. doi:10.1038/ngeo964.
13. Toulza E, Tagliabue A, Blain S, Piganeau G (2012) Analysis of the global ocean sampling (GOS) project for trends in iron uptake by surface ocean microbes. PLoS One 7: e30931. doi:10.1371/journal.pone.0030931
14. Berman-Frank AI, Cullen JT, Shaked Y, Sherrell RM, Falkowski PG (2001) Iron availability, cellular iron quotas, and nitrogen fixation in Trichodesmium. Limnol Oceanogr 46: 1249–1260.
15. Kustka AB, San SA, Carpenter EJ, Sunda WG (2003b) Iron requirements for dinitrogen- and ammonium-supported growth in cultures of Trichodesmium (IMS 101): Comparison with nitrogen fixation rates and iron : carbon ratios of field populations. Limnol Oceanogr 48: 1869–1884.
16. Bucciarelli E, Ridame C, Sunda WG, Dimier-Hugueney C, Cheize M, et al. (2013) Increased intracellular concentration of DMSP and DMSO in iron-limited oceanic phytoplankton Thalassiosira oceanica and Trichodesmium erythraeum. Limnol and Oceanogr 58: 1667–1679.
17. Moore MC, Mills MM, Achterberg EP, Geider RJ, LaRoche J, et al. (2009) Large-scale distribution of Atlantic nitrogen fixation controlled by iron availability. Nat Geosci 2: 867–871. doi:10.1038/ngeo667.
18. Capone DG, Carpenter E. (1982) Nitrogen fixation in the marine environment. Science 217: 1140–1142.
19. Capone DG, Zehr JP, Paerl HW, Bergman B, Carptenter JE (1997) Trichodesmium, a globally significant marine cyanobacterium. Science 276: 1221–1229. doi/10.1126/science.276.5316.1221.
20. Zehr JP, Waterbury JB, Turner PJ, Montoya JP, Omoregie E, et al. (2001) Unicellular cyanobacteria fix N2 in the subtropical North Pacific Ocean. Nature 412: 635–638.
21. Bonnet S, Biegala IC, Dutrieux P, Slemons LO, Capone DG (2009) Nitrogen fixation in the Western equatorial Pacific: rates, diazotrophic cyanobacterial size class distribution, and biogeochemical significance. Global Biogeochem Cy 23: doi:10.1029/2008GB003439.
22. Monteiro FM, Follows MJ, Dutkiewicz S (2010) Distribution of diverse nitrogen fixers in the global ocean. Global Biogeochem Cy 24: doi:10.1029/2009GB003731.
23. Goebel NL, Edwards CA, Carter BJ, Achilles KM, Zehr JP (2008) Growth and carbon content of three different-sized diazotrophic cyanobacteria observed in the subtropical North Pacific. J Phycol 44: 1212–1220.
24. Moisander PH, Beinart RA, Hewson I, White AE, Johnson KS, et al. (2010) Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N2 fixation domain. Science 327: 1512–1514.
25. Webb EA, Ehrenreich IM, Brown SL, Valois FW, Waterbury JB (2009) Phenotypic and genotypic characterization of multiple strains of the diazotrophic cyanobacterium, Crocosphaera watsonii, isolated from the open ocean. Environ microbio 11: 338–348.
26. Dyhrman ST, Haley ST (2006) Phosphorus scavenging in the unicellular marine diazotroph Crocosphaera watsonii. Appl environ microb 72: 1452–1458. doi:10.1128/AEM.72.2.1452.
27. Langlois RJ, Mills MM, Ridame C, Croot P, LaRoche J (2012) Diazotrophic bacteria respond to Saharan dust additions. Mar Ecol Prog Ser 470: doi: 10.3354/meps10109.
28. Turk-Kubo KA, Achilles KM, Serros TRC, Ochiai M, Montoya JP, et al. (2012) Nitrogenase (nifH) gene expression in diazotrophic cyanobacteria in the Tropical North Atlantic in response to nutrient amendments. Front microbiol 3: 386. doi: 10.3389/fmicb.2012.00386.
29. Garcia NS, Fu F, Hutchins DA (2013) Colimitation of the unicellular photosynthetic diazotroph Crocosphaera watsonii by phosphorus, light and carbon dioxide. Limnol Oceanogr 58: 1501–1512. doi:10.4319/lo.2013.58.4.1501.
30. Saito MA, Bertrand EM, Dutkiewicz S, Bulygin VV, Moran DM, et al. (2011) Iron conservation by reduction of metalloenzyme inventories in the marine diazotroph Crocosphaera watsonii. pnas 108: doi:10.1073/pnas.1006943108.
31. Webb EA, Moffett JW, Waterbury JB (2001) Iron stress in open-ocean cyanobacteria identification of the IdiA protein. Appl environ microb 67: 5444–5452. doi:10.1128/AEM.67.12.5444.
32. Fu F, Mulholland MR, Garcia NS, Beck A, Bernhardt PW, et al. (2008) Interactions between changing pCO2, N2 fixation, and Fe limitation in the marine unicellular cyanobacterium Crocosphaera. Limnol Oceanogr 53: 2472–2484.
33. Moisander PH, Zhang R, Boyle EA, Hewson I, Montoya JP, et al. (2012) Analogous nutrient limitations in unicellular diazotrophs and Prochlorococcus in the South Pacific Ocean. The ISME journal 6: 733–744.
34. Chen YB, Zehr JP, Mellon M (1996) Growth and nitrogen fixation of the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium Trichodesmium sp. IMS 101 in defined media: evidence for a circadian rhythm. J phycol 32: 916–923.
35. Obata H, Karatani H, Nakayama E (1993) Automated determination of iron in seawater by chelating resin concentration and chemiluminescence detection. Anal chim acta 65: 1524–1528.
36. Troussellier M, Courties C, Lebaron P, Servais P (1999) Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. FEMS microbiol Ecol 29: 319–330.
37. Gundersen K, Heldal M, Norland S, Purdie DA, Knap AH (2002) Elemental C, N, and P cell content of individual bacteria collected at the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. Limnol Oceanogr 47: 1525–1530.
38. Sunda WG, Huntsman SA (2003) Effect of pH, light, and temperature on Fe–EDTA chelation and Fe hydrolysis in seawater. Mar Chem 84: 35–47.
39. Hudson RJM, Morel FMM (1990) Iron transport in marine phytoplankton : kinetics of cellular and medium coordination reactions. Limnol Oceanogr 35: 1002–1020.
40. Sunda WG (2001) Bioavailability and Bioaccumulation of Iron in the Sea. In: Turner DR, Hunter KA, editors. The Biogeochemistry of Iron in Seawater. Wiley. pp. 41–84
41. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9: 671–67.
42. Strickland JDH, Parsons TR (1997) A practical handbook of seawater analysis. Bull Fish Res BD Can.
43. Hama T, Miyazaki T, Ogawa Y, Iwakuma T, Takahashi M, et al. (1983) Measurement of photosynthetic production of a marine phytopklankton population using a stable 13C isotope. Mar biol 73: 31–36.
44. Montoya JP, Voss M, Kahler P, Capone DG (1996) A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N2 fixation. Appl environ microb 62: 986–993.
45. Mohr W, Intermaggio MP, LaRoche J (2010) Diel rhythm of nitrogen and carbon metabolism in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium Crocosphaera watsonii WH8501. Environ microbiol 12: 412–421.
46. Tuit C, Waterbury J, Ravizza G (2004) Diel variation of molybdenum and iron in marine diazotrophic cyanobacteria. Limnol and Oceanogr 49: 978–990.
47. Dekaezemacker J, Bonnet S (2011) Sensitivity of N2 fixation to combined nitrogen forms (NO3− and NH4+) in two strains of the marine diazotroph Crocosphaera watsonii (Cyanobacteria). Mar Ecol Prog Ser 438: 33–46. doi:10.3354/meps09297.
48. Dron A, Rabouille S, Claquin P, Le Roy B, Talec A, et al. (2011) Light-dark (12:12) cycle of carbon and nitrogen metabolism in Crocosphaera watsonii WH8501: relation to the cell cycle. Environ microbiol 14: 967–981.
49. Großkopf T, Laroche J (2012) Direct and indirect costs of dinitrogen fixation in Crocosphaera watsonii WH8501 and possible implications for the nitrogen cycle. Front microbial 3. doi: 10.3389/fmicb.2012.00236.
50. Mohr W, Vagner T, Kuypers MMM, Ackermann M, Laroche J (2013). Resolution of Conflicting Signals at the Single-Cell Level in the Regulation of Cyanobacterial Photosynthesis and Nitrogen Fixation. PLOS one, 8(6), e66060. doi:10.1371/journal.pone.0066060.

51. Mohr W, Grosskopf T, Wallace DWR, La Roche J (2010b) Methodological underestimation of oceanic nitrogen fixation rates. PLOS one 5(9) : e12583. Doi : 10.1371/journal.pone.0012583.
52. Sunda WG, Huntsman SA. (1995) Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. Mar Chem 50: 189–206. doi:10.1016/0304-4203(95)00035-P.
53. Takeda S (1998) Influence of iron availability on nutrient consumption ratio of diatoms in oceanic waters. Nature 393: 774–777.
54. Rubin M, Berman-frank I, Shaked Y (2011) Dust- and mineral-iron utilization by the marine dinitrogen-fixer Trichodesmium. Nat Geosci 4: 529–534. doi:10.1038/NGEO1181.
55. Wang W, Dei RCH (2003) Bioavailability of iron complexed with organic colloids to the cyanobacteria Synechococcus and Trichodesmium. Aquat Microb Ecol 33: 247–259. DOI: 10.3354/ame033247.
56. Shaked Y, Kustka AB, Morel FMM (2005) A general kinetic model for iron acquisition by eukaryotic phytoplankton. Limnol and Oceanogr 50: 872–882.
57. Behrenfeld MJ, Milligan AJ (2013) Photophysiological expressions of iron stress in phytoplankton. Ann rev mar sci 5: 217–246. 10.1146/annurev-marine-121211-172356.
58. Küpper H, Setlik I, Seibert S, Prásil O, Setlikova E, et al. (2008) Iron limitation in the marine cyanobacterium Trichodesmium reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. The New phytol 179: 784–798.
59. Richier S, Macey AI, Pratt NJ, Honey DJ, Moore CM, et al. (2012) Abundances of iron-binding photosynthetic and nitrogen-fixing proteins of Trichodesmium both in culture and in situ from the North Atlantic. PLOS one 7: e35571. doi:10.1371/journal.pone.0035571.
60. Dron A, Rabouille S, Claquin P, Chang P, Raimbault V, et al. (2012) Light : dark (12:12 h) quantification of carbohydrate fluxes in Crocosphaera watsonii. Aquat Microb Ecol 68: 43–55. doi:10.3354/ame01600.
61. Ehrenreich IM, Waterbury JB, Webb EA (2005) Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. App environ microb 71: 7401–7413. doi:10.1128/AEM.71.11.7401.
62. Berman-Frank IA, Quigg A, Finkel ZV, Irwin AJ, Haramaty L (2007) Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. Limnol and Oceanogr 52: 2260–2269.
63. Zehr JP, Bench SR, Mondragon EA, McCarren J, DeLong EF (2007) Low genomic diversity in tropical oceanic N2-fixing cyanobacteria. Pnas 104: 17807–17812. doi:10.1073/pnas.0701017104.
64. Raven JA (1990) Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathway. New Phytol 116: 1–18. doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00505.x.
65. LaRoche J, Breitbarth E (2005) Importance of the diazotrophs as a source of new nitrogen in the ocean. J Sea Res 53: 67–91.
66. Ferreira F, Straus NA (1994) Iron deprivation in cyanobacteria. J appl phycol 6: 199–210.
67. Chappell PD, Webb EA (2010) A molecular assessment of the iron stress response in the two phylogenetic clades of Trichodesmium. Environ microbiol 12: doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02026.x.
68. Jickells TD, An ZS, Andersen KK, Baker AR, Bergametti G, et al. (2005) Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. Science 308: 67–71.
69. Campbell L, Carpenter E., Montoya JP, Kustka AB, Capone DG (2005) Picoplankton community structure within and outside a Trichodesmium bloom in the Southwestern Pacific Ocean. Vie milieu 55: 185–195.
70. Moore JK (2004) Upper ocean ecosystem dynamics and iron cycling in a global three-dimensional model. Global Biogeochem Cy 18: DOI: 10.1029/2004GB002220.
71. Coles VJ, Hood RR (2007) Modeling the impact of iron and phosphorus limitations on nitrogen fixation in the Atlantic Ocean. Biogeosciences 4: 455–479.
72. Dutkiewicz S, Ward BA, Monteiro F, Follows MJ (2012) Interconnection of nitrogen fixers and iron in the Pacific Ocean: Theory and numerical simulations. Global Biogeochem Cy 26: DOI: 10.1029/2011GB004039.
73. Monteiro FM, Dutkiewicz S, Follows MJ (2011) Biogeographical controls on the marine nitrogen fixers. Global Biogeochemical Cy 25: 1–8. doi:10.1029/2010GB003902.

Correction: Response of the Unicellular Diazotrophic Cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* to Iron Limitation

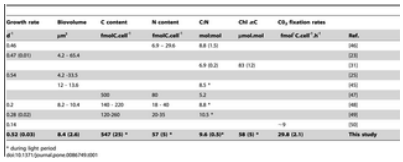
The PLOS ONE Staff

Published: April 09, 2014 • DOI: 10.1371/journal.pone.0092655

The following information is missing from the Funding section: This publication was funded by the French national IPSL project MODIF (Développement d'un MOdèle numérique du phytoplancton DIazotrophe)(Crocosphaera sp.) et de sa limitation en Fer.

In the Materials and Methods section, the second to last sentence incorrectly lists the percentage of total particulate organic carbon represented by C content associated with bacteria as 4%. The correct percentage is 2.8+/- 0.9 %

The final line of the second column of Table 2 incorrectly includes an asterisk. The correct version of Table 2 is below.



Growth rate	Biovolume	C content	N content	C/N	Chl *a*C	CO_2 fixation rates	
d^{-1}	μm^3	fmolC.cell^{-1}	fmolC.cell^{-1}	mol:mol	µmol.mol	fmol C.cell^{-1}.h^{-1}	Ref.
0.46			6.9 - 29.6	8.8 (1.3)			[46]
0.47 (0.01)	4.2 - 65.4						[23]
				6.9 (0.2)	83 (12)		[31]
0.54	4.2 - 33.5						[25]
	12 - 13.6			8.5 *			[45]
		500	80	5.2			[47]
0.2	8.2 - 10.4	140 - 220	18 - 40	8.8 *			[48]
0.28 (0.02)		120-260	20-35	10.5 *			[49]
0.14					~9		[50]
0.32 (0.03)	**8.4 (2.4)**	**547 (25) ***	**57 (5) ***	**9.6 (0.5)***	**98 (5) ***	**29.8 (2.1)**	**This study**

* during light period
doi:10.1371/journal.pone.0086749.t001

Table 2. Comparison of growth rate, biovolume, cellular contents, elemental ratio and CO_2 fixation rate of *C. watsonii* WH8501 cultivated under Fe-replete conditions (numbers in brackets represent standard deviation).
doi:10.1371/journal.pone.0086749.t001

Reference

1. Jacq V, Ridame C, L'Helguen S, Kaczmar F, Saliot A (2014) Response of the Unicellular Diazotrophic Cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* to Iron Limitation. PLoS ONE 9(1): e86749 doi:10.1371/journal.pone.0086749.
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar

Figures

Citation: The *PLOS ONE* Staff (2014) Correction: Response of the Unicellular Diazotrophic Cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* to Iron Limitation. PLoS ONE 9(4): e92655. doi:10.1371/journal.pone.0092655

Published: April 9, 2014

Copyright: © 2014 The PLOS ONE Staff. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Annexe 2. Récapitulatif des paramètres mesurés (chapitre 1)

Les valeurs indiquées représentent les moyennes des mesures obtenues pendant la phase exponentielle de croissance, avec leurs écart-types associés entre parenthèses. Le facteur de variation correspond à la valeur obtenue pour Fe=403.3 nM divisée par la valeur obtenue pour Fe=3.3 nM (excepté pour le rapport surface/volume nécessitant le calcul inverse du fait de son augmentation) ; le signe correspond au sens de variation : - pour une diminution, + pour une augmentation.

Fe (nM)	**3.3**	**5.3**	**8.3**	**13.3**	**23.3**	**43.3**	**103.3**	**403.3**	Facteur de
Fe' (nM)	0.16	0.26	0.41	0.66	1.16	*2.16**	*5.16**	*20.16**	variation
Croissance									
Taux de croissance (μ, j^{-1})	0.20 (0.03)	0.23 (0.01)	0.26 (0.02)	0.34 (0.04)	0.37 (0.01)	0.50 (0,03)	0.51 (0.03)	0.52 (0.03)	-2.6
Temps de doublement (j^{-1})	3.55 (0.54)	2.97 (0.18)	2.70 (0.22)	2.03 (0.23)	1.85 (0.03)	1.38 (0.08)	1.37 (0.08)	1.34 (0.09)	+2.7
Biovolume									
Biovolume (μm^3)#	3.8 (0.7)			4.7 (0.9)		4.8 (0.7)		8.4 (2.6)	-2.2
Surface:volume (μm^2:μm^3)#	3.1 (0.2)			2.9 (0.2)		2.9 (0.1)		2.4 (0.3)	+ 1.3
Composition cellulaire									
Contenu en C (fmol $C.cell^{-1}$)†	145.3 (14.9)	255.1 (35.3)	283.7 (42.4)	272.4 (28.7)	294.7 (28.8)	347.1 (25.2)	418.4 (49.7)	546.7 (24.6)	-3.8
Contenu en C (fmol $C.\mu m^{-3}$)	39.4 (6.8)			59.5 (11.8)		74.0 (10.2)		71.4 (24.2)	-1.8
Contenu en N (fmol $N.cell^{-1}$) †	17.5 (1.8)	28.8 (3.8)	31.6 (3.7)	26.6 (2.6)	31.2 (2.8)	41.7 (2.3)	52.0 (3.0)	57.1 (4.9)	-3.3
Contenu en N (fmol $N.\mu m^{-3}$)	4.8 (0.8)			5.8 (1.2)		8.9 (1.2)		7.5 (2.5)	-1.6
Contenu en Chl*a* (fg $Chla.cell^{-1}$) †	6.7 (1.5)	9.0 (1.0)	8.6 (1.5)	9.0 (1.8)	14.0 (2.2)	19.7 (1.7)	24.6 (3.2)	27.6 (2.9)	-4.1
Contenu en Chl*a* (fg $Chla.\mu m^{-3}$)	1.8 (0.3)			2.0 (0.4)		4.2 (0.6)		3.6 (1.2)	-2.0
C:N (mol:mol) †	8.3 (0.5)	8.9 (0.3)	8.8 (0.6)	10.2 (0.4)	9.5 (0.9)	8.3 (0.3)	8.0 (0.8)	9.6 (0.5)	-1.2
Chl*a* : C (fg:pmol) †	45.7 (7.6)	36.6 (3.2)	30.5 (6.9)	32.7 (3.8)	48.9 (5.9)	56.9 (6.1)	59.4 (7.5)	51.9 (4.7)	-1.1
Processus									
N_2 fixation (fmol $N.cell^{-1}.h^{-1}$)	0.11 (0.05)	0.74 (0.08)	0.53 (0.12)		1.01 (0.28)	1.04 (0.17)	2.58 (0.44)	2.10 (0.47)	-19
N_2 fixation (fmol $N.\mu m^{-3}.h^{-1}$)	0.03 (0.01)					0.22 (0.03)		0.27 (0.09)	-9.3
N_2 fixation (fmol $N.pmolC^{-1}.h^{-1}$)	1.07 (0.41)	2.81 (0.47)	2.09 (0.28)		4.25 (1.04)	3.65 (0.39)	5.84 (0.93)	3.91 (0.67)	-3.7
CO_2 fixation (fmol $C.cell^{-1}.h^{-1}$)	4.4 (0.4)	8.1 (1.6)	11.1 (1.7)	14.2 (2.2)	15.8 (3.5)	16.4 (2.3)	16.9 (2.2)	29.8 (2.1)	-6.8
CO_2 fixation (fmol $C.\mu m^{-3}.h^{-1}$)	1.2 (0.2)			3.1 (0.6)		3.5 (0.5)		3.9 (1.3)	-3.3
CO_2 fixation (fmol $C.pmolC^{-1}.h^{-1}$)	30.7 (1.8)	31.6 (3.3)	39.1 (2.3)	52.0 (4.1)	53.1 (7.5)	47.1 (4.9)	41.0 (8.4)	55.0 (2.7)	-1.8

* Concentrations en Fe' supérieures à la limite théorique de solubilité du Fe' (~1.45 nM, Sunda et Huntsman, 2003) † Mesuré durant la période lumineuse
# Mesuré durant la période d'obscurité

Annexe 3. *curriculum vitae*

Violaine JACQ – Doctorante – Biogéochimie Marine

Sorbonne Universités (UPMC, univ. Paris 6)-CNRS-IRD-MNHN, Laboratoire LOCEAN-IPSL

Née le 10 novembre 1986

Email: violaine.jacq@locean-ipsl.upmc.fr **Tel.:** +33 (0)1 44 27 48 61

Parcours universitaire

- **2004 - 2008: Licence "Science de la vie" spécialité biologie cellulaire** (dont 6 UE optionnelles d'écologie et/ou océanographie) - Université Aix-Marseille II.
- **2008 - 2009: Master 1 recherche "Océanographie Physique, Chimique et biologique"** - Centre d'Océanographie de Marseille (COM, actuellement Mediterranean Institute of Oceanography), Marseille, France.
- **2009 - 2010: Master 2 recherche "Océanographie Physique, Chimique et biologique" spécialité biogéochimie marine -** COM, Marseille, France - Mention Bien.
- **02/2010 - 06/2010**: **Stage Master 2 recherche** sous la direction de Dr. C. Panagiotopoulos et Dr. R. Sempéré (LMGEM, COM, Marseille, France) - "Mise au point d'une technique de dessalement appliquée à l'analyse de la composition en sucres du carbone organique dissous en mer de Beaufort (projet MALINA) "

-

Situation actuelle

Depuis 10/2010: Thèse de doctorat. Université Paris VI sous la direction de Pr. A. Saliot (Professeur émérite Sorbonne Universités - UPMC, univ. Paris 6) et Dr. C. Ridame (Maître de conférence Sorbonne Universités - UPMC, univ. Paris 6) - " Influence de la biodisponibilité des nutriments sur la fixation de N_2 et réponse de *Crocosphaera watsonii* face à la limitation en fer " - ED129.

10/2010 – 08/2013 : Doctorante contractuelle. 09/213 – 08-2014 : Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche – section CNU 37

Expérience professionnelle

- **10/2011 et 03/2013: Animation grand public** du stand de l'INSU/CNRS au "Forum international de la météo et du climat", Société météorologique de France, Paris, France.
- **08/2012 - 09/2012:** Participation à la **campagne océanographique internationale** STRASSE (Sub-TRopical Atlantic Surface Salinity Experiment), N/O Thalassa (Ifremer/Genavir), PI : Gilles Reverdin: Réalisation d'incubations d'eau de mer permettant de déterminer la limitation nutritive et l'influence d'un apport de poussières sahariennes sur la croissance et l'activité de la communauté diazotrophe en Atlantique subtropical Nord.
- **09/2011**: **Membre du comité d'organisation** des "Journées des doctorants du Centre des Sciences de la Mer", Paris, France.

Enseignement

- **Octobre 2010**- **Juillet 2013 : Monitorat** en biogéochimie marine, niveau Licence 2 à Master 1. 64 h équivalent TD par an.
- **Août 2013 – Août 2014 Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER). Niveau Licence 1 à Master 1.** Section CNU 37. 192 h équivalent TD.

Encadrement de stage

- **04/2012 - 06/2011**: Co-encadrement d'un **stagiaire de 2ème année de licence** Science et Vie de la Nature: "Étude de la limitation en fer sur la croissance d'une cyanobactérie unicellulaire diazotrophe: *Crocosphaera watsonii*, souche WH8501", rapport écrit de 20 pages et présentation orale en français (Note obtenue: 16/20).
- **04/2012 - 06/2012**: Encadrement d'une **stagiaire de 1ère année de Master recherche** Océanographie et Environnement Marin: "Étude de la limitation en Fer sur la croissance d'une cyanobactérie unicellulaire diazotrophe: *Crocosphaera watsonii*, souche WH8501", rapport écrit de 10 pages et présentation d'un poster en français (Note obtenue: 15/20).

Compétences scientifiques

Echantillonnage et mesures	Logiciels	Langues
Cultures phytoplanctoniques en conditions «métaux traces» (Préparation d'eau de mer artificielle et culture de phytoplancton diazotrophe en condition de limitation sévère en fer: techniques ultra propres et stériles) Purification sur **résine CHELEX** 100 (+ conception et mise en place intégrale du montage au LOCEAN) **Fixation N_2 and CO_2** (incubation avec $^{15}N_2$ et ^{13}C) **Phosphates** (dosage colorimétrique, spectrophotomètre) **Chlorophylle *a*** (spectrofluorimètre) **Echantillonnage CTD** (DIC, O_2, nutritifs, ^{13}C, ^{18}O) **Echantillonnage en condition «métaux trace»: Bouteilles Go-Flo**	PackOffice Windows Xlstat® R gnu (débutante, statistiques) Ocean Data View ®	Français (langue maternelle) Anglais (compris, lu et écrit (rédaction scientifique)) Espagnol (notions)

Communications orales

- **08/2013:** Jacq, V., Ridame, C., L'Helguen, S., Kaczmar F., Saliot, A. "Impact of iron limitation on marine unicellular diazotrophic cyanobacteria" Présentation orale acceptée - **Goldschmidt 2013** - Florence, Italie.
- **05/2013:** Jacq, V., Ridame, C., L'Helguen, S., Kaczmar F., Saliot, A. "Response of marine unicellularN_2 fixing cyanobacteria to iron limitation" Présentation orale – conférence **Young Researchers In Life Sciences** – Paris, France.
- **04/2012:** Jacq, V., Ridame, C., L'Helguen, S., Kaczmar, F., Catala, P., Saliot, A. "The influence of iron limitation on the growth and activity of *Crocosphaera watsonii*, an unicellular diazotrophic cyanobacterium" Poster présenté au meeting de l'**European Geoscience Union 2012**, Vienne, Autriche.

- **09/2011: Journées des doctorants du Centre des Sciences de la Mer (CSM)**: "The influence of nutrient limitations on the growth and activity of an unicellular diazotrophic cyanobacterium: *Crocosphaera*". Prix CSM de la meilleure présentation
- **09/2011 et 12/2012**: Journée des doctorants de l'équipe PaléoProxus du LOCEAN: Influence de la limitation en fer chez une cyanobactérie diazotrophe unicellulaire: *Crocosphaera watsonii*

- **03/2011**: Séminaire **BIOMAR** (groupe de travail sur la biogéochimie marine à l'Institut Pierre Simon Laplace): "The influence of nutrient limitations on the growth and activity of an unicellular diazotrophic cyanobacterium: *Crocosphaera*"

Publications scientifiques

2014: Jacq, V., Ridame, C., L'Helguen, S., Kaczmar, F., Saliot, A. (2014) Response of the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera* watsonii to iron limitation. Plos one 9, e86749. doi:10.1371/journal.pone.0086749.

Projet scientifique en cours

2013-2014 : Projet IPSL (Institut Pierre Simon Laplace) **MODIF: Développement d'un MOdèle numérique du phytoplancton DIazotrophe (*Crocosphaera* sp.) et de sa limitation en Fer.** PI. Dr Giovanni Aloisi (Sorbonne Universités (UPMC, univ. Paris 6)-CNRS-IRD-MNHN, Laboratoire LOCEAN-IPSL) et Dr. Céline Ridame.

Influence de la biodisponibilité des nutriments sur la fixation de N_2 et réponse de *Crocosphaera watsonii* face à la limitation en fer

Résumé:

La fixation de N_2, ou diazotrophie, est un processus biogéochimique majeur en raison de son apport en azote nouveau dans la couche de surface de l'océan. Cependant ses facteurs de contrôle restent mal connus. Le fer, dont les concentrations de surface sont faibles, est un élément potentiellement limitant de la fixation de N_2 du fait du contenu en fer important de l'enzyme responsable de ce processus : la nitrogénase. En raison de leur découverte récente, peu d'études ont été menées sur les cyanobactéries diazotrophes unicellulaires (UCYN) pouvant être responsables de ~50% de la fixation de N_2 à l'échelle globale. Des expériences en culture ont permis de caractériser et quantifier pour la première fois la réponse d'une UCYN, *Crocosphaera watsonii*, face à la limitation en fer. Lors de la diminution des concentrations en fer dans le milieu, il a été observé une réduction de la croissance et des taux de fixation de N_2 de cet organisme ainsi qu'une stratégie d'adaptation des cellules avec une diminution de leur biovolume. De plus, la stimulation de la croissance et de l'activité de *C. watsonii* cultivées en condition de limitation en fer suite à l'ajout d'une pluie saharienne artificielle a permis de mettre en évidence qu'une partie au moins du fer issu de poussières désertiques est biodisponible. En Atlantique subtropical Nord, où nous avons déterminé une forte contribution de la fixation de N_2 à la production nouvelle, nous avons observé une limitation de la fixation de N_2 et de la production primaire principalement par les phosphates et mis en évidence le rôle des métaux traces dans le contrôle de la fixation de N_2. Un ajout de pluie saharienne a permis de stimuler systématiquement la fixation de N_2 et la production primaire. L'ensemble de ces résultats participe donc à la réflexion globale sur la fixation de N_2 en milieu océanique et apporte des informations sur les mécanismes responsables des interactions entre les cycles biogéochimiques du fer, de l'azote et du carbone.

Mots clés : Fixation de N_2, limitation en fer, *Crocosphaera watsonii*, poussières désertiques, Atlantique subtropical Nord, métaux traces.

Impact of nutrients bioavailability on N_2 fixation and response of *Crocosphaera watsonii* to iron limitation

Abstract :

Despite the biogeochemical importance of N_2 fixation, which represents the largest source of newly-fixed nitrogen to the open ocean, some uncertainties remain about its controlling factors. Iron (Fe) is widely suspected as a key controlling factor due to the high Fe content of the nitrogenase complex involved in the biological N_2 fixation and to its low concentration in oceanic surface seawaters. N_2 fixation rates associated with unicellular N_2 fixing cyanobacteria (UCYN) were estimated to be ~50% of the total N_2 fixation at global scale, but as they have been recently discovered few studies have been conducted on these organisms. We performed culture experiments in order to quantify for the first time the response of an UCYN, *Crocosphaera watsonii*, to Fe limitation. Reduction of ambient Fe concentration led to significant decreases in growth rate and N_2 fixation rates per cell and we observed an adaptive strategy to Fe limitation with a cell volume reduction. Then, the enhancement of growth and activity of *C. watsonii* under Fe limitation condition after artificial Saharan rain addition highlighted that at least a part of the Fe released by the dust is bioavailable. In subtropical North Atlantic, an important contribution of N_2 fixation to new production was observed and we showed that primary production and N_2 fixation were globally P-limited. We revealed that trace metals play a key role in controlling N_2 fixation in this area. Saharan rain addition stimulated N_2 fixation, presumably by supplying these nutrients. All these results contribute to our knowledge of the control of oceanic N_2 fixation and provide new insight about interactions between Fe, nitrogen and carbon biogeochemical cycles.

Keywords: N_2 fixation, iron limitation, *Crocosphaera watsonii*, Saharan dust, subtropical North Atlantic, trace metals