



**HAL**  
open science

# Etude de la bio-calcification des coccolithophoridés dans un contexte d'acidification des océans. Calibrations de proxies (B/Ca et $\delta^{11}\text{B}$ ) du pH dans les coccolithes

Nina Delebecque

## ► To cite this version:

Nina Delebecque. Etude de la bio-calcification des coccolithophoridés dans un contexte d'acidification des océans. Calibrations de proxies (B/Ca et  $\delta^{11}\text{B}$ ) du pH dans les coccolithes. Autre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT: 2017BRES0125 . tel-01835154

**HAL Id: tel-01835154**

**<https://theses.hal.science/tel-01835154>**

Submitted on 11 Jul 2018

**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.

Thèse préparée à l'Université de Bretagne Occidentale  
pour obtenir le diplôme de DOCTEUR délivré de façon partagée par  
l'Université de Bretagne Occidentale et l'Université de Bretagne Loire

Spécialité : Chimie Marine

École Doctorale Sciences de la Mer et du Littoral

présentée par

**Nina Delebecque**

Etude de la bio-calcification des  
coccolithophoridés dans un  
contexte d'acidification des océans.  
Calibrations de proxies (B/Ca et  
 $\delta^{11}\text{B}$ ) du pH dans les coccolithes

**Thèse soutenue le 11 Décembre 2017**  
devant le jury composé de :

**Paul TREGUER**

Professeur Émérite, LEMAR – IUEM - *Président du Jury*

**Patrizia ZIVERI**

Full Professor, ICTA, Universitat Autònoma de Barcelona -  
*Rapporteur*

**Nicolas CASSAR**

Professeur Associate, Nicholas School of the Environment ,  
*Duke University – Rapporteur*

**Jill Naomi SUTTON**

Maitre de Conférence, LEMAR - IUEM – *Examinatrice*

**Paolo MONTAGNA**

Chercheur, Istituto di Scienze Marine (CNR), U.O.S. di Bologna  
– *Examineur*

**Eric DOUVILLE**

Chargé de Recherche, LSCE, USQY – *Examineur*

**Marie BOYÉ**

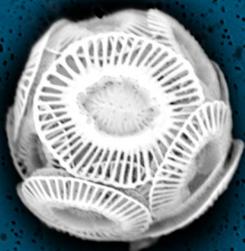
Directrice de Recherche, LOCEAN, UPMC – *Directrice de thèse*

**Marie-Alexandrine SICRE**

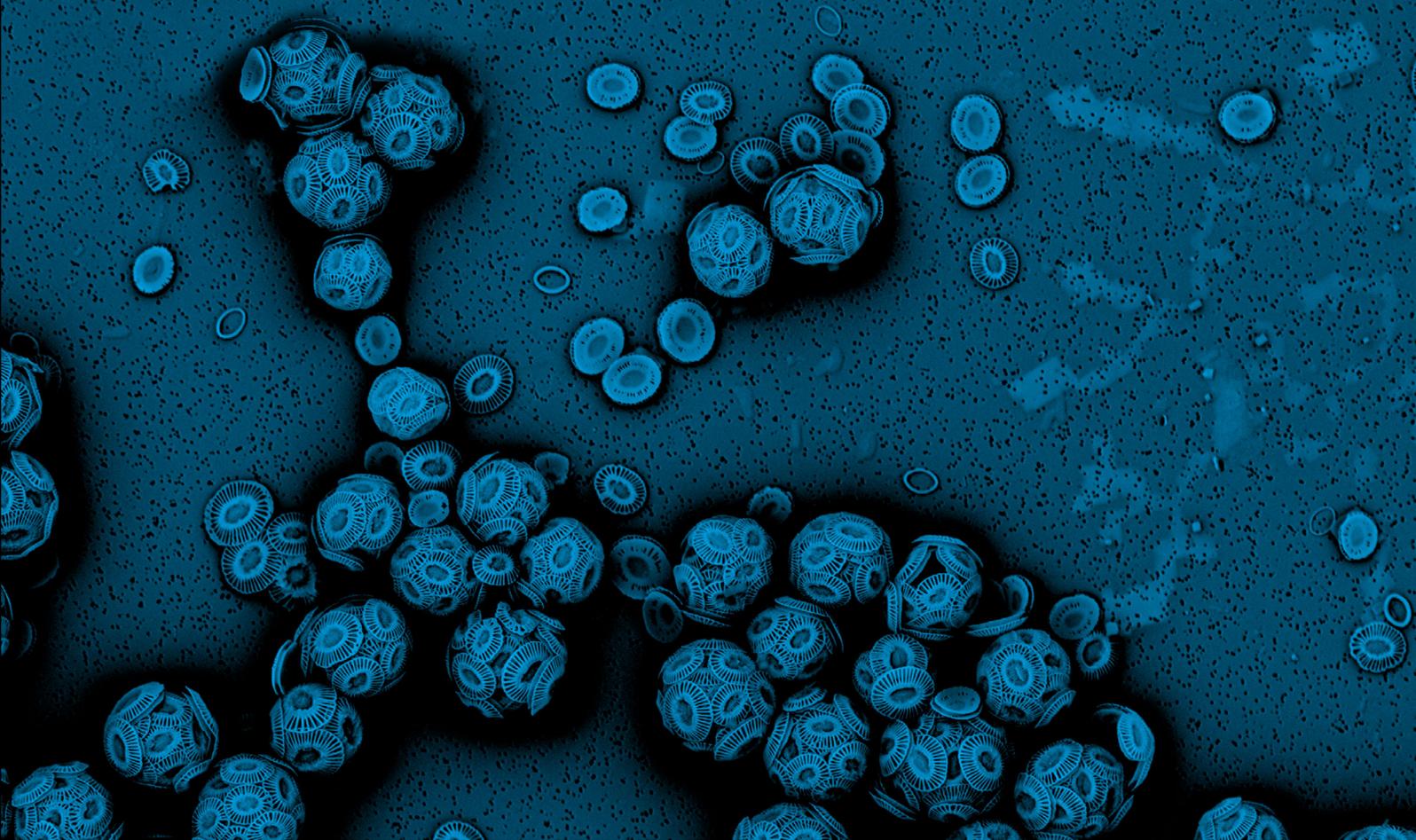
Directrice de Recherche, LOCEAN, UPMC – *Directrice de thèse*







Étude de la bio-calcification des  
**coccolithophoridés**  
dans un contexte d'acidification des océans  
*Calibrations de proxies (B/Ca et  $\delta^{11}\text{B}$ ) du pH dans les coccolithes*



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
Spécialité : Chimie Marine  
École Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral

présentée par  
**Nina Delebecque**

Préparée à l'Université de Bretagne  
Occidentale

Thèse soutenue le 11 décembre 2017 devant le jury composé de :

Paul TREGUER  
Professeur Émérite, LEMAR – IUEM – Président du Jury

Patrizia ZIVERI  
Full Professor, ICTA, Universitat Autònoma de Barcelona – Rapporteur

Nicolas CASSAR  
Professeur Associate, Nicholas School of the Environment, Duke University – Rapporteur

Jill Naomi SUTTON  
Maître de Conférence, LEMAR – IUEM – Examinatrice

Paolo MONTAGNA  
Chercheur, Istituto di Scienze Marine (CNR), U.O.S. di Bologna – Examineur

Eric DOUVILLE  
Chargé de Recherche, LSCE, USQY – Examineur

Marie BOYÉ  
Directrice de Recherche, LOCEAN, UPMC – Directrice de thèse

Marie-Alexandrine SICRE  
Directrice de Recherche, LOCEAN, UPMC – Directrice de thèse



# TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	13
<b>I État de l'art</b>	<b>1</b>
1 LE CARBONE	3
2 LE CARBONE DANS L'OCÉAN	7
2.1 LE CARBONE INORGANIQUE . . . . .	7
2.2 L'ACIDIFICATION DES OCÉANS . . . . .	10
2.3 RÔLE DES CARBONATES . . . . .	12
3 LES COCCOLITHOPHORIDÉS	15
3.1 HISTOIRE DES COCCOLITHOPHORIDÉS . . . . .	15
3.2 MORPHOLOGIE ET FONCTION . . . . .	16
3.3 LA BIOGÉOCHIMIE DES COCCOLITHOPHORIDÉS . . . . .	17
3.4 EFFETS DE L'ACIDIFICATION DES OCÉANS SUR LES COCCOLITHOPHORIDÉS . . . . .	18
4 $\delta^{11}B$ ET B/CA DE LA CALCITE ET pH	21
4.1 LE BORE ET SES ISOTOPES . . . . .	21
4.2 SPÉCIATION DU BORE DANS L'EAU DE MER . . . . .	22
4.3 COMPOSITION DU BORE DANS LES CARBONATES MARINS . . . . .	22
5 OBJECTIFS ET PLAN DE THÈSE	25

<b>II Méthodes expérimentales de l'étude physiologique d'<i>Emiliana huxleyi</i> en culture</b>	<b>29</b>
2.1 INTRODUCTION . . . . .	31
2.2 TECHNIQUES DE CULTURE . . . . .	31
2.2.1 Culture en turbidostat . . . . .	31
2.2.2 Culture en batch . . . . .	35
2.3 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DE CULTURES EN BATCH . . . . .	37
2.3.1 Choix des souches . . . . .	37
2.3.2 Choix des pH et technique d'équilibre du pH . . . . .	37
2.3.3 Préparation des milieux de culture . . . . .	38
2.4 CULTURES . . . . .	38
2.4.1 Acclimatation des souches . . . . .	38
2.4.2 Déroulement des expériences en batchs dilués . . . . .	40
2.4.3 Taux de croissance et nombre de génération . . . . .	40
2.5 ÉCHANTILLONNAGE DES CULTURES EN BATCHS DILUÉS . . . . .	42
2.6 TRAITEMENT DES DONNÉES ET ANALYSES DES PARAMÈTRES . . . . .	43
2.6.1 Mesures des paramètres du système des carbonates . . . . .	43
2.6.2 Analyses du carbone particulaire . . . . .	45
2.6.3 Analyses de la morphologie . . . . .	45
2.6.4 Épaisseur de la calcite . . . . .	45
2.7 CONCLUSION . . . . .	46
<b>III Méthodologie</b>	<b>47</b>
1 PROCOLES D'ISOLATION DES COCCOLITHES ET D'EXTRACTION DU BORE	49
1.1 INTRODUCTION . . . . .	49
1.2 ÉCHANTILLONNAGES ET ISOLATION DES COCCOLITHES . . . . .	50
1.2.1 Échantillonnage des cellules par filtration . . . . .	50
1.2.2 Choix des filtres . . . . .	51
1.2.3 Traitement alcalin : dissolution de la matière organique issue de la filtration	51
1.2.4 Échantillonnage des cellules par centrifugation . . . . .	52
1.2.5 Traitement alcalin à l'issu de la centrifugation . . . . .	52
1.3 DISSOLUTION DE LA CALCITE . . . . .	53

1.3.1	Mise en solution de la calcite sous vapeurs d'acide . . . . .	53
1.3.2	Technique par ajout d'acide sur la calcite après centrifugation . . . . .	53
1.4	EXTRACTION DU BORE . . . . .	54
1.4.1	Résine Amberlite . . . . .	54
1.4.2	Protocole d'extraction sur colonne en boucle . . . . .	55
1.4.3	Technique par batch/gravité . . . . .	55
1.4.4	Calcul de rendement / efficacité de la colonne . . . . .	57
1.5	BLANCS DE PROTOCOLE, DE RÉACTIFS, DE MATÉRIEL ET LES LIMITES DE DÉTECTIONS . . . . .	57
1.6	RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSIONS . . . . .	58
1.6.1	Récolte et isolation des coccolithes . . . . .	58
1.6.2	Dissolution de la calcite . . . . .	59
1.6.3	Extraction du bore . . . . .	60
1.7	CONCLUSION . . . . .	61
2	ANALYSES ICP-QMS ET MC-ICP-MS . . . . .	63
2.1	PRINCIPE DES MESURES ICP . . . . .	63
2.2	MESURE ÉLÉMENTAIRE AU SPECTROMÈTRE DE MASSE : ICP-QMS . . . . .	65
2.3	MESURE ISOTOPIQUE AU SPECTROMÈTRE DE MASSE : MC-ICPMS . . . . .	65
2.4	EFFET MÉMOIRE DU BORE . . . . .	66
3	ANNEXE : PUBLICATION SCIENTIFIQUE . . . . .	67
3.1	INTRODUCTION . . . . .	70
3.2	MATERIAL AND METHODS . . . . .	72
3.2.1	Culture conditions of the coccolithophores . . . . .	72
3.2.2	Cleaning procedure . . . . .	72
3.2.3	Standards preparation . . . . .	73
3.2.4	Instrumentation - B/Ca and $\delta^{11}B$ measurements . . . . .	73
3.2.4.1	Boron concentrations . . . . .	73
3.2.4.2	Boron isotope measurements : . . . . .	73
3.2.5	Chemical treatment of the samples . . . . .	75
3.2.5.1	Coccolith isolation . . . . .	75
3.2.5.2	Boron extraction and isotopic measurement . . . . .	75
3.3	RESULTS . . . . .	76

3.3.1	Protocols development . . . . .	76
3.3.1.1	Blanks . . . . .	76
3.3.1.2	Removal of organic matter . . . . .	76
3.3.1.3	Boron extraction . . . . .	77
3.3.2	ICP-QMS and MC-ICP-MS measurements . . . . .	79
3.3.3	Results of $\delta^{11}B$ in calcite . . . . .	79
3.4	DISCUSSION . . . . .	79
3.4.1	$\delta^{11}B$ in coccolith calcite . . . . .	79
3.4.2	B/Ca ratio in coccolith calcite . . . . .	80
3.5	CONCLUSION . . . . .	82
<b>IV</b>	<b>Le bore proxy du pH</b>	<b>87</b>
4.1	INTRODUCTION . . . . .	89
4.2	RÉSULTATS DE $\delta^{11}B$ DE LA CALCITE DES SOUCHES RCC-P41 ET RCC-P4 . . . .	90
4.2.1	Souche RCC-P41 . . . . .	90
4.2.2	Souche RCC-P4 . . . . .	90
4.2.3	Condition de culture . . . . .	90
4.2.4	Composition isotopique et pH . . . . .	93
4.2.5	Résultats du ratio B/Ca dans la calcite des coccolithes . . . . .	94
4.3	DISCUSSION . . . . .	94
4.3.1	Incorporation de l'acide borique dans la cellule . . . . .	97
4.3.2	Comparaison au $\delta^{11}B$ d'hétérotrophes . . . . .	99
4.3.3	B/Ca dans la calcite . . . . .	100
4.4	CORRÉLATION ENTRE LES PARAMÈTRES BIOLOGIQUES ET BIOGÉOCHIMIQUES . .	101
<b>V</b>	<b>Réponses physiologiques d'<i>E. huxleyi</i> aux variations de pH</b>	<b>105</b>
5.1	INTRODUCTION . . . . .	107
5.2	PRÉSENTATION DES RÉSULTATS OBTENUS . . . . .	107
5.2.1	Les taux de croissance . . . . .	107
5.2.2	Chimie des carbonates dans les expériences de cultures d' <i>E. hux</i> . . . . .	107
5.2.3	Morphologie des cellules . . . . .	111
5.2.3.1	Le diamètre des coccosphères . . . . .	113

5.2.3.2	La taille des coccolithes : DSL . . . . .	114
5.2.4	Carbone Particulaire . . . . .	116
5.3	DISCUSSION . . . . .	118
5.3.1	Réponse des souches de <i>E. huxleyi</i> lors de la variation du pH . . . . .	118
5.3.2	Réponses spécifiques des souches RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> . . . . .	118
5.3.3	Impact de la variation du pH . . . . .	120
5.3.4	Les souches RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> dans le cycle du carbone . . . . .	121
5.4	CONCLUSION . . . . .	121
 <b>VI Conclusions générales et perspectives</b>		<b>125</b>
 <b>VII Annexes</b>		<b>143</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>147</b>



# TABLE DES FIGURES

1.1	Courbe de Keeling issue du site internet <a href="https://scripps.ucsd.edu">https://scripps.ucsd.edu</a> . . . . .	3
1.2	Cycle du Carbone – Les chiffres en noir correspondent au stockage du carbone exprimés en GtC, ceux en violet correspondent au flux annuel exprimés en GtC/an. Image et données sont issues du site <a href="http://earthobservatory.nasa.gov">earthobservatory.nasa.gov</a> . . . . .	5
1.3	Sources et puits du CO <sub>2</sub> - Issue de l'étude de Archer (2010) . . . . .	6
1.4	Cycle du carbone dans l'océan : pompes physiques et biologiques (d'après Bopp et al., 2002) . . . . .	8
1.5	Spéciation et abondance du carbone inorganique dissous dans l'eau en fonction du pH mesuré . . . . .	10
1.6	Système des carbonates avant l'ère industrielle (gauche) et dans le contexte de l'acidification des océans (droite), les flèches rouges indiquent le flux de carbone d'origine anthropique modifiant l'équilibre du système des carbonates. . . . .	11
1.7	Organismes calcifiants de l'océan. (a) Squelette de corail (issue de la collection de Université College de Dublin (UCD)); (b) foraminifère observé au Microscope Electronique à Balayage (MEB) (issue du Museum d'histoire naturelle de Londres); (c) coccolithophoridés observés au MEB à la Station Biologique de Roscoff. . . . .	12
1.8	Coccolithophoridés dans le cycle du carbone biogéochimique, (A) Pompe biologique du Carbone; (B) Contre-pompe des carbonates, schéma adapté par Bendif 2011 issue de l'étude de de Vargas et al. 2007. . . . .	14
1.9	Illustration des premières observations de coccophères (Wallich, 1861) . . .	15
1.10	Schéma de la formation de coccolithes dans la vésicule interne, schéma adapté de Taylor et al. (2011) . . . . .	16

1.11	Réponses des coccolithophoridés face l'augmentation à $CO_2$ atmosphérique pour <i>E. huxleyi</i> (gauche) et <i>Gyrophycapsa oceanica</i> - (a),(b)et (c) représentent les coccosphères et les coccolithes dans les conditions pré-industrielles – et (d),(e) et (f) représentent les coccosphères et les coccolithes dans un océan s'acidifiant. Issue de l'étude de Riebesell et Zondervan 2000 . . . . .	19
1.12	Réponses spécifiques des différentes souches de <i>E. huxleyi</i> , étude issue des travaux de Langer et al. (2009) . . . . .	20
1.13	Spéciation de l'acide borique et des ions borates (a), et variation de la composition isotopique dans l'acide borique et les ions borates (b) en fonction du pH de l'eau de mer. Les calculs suivent les équations (4.1) et (4.5) (Foster et al. 2010) et utilisent le coefficient de fractionnement isotopique défini par (Klochko et al. 2006) . . . . .	23
2.1	Schéma du turbidostat - Détails de chaque numéro décrit dans le paragraphe 2.2.1 : [1] le bioréacteur, [2] et [4] pompes péristaltiques à double tête, [2a] et [2b] deux bouteilles en PC, [3] la sonde pH, [4a] et [4b] milieu de culture, [5] le biocontrôleur, [6a] les valves de $CO_2$ , [6b] les valves de $O_2$ et [7] l'ordinateur. . . . .	33
2.2	Photo de l'installation du turbidostat au laboratoire du LEMAR . . . . .	34
2.3	Cultures en batch au laboratoire du LEMAR . . . . .	36
2.4	Schéma d'explication des cultures en batch versus culture en turbidostat (culture continu) . . . . .	36
2.5	Photo des souches RCC-P4 et RCC-P41 prises au Microscope Electronique à Balayage (MEB), à la station Biologique de Roscoff (SBR). . . . .	37
2.6	Déroulement des cultures en batchs dilués réalisées en laboratoire dans les différentes conditions de pH . . . . .	41
2.7	Mesures du diamètre des coccosphères et de la plus grande longueur des coccolithes (DSL) . . . . .	46
3.1	Schéma du protocole d'échantillonnage des coccolithophoridés par filtration et de purification des coccolithes avec un traitement alcalin . . . . .	51

3.2	Étapes d'échantillonnage des coccolithophoridés par centrifugation et de purification par traitement alcalin à partir des travaux de Blanco-Ameijeiras et al. (2012), Müller et al. (2013) . . . . .	52
3.3	Dissolution de la calcite par digestion sous vapeurs d'acide de $HNO_3$ . . . . .	53
3.4	Schéma d'explication de l'extraction du bore par la résine Amberlite à l'échelle moléculaire à partir de Rajiv et al. (2010) . . . . .	55
3.5	Principe de l'extraction en ligne et en boucle des isotopes du bore sur colonne amberlite . . . . .	56
3.6	Composition (en %) des blancs de réactifs et de matériels mesurés en bouteille PTFE (à gauche) et réduction des blancs par utilisation de bouteilles en PFA (à droite). Les pourcentages du diagramme (à droite) ont été calculés à partir des pourcentages du diagramme (à gauche). . . . .	58
3.7	Collecte de cellules de coccolithophoridés sur des filtres PC suite au traitement alcalin avec une solution à 0.5 M de $NH_4OH$ et 2% de $H_2O_2$ . . . . .	59
3.7	Observation au MEB (N. Gayet, IFREMER) des filtres PC après l'étape de leaching . . . . .	60
3.8	Principe d'introduction d'un échantillon dans un spectromètre de masse . . . . .	64
3.9	B Speciation in borate ions ( $B(OH)_4^-$ ) and acid boric ( $B(OH)_3$ ) (a) and variations in isotopic composition these two B species with seawater pH (b). Calculations are based on equations (1) and (2) by Foster et al. (2010), Klochko et al. (2006), Dickson (1990). . . . .	71
3.10	(a) The lines indicate the theoretical $\delta^{11}B$ values of borate in seawater with different values of $\alpha$ (from the equation (6)). Also showing the $\delta^{11}B$ measured in the coccolith calcite of <i>E. huxleyi</i> RCC-P41 at pH 8.1 (orange circles) and in the Argenton sea water (blue square) used as a medium for the cultures and data set at around same pH of foraminifera ( <i>G. ruber</i> , Hennehan et al. (2013) and <i>G. sacculifer</i> , Sanyal et al. (2001)) of coral ( <i>Acropora sp.</i> , Disard et al. (2012) and inorganique calcite Sanyal et al. (2000) (b) $\delta^{11}B_{calcite} - \delta^{11}B_{borate}$ for RCC-P41, foraminifera ( <i>G. ruber</i> and <i>G. sacculifer</i> ), coral ( <i>Acropora sp.</i> ) and inorganique calcite black line is 1 :1 $\delta^{11}B_{calcite} - \delta^{11}B_{borate}$ relationship. . . . .	81

3.11	Plots showing the B/Ca ratios in coccoliths of <i>E. huxleyi</i> P41 (orange symbols) at modern ocean pH value of 8.1 (a). Values of B/Ca measured (a) in coccoliths from Stoll et al. (2012) and (b) in foraminifera from Allen et al. (2016) are also shown. Plots of B/Ca against $[CO_3^{2-}]$ for coccoliths (c) and foraminifera (d). Plots of B/Ca against $[B(OH)_4^- / HCO_3^-]$ for coccoliths (e) and foraminifera (f). . . . .	83
4.1	Valeurs de $\delta^{11}B$ mesurées dans la calcite de la souche RCC-P41 (cercles jaunes) et dans l'eau de mer utilisée pour l'expérience (carré). Courbes des valeurs de $\delta^{11}B_{borate}$ en fonction du pH pour plusieurs valeurs de $\alpha$ (Klochko et al. 2006, Kakihana et al. 1977, Byrne et al. 2006, Palmer et al. 1987, Nir et al. 2015). . . . .	91
4.2	Valeurs de $\delta^{11}B$ mesurées dans la calcite de la souche RCC-P4 (cercles bleus) et dans l'eau de mer utilisée pour l'expérience (carré). Courbes des valeurs de $\delta^{11}B_{borate}$ en fonction du pH pour plusieurs valeurs de $\alpha$ (Klochko et al. 2006, Kakihana et al. 1977, Byrne et al. 2006, Palmer et al. 1987, Nir et al. 2015). . . . .	92
4.3	(a) $\delta^{11}B$ -pH (total scale) et (b) $\delta^{11}B_{carbonate}$ - $\delta^{11}B_{borate}$ ; pour les deux graphes les cercles bleus et jaunes correspondent respectivement aux souches de <i>E.huxleyi</i> (RCC-P41 et RCC-P4). Les losanges jaunes et marrons correspondent aux foraminifères ( <i>G.ruber</i> , <i>G. sacculifer</i> ) (Henehan et al. 2013, Sanyal et al. 2001), les carrés verts correspondent aux coraux ( <i>Acropora sp.</i> , (Dissard et al. 2012)) - La droite noire correspond à pour un rapport de 1 :1.	95
4.4	Rapport de B/Ca pour les souches RCC-P41 (gauche) et RCC-P4 (droite) - Représentation en fonction du pH (a et d), en fonction de $[B(OH)_4^- / HCO_3^-]$ (b et c) et en fonction de $[CO_3^{2-}]$ (c et f) . . . . .	96
4.5	Modèles des incorporations du carbone inorganique/calcium et du bore dans la cellule et la vésicule interne. Basée sur l'intégration des ions par diffusion et sur la potentielle recoordination de l'acide borique en ions borate.	98
4.6	Calcul de la valeur du pH à partir de la mesure de la composition isotopique du bore (rond vert) comparé aux valeurs de pH mesurées dans l'eau de mer (losange rouge) pour la souche RCC-P41. . . . .	102

5.1	Courbes montrant l'évolution de la densité cellulaire en cellules/mL en fonction du temps pour les trois valeurs de pH et les deux souches étudiées RCC-P <sub>41</sub> (en haut) et RCC-P <sub>4</sub> (en bas). . . . .	108
5.2	Taux de croissance des expériences contrôles en batchs dilués pour les souches RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> . . . . .	110
5.3	Calcul du DIC à partir du logiciel CO <sub>2</sub> sys avant et après expérience pour les souches RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> . Calcul du $\Delta$ DIC en pourcentage pour les deux souches . . . . .	112
5.4	Mesures de la taille (en $\mu$ m) des coccosphères et des coccolithes par le logiciel ImageJ pour les deux souches étudiées RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> . . . . .	114
5.5	Observation au MEB de l'allure des coccosphères et des coccolithes des souches RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> dans les différentes conditions de pH. . . . .	115
5.6	Valeurs de PIC, POC, taux de production du PIC et du POC pour les souches RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> . . . . .	117
5.7	Rain ratio, PIC/POC de chaque souche en fonction des différentes conditions de pH étudiées. . . . .	119
6.1	Composition isotopique du bore en fonction du pH pour les deux souches étudiées RCC-P <sub>41</sub> et RCC-P <sub>4</sub> et valeurs mesurées par M. Henehan sur une souche de <i>Emiliana huxleyi</i> (2015) . . . . .	130
6.2	Résultats préliminaires du ratio B/Ca dans les sédiments marins . . . . .	131



# Liste des tableaux

2.1	Tableau récapitulatif des concentrations des éléments utilisées pour la fabrication de l'eau de mer artificielle en sels et en vitamines, nutriments et métaux, les concentrations en nutriments, vitamines et métaux sont celles utilisées pour enrichir le milieu naturel enrichi issu du site d'Argenton . . .	39
2.2	Liste des échantillons prélevés à la fin de l'expérience. Avec DIC : Dissolved Organic Carbon, TPC : Total Particulate Carbon, POC : Particulate Organic Carbon, MEB : Microscope Electronique à Balayage, GF/F : Glass Fiber Filter, PC : PolyCarbonate Filter . . . . .	42
2.3	Tableau récapitulatif des paramètres analysés. Détails des traitement effectués, des appareils utilisés pour faire les mesures ainsi que le laboratoire où les analyses ont été effectuées (LEMAR : Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin; SBR : Station Biologique de Roscoff; CEREGE : Centre de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement) . . .	44
3.1	Settings of ICP-QMS for elementary analyses and MC-ICP-MS for boron isotopic analyses . . . . .	74
3.2	Blank levels determined in solutions, consumables and analytical protocols	76
3.3	Effect of alkaline treatment on boron concentration with the cleaning coccoliths procedure . . . . .	77
3.4	Elemental ratios (Mg/Ca, P/Ca, Fe/Ca) measured in coccolithophore samples before and after alkaline treatment following our protocol and the estimation of recovery (%) . . . . .	77
3.5	B/Ca and $\delta^{11}B$ values measured in corals, foraminifera and coccolithophores	78
4.1	Concentration en bore (mesurée en ICP-QMS) et masse de calcite (pesée en fin d'expérience) pour chaque souche étudiée et pour chaque valeur de pH	93

4.2	Composition hypothétique de la vésicule interne - Lieu de formation des coccolithes . . . . .	101
5.1	Données pour les deux souches d' <i>E. huxleyi</i> étudiées, RCC-P41 et RCC-P4. Valeurs moyennes des paramètres du système des carbonates, quotas taux de production de POC et de PIC, et paramètres morphologies des cellules pour chaque condition pH appliqué. . . . .	109
5.2	Résultats des mesures de DIC après ajustement du pH des cultures et état de saturation en calcium pour les milieux de cultures avant expérience. Les valeurs initiales de DIC étaient de 1791 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ pour la souche RCC-P41 et de 1822 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ pour la souche RCC-P4. . . . .	112
5.3	Valeurs de DIC et $\Omega\text{Ca}$ pour les milieux de cultures après expériences – $\Delta\text{pCO}_2$ et $\Delta\text{DIC}$ correspondent aux consommations au cours de l'expérience. . . . .	113
5.4	Tableau de comparaison entre les souches étudiées dans cette thèse et les souches issues des travaux de von Dassow et al. (2017) et Rouco et al. (2013)	121

# FINANCEMENT

Ce projet de thèse a été financé par la Région Bretagne (ARED) et l'Université de Bretagne Occidentale (UBO). Les travaux de recherches ont été menés au sein du Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin (LEMAR), à Plouzané (France). Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier du projet national proCOCA (Calibration de proxies pH et SSTs in coccolithes) par LEFE-CYBER.





# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, Patrizia Ziveri, Nicolas Cassar, mes rapporteurs. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de m'avoir apporter vos conseils. Je remercie aussi mes examinateurs Paolo Montagna, Eric Douville et Jill Sutton d'être venus jusqu'à Brest et d'avoir apporter des remarques et conseils importants.

Je souhaite remercier mes deux directrices de thèse, Marie Boyé et Marie-Alexandrine Sicre, de m'avoir proposé un sujet de thèse intéressant, innovant et palpitant. Je tiens à remercier plus particulièrement Marie-Alexandrine, pour ton épaulement jusqu'au bout, pour ces discussions scientifiques et ta disponibilité, même à l'autre bout du monde. Je remercie aussi Paul Tréguer pour sa disponibilité et sa bienveillance au cours de ces derniers mois de thèse.

Je souhaite remercier très chaleureusement mes "sauveurs de l'ombre". Jill, Ian and Gerald, thank you to have been there during these years. Thank you to have gave me the energy and the courage to continue this adventure. Thank for these all discussions about ... all subjects! :)

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe PSO, Emmanuel Ponzevera, Alexis De Prunele, Yoan Germain pour votre aide en salle blanche, dans l'élaboration du protocole et des mesures de l'isotopie du bore. Merci à Marie-Laure Rouget, Bleuenn Gueguen, et Claire de m'avoir aidée dans ces premières mesures élémentaires du bore dans les coccolithes! Merci à vous pour votre soutien et votre aide très précieuse durant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier l'École Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral, à Fred Jean et Elisabeth Bondu et au directeur du LEMAR, Luis Tito, pour leurs bienveillances et d'avoir fait en sorte que je puisse aller jusqu'au bout de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Stephane L'Helguen, Hélène Planquette, Fred Planchon, Morgan Gallinari, Aurélie Gaudrant, Eva Bucciarelli, Manon Le Goff, Christophe

Lambert, Nelly Le Goïc et les personnes du LEMAR pour votre soutien, votre aide pour que je puisse mener à bien mon projet de thèse.

Je remercie Dominique Ratiskol du site IFREMER Argenton, pour son aide et sa ponctualité. Et je remercie Nicolas Gayet pour ces chouettes moments musicaux passés au MEB!

Merci à mes copains de Brest! Laura, Marine, Gaëlle, Ewan, Marta, Sonia, Yann, Clémentine les soirées au Tara vont me manquer. Merci à Manon et Nolwenn pour leur bonne humeur, leur déconne et leur soutien sans faille. Et à tous les autres ... merci!

Mes boulettes, vous m'avez accompagnées de bout en bout et même à l'autre bout du monde. Ça a commencé avec les copépodes et Pingu et ça se termine avec les coccos! Merci mes boulettes d'avoir répondu présentes à toutes les occasions.

Ces trois années de thèse ont été rythmées par de nombreux concerts, mon poto d'enfance, Vincent, merci de m'avoir donné ces bouffées d'air, de déconne, de présence. C'est la première fois que je ne serais pas diplômée en même temps que toi.

Ma rousse, Ju, Christine, mes copains de lycée, votre soutien infailible, vos coups de rebooste ont été des plus importants pour moi. Merci de votre présence même à l'autre bout de la France et de l'Allemagne.

Je tiens à remercier l'ensemble de ma famille. À mes grands-mères, leurs soutiens. À mes deux petits neveux, Ewen et Mylan, pour votre innocence qui m'a permis de décrocher quand il le fallait. À ma soeur et mon beau frère de m'avoir apporté un réconfort dès qu'il fallait. À mon oncle et ma tante, d'avoir toujours répondu présent quand j'en avais besoin.

Et puis le plus grand des mercis revient à vous deux!

Papa, Maman!

Merci de m'avoir supportée dans cette aventure du Chiantifique, de m'avoir soutenue et aidée à accomplir cette passion et cette curiosité. Et surtout à toi, Maman, Merci, d'avoir su apporter toute cette énergie, cette présence et ce roc que tu as su être pour deux!

Enfin à toi, Jérôme, tu es arrivé au milieu de cette course. Tu as su me comprendre dans cette folie, m'écouter avec patience et raison et me donner suffisamment de réconfort pour m'aider à trouver l'énergie d'aller au bout.

Pour mes parents,  
"Hold on to what you got"  
*Walk off the Earth*



# I

État de l'art



# LE CARBONE

1

Durant de nombreuses années, la concentration en dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) a évolué stablement dans l'atmosphère autour de 180 à 280 parties par millions (ppm). Le carbone était jusque là stocké dans des réservoirs stables. L'utilisation des énergies fossiles, et notamment par combustion, a contribué à une augmentation brutale des concentrations de  $CO_2$  dans l'atmosphère. Depuis le début de la révolution industrielle, cette concentration ne cesse d'augmenter et a atteint en 2013 des valeurs de 400 ppm (Tans et Keeling 2014) (figure 1.1) soit presque 590 Giga tonnes de Carbone (GtC) dans l'atmosphère (Foster et Rae 2016).

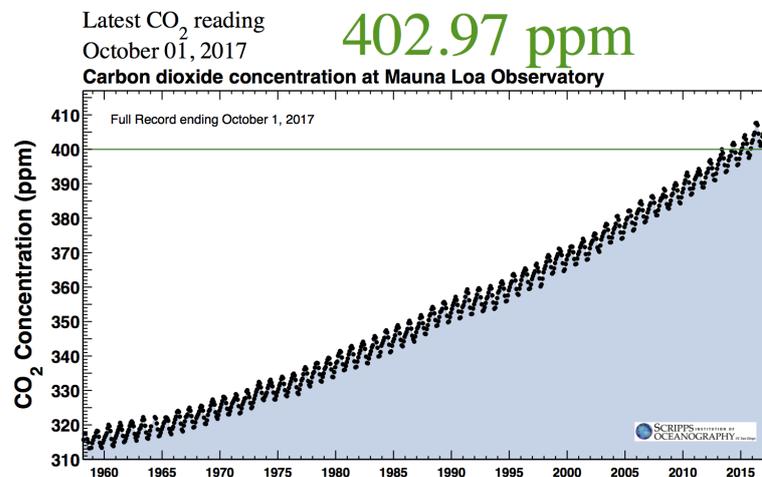


FIGURE 1.1 – Courbe de Keeling issue du site internet <https://scripps.ucsd.edu>

Les prédictions à l'horizon 2100 des teneurs en  $CO_2$  atmosphérique sont de l'ordre de 550 ppm dans le meilleur des scénarios et de 930 ppm dans le pire des scénarios. Cette augmentation avait été estimée à environ 1% par année, cependant depuis quelques années, elle se serait accélérée jusqu'à atteindre une valeur de 3.4% par an (Le Quéré et al. 2009). Durant les années 1980 et 1990 seulement 50% du  $CO_2$  rejeté par les activités humaines dans l'atmosphère a été piégé par les océans et la biosphère terrestre (Houghton

JT et al. 2001, Kleypas et al. 2006, EPICA community members 2004, Siegenthaler et al. 2005).

Le  $\text{CO}_2$  est l'un des gaz à effets de serre (GES) les plus abondants de l'atmosphère avec le méthane ( $\text{CH}_4$ ), le protoxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}$ ) et la vapeur d'eau. Les GES absorbent le rayonnement infrarouge et contribuent ainsi au réchauffement de la planète. L'augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$  d'origine anthropique à laquelle s'ajoutent les émissions de composés fluorés (Chlorofluorocarbures, Hydrofluorocarbures, Hexafluorure de soufre,...) contribuent au processus de réchauffement au cours du dernier siècle. Ce dernier engendre des changements dans les gradients de températures entre les pôles et l'équateur. En effet, on observe une augmentation de la température plus importante aux niveaux des pôles. Cela se traduit par des modifications de l'albédo avec des rétroactions positives sur le bilan énergétique de la planète (Solomon 2007, Stocker 2014). Ce réchauffement n'est qu'une des manifestations du changement climatique.

On retrouve dans l'océan une quantité importante de carbone (figure 1.2). Il constitue un puits important du  $\text{CO}_2$ . Il y a environ 1020 GtC à la surface des océans sous forme dissoute. Environ 3 GtC sont utilisés par le phytoplancton, les macro-algues, les bactéries, le zooplancton et les poissons. Le carbone organique dissous (Dissolved Organic Carbon : DOC) représente environ 800 GtC excrété par le phytoplancton. L'océan profond contient plus de 38.000 GtC et le sédiment 150 GtC. L'océan profond constitue ainsi l'un des plus grands réservoirs de carbone de la planète. Au total, l'océan contient près le 40,000 GtC (océan et sédiments). L'atmosphère et la biosphère terrestre sont de petits réservoirs comparés à celui de l'océan (respectivement, 730 GtC sous la forme de  $\text{CO}_2$  gazeux et 2200 GtC (sols et végétations).

Les échanges de carbone entre atmosphère/océan, atmosphère/biosphère et océan de surface/océan profond sont plus ou moins intenses (figure 1.2). Du fait de l'augmentation des émissions anthropiques, les flux d'échanges sont perturbés et le bilan des échanges entre l'atmosphère, la biosphère et l'océan est déséquilibré d'environ de 8 GtC/an. En outre la combustion des énergies fossiles, le développement des procédés industriels ou encore la déforestation (figure 1.3) contribuent au déséquilibre du bilan de carbone. La déforestation et l'industrialisation contribue à l'augmentation de 45% du  $\text{CO}_2$  atmosphérique et de 26% dans les océans. Les principaux puits du  $\text{CO}_2$ , à court terme, sont la photosynthèse par la biomasse chlorophyllienne et les échanges océan/atmosphère notamment et par le transfert du carbone vers l'océan profond. Il existe d'autres sources qui

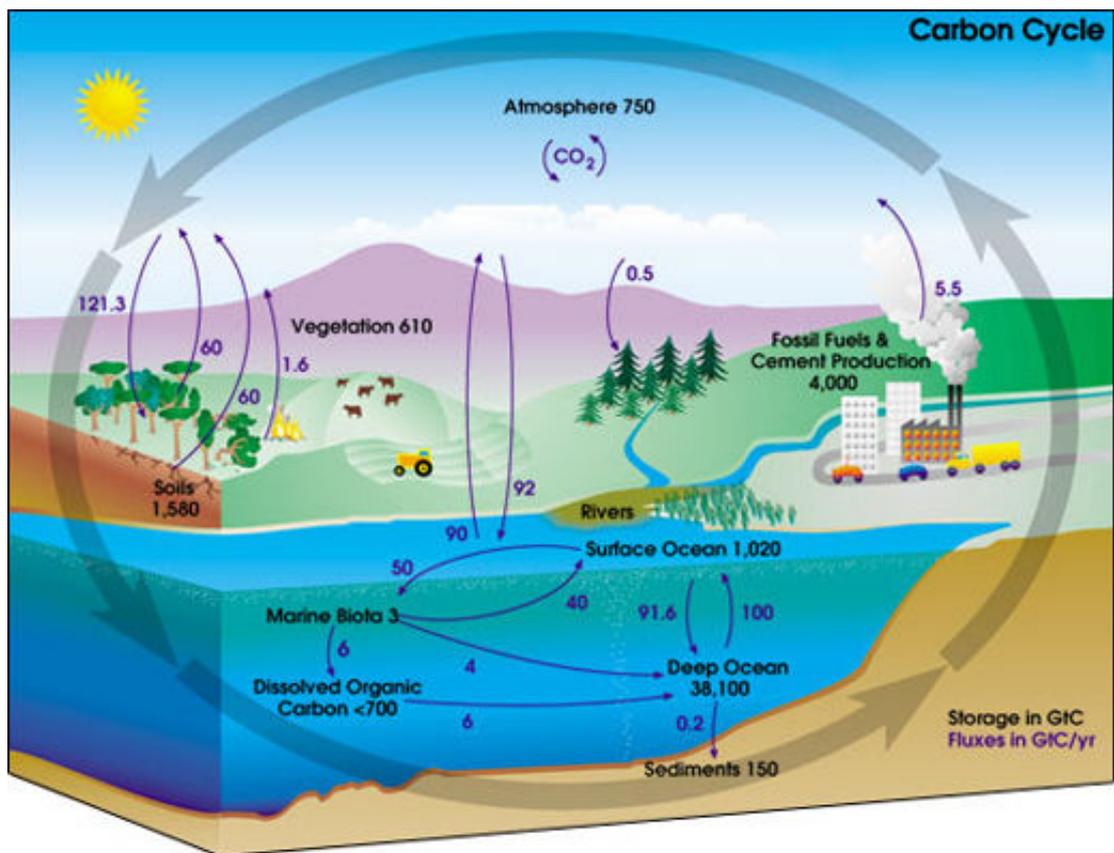


FIGURE 1.2 – Cycle du Carbone – Les chiffres en noir correspondent au stockage du carbone exprimés en GtC, ceux en violet correspondent au flux annuel exprimés en GtC/an. Image et données sont issues du site [earthobservatory.nasa.gov](http://earthobservatory.nasa.gov)

sont, quant à elles, des sources naturelles du  $\text{CO}_2$  telles que le manteau terrestre par son activité volcanique à travers les sources hydrothermales, la respiration de la biosphère ou encore la combustion des énergies fossiles. L'océan absorbe plus de  $\text{CO}_2$  qu'il n'en émet en réponse à l'apport anthropique de  $\text{CO}_2$  (figure 1.2).

### Human Perturbation of the Global Carbon Budget

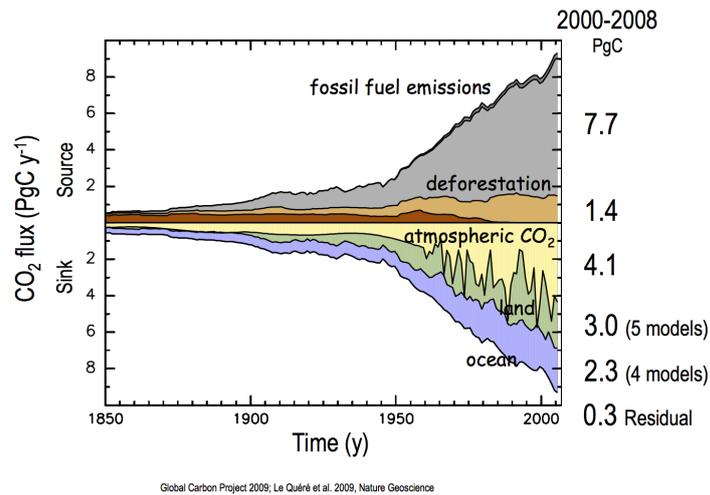


FIGURE 1.3 – Sources et puits du  $\text{CO}_2$  - Issue de l'étude de Archer (2010)

# LE CARBONE DANS L'OcéAN

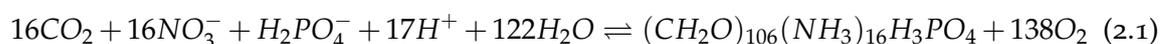
# 2

## 2.1 LE CARBONE INORGANIQUE

L'océan couvre les deux tiers de la surface du globe. Depuis l'ère industrielle, il joue un rôle clé dans le cycle du carbone, en absorbant près du tiers du  $CO_2$  atmosphérique d'origine anthropique (Khatiwala et al. 2013). Le carbone existe dans l'eau de mer sous 3 formes inorganique principales : le  $CO_2$  aqueux dissous, les ions bicarbonates ( $HCO_3^-$ ) et les ions carbonates ( $CO_3^{2-}$ ). La distribution de ces espèces varie en fonction notamment de la profondeur.

La distribution du  $CO_2$  dissous dans les océans résulte de processus biologiques et de processus physico-chimiques qui contrôlent les échanges de  $CO_2$  entre l'atmosphère et l'océan puis l'export (figure 1.4) (Bopp et al. 2015).

La photosynthèse réalisée par le phytoplancton se déroule essentiellement dans la zone euphotique. Les organismes autotrophes utilisent en effet la lumière, les nutriments et le carbone inorganique dissous pour synthétiser la matière organique particulaire (POC) selon la réaction :



Cette production primaire génère aussi une quantité de carbone organique dissous. Une partie de ce carbone organique est transférée plus profondément dans la colonne d'eau par le biais des réseaux trophiques qui permettent ainsi à une partie du DOC d'être séquestrée dans les eaux profondes (seulement 0,1%, d'après Feely et al. (2009)). Associé à la pompe biologique, il existe une autre pompe nommée la contre-pompe des carbonates. Cette contre-pompe résulte de la production des carbonates de calcium par les réactions

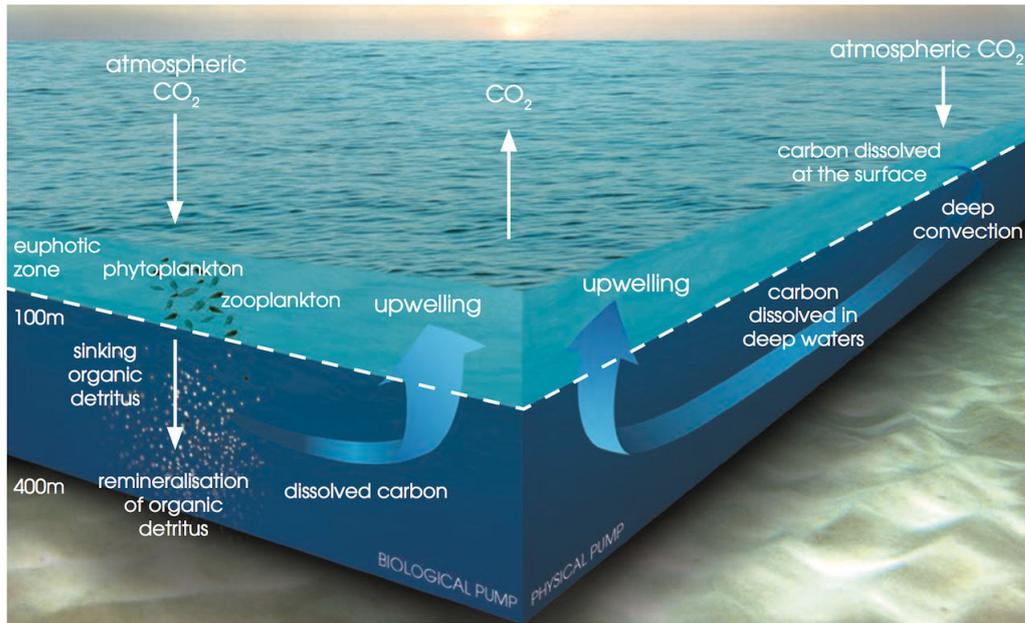
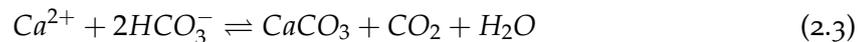


FIGURE 1.4 – Cycle du carbone dans l'océan : pompes physiques et biologiques (d'après Bopp et al., 2002)

suivantes :



L'existence de cette contre-pompe est liée à l'activité des organismes calcifiants tels que les coccolithophoridés, les foraminifères ou les coraux (Denman et al. 2007) (voir partie 2.3). Les mécanismes physico-chimiques interviennent aussi dans le cycle océanique du carbone. Ils sont liés aux échanges directs entre l'océan et l'atmosphère par processus thermodynamiques et à la circulation océanique (Sabine et al. 2004) (figure 1.6a). C'est le cas par exemple des zones d'upwellings, qui par la remontée d'eaux profondes chargées en carbone inorganique dissous contribuent au relargage de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère. Les zones de convection au contraire, comme la mer du Labrador en Atlantique Nord, sont des régions de piégeage du CO<sub>2</sub> atmosphérique dans l'océan profond. L'équilibre thermodynamique entre la forme gazeuse et la forme aqueuse du CO<sub>2</sub> est décrit par la loi de Henry :



La constante  $K_0$  correspond au coefficient de solubilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau de mer (Weiss 1974). Elle dépend de la température et de la salinité. Le CO<sub>2</sub> est plus soluble à basse température. Une fois dissous dans l'eau il donne lieu à plusieurs formes libres (eq. (2.5)) : le CO<sub>2</sub>(aq), les ions bicarbonates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, les ions carbonates CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> et l'acide

carbonique  $H_2CO_3$ , mais ce dernier ne représente que 0.3% du  $CO_2$ .



Les différentes espèces inorganiques du carbone dissous (figure 1.5) réagissent avec l'eau de mer selon les équilibres suivants :



Les constantes  $K_1^*$  et  $K_2^*$  sont les constantes d'équilibres stoechiométriques et de dissociations du dioxyde de carbone dans l'eau de mer. Elles sont exprimées en fonction des concentrations des différentes formes dans l'eau de mer. Avec  $pK_S^* = -\log(K^*)$ , on a :

$$K_1^* = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]} \quad (2.8)$$

$$K_2^* = \frac{[CO_3^{2-}][H^+]}{[HCO_3^-]} \quad (2.9)$$

$K_1^*$  et  $K_2^*$  sont fonction de la température, de la pression et la salinité. On définit le carbone inorganique dissous (Dissolved Inorganic Carbon : DIC) comme étant la somme des formes inorganiques du carbone inorganique :

$$DIC = [CO_2] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] + [H_2CO_3] \quad (2.10)$$

La proportion de chacune des espèces dépend des constantes de dissociation qui varient en fonction du pH (figure 1.5). Dans les conditions actuelles, le pH à la surface des océans est d'environ 8.1, les ions  $HCO_3^-$  sont majoritaires (environ 91%), les ions  $CO_3^{2-}$  ne représentent que 8% du carbone dissous total (Raven et al. 2005).

Pour décrire le système des carbonates dans l'eau de mer il existe un autre paramètre essentiel : l'alcalinité totale (Total Alkalinity : TA). Ce paramètre rend compte de l'équilibre des charges ioniques dans l'eau de mer. Il est défini comme l'excès de base c'est à dire la somme des charges positives non compensées par les acides forts, ou bien l'ensemble des charges des acides faibles. L'alcalinité totale est donnée par l'équation suivante :

$$TA = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [HO^-] - [H^+] + autres \quad (2.11)$$

Le terme "autres" correspond aux ions mineurs présents dans l'eau de mer. Les travaux de Broecker et al. 1982 ont montré que l'alcalinité associée aux ions  $CO_3^{2-}$ ,  $HCO_3^-$  mais

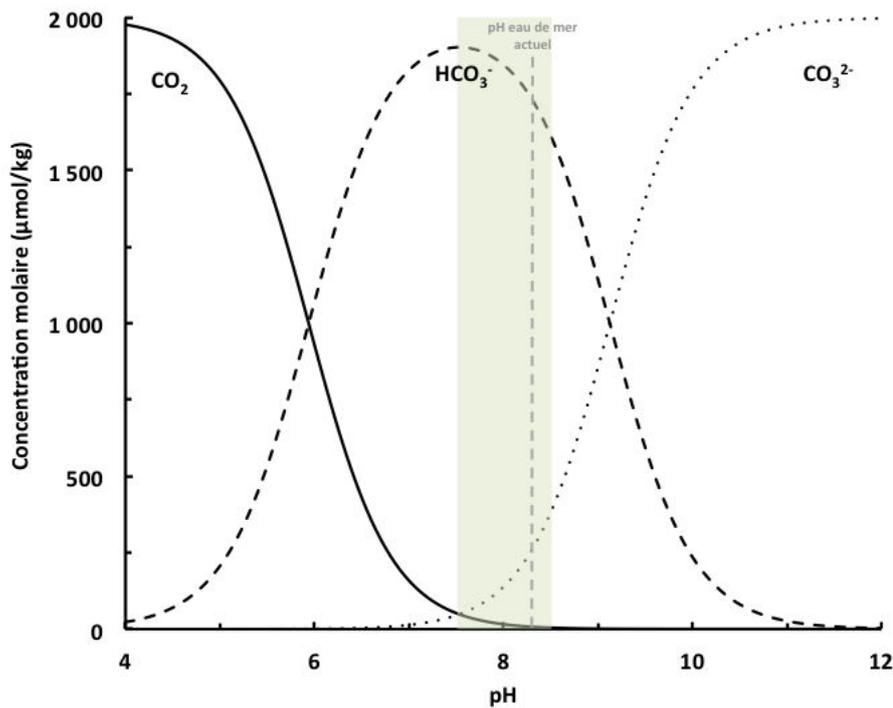


FIGURE 1.5 – Spéciation et abondance du carbone inorganique dissous dans l'eau en fonction du pH mesuré

aussi associée aux ions  $B(OH)_4^-$  permettaient de contrebalancer la majeure partie de l'excès de charges des cations conservatifs ( $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4$ ) et des anions (chlorures et sulfates). TA avec le DIC sont des paramètres dont les quantités sont conservatives (Zeebe 2012). Les concentrations sont exprimées en  $\mu mol.kg^{-1}$  et sont affectées par les variations de pressions et de températures (Zeebe 2012).

## 2.2 L'ACIDIFICATION DES OCÉANS

L'augmentation des teneurs en  $CO_2$  atmosphérique et sa dissolution en quantités croissantes dans les océans induisent le phénomène d'acidification des océans (Ocean Acidification : OA) qui se traduit par une diminution du pH dont l'expression est donnée par la formule suivante :

$$pH = -\log[H^+] \quad (2.12)$$

L'OA fait donc référence au changement de pH dans l'océan résultant de l'augmentation du  $CO_2$  dissous dans l'océan et au déplacement d'équilibre du système des carbonates (figure 1.6).

Les variations de pH peuvent être liées à d'autres processus tels que la photosynthèse

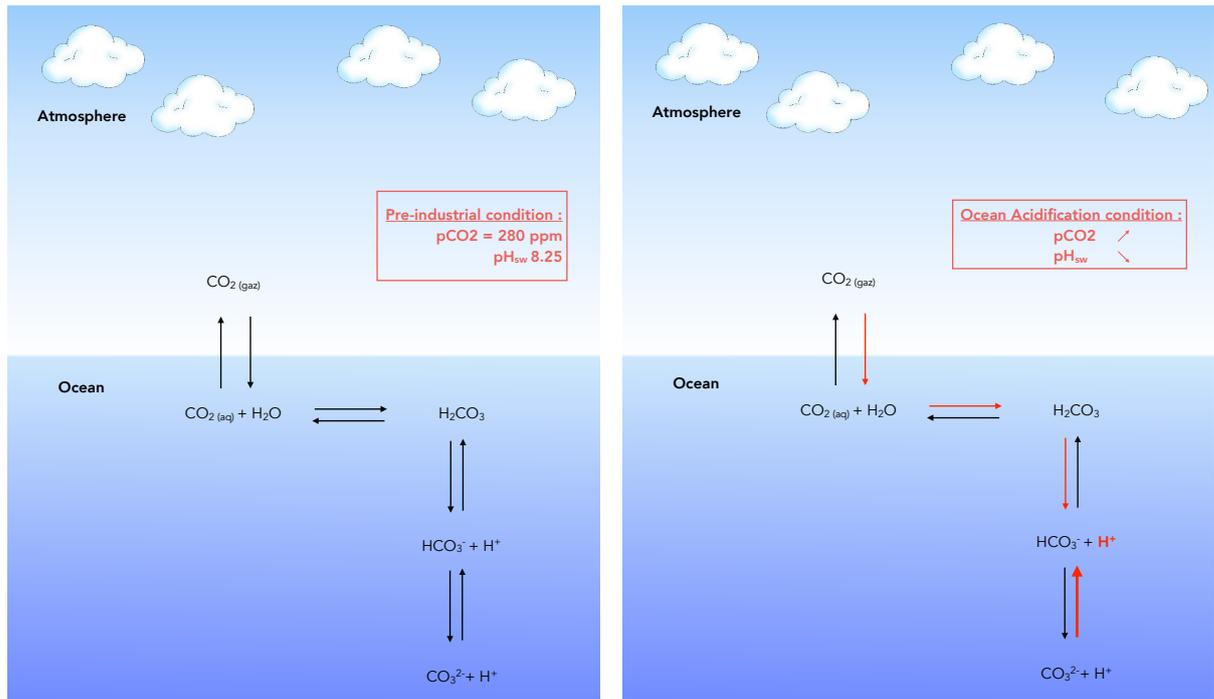


FIGURE 1.6 – Système des carbonates avant l'ère industrielle (gauche) et dans le contexte de l'acidification des océans (droite), les flèches rouges indiquent le flux de carbone d'origine anthropique modifiant l'équilibre du système des carbonates.

et la minéralisation (EPOCA et Union 2010). Avant l'ère industrielle, le pH de l'eau de mer était de l'ordre de 8.2 (EPOCA et Union 2010). Il a diminué de 0.1 unité au cours du dernier siècle, ce qui correspond à une augmentation de 26% du  $\text{CO}_2$  absorbé par l'océan au cours de cette période. Actuellement, le pH actuel de l'océan est donc en moyenne de 8.1 et diminue d'environ 0.001 unité par année, ce qui à ce taux, amènerait à un pH des océans à 7.8 d'ici 2100 (Gattuso et Lavigne 2009, Caldeira et Wickett 2003, Zeebe 2012, Solomon 2007, Zeebe et Caldeira 2008). Les suivis temporels du pH de l'eau de mer ont montré qu'en quelques décennies, les valeurs ont variés plus fortement qu'au cours des ères géologiques (Hönisch et al. 2012). L'impact de l'OA sur la biodiversité et sur les capacités d'adaptation des organismes sont à l'heure actuelle largement étudiés mais encore mal compris. Ces travaux menés jusqu'ici ont révélés des réponses négatives sur les organismes carbonatés notamment chez les coraux et certains organismes phytoplanctoniques. Il apparaît que certains organismes exercent à des degrés variables un contrôle sur les processus de biominéralisation.

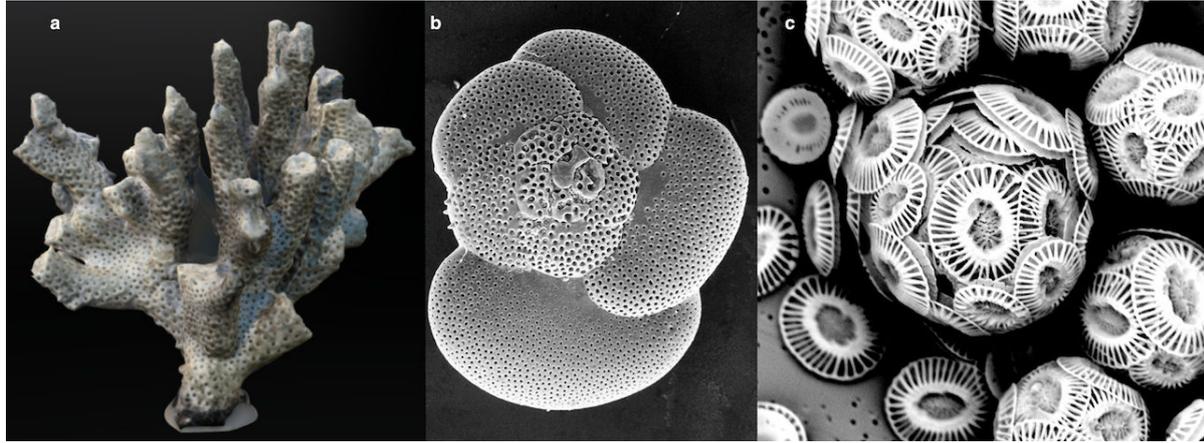
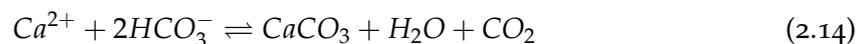


FIGURE 1.7 – Organismes calcifiants de l'océan. (a) Squelette de corail (issue de la collection de Université College de Dublin (UCD)); (b) foraminifère observé au Microscope Electronique à Balayage (MEB) (issue du Museum d'histoire naturelle de Londres); (c) coccolithophoridés observés au MEB à la Station Biologique de Roscoff.

### 2.3 RÔLE DES CARBONATES

Le cycle des carbonates en milieu marin fait partie intégrante du cycle du carbone. Le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) est formé à partir des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et des ions  $\text{CO}_3^{2-}$ . Il existe deux types de processus impliquant les carbonates de calcium : la calcification et la dissolution. Elle peut être d'origine authigénique c'est-à-dire issue de la diagenèse, ou d'origine biogénique donc liée la production par les organismes phytoplanctoniques tels que les coccolithophoridés, les foraminifères planctoniques et benthiques, ou les coraux. La formation du  $\text{CaCO}_3$  est décrite selon les équations suivantes :



Chez les organismes calcifiants (figure 1.7), le  $\text{CaCO}_3$  existe sous deux formes principales : l'aragonite de structure cristalline orthorhombique, et la calcite de structure cristalline rhomboédrique. Ces structures se distinguent par des propriétés physico-chimiques, c'est-à-dire par leur capacité à se solubiliser. Le produit de solubilité,  $K_{sp}^*$  s'exprime par :

$$K_{sp}^* = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}] \quad (2.15)$$

$K_{sp}^*$  dépend de la température, de la salinité, de la pression mais surtout de la structure cristalline. L'aragonite est deux fois plus soluble que la calcite (Mucci 1983). La précipita-

tion et la dissolution du  $CaCO_3$  dépendent de l'indice de saturation ( $\Omega$ ), défini par :

$$\Omega = \frac{[Ca^{2+}][CO_3^{2-}]}{K_{sp}^*} \quad (2.16)$$

$\Omega$  dépend des concentrations en ions  $CO_3^{2-}$  du milieu. Les coquilles ou les squelettes carbonatés se forment lorsque  $\Omega > 1.0$ . À l'inverse, ils se dissolvent lorsque  $\Omega < 1.0$ . L'état de saturation de l'océan est donc un paramètre important pour la préservation des organismes carbonatés. On définit, la lysocline comme étant la profondeur en dessous de laquelle  $CaCO_3$  se dissout (figure 1.8). Quant à la profondeur de compensation des carbonates (Carbonate Compensation Depth, CCD) (figure 1.8), elle représente la profondeur à laquelle le taux de dissolution est égal au taux de production en surface. L'indice de saturation des carbonates diminue avec la concentration en ions carbonates provoquée par l'abaissement du pH des océans.

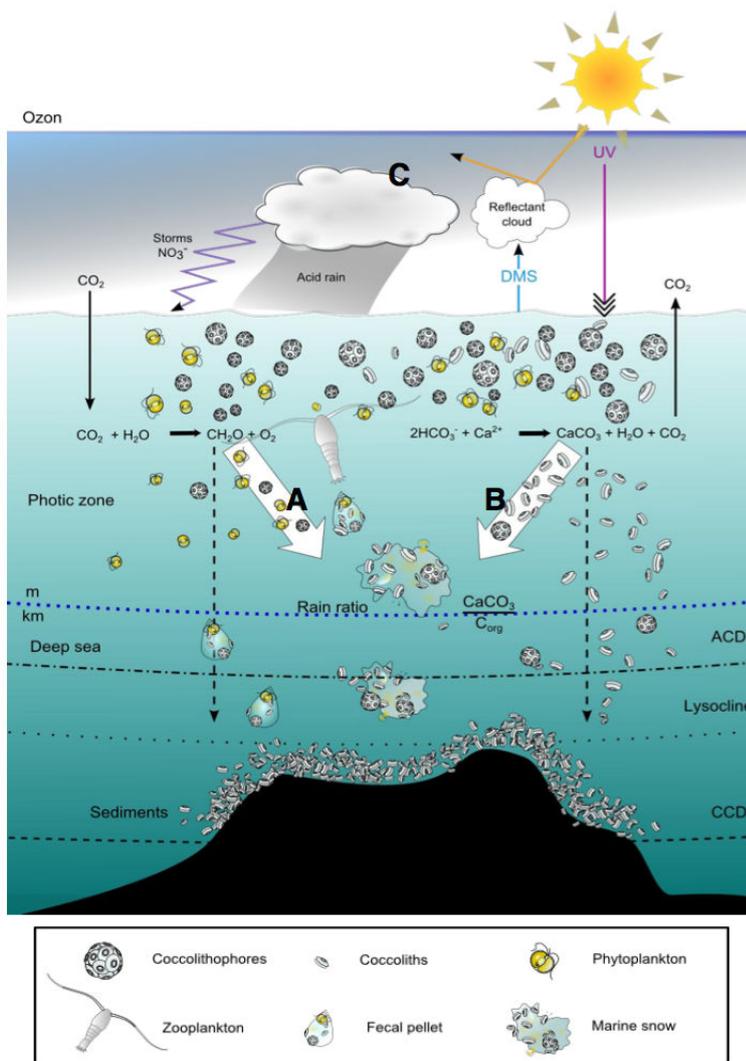


FIGURE 1.8 – Coccolithophoridés dans le cycle du carbone biogéochimique, (A) Pompe biologique du Carbone ; (B) Contre-pompe des carbonates, schéma adapté par Bendif 2011 issue de l’étude de de Vargas et al. 2007.

# LES COCCOLITHOPHORIDÉS

## 3.1 HISTOIRE DES COCCOLITHOPHORIDÉS

C'est à partir du XIXe siècle qu'ont été réalisées les premières observations de coccolithes décrits comme de "minuscules objets elliptiques" (Christian Gottfried Ehrenberg, 1836). C'est Huxley qui confirma l'hypothèse avancée en 1857, qu'un coccolithe est un "objet arrondi" de type inorganique. Il les nomma alors "coccolithes". La fin du XIXe siècle est marquée par la première représentation des coccosphères par Georges Charles Wallich (figure 1.9). Au cours du XXe siècle, des études plus approfondies ont été réalisées afin de décrire plus précisément le nanoplancton dont font partie les coccolithophoridés (Bown et al. 2004). Dans les années 1950, l'apparition de la microscopie a permis d'observer et de mieux illustrer les espèces du nanoplancton. Depuis, le microscope électronique à balayage (MEB) est devenu un outil très utilisé pour comprendre, étudier et illustrer la morphologie et la structure de ces espèces nanoplanctoniques comme les coccolithophoridés.



FIGURE 1.9 – Illustration des premières observations de coccosphères (Wallich, 1861)

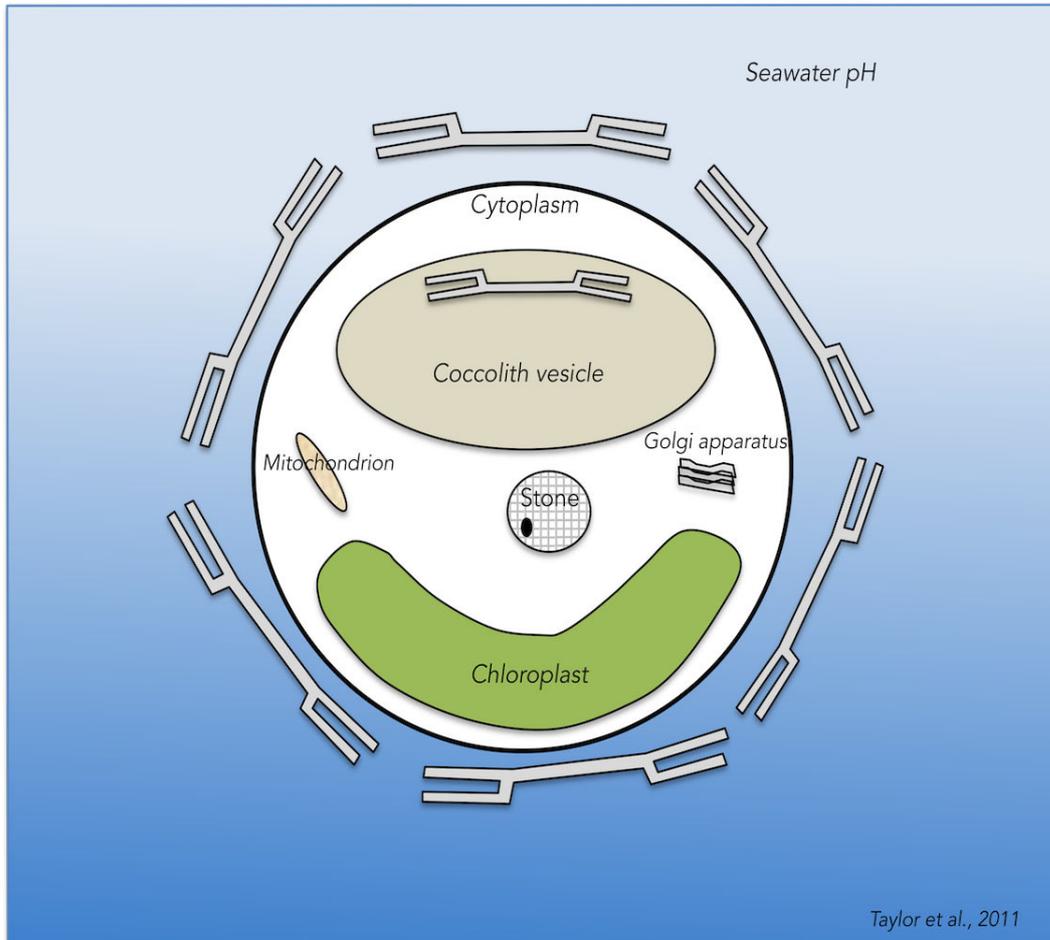


FIGURE 1.10 – Schéma de la formation de coccolithes dans la vésicule interne, schéma adapté de Taylor et al. (2011)

### 3.2 MORPHOLOGIE ET FONCTION

Le plancton marin représente quasiment 98% de la biomasse des océans (Sheldon et al. 1972). Deux groupes majoritaires existent chez le plancton, les organismes pluricellulaires et les organismes unicellulaires. C'est de ce dernier groupe dont fait partie les coccolithophoridés. Ils appartiennent au groupe des Haptophytes, de la classe des Coccolithophyceae et de la sous-classe des Prymnesiophyceae (Thierstein et Young 2013). Les coccolithophoridés entrent dans la catégorie du nannoplancton, du fait de leur petite taille (comprise entre 2 µm et 20 µm) (Bown et al. 2004).

Ces algues calcaires fabriquent des structures complexes que l'on appelle des "coccosphères" composées d'un assemblage de coccolithes (figure 1.10). Ces derniers sont formés généralement dans une vésicule intracellulaire (Coccolith Vesicle : CV). Une fois formé, le coccolithe est expulsé de la cellule au travers la membrane plasmique.

On distingue deux grandes sortes de coccolithes : les holococcolithes et les hétérococcolithes. Les holococcolithes sont formés extracellulairement alors que les hétérococcolithes sont formés intracellulairement, puis excrétés vers l'extérieur. Certaines espèces peuvent former les deux types de coccolithes (Cros et al. 2000). Dans le cas de l'espèce *Emiliania huxleyi*, sélectionnée pour cette étude, les coccolithes formés sont des hétérococcolithes.

Le rôle des coccolithes et de la coccosphère sont encore mal définis. Cette coquille pourrait être fabriquée pour protéger les cellules contre la prédation et les agents pathogènes. Elle pourrait être aussi une protection vis-à-vis des facteurs environnementaux extérieurs tels que les stress osmotiques, chimiques ou encore physiques (Manton 1986). Les coccolithes pourraient aussi agir sur la régulation de flottabilité de la cellule et avoir un rôle de régulateur sur la quantité de lumière reçue au cours de son développement (Winter et Roth 1994) et faciliteraient la photosynthèse (Brownlee et Taylor 2004).

### 3.3 LA BIOGÉOCHIMIE DES COCCOLITHOPHORIDÉS

Les organismes phytoplanctoniques autotrophes sont capables d'effectuer la photosynthèse donc de synthétiser la matière organique décrite par l'équation (2.1). Ils vont donc jouer un rôle primordial dans la pompe biologique du carbone.

Le groupe des coccolithophoridés est très répandu sur le globe. Il a un impact important sur les cycles biogéochimiques marins, comme celui du carbone, avec des conséquences directes sur le climat. Depuis le milieu du Crétacé, il est responsable avec les foraminifères du maintien du gradient vertical de l'alcalinité de l'eau de mer (Zeebe 2012). Ces deux groupes représentent à eux deux presque 90% de la production de calcite pélagique (Schiebel 2002). Les coccolithophoridés jouent un rôle clé non seulement dans le cycle du carbone mais aussi dans celui du soufre. Ils sont aussi un composant important dans les sédiments. La composition isotopique de la calcite des coccolithes ou celles de certains biomarqueurs qu'ils produisent sont utilisées pour étudier le changement climatique (Thierstein et Young 2013). Cet organisme photosynthétique fixe le carbone inorganique dans l'océan de surface en produisant de la matière organique particulaire (Particular Organic Carbon : POC). L'export vertical d'une partie du matériel organique produit en surface vers les eaux intermédiaires et profonds conduit à un piégeage du CO<sub>2</sub>. La minéralisation du POC et le transfert de carbone à travers la chaîne trophique constituent d'autres mécanismes qui permettent au carbone d'accéder aux couches profondes. L'en-

semble de ces processus font partie de la pompe biologique du carbone (voir partie 2.1.). Au contraire, la production du  $CaCO_3$  a un effet opposé sur les échanges air/océan qui se traduit par un relargage de  $CO_2$  vers l'atmosphère. Ce processus est la contre-pompe des carbonates (voir les parties 2.1. et 2.3.).

Les coccolithophoridés ont donc un double rôle sur les flux de  $CO_2$  échangés à l'interface océan/atmosphère, en se comportant à la fois comme une source ou comme un puits de  $CO_2$ . La résultante de ces flux est caractérisée par le rapport du POC produit au cours de la photosynthèse sur le PIC produit lors de la calcification (Shutler et al. 2013). Ce rapport PIC/POC est appelé le "rain ratio". Les valeurs  $> 1$ , indiquent une production de carbone inorganique plus élevée que celle de carbone organique. L'océan est alors une source de  $CO_2$  vers l'atmosphère. À l'inverse, pour des valeurs  $< 1$ , l'océan est un puits de  $CO_2$  atmosphérique.

### 3.4 EFFETS DE L'ACIDIFICATION DES OCÉANS SUR LES COCCOLITHOPHORIDÉS

L'étude de Meier et al. 2014 soulève une question importante : comment le  $CO_2$  anthropique influence t-il l'écosystème marin ?

Selon les modèles, avec l'abaissement du pH et la diminution de l'indice de saturation en  $CaCO_3$ , d'ici la fin du siècle, les organismes calcifiants seront affectés par l'acidification des océans mais sans doute de manières différentes selon les espèces.

L'étude de Riebesell et Zondervan (2000), suggère que l'augmentation du  $pCO_2$  augmenterait le processus de photosynthèse des coccolithophoridés. Elle indique aussi un effet direct sur la chimie des carbonates et les mécanismes de production des coccolithes dans la cellule. Les effets sur la calcification de l'augmentation de  $pCO_2$  auraient des rétroactions sur le cycle du carbone et donc sur l'équilibre des carbonates. Associée aux effets sur le métabolisme des organismes, la diminution du pH a des conséquences sur la morphologie des coccolithophoridés (figure 1.11). Une malformation des coccolithes et des coccosphères incomplètes ont été observées chez plusieurs espèces à des pH plus faibles que le pH actuel. Cette étude indique que certains organismes carbonatés sont sensibles aux variations de  $pCO_2$ .

Cependant, des études intra-espèces ont montré que la réponse des coccolithophoridés dépend aussi bien des espèces, que des souches et de leurs morphotypes (Langer et al.

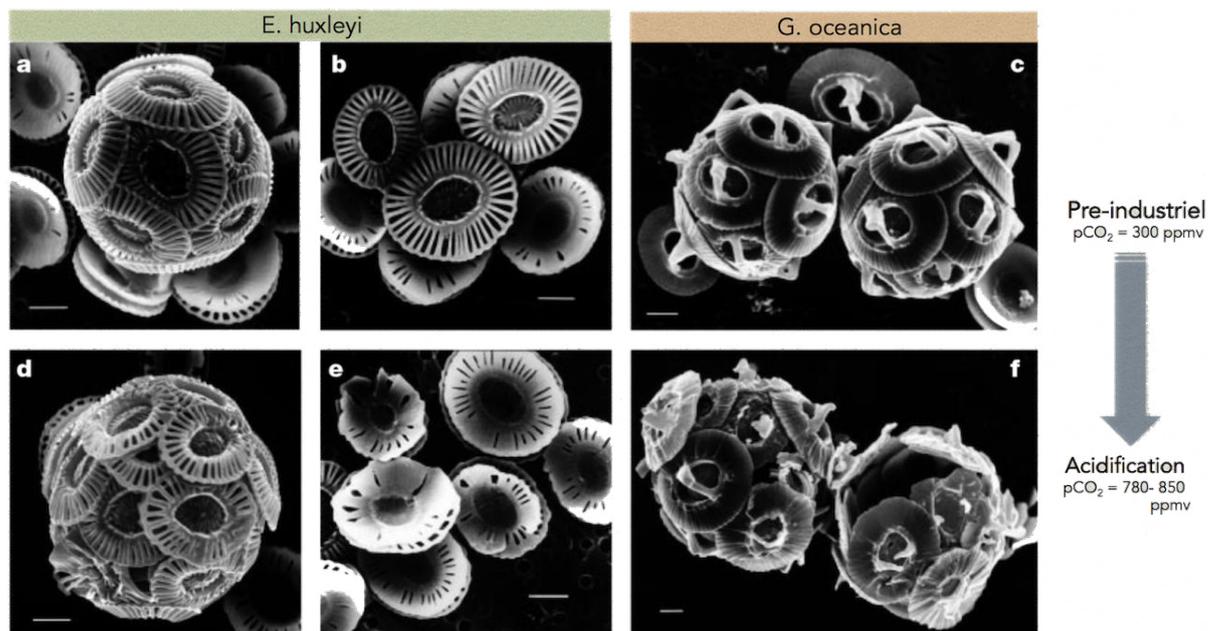


FIGURE 1.11 – Réponses des coccolithophoridés face l'augmentation à  $\text{CO}_2$  atmosphérique pour *E. huxleyi* (gauche) et *Gyrophycapsa oceanica* - (a),(b)et (c) représentent les coccosphères et les coccolithes dans les conditions pré-industrielles – et (d),(e) et (f) représentent les coccosphères et les coccolithes dans un océan s'acidifiant. Issue de l'étude de Riebesell et Zondervan 2000

2009, Beaufort et al. 2011) (figure 1.12). L'étude de plusieurs souches a révélé l'adaptation possible à l'augmentation du  $\text{CO}_2$  (Rouco et al. 2013, von Dassow et al. 2017).

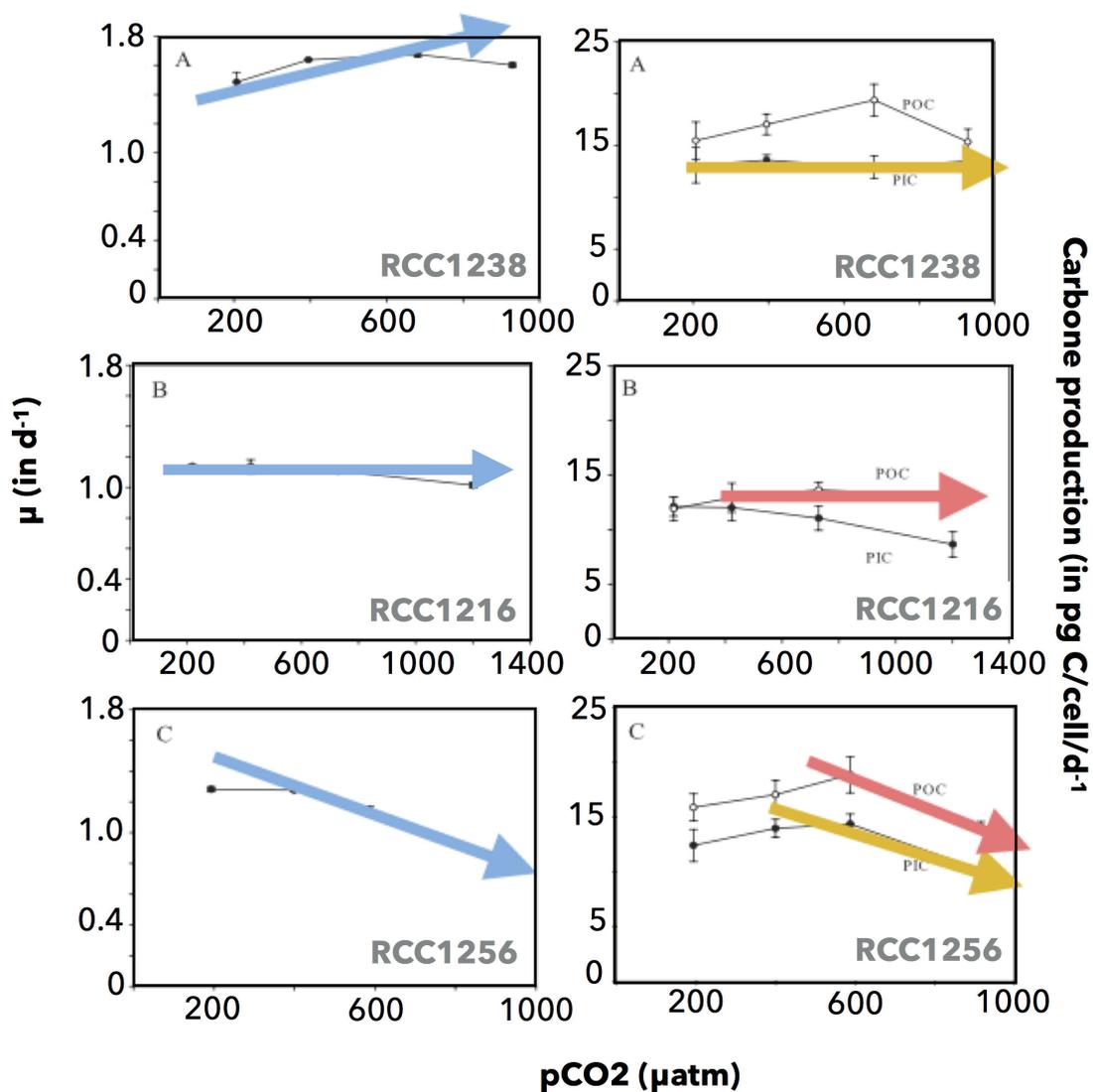


FIGURE 1.12 – Réponses spécifiques des différentes souches de *E. huxleyi*, étude issue des travaux de Langer et al. (2009)

# $\delta^{11}B$ ET B/CA DE LA CALCITE ET PH

# 4

En paléocéanographie et biogéochimie, on définit un proxy comme une molécule, un élément chimique ou biologique enregistrant les variations environnementales ou climatiques. Les espèces carbonatées comme les coccolithophoridés ou les foraminifères constituent des archives des conditions climatiques passées. Plusieurs traceurs géochimiques issus des coccolithophoridés sont utilisés pour la reconstruction du climat. Le degré d'insaturation des alcénones, molécules organiques produites lors de la photosynthèse, est un proxy robuste de la température de surface de l'eau de mer (Sea Surface Temperature, SST). Leurs analyses dans les sédiments marins permettent de reconstruire à haute résolution temporelle les températures passées de l'océan de surface (Prahl 1987, Sicre et al. 2008). L'isotopie du carbone ( $\delta^{13}C$ ) des alcénones et des coccolithes est utilisée pour la reconstruction du  $pCO_2$  (Hermoso et al. 2014). Les rapports strontium sur calcium (Sr/Ca) ou encore magnésium sur calcium (Mg/Ca) de la calcite des coccolithes font l'objet d'une recherche active. Ces rapports élémentaires pourraient permettre de tracer l'évolution des températures et des conditions de calcification (Müller et al. 2013, Langer et al. 2006).

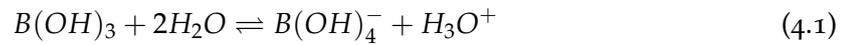
## 4.1 LE BORE ET SES ISOTOPES

Le bore est un élément chimique appartenant à la famille des métalloïdes (colonne IIA) mais il est le seul élément non métallique de sa colonne. Son numéro atomique est 5, de configuration électronique  $1s^2 2s^2 2p^1$ . Le bore est trivalent et forme des liaisons covalentes. Son état redox est + III, sa spéciation est donc indépendante de l'état redox du milieu dans lequel il se trouve. Le bore est un élément lithophile, c'est-à-dire qu'on le retrouve facilement sous la forme borate ( $B(OH)_4^-$ ) ou acide borique ( $B(OH)_3$ ) en association avec l'oxygène. Il existe principalement dans la croûte terrestre sous forme tétravalente ou trivalente. Il existe 14 isotopes connus du bore, deux sont stables dans la nature :  $^{10}B$  et  $^{11}B$ . Leurs abondances respectives sont 19,82% et 80,18%. En dehors des deux iso-

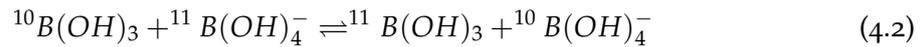
topes stables du bore, les autres isotopes se désintègrent en hélium pour les isotopes les plus légers du bore et en carbone pour les plus lourds.

## 4.2 SPÉCIATION DU BORE DANS L'EAU DE MER

Le bore fait partie des éléments majeurs de l'eau de mer. Sa concentration moyenne dans l'océan global est de  $432.6 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  (soit 4,33 ppm) (Lee et al. 2010). Les deux formes  $B(OH)_3$  et  $B(OH)_4^-$  co-existent selon l'équilibre (Zeebe 2005) :



où le  $pK_B^*$  est la constante de dissociation de l'acide borique dans l'eau de mer ( $pK_B^* = 8.6$  à  $25^\circ\text{C}$  pour une salinité de 35) (Dickson 1990). La répartition des isotopes stables du bore suit l'équation suivante :



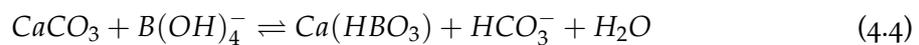
Le facteur de fractionnement,  $\alpha$ , permet d'estimer le fractionnement isotopique des ces deux formes chimiques dans l'eau de mer. Il est défini selon l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{(^{11}B/^{10}B)_{boric}}{(^{11}B/^{10}B)_{borate}} \quad (4.3)$$

L'acide borique est enrichi en  $^{11}B$  vis-à-vis des ions borates (figure 1.13). Dans l'eau de mer, le bore est un élément conservatif (Foster et al. 2010), et a un temps de résidence de l'ordre de 14 millions d'années (Lemarchand et al. 2002). La figure 1.13 présente les variations des deux espèces du bore dans l'eau de mer en fonction du pH.

## 4.3 COMPOSITION DU BORE DANS LES CARBONATES MARINS

Hemming et Hanson (1992) ont proposé un modèle d'incorporation du bore dans les carbonates reposant sur l'hypothèse que seuls les ions borates sont incorporés dans la calcite, selon l'équation suivante :



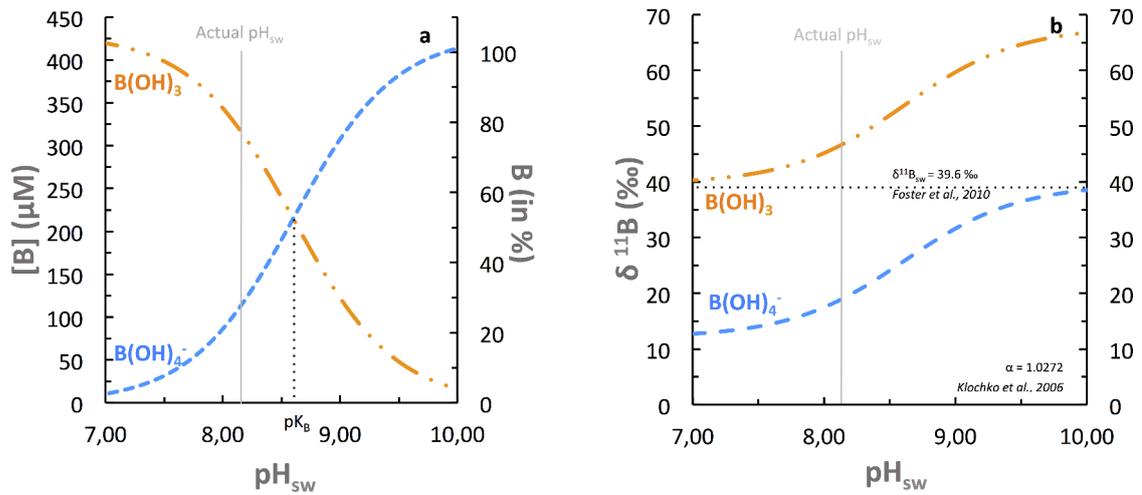


FIGURE 1.13 – Spéciation de l'acide borique et des ions borates (a), et variation de la composition isotopique dans l'acide borique et les ions borates (b) en fonction du pH de l'eau de mer. Les calculs suivent les équations (4.1) et (4.5) (Foster et al. 2010) et utilisent le coefficient de fractionnement isotopique défini par (Klochko et al. 2006)

Connaissant la composition isotopique de l'eau de mer en bore et le  $\delta^{11}B$  des carbonates, on peut calculer le pH à partir de l'équation suivante (Zeebe et Wolf-gladrow 2002) :

$$pH = pK_B * -\log\left[-(\delta^{11}B_{sw} - \delta^{11}B_{ech}) / (\delta^{11}B_{sw} - (\alpha * \delta^{11}B_{ech}) - 1000(\alpha - 1))\right] \quad (4.5)$$

où  $\delta^{11}B_{sw}$  est la composition isotopique en bore de l'eau de mer (valeur théorique : 39.61 ‰, (Foster et al. 2010).

$\delta^{11}B$  est la composition isotopique mesurée dans les carbonates par spectrométrie de masse. La valeur de  $\alpha$  la plus communément utilisée est celle déterminée par (Klochko et al. 2006) ( $\alpha = 1.0272$ ). De cette relation et selon l'hypothèse de Hemming et Hanson (1992), il est donc possible d'estimer le pH de l'eau de mer passé connaissant la valeur de  $\delta^{11}B$  de  $CaCO_3$ .

L'incorporation du bore dans la calcite peut être décrite par un coefficient apparent de partition  $K_D$ , à partir de l'équation (4.4), pouvant s'écrire :

$$K_D = \frac{[HBO_3^- / CO_3^{2-}]_{CaCO_3}}{[B(OH)_4^- / HBO_3^-]_{sw}} \quad (4.6)$$

En considérant que la concentration en  $HBO_3^{2-}$  correspond à la concentration en élément bore intégrée dans la calcite, le rapport  $HBO_3^- / CO_3^{2-}$  peut être remplacé par le

rapport B/Ca de la calcite. Nous obtenons alors la relation suivante :

$$K_D = \frac{[B/Ca]_{CaCO_3}}{[B(OH)_4^- / HBO_3^-]_{aq}} \quad (4.7)$$

Le rapport  $[B(OH)_4^- / HBO_3^-]_{sw}$  varie proportionnellement au pH. Dans le contexte de l'acidification la concentration en ions carbonates tend à diminuer (figure 1.5) de même que celles des ions borates (figure 1.13).

Par calcul, il serait alors possible de remonter jusqu'au pH correspondant au moment du processus de calcification. Yu et Elderfield (2007) ont montré que le rapport B/Ca dans les foraminifères serait lié aux variations en ions carbonates ( $\Delta_{calcite}$ ) dans l'eau de mer. Le rapport B/Ca pourrait fournir un proxy de la concentration en ions carbonate dans l'eau de mer.

## OBJECTIFS ET PLAN DE THÈSE

L'un des objectifs de cette thèse est de **comprendre et quantifier les réponses physiologiques d'*E. huxleyi* dans le contexte de l'acidification des océans.**

Pour cela, nous nous sommes focalisés sur l'étude des processus de croissance, de photosynthèse et de calcification de deux souches différentes. Nous avons choisi d'étudier deux souches d'*E. huxleyi*, l'une considérée comme fortement calcifiante (RCC-P41), une seconde modérément calcifiante (RCC-P4). La comparaison de ces deux souches nous apportera des informations physiologiques et morphologiques pour évaluer leurs capacités à s'adapter à l'acidification des océans. Ce travail est réalisé sous différentes conditions de pH, allant d'un pH basique reflétant les conditions pré-industrielles (8.6) à un pH (7.6) proche de 5 fois la concentration actuelle en  $CO_2$ . Ce dernier pH est proche du pH limite de formation des coccolithes dans la vésicule interne (Stoll et al. 2012). Ce travail contribue à mieux comprendre les processus de biominéralisation et à ouvrir de nouvelles perspectives sur les rétroactions possible sur le climat. Le travail expérimental est réalisé en culture en batch dilué dans le but d'appréhender les mécanismes d'incorporation des éléments inorganiques, B et Ca, dans les coccolithes et estimer l'impact des variations de pH sur les processus physiologiques.

Le deuxième objectif majeur de cette thèse est d'examiner l' **existence d'une relation entre le  $\delta^{11}B$  de la calcite et le pH de l'eau de mer et donc d'évaluer son utilisation potentielle comme proxy du pH pour des études paléocéanographiques. Nous examinons également l'information contenue dans le rapport B/Ca dans la calcite des coccolithes.**

Plus précisément, cet objectif vise à explorer les mécanismes d'incorporation de ces éléments et isotopes dans la calcite au cours du processus de calcification. Cela a nécessité dans un premier temps un développement analytique important afin de pouvoir réaliser des mesures de  $\delta^{11}B$  et B/Ca par spectrométrie de masse (Inductively Coupled Plasma

– Mass Spectrometry – Quadripole et Multi-Collecteur : ICP-QMS et MC-ICPMS respectivement). Nous avons ensuite mis au point un protocole pour la conduite des cultures afin de nous placer dans les conditions optimales pour la mesure du  $\delta^{11}B$  et B/Ca dans la calcite aux différentes valeurs de pH pour les deux souches considérées. Selon les espèces, le rapport B/Ca pourrait aussi fournir des informations sur le changement de pH (Stoll et al. 2012). mais aucune relation entre ce paramètre et le pH n'a pu être encore établie jusqu'ici. La composition isotopique du bore est un proxy encore inexplorée dans les coccolithes car sa mesure représente un véritable défi analytique, car cela nécessite de pouvoir isoler la calcite et le bore qu'elle contient dans des conditions extrêmes du fait des faibles teneurs en bore dans la calcite. Le  $\delta^{11}B$  et B/Ca ont jusqu'ici été mesurés dans les coraux et les foraminifères (Douville et al. 2010, Dissard et al. 2012, Hönisch et al. 2004, Henehan et al. 2013). mais il n'existe que des mesures préliminaires dans la calcite des coccolithes encore non publiées. Nous supposons que l'incorporation des isotopes du bore et de la concentration en bore dans la calcite dépendent des espèces étudiées ainsi que du type de souches.

## APPROCHES UTILISÉES ET PLAN DE MANUSCRIT

Après ce **chapitre 1** introductif sur le sujet de thèse, la présentation du travail de recherche réalisé se décline en plusieurs chapitres.

Le **chapitre 2** de ce manuscrit est consacré à la description des méthodes expérimentales que nous avons mises en oeuvre, c'est-à-dire les techniques de culture en batch dilué et en chemostat (turbidostat). Nous détaillerons le choix des souches étudiées ainsi que des pH sélectionnés, les techniques d'acclimatation et enfin le déroulement des manipulations.

Le **chapitre 3** présente dans une première partie l'ensemble des techniques qui ont permis de purifier les coccolithes et d'extraire le bore de la calcite. Ces techniques seront discutées en détails et les limites présentées. Une seconde partie présentera les appareils d'analyses par ICP-QMS et MC-ICPMS et les difficultés rencontrées dans la mesure du bore. Nous expliquerons comment nous avons relevé le défi analytique que constitue la mesure des isotopes bore dans les coccolithes. Enfin une dernière partie présentera la valorisation de ce développement analytique par la rédaction d'une publication soumise à une revue internationale (à soumettre à *Geochemistry, Geophysics, Geosystems, AGU Publications*).

Le **chapitre 4** présente l'ensemble des résultats obtenus concernant les paramètres physiologiques et morphologiques pour les deux souches d'*E. huxleyi*. Une comparaison aux différentes conditions de pH sera menée.

Grâce aux développements chimique et analytique présentés dans le chapitre 3, nous avons pu mesurer les valeurs  $\delta^{11}B$  et B/Ca dans la calcite à différents pH. Le **chapitre 5** présente et discute de l'ensemble de ces résultats géochimiques, morphologiques et métaboliques et les confronte aux données publiées pour les foraminifères et coraux.

Le **chapitre 6** conclue ce manuscrit par une discussion générale et des pistes de perspectives.



# II

**Méthodes expérimentales de l'étude  
physiologique d'*Emiliana huxleyi* en culture**



## 2.1 INTRODUCTION

Les effets du réchauffement climatique et de acidification progressive des océans sur les organismes calcifiants (Müller et al. 2017, Hutchins et al. 2003, Hoppe et al. 2011) comme les coccolithophoridés font l'objet d'importantes recherches. Celles menées en laboratoire ont pour but d'examiner en milieu contrôlé la réponse des organismes à ces changements. Elles consistent à isoler des souches et à les adapter aux conditions choisies. Ce chapitre décrit les deux techniques de cultures qui ont été utilisées au cours de cette thèse, puis les conditions expérimentales de croissance dans une eau de mer artificielle et une eau de mer naturelle enrichie. Il décrit également le plan des expériences, les différents paramètres mesurés, compare les deux techniques de culture et justifie enfin les choix réalisés.

## 2.2 TECHNIQUES DE CULTURE

Deux modes de cultures ont été mises en oeuvre dans le cadre de nos études. L'un, en turbidostat, l'autre en batch dilué. Le premier a été implanté au LEMAR au cours de ces dernières années dans le but d'étudier l'impact des métaux sur la croissance du phytoplancton. Le second, plus simple à mettre en oeuvre est utilisé par la plupart des laboratoires pour étudier la physiologie du phytoplancton. Ici, le choix du mode de culture a été déterminant pour la détection et la quantification précise du bore et des paramètres B/Ca et  $\delta^{11}B$  dans les coccolithes. Les analyses ont nécessité de travailler sur un volume de culture compatible avec la détection du bore tout en maintenant une densité cellulaire  $< 50\ 000$  cellules/mL (Langer et al. 2009).

### 2.2.1 Culture en turbidostat

Le turbidostat est constitué d'un bioréacteur [1], dans notre cas une bouteille en polycarbonate (PC) de 10 L. La figure 2.1 montre un schéma du dispositif expérimental, la figure 2.2 une photographie du turbidostat installé au LEMAR. La souche étudiée est incubée dans un volume de culture de 2.50 L contenu dans le bioréacteur. Le turbidostat est un système de culture continu dans laquelle la densité cellulaire et les conditions de croissance sont maintenues dans un état stationnaire grâce à un système de dilution. Une pompe péristaltique [2] à double tête (5 rpm) prélève du milieu de culture propre contenu

dans une bouteille en PC [2a] et soustrait le même volume de milieu du bioréacteur qu'il rejette dans une autre bouteille PC [2b]. Ce système permet de conserver un volume de milieu constant puisque les vitesses d'entrée et de sortie sont identiques. Pour contrôler le pH dans le bioréacteur et maintenir constante la valeur du  $CO_2$  dissous dans le milieu, une sonde pH est montée en mode dérivatif [3]. De la même manière que pour le renouvellement de milieu, une pompe péristaltique à double tête [4] est utilisée afin de prélever dans le milieu de culture [4a], un volume destiné à la mesure du pH et à ajouter du milieu neuf [4b] dans ce milieu de culture pour maintenir un volume constant. La valeur du pH est mesurée en continu par le biocontrôleur [5]. Si le pH enregistré est supérieur au pH fixé, le biocontrôleur ouvre les valves de  $CO_2$  [6a], et les valves de  $O_2$  [6b] pour réajuster le pH quand il est inférieur au pH fixé. Les données (pH, température et ajout de  $CO_2$ ) sont retranscrites sur un ordinateur [7]. Le mélange air/ $CO_2$  opéré par le biocontrôleur dans la phase gazeuse est injecté dans le bioréacteur au travers d'un filtre stérilisé de porosité 0.2 mm. Ce dispositif est destiné à reproduire les conditions d'acidification des océans par une augmentation du  $CO_2$  gazeux se dissolvant dans l'eau.

Le système (bouteilles, tubes, connexions et filtres à air) est préalablement autoclavé pendant 20 minutes à  $110^\circ C$ , avant que le milieu de culture soit introduit. Les matériaux utilisés sont du PC pour les bouteilles d'entrée et sortie de milieu, la sonde pH et du bioréacteur. Les tuyaux sont en tygon ou perfluoroalkoxy (PFA) et les connexions en polypropylène. L'avantage de ces matériaux est qu'ils assurent une bonne résistance à l'autoclavage et une faible contamination en métaux. L'ensemble est ensuite placé dans un incubateur dont la température est contrôlée et maintenue à  $18.5^\circ C$  correspondant à la température optimale de croissance des souches de coccolithophoridés étudiées.

Le cycle lumineux jour/nuit de 14h :10h est simulé; l'utilisation d'un film bleu est destinée à reproduire le spectre d'irradiance des eaux de surface. Ce système continu présente l'avantage de simuler dans une armoire climatique l'augmentation du  $CO_2$  et de travailler en conditions stationnaires similaires à celles de l'océan ouvert. Cependant, il présente des inconvénients, comme notamment les temps d'équilibre du pH très long à atteindre (de l'ordre du mois) et qui nécessite une surveillance constante. Mais surtout, compte tenu des faibles teneurs en bore dans la calcite des coccolithes, le volume de 2.3 L du bioréacteur des turbidostats est incompatible avec la contrainte d'une densité cellulaire inférieure à 50 000 cellules/mL (section suivante). Cette technique a toutefois

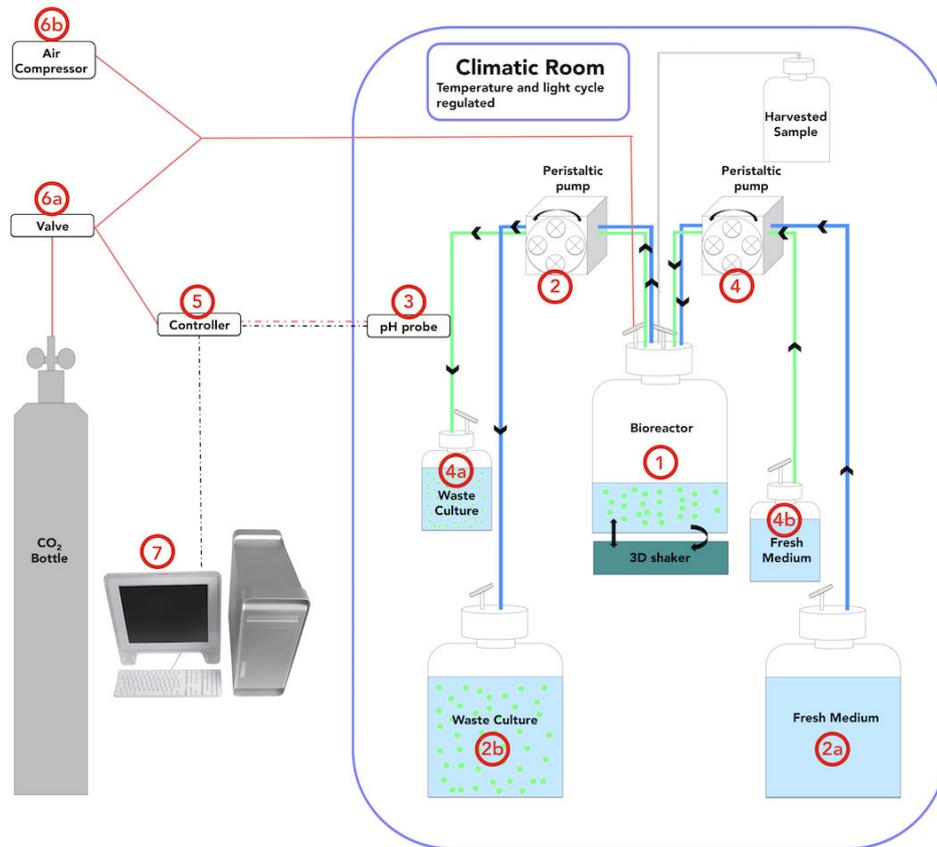


FIGURE 2.1 – Schéma du turbidostat - Détails de chaque numéro décrit dans le paragraphe 2.2.1 : [1] le bioréacteur, [2] et [4] pompes péristaltiques à double tête, [2a] et [2b] deux bouteilles en PC, [3] la sonde pH, [4a] et [4b] milieu de culture, [5] le biocontrôleur, [6a] les valves de CO<sub>2</sub>, [6b] les valves de O<sub>2</sub> et [7] l'ordinateur.

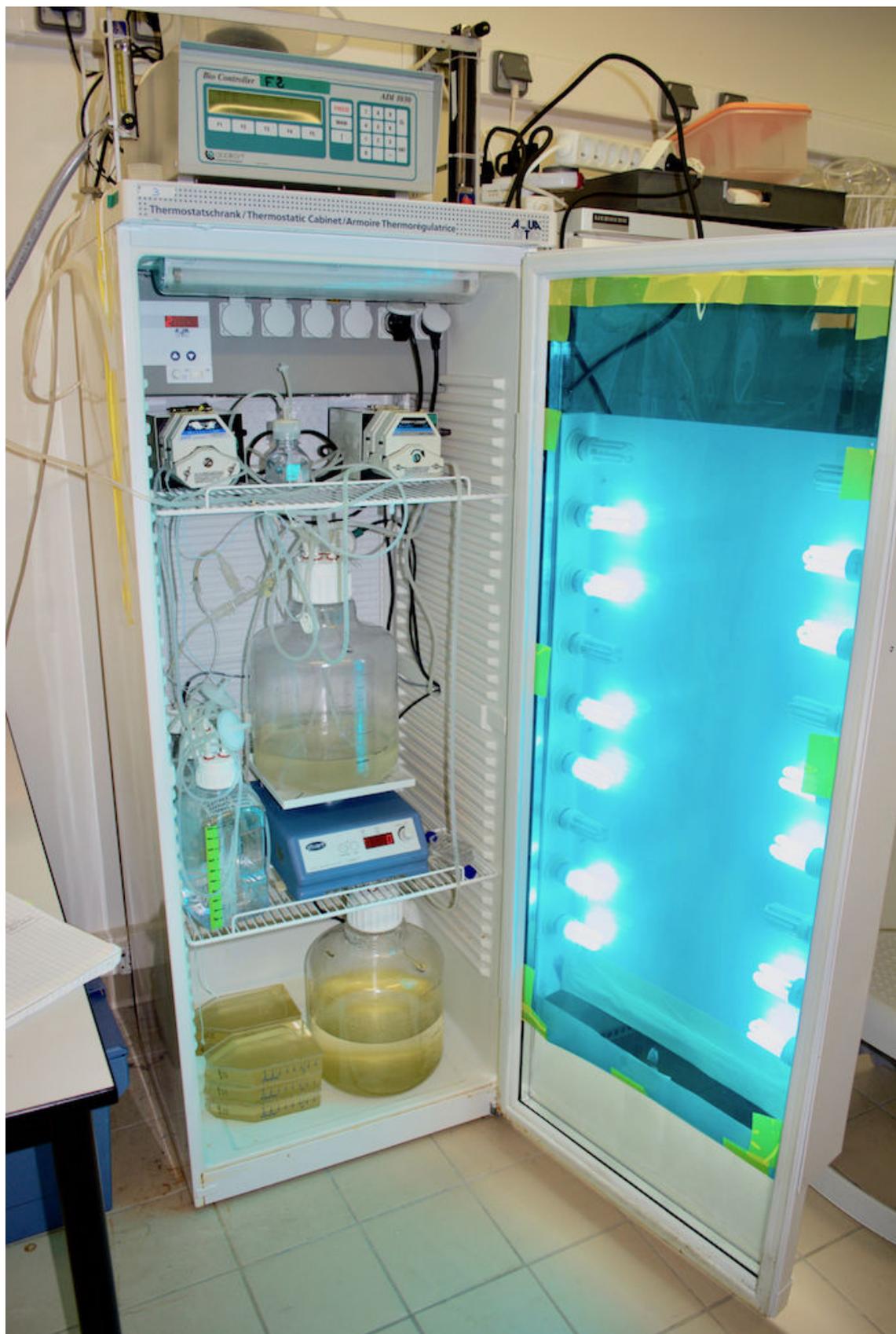


FIGURE 2.2 – Photo de l'installation du turbidostat au laboratoire du LEMAR

été utilisée au cours de deux premières années de thèse et abandonnée car inadaptée au vu des contraintes analytiques décrites (cf. chapitre 3).

### 2.2.2 Culture en batch

Les cultures en batch diluées ont donc été mises en place pour redimensionner les conditions de travail en culture en adéquation avec les contraintes de mesures du bore. Au cours de leur développement en batch, les cellules amorcent une croissance avec une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire correspondant à une limitation en nutriments (figure 2.4). Pour notre étude, une étape de pré-adaptation des cellules est nécessaire. Le nombre de générations est de 10 comme préconisé par Langer et al. (2006). La densité cellulaire maximale doit être comprise entre 50.000 et 60.000 cell/mL afin de ne pas modifier le système des carbonates (< 5% du DIC) (Zondervan et al. 2002). Pour ces travaux, le milieu de culture est mis dans une bouteille en PC de 13.30 L. Le pH est ajusté par ajout d'HCl ou de NaOH à 1M. Le choix de ce mode d'ajustement est détaillé dans la partie 2.4.2. À la différence du turbidostat, les bouteilles sont placées dans une chambre climatique thermostatée à température choisie sur un cycle jour/nuit 14h :10h. Cette technique simple à mettre en œuvre est couramment utilisée pour des travaux en cultures. Elle permet de travailler avec de plus grands volumes que le turbidostat et donc dans notre cas d'obtenir les quantités nécessaires de calcite pour réaliser les mesures géochimiques, en particulier isotopique. L'inconvénient éventuel est l'évolution possible de la composition du milieu au cours de la croissance, ce qui peut amener à modifier le pH de l'eau de mer. Afin de limiter ce risque, la densité cellulaire autorisée est relativement faible et les bouteilles sont remplies totalement pour limiter les échanges avec l'air ambiant. Des mesures du pH ont été réalisées en fin de cultures pour en assurer le contrôle.

La figure 2.4 résume les deux modes de culture. Elle montre l'évolution de la densité cellulaire dans le cas du système continu générant un mode stationnaire avec une densité cellulaire constante et maîtrisée, et celle du système non-continu induisant une augmentation de la densité cellulaire comprenant trois phases.



FIGURE 2.3 – Cultures en batch au laboratoire du LEMAR

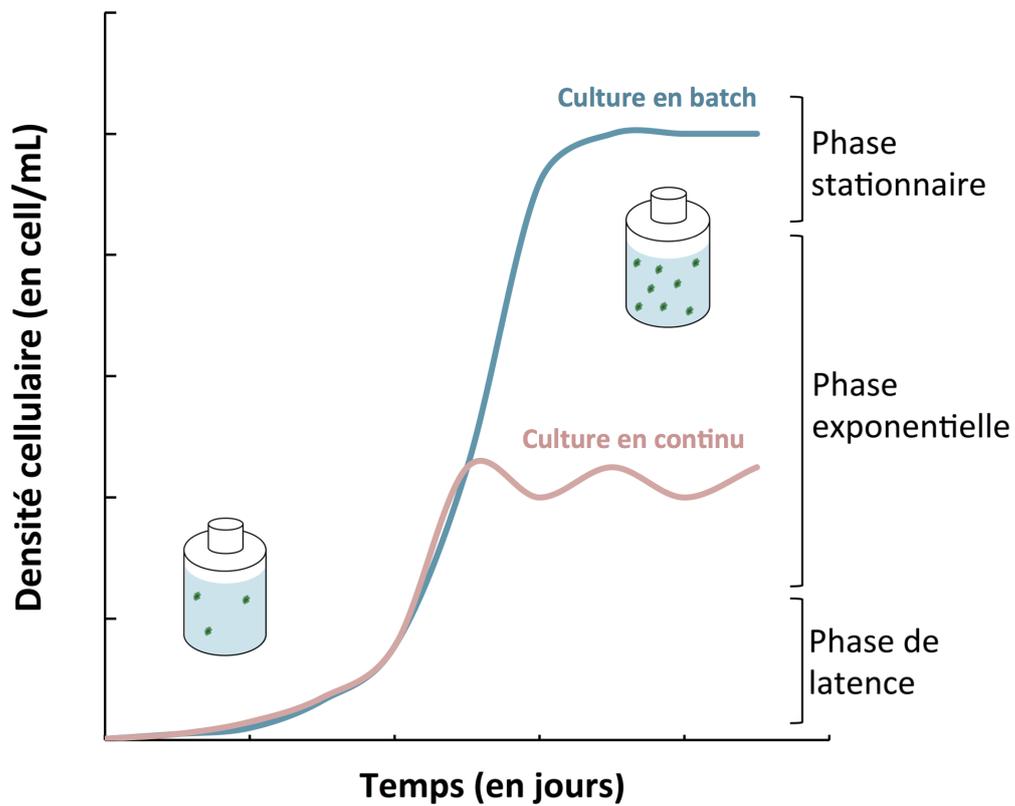


FIGURE 2.4 – Schéma d'explication des cultures en batch versus culture en turbidostat (culture continu)

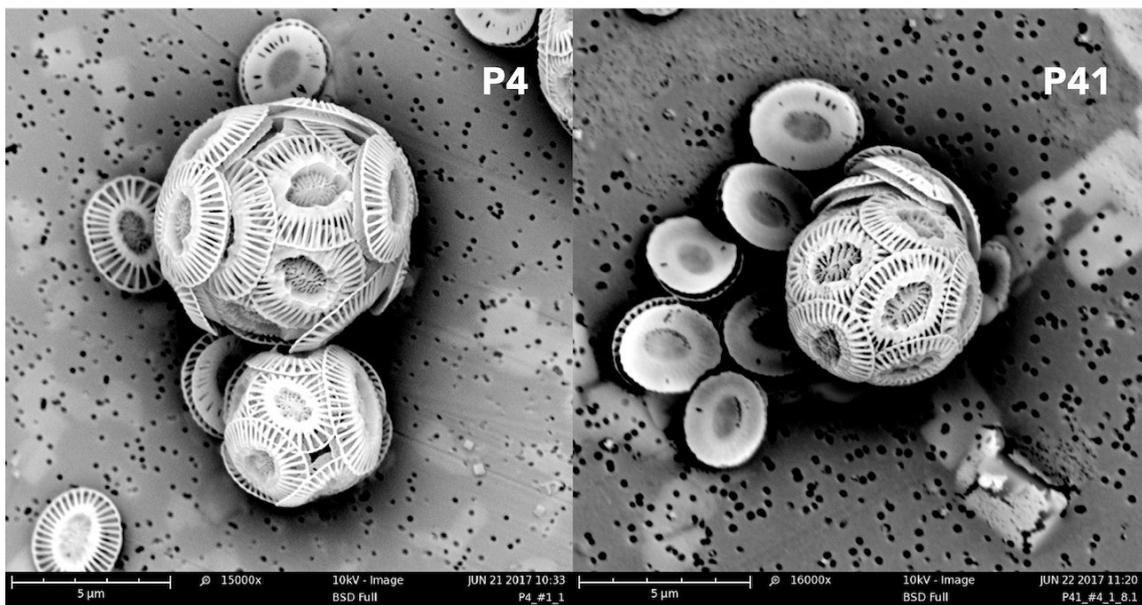


FIGURE 2.5 – Photo des souches RCC-P<sub>4</sub> et RCC-P<sub>41</sub> prises au Microscope Electronique à Balayage (MEB), à la station Biologique de Roscoff (SBR).

## 2.3 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DE CULTURES EN BATCH

### 2.3.1 Choix des souches

Deux souches d'*E. huxleyi* issues de la région de l'upwelling du Pérou ont été sélectionnées pour nos travaux. L'une prélevée au coeur de l'upwelling, la seconde hors de la zone active de remontée, plus au large. Ces souches ont été choisies car on suppose qu'elles présentent vraisemblablement des réponses et des adaptations différentes aux changements de pH de l'eau de mer du fait de leurs habitats différents (figure 2.5).

### 2.3.2 Choix des pH et technique d'équilibre du pH

Trois valeurs de pH sélectionnées pour notre étude sont 8.6, 8.1 et 7.6. Le pH 8.6 a été initialement choisi afin de comparer notre étude sur *E. huxleyi* avec celle d'une autre espèce de coccolithophoridés, *Calcidiscus leptoporus* (cependant cette souche n'a pas pu être étudiée du fait de la faible densité cellulaire obtenue). Cette valeur de pH est aussi celle présumée de la période pré-industrielle. Cette dernière a la particularité de mieux calcifier à un pH plus élevé (Langer et al. 2006). La valeur de pH 8.1 correspond à la valeur moyenne de l'océan actuel (Raven et al. 2005). Quant à la valeur de 7.6 elle représente le

pH atteint pour 5 fois la concentration actuelle en  $\text{CO}_2$  atmosphérique (Kleypas et al. 2006).

En turbidostat, les pH choisis étaient relativement proches de ceux sélectionnés pour les cultures en batchs dilués. Les deux pH retenus étaient en effet ceux du pH actuel de l'eau de mer (pH 8.1) et celui prédit à l'horizon 2100 (pH 7.9) (Kleypas et al. 2006). Le pH de l'eau de mer a été ajusté dans les cultures en batch par ajout de HCl ou NaOH 1M dans le milieu de culture. Ces ajouts font varier l'alcalinité du milieu, mais le DIC reste constant. L'alcalinité initiale du milieu de culture est mesurée (section 2.6.1), puis le logiciel  $\text{CO}_2\text{sys}$  (Lewis et al. 1998) permet de calculer la variation d'alcalinité entre le pH initial du milieu et le pH visé, à DIC constant. La différence d'alcalinité permet de déduire le volume (en mL/L) d'acide ou de base à ajouter dans le milieu de culture. Pour les conditions d'ajustement du pH en turbidostats voir la section 2.2.1.

### 2.3.3 Préparation des milieux de culture

Deux types de milieu de culture ont été utilisés, un milieu artificiel et un milieu naturel d'eau de mer enrichie. Le milieu artificiel est préparé à partir de sels anhydres et hydratés auxquels sont ajoutés des nutriments, des vitamines ( $\text{B}_{12}$ , Biotine, Thiamine) et des micro-nutritifs métalliques. Les métaux sont ajoutés sans Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) (tableau 2.1). Ce milieu a été mis au point au cours d'une étude antérieure conduite au LEMAR (Myrto Spinou, Stage Erasmus, 2011-2012). Il a été principalement utilisé pour les expériences menées en turbidostat. Le milieu naturel enrichi est, quant à lui, de l'eau de mer naturelle prélevée sur le site d'Ifremer à Argenton qui a été enrichie après filtration sur filtres stérilisés, en nutriments (nitrates, phosphates et silicates), vitamines ( $\text{B}_{12}$ , Biotine et Thiamine) et métaux. Les quantités ajoutées sont identiques à celles utilisées pour le milieu artificiel. Ce milieu a été utilisé pour l'ensemble des expériences en batchs dilués.

## 2.4 CULTURES

### 2.4.1 Acclimatation des souches

Le milieu de culture artificiel utilisé pour les expériences en turbidostat est dans un premier temps équilibré au pH souhaité par des injections de  $\text{CO}_2$  par le bio-contrôleur.

TABLE 2.1 – Tableau récapitulatif des concentrations des éléments utilisées pour la fabrication de l'eau de mer artificielle en sels et en vitamines, nutriments et métaux, les concentrations en nutriments, vitamines et métaux sont celles utilisées pour enrichir le milieu naturel enrichi issu du site d'Argenton

	Ingrédient	Concentration en $\text{mol.L}^{-1}$
<i>Sels anhydres</i>	NaCl	$4.20.10^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$2.88.10^{-2}$
	KCl	$9.39.10^{-3}$
	$\text{NaHCO}_3$	$2.38.10^{-3}$
	KBr	$8.40.10^{-4}$
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$4.10.10^{-4}$
	NaF	$7.14.10^{-5}$
<i>Sels hydratés</i>	$\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	$5.46.10^{-2}$
	$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	$1.05.10^{-2}$
	$\text{SrCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	$8.18.10^{-5}$
<i>Nutriments</i>	$\text{NaNO}_3$	$9.60.10^{-5}$
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$6.00.10^{-6}$
	$\text{NaSiO}_3.5\text{H}_2\text{O}$	$4.01.10^{-5}$
<i>Vitamines</i>	Vitamine B12	$74.10^{-12}$
	Biotine	$0.2.10^{-9}$
	Thiamine HCl	$59.10^{-9}$
<i>Métaux nutritifs</i>	$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$	$2.10^{-9}$
	$\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	$1.10^{-9}$
	$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	$1.10^{-9}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	$20.10^{-12}$
	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	$60.10^{-9}$
	$\text{NiSO}_4.6\text{H}_2\text{O}$	$10.10^{-9}$
	$\text{K}_2\text{CrO}_4$	$10.10^{-9}$
	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	$1.10^{-9}$
	LiCl	$70.10^{-9}$
	KI	$60.10^{-9}$
	$\text{AlCl}_3$	$100.10^{-9}$
	RbCl	$250.10^{-9}$
	Co	$40.10^{-12}$
	Zn	$1.10^{-9}$
	Cd	$20.10^{-12}$

Les souches d'*E. huxleyi* sont acclimatées initialement au milieu synthétique dans des flacons de 20 mL. Elles sont ensuite inoculées dans le bioréacteur contenant ce milieu au pH choisi.

Pour les expériences en batch, les cellules sont d'abord acclimatées sur une ou deux générations dans des flacons de 20 mL contenant l'eau de mer d'Argenton. Elles sont ensuite acclimatées aux différents pHs dans d'autres flacons de 20 mL. Les souches sont inoculées à faible densité cellulaire dans le milieu de culture. Lorsque la densité cellulaire de 50 000 cellules/mL est atteinte correspondant au début de la phase exponentielle, les cellules sont inoculées dans un nouveau milieu de culture au pH choisi. Dans les deux types de système de culture, le nombre de générations pour acclimater les cellules est de l'ordre de 10 comme préconisé par Langer et al. (2009).

#### 2.4.2 Déroulement des expériences en batchs dilués

Pour les expériences en batch, les cellules acclimatées sont introduites dans des bouteilles de 13.3 L à une densité cellulaire d'environ 200-400 cell/ml. Les bouteilles sont agitées manuellement afin de limiter la sédimentation des cellules. La densité cellulaire est déterminée quotidiennement en cytométrie en flux (GUAVA). Une fois la valeur de 50 000 cellules/mL atteinte, chaque bouteille est échantillonnée (partie 2.4.3). À cette densité cellulaire, moins de 5% du DIC est consommé (Zondervan et al. 2002). On limite ainsi les biais introduits lors de la photosynthèse et la calcification qui consomment ou libèrent du CO<sub>2</sub> et peuvent de ce fait modifier le pH du milieu. Le déroulement des cultures en batchs dilués est schématisé sur la figure 2.6.

#### 2.4.3 Taux de croissance et nombre de génération

La densité cellulaire,  $C$ , exprimée en cellules/mL a été estimée par comptage automatisé au cytomètre en flux (GUAVA). Le taux de croissance instantané ( $\mu$ , exprimé en  $\text{jour}^{-1}$ ) est égal à la pente donnée par le logarithme de la densité cellulaire ( $C$ ) en fonction du temps ( $t$ ), selon l'équation suivante :

$$\mu = \frac{\ln C_1 - \ln C_0}{t(C_1) - t(C_0)} \quad (2.1)$$

La densité cellulaire est mesurée quotidiennement à la même heure ce qui permet de calculer le taux de croissance journalier. La densité cellulaire a aussi été estimée ponc-

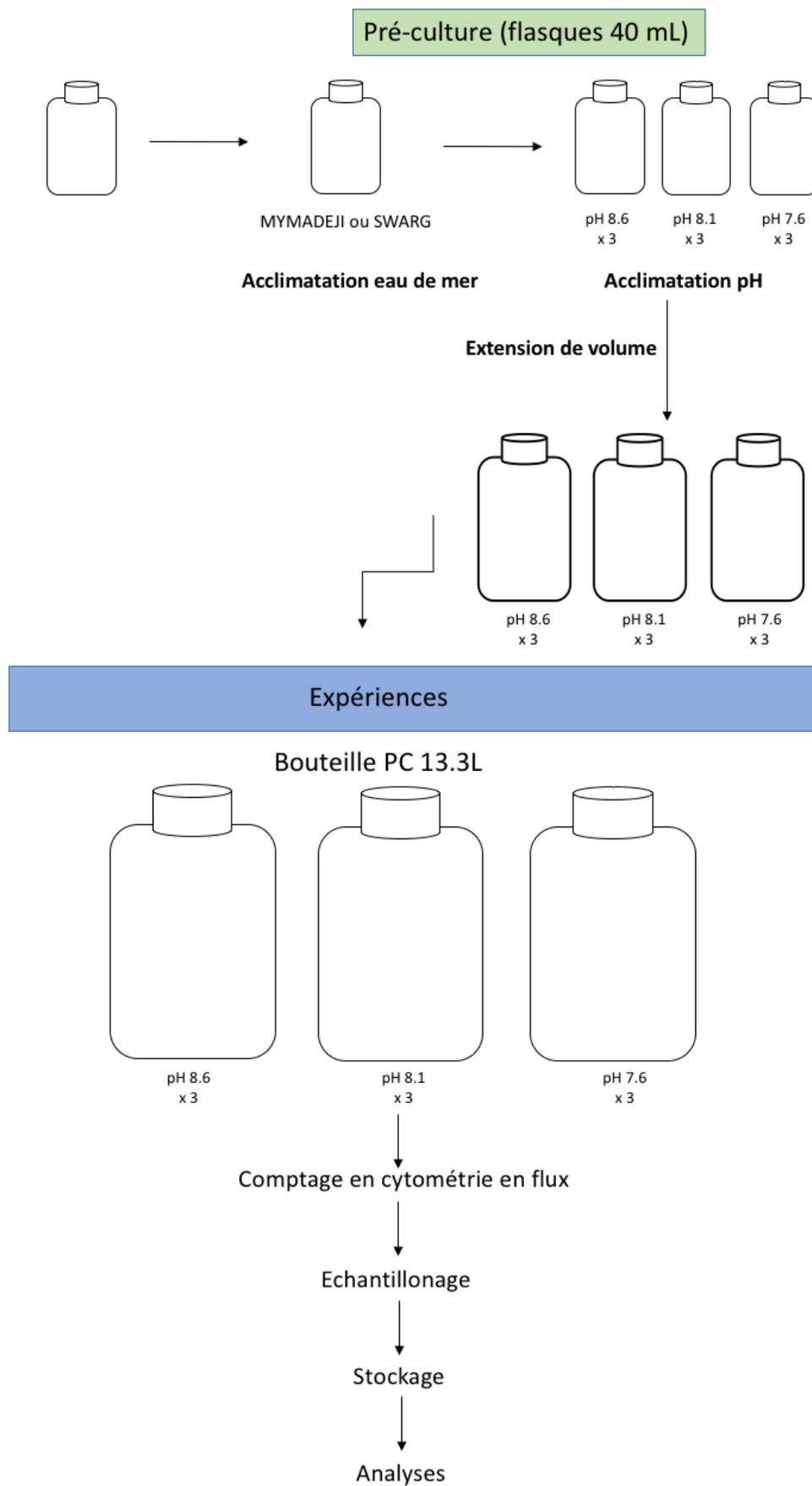


FIGURE 2.6 – Déroulement des cultures en batchs dilués réalisées en laboratoire dans les différentes conditions de pH

TABLE 2.2 – Liste des échantillons prélevés à la fin de l'expérience. Avec DIC : Dissolved Organic Carbon, TPC : Total Particulate Carbon, POC : Particulate Organic Carbon, MEB : Microscope Electronique à Balayage, GF/F : Glass Fiber Filter, PC : PolyCarbonate Filter

Echantillons	Volume	Filtres	Récipient	Stockage	Blancs
Alcalinité	3 x 100 mL	/	Bouteille PC	/	/
DIC	100 mL	/	Bouteille borosilicaté	Obscurité < 20°C	+
pH	2 x 4 mL	/	Tube 15 mL	/	/
TPC	2 x V(10 <sup>6</sup> cell)	25 mm GF/F calcinés	Pilulier borosilicaté calcinés	Congélation	2
POC	2 x V(10 <sup>6</sup> cell)	25 mm GF/F calcinés	Pilulier borosilicaté calcinés	Congélation	2
MEB	3 mL	25 mm 0.2µm PC	Boite de pétri	Congélation	/
épaisseur de la calcite	3 mL	25 mm Cellulose	Boite de pétri	Congélation	/

tuellement par comptage manuel en microscopie optique sur une cellule de Malassez. Le nombre de génération (n) est calculé à partir du taux de croissance (equation 2.1).

$$\mu = \frac{1}{G} * \ln(2) \quad (2.2)$$

où G correspond au temps de génération tel que

$$G = \frac{t}{n} \quad (2.3)$$

où t est la durée d'expérience et n le nombre de générations. Les cellules sont considérées comme acclimatées au bout de 10 générations dans des conditions stables de cultures (température, lumière, nutriments) (Langer et al. 2009).

## 2.5 ÉCHANTILLONNAGE DES CULTURES EN BATCHS DILUÉS

L'échantillonnage des cultures en batch est réalisé en une fois, certains paramètres comme le pH, la salinité et l'alcalinité sont mesurés immédiatement. Les échantillons destinés aux observations au Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et à l'analyse de

l'épaisseur de la calcite sont filtrés deux fois, respectivement, sur des filtres en PC et des filtres de nitro-cellulose. Ces filtres sont séchés puis stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Afin de compléter les mesures de pH et d'alcalinité, un flacon destiné à la mesure du DIC est prélevé et empoissonné au glutaraldéhyde, puis conservé à l'obscurité et à une  $T < 20^{\circ}\text{C}$ . Enfin un volume contenant au moins  $10^6$  cellules est filtré deux fois pour l'analyse du carbone total particulaire (Total Particular Carbon : TPC) et du carbone organique particulaire (Particular Organic Carbon : POC), grillés à  $450^{\circ}\text{C}$  pendant 4h, comme pour les filtres. Ces échantillons sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse. Le tableau 2.2 fournit la liste des échantillons prélevés, le volume ou le nombre de cellules, ainsi que le conditionnement et le mode de stockage. Les volumes restants sont réservés à la mesure du bore.

## 2.6 TRAITEMENT DES DONNÉES ET ANALYSES DES PARAMÈTRES

Le tableau 2.3 donne le détail des paramètres analysés, des appareils d'analyses utilisés et le nom des laboratoires où les analyses ont été réalisées.

### 2.6.1 Mesures des paramètres du système des carbonates

Le pH est mesuré au moment de l'échantillonnage. Il est mesuré deux fois avec une sonde pH (sonde pH C281 ou HQ40d multi pH-meter, HACH) avec une précision donnée de 0.002 unité pH. La mesure de l'alcalinité totale suit le protocole de titrage de Gran. Il consiste à ajouter un volume d'acide chlorhydrique jusqu'à atteindre le point d'équivalence. L'alcalinité correspond à la quantité de protons nécessaire pour neutraliser les bases faibles contenues dans un kilogramme d'eau de mer. Cette opération est réalisée par ajout de HCl à 0.01 M :



La mesure du pH permet de déduire la concentration en protons sachant que le  $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ . L'alcalinité totale est calculée à partir de la quantité d' $\text{H}^+$  ayant réagi, du volume de l'ajout ainsi de l'activité chimique des protons. Cette mesure est réalisée trois fois, et avec une précision de 0.14 mmol/L correspondant à une précision de pH à 0.07 unité de pH. Cette méthode de mesure d'alcalinité totale par titration manuelle a été comparée avec la technique utilisée par le Service National des mesures de  $\text{CO}_2$  SNAPO- $\text{CO}_2$  (LOCEAN, Paris) sur les mêmes échantillons d'eau de mer. Ces deux méthodes montrent un écart des valeurs d'alcalinité de 0.06 mmol/kg. L'avantage de la titration manuelle

TABLE 2.3 – Tableau récapitulatif des paramètres analysés. Détails des traitements effectués, des appareils utilisés pour faire les mesures ainsi que le laboratoire où les analyses ont été effectuées (LEMAR : Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin; SBR : Station Biologique de Roscoff; CEREGE : Centre de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement)

Paramètres analysés	Traitement	Appareil utilisé		Laboratoire d'analyse
Alcalinité	30 mL HCl 0.1 M	pHC281, meter, HACH	pH-	LEMAR
DIC	Empoisonnement au glutaraldéhyde	AIRICA		en attente
pH	/	pHC281, meter, HACH	pH-	LEMAR
TPC	Séchage à l'étuve à 55°C	CHN		LEMAR
POC	Dessiccateur fumant / Séchage à l'étuve à 55°C	CHN		LEMAR
MEB	Séché à l'étuve à 55°C - 1H / Montage sur plot le aluminium et recouvert d'or-paladium	Microscope électronique à balayage Phenom G2 pro desktop	élec- à ba-	SBR
épaisseur de la calcite	Séchage à l'étuve durant quelques heures à 55°C	SYRACO		CEREGE

est qu'elle nécessite un faible volume d'échantillon (100 mL) comparé aux 500 mL nécessaires pour la mesure d'alcalinité réalisée au SNAPO-CO<sub>2</sub>. En utilisant les mesures de pH et d'alcalinité, le système des carbonates est calculé avec le programme CO<sub>2</sub>sys (Lewis et al. 1998), et les constantes définies par Mehrbach et al. (1973) et Dickson et Millero (1987). Nous pouvons donc définir le système des carbonates : le DIC, les teneurs en ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ainsi que l'indice de saturation de la calcite.

### 2.6.2 Analyses du carbone particulaire

Pour réaliser les mesures de POC, les filtres sont placés dans un dessiccateur sous vapeurs de HCl à 37% pendant 4h afin de décarbonater les échantillons. Ils sont ensuite séchés à l'étuve à 50°C durant une nuit. Les filtres servant à l'analyse du TPC sont quant-à-eux directement séchés à l'étuve sans l'étape de décarbonatation. Le PIC est calculé par différence entre le TPC et le POC. Les analyses de TPC et POC sont réalisées sur un analyseur CHN-Carlo Erba Analyzer 1500 (Le Moigne et al., Giraud et al. 2016). Ce protocole est celui utilisé par SOMLIT et décrit par Bichon et al. (2013).

### 2.6.3 Analyses de la morphologie

Afin de déterminer les caractéristiques morphologiques des souches étudiées, un volume de culture a été filtré sur des filtres PC, qui sont ensuite séchés et conservés au congélateur à -20°C. Les filtres sont ensuite placés durant une heure à l'étuve à 50°C. La préparation pour l'observation au microscope électronique à balayage (MEB) nécessite un dépôt d'or et de platinium à la surface du filtre. Chaque filtre observé au MEB est ensuite traité à l'aide du logiciel ImageJ (Young 2015) pour mesurer le diamètre approximatif des coccosphères, la longueur des coccolithes, appelé Distal Shield Length, DSL (Poulton et al. 2011) (figure 2.7). Le diamètre des coccosphères et la longueur des coccolithes ont été mesurés sur 100 cellules sur chaque triplicat pour chaque valeur de pH. La moyenne et la déviation standard pour chaque triplicat ont été calculées.

### 2.6.4 Épaisseur de la calcite

Les mesures de l'épaisseur de la calcite à chaque pH ont été réalisées au CEREGE (Aix-en-Provence) par L. Beaufort. Cette technique repose sur l'identification de la morphologie

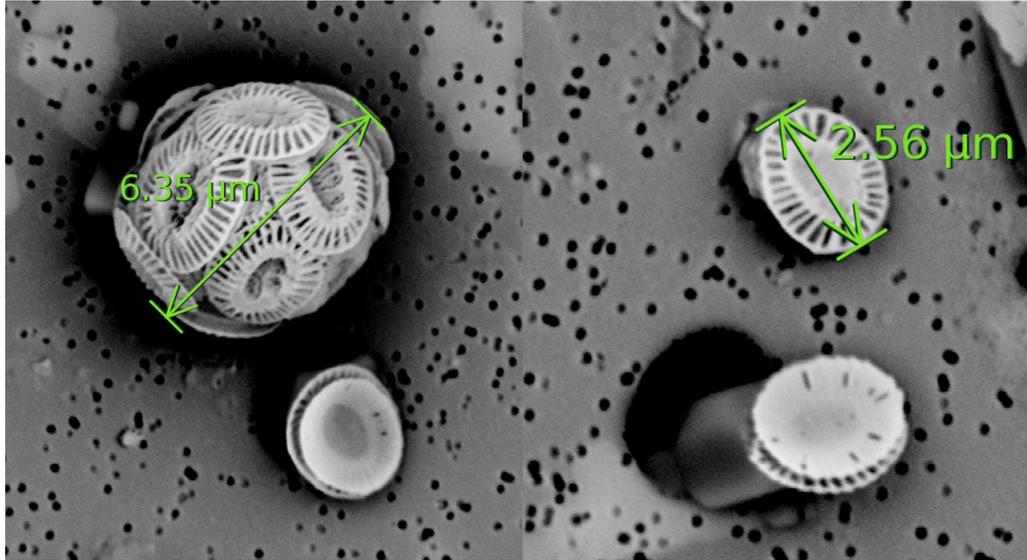


FIGURE 2.7 – Mesures du diamètre des coccosphères et de la plus grande longueur des coccolithes (DSL)

des cellules par l'utilisation du logiciel SYRACO. L'utilisation de la birefringence permet d'estimer la masse des coccolithes et de déterminer leur épaisseur.

## 2.7 CONCLUSION

L'ensemble des paramètres décrits est destiné à compléter les mesures de B/Ca et  $\delta^{11}B$  réalisées sur la calcite des coccolithophoridés des deux souches sélectionnées et aux 3 valeurs de pH choisies pour mieux comprendre les mécanismes d'incorporation du bore dans la calcite, la réponse physiologique de ces organismes aux changements de pH sur une gamme de 1 unité de pH et ses conséquences sur leurs morphologies.

Dans le chapitre qui suit nous décrivons les développements analytiques qui ont été nécessaires pour produire des données fiables de bore et notamment de  $\delta^{11}B$  dans la calcite des coccolithes.





# III

## Méthodologie



# 1

# PROCOLES D'ISOLATION DES COCCOLITHES ET D'EXTRACTION DU BORE

## 1.1 INTRODUCTION

Les analyses du B/Ca et du  $\delta^{11}B$  dans les coccolithes des coccolithophoridés sont encore exploratoires. Les protocoles et méthodes pour réaliser ces mesures n'ont été que peu (B/Ca) ou pas ( $\delta^{11}B$ ) développés. Les analyses élémentaires et isotopiques du bore par spectrométrie de masse requièrent une maîtrise non seulement des conditions de cultures mais aussi des différentes étapes du traitement des échantillons et des blancs expérimentaux. Dans cette thèse, des développements méthodologiques et analytiques ont été nécessaires :

1. Pour mesurer le rapport élémentaire, B/Ca; un premier protocole a été adapté à partir de protocoles existants. Nous avons ensuite adapté un second protocole à partir d'études publiées sur les mesures de Sr/Ca ou Mg/Ca dans les coccolithes (Müller et al. 2013, Blanco-Ameijeiras et al. 2012).
2. Pour mesurer le  $\delta^{11}B$ , il n'existe à ce jour aucune donnée publiée de  $\delta^{11}B$  mesurée dans la calcite des coccolithes. Le développement de notre protocole s'est appuyé sur les méthodes publiées pour la mesure du  $\delta^{11}B$  dans les foraminifères (Henehan et al. 2013, Hönisch et al. 2004) et les coraux (Douville et al. 2010, Dissard et al. 2012).

L'analyse élémentaire de la composition en éléments traces de la calcite s'est appuyée sur plusieurs publications (Yu et al. 2005, Coadic 2013, Misra et al. 2014a, Stoll et al. 2012) celle de la mesure isotopique du bore sur les analyses publiées par (Misra et al. 2014b, Kaczmarek et al. 2016, Sutton et al. 2017).

Ce chapitre présente les développements analytiques réalisés au cours des 24 premiers mois de thèse, et notamment les protocoles optimisés pour les analyses élémentaires et isotopiques du bore dans la calcite des coccolithophoridés en spectrométrie de masse. Cela inclue les difficultés d'analyses rencontrées, les blancs d'analyse et de matériel, la préparation des standards et des solutions de calibration. Ce travail a fait l'objet d'une publication méthodologique à soumettre à *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, (Delebecque et al.) qui est annexée en dernière partie de ce chapitre.

## 1.2 ÉCHANTILLONNAGES ET ISOLATION DES COCCOLITHES

Cette première étape consiste à recueillir les cellules de coccolithophoridés préalablement cultivées en batchs dilués ou turbidostat (cf. Chapitre 2). La contrainte est de recueillir suffisamment de matériel pour pouvoir détecter et quantifier en spectrométrie de masse (ICP-QMS et MC-ICP-MS) les concentrations en bore et ses isotopes ( $^{10}\text{B}$  et  $^{11}\text{B}$ ) dans la calcite. Au cours de cette thèse, deux techniques ont été explorées. La première méthode par filtration, a été développée au cours d'un stage de Master 1 (Marine Bretagnon, Master 1, 2014) puis optimisée. La seconde méthode par centrifugation, est déjà utilisée par certains auteurs (Blanco-Ameijeiras et al. 2012, Müller et al. 2013) pour recueillir les coccolithophoridés. Nous l'avons adaptée à l'analyse du bore. Un traitement alcalin a été appliqué aux coccolithophoridés afin d'éliminer la matière organique et purifier la calcite des coccolithes.

### 1.2.1 Échantillonnage des cellules par filtration

Partant de l'étude de Y. Resnais (LABEX-MER) nous avons recueilli les cellules par filtration. Après un comptage de la densité cellulaire de la culture en microscopie optique, un volume est filtré grâce à une seringue en PFA reliée à porte-filtre en PFA équipée d'un filtre de 25 mm de diamètre et 0.2  $\mu\text{m}$  de porosité. Ce protocole conduisait cependant souvent à l'éclatement des cellules ou à des fuites provoquées par une trop forte pression. Nous l'avons modifié en réalisant la filtration l'aide d'une pompe péristaltique opérant à une vitesse de rotation de 20 rpm. Dans ce protocole, des cannes en PFA sont placées en amont pour pomper la solution de culture contenant les cellules. Les tuyaux en PFA et en tygon sont utilisés pour le pompage par la pompe péristaltique (figure 3.1). Les porte-

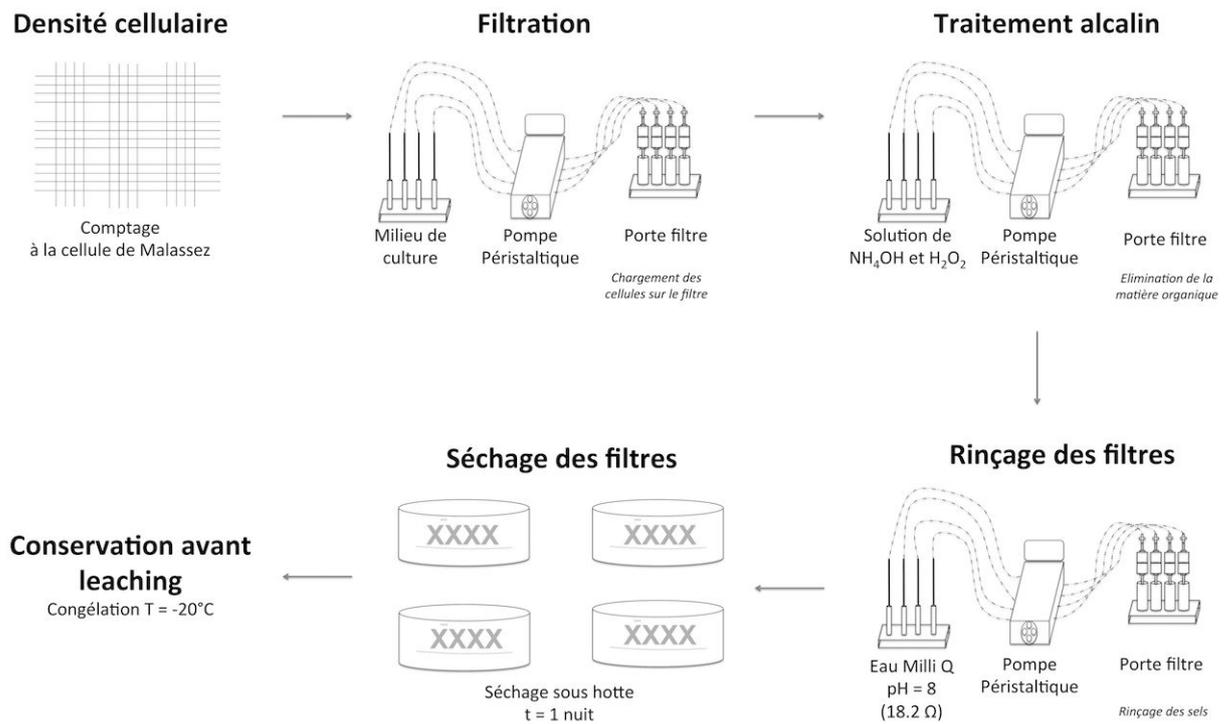


FIGURE 3.1 – Schéma du protocole d'échantillonnage des coccolithophoridés par filtration et de purification des coccolithes avec un traitement alcalin

filtres en PFA sur lesquels sont montés les filtres sont reliés aux tuyaux et, enfin, à une bouteille en PTFE pour recueillir le filtrat.

### 1.2.2 Choix des filtres

Deux types de filtres d'un diamètre de 25 mm et d'une porosité de  $0.2 \mu m$  en polycarbonates (PC) et en polyethersulfone (PES) ont été initialement sélectionnés. Les filtres en PES ont été choisis à cause de leur digestion plus facile en condition acide ainsi que les filtres PC et de leurs faibles inerties aux métaux traces.

### 1.2.3 Traitement alcalin : dissolution de la matière organique issue de la filtration

Après échantillonnage des coccolithophoridés (figure 3.1), la matière organique présente sur le filtre est dissoute grâce à un traitement alcalin. Pour cela, une solution alcaline est préparée à partir du  $NH_4OH$  dans laquelle du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est ajouté. Le traitement alcalin de l'échantillon est réalisé également en ligne avec une pompe péristaltique à une vitesse de rotation de 20 rpm (figure 3.1). La concentration

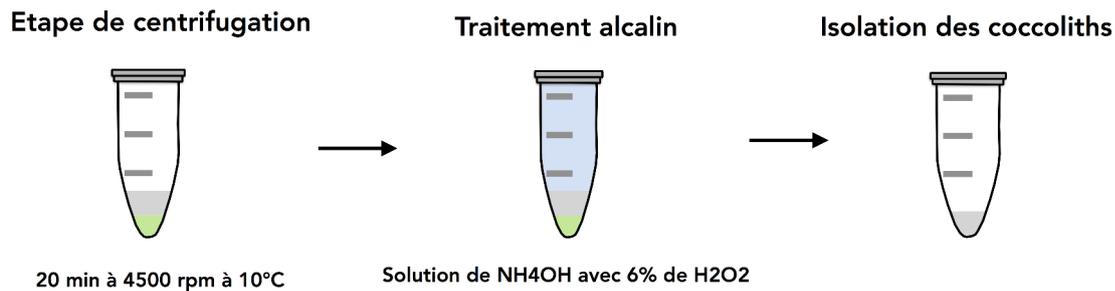


FIGURE 3.2 – Étapes d'échantillonnage des coccolithophoridés par centrifugation et de purification par traitement alcalin à partir des travaux de Blanco-Ameijeiras et al. (2012), Müller et al. (2013)

initialement testée était de 0.1 M. Les filtres ainsi traités sont ensuite rincés avec de l'eau Milli-Q tamponnée à pH 8 (18.2  $\Omega$ ) afin d'éliminer les traces de sels tout en évitant la dissolution de la calcite. Ils sont ensuite séchés sous une hotte à flux laminaire.

#### 1.2.4 Échantillonnage des cellules par centrifugation

Les cellules sont concentrées par centrifugation comme décrit par Blanco-Ameijeiras et al. (2012), Müller et al. (2013). La méthode consiste à placer la solution de culture dans des tubes de centrifugation durant 20 minutes à une température de 10°C soumis à une vitesse de 4600 rpm. Le surnageant est centrifugé deux fois pour récupérer l'ensemble des coccolithes présents. Comme indiqué par Blanco-Ameijeiras et al. (2012), la matière organique après centrifugation se situe au dessus de la calcite dans le culot du tube (figure 3.2). L'ensemble est ensuite rincé à l'eau Milli-Q (18.2  $\Omega$ ) tamponnée à pH 8.

#### 1.2.5 Traitement alcalin à l'issue de la centrifugation

Le traitement alcalin est réalisé avec une solution de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 0.5M et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 6% afin d'éliminer la matière organique (figure 3.2). Les tubes contenant la calcite et la matière organique avec la solution alcaline sont placés dans un bain thermostaté à 50°C et agités durant 24 h. Les tubes sont ensuite centrifugés à 4000 rpm durant 5 minutes à 10°C. Cette étape est répétée plusieurs fois pour éliminer la matière organique. Une solution de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 0.5M et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 6% est fraîchement préparée à chaque nouveau traitement afin de limiter toute contamination éventuelle de la solution en bore (Coadic 2013). Une fois la matière organique éliminée, la calcite est transférée dans un nouveau tube pré-pesé, et préalablement lavé à l'acide. Ce transfert est nécessaire pour d'éviter les relargages des parois du tube lors du passage du traitement alcalin au traitement acide. Les tubes sont

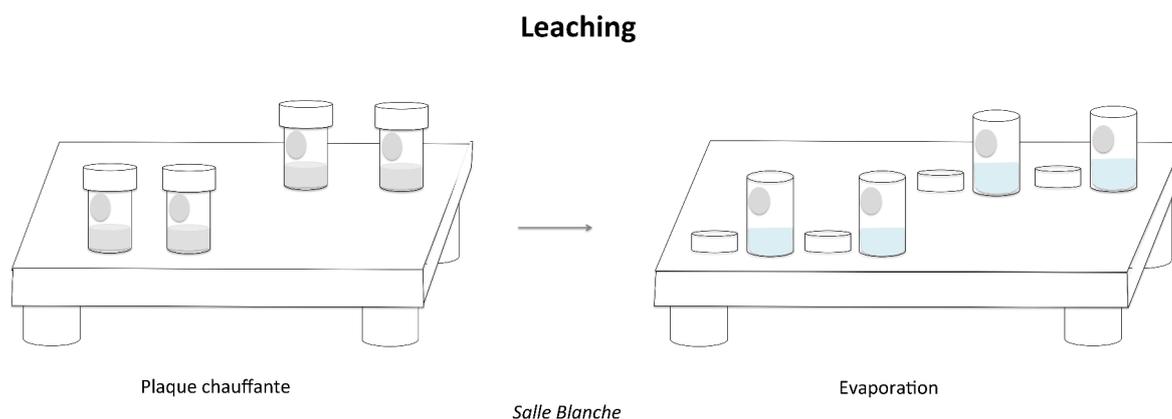


FIGURE 3.3 – Dissolution de la calcite par digestion sous vapeurs d'acide de  $HNO_3$

mis à sécher sous la hotte en salle blanche puis pesés pour estimer la quantité de calcite recueillie.

### 1.3 DISSOLUTION DE LA CALCITE

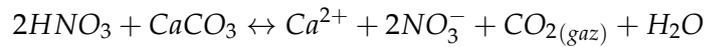
#### 1.3.1 Mise en solution de la calcite sous vapeurs d'acide

La dissolution de la calcite est réalisée sur des filtres préalablement séchés. 1 mL d'acide nitrique ( $HNO_3$ ) pur est ajouté dans un flacon en PFA et le filtre sec plaqué contre la paroi du tube au dessus de l'acide (figure 3.3). En salle blanche (classe ISO 6, Classe 1000), les flacons sont placés sur une plaque chauffante en PFA durant une nuit à une température de  $120^\circ C$  sous une hotte à flux laminaire. Les éléments contenus dans la calcite sont entraînés au fond du flacon avec les vapeurs d'acide.  $HNO_3$  est ensuite évaporé à  $130^\circ C$  durant 4h. Une solution  $HNO_3$  2% est utilisée pour la remise en solution de l'échantillon avant l'analyse par l'ICP-QMS.

#### 1.3.2 Technique par ajout d'acide sur la calcite après centrifugation

La calcite recueillie par centrifugation et purifiée par traitement alcalin est dissoute avec un 1 mL de  $HNO_3$  1M. Ce volume est ensuite divisé en deux pour d'une part l'analyse de la composition élémentaire par ICP-QMS, et d'autre part l'analyse par MC-ICP-MS.

Afin de réaliser une dissolution totale de la calcite, nous avons utilisé une solution de  $HNO_3$  1M en excès. La réaction chimique de la dissolution de la calcite est la suivante :



(1.1)

Pour favoriser la dissolution, la calcite sèche présente au fond du tube est émiétée à l'aide d'une baguette en PFA afin de limiter toute contamination. Cette étape limite la formation de particules, et donc une étape de centrifugation supplémentaire avant l'analyse élémentaire par ICP-QMS.

## 1.4 EXTRACTION DU BORE

L'extraction des isotopes du bore est réalisée avec de la résine Amberlite IRA 743. Cette résine est préalablement écrasée et tamisée afin de récupérer une poudre qui est nettoyée avec  $HNO_3$  de molarité décroissante et rincée l'eau Milli-Q (18.2  $\Omega$ ) entre chaque lavage à l'acide. Elle est ensuite stockée dans un flacon en PFA dans de l'eau Milli-Q tamponnée à pH 8. Avant chaque utilisation, la résine est nettoyée une dernière fois avec une solution de  $HNO_3$  1M puis équilibrée à pH 8. 24 h avant d'effectuer le protocole d'extraction, les échantillons sont équilibrés à pH 8 avec une solution  $NH_4OH$  à 4M.

Deux protocoles d'extraction ont été évalués, le premier en passant en boucle l'échantillon tamponné sur la résine, et le seconde par élution par gravité.

### 1.4.1 Résine Amberlite

L'explication du principe d'extraction de la résine Amberlite est schématisée sur la figure 3.4. La résine est formée de molécules de N-méthylglucamine. C'est la fonction glutamine (liaison -OH) qui permet de retenir les ions borates sur la résine. L'échantillon est préalablement équilibré à pH basique afin que l'ensemble du bore présent dans l'échantillon soit sous la forme d'ions borate et puisse être retenu par la résine (Rajiv et al. 2010, Rohm and Haas Company 2003). L'utilisation d'un acide fort comme le  $HNO_3$  permet ensuite d'éluer l'ensemble du bore de la résine pour être ensuite mesuré par MC-ICPMS.

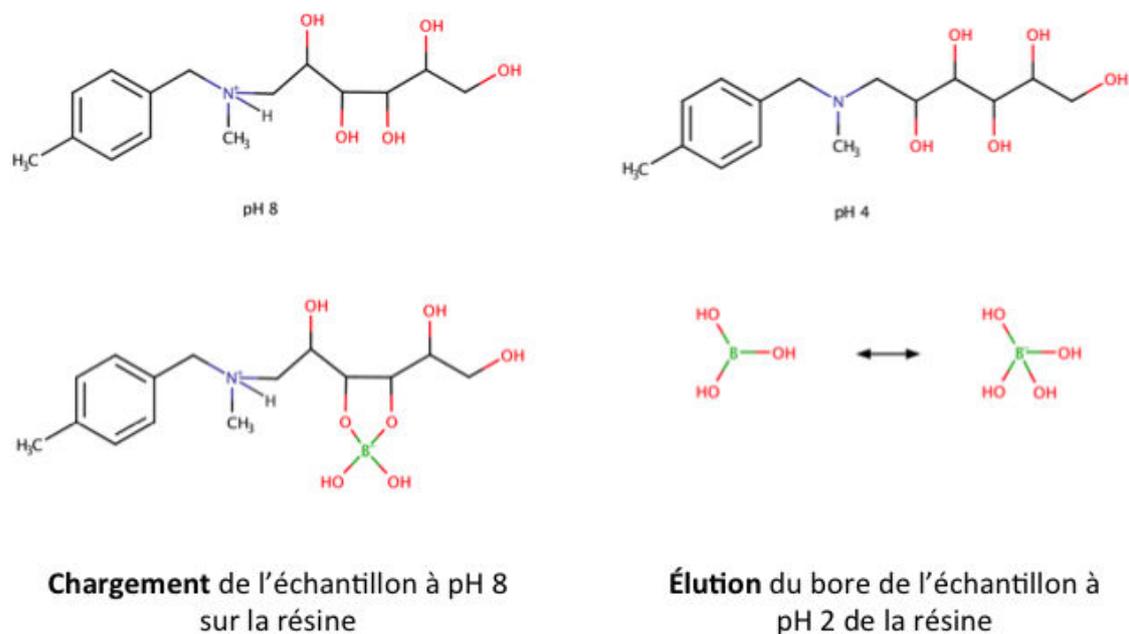


FIGURE 3.4 – Schéma d'explication de l'extraction du bore par la résine Amberlite à l'échelle moléculaire à partir de Rajiv et al. (2010)

#### 1.4.2 Protocole d'extraction sur colonne en boucle

À partir des 0,5 mL de la solution de  $HNO_3$  1M contenant le bore destinés à la mesure de  $\delta^{11}B$ , le volume est amené à 10 mL avec de l'eau Milli-Q. La solution de  $HNO_3$  passe ainsi d'une concentration de 1 M à 0,48 M, soit 2%  $HNO_3$ . Cette solution diluée est chargée sur la résine Amberlite grâce à une pompe péristaltique fonctionnant à une vitesse faible de 5 rpm. Les tuyaux utilisés sont en PFA et en tygon (gris/gris) (figure 3.5). La résine Amberlite a été préalablement placée dans une micro-colonne entre deux frittés. Le système utilisé est semblable à celui utilisé pour la Flow Injection Analysis (FIA). L'étape d'élution est réalisée dans le sens inverse du chargement, à la même faible vitesse.

#### 1.4.3 Technique par batch/gravité

Dans ce cas, la résine Amberlite est placée cette fois dans un micro-tube, le surnageant d'eau Milli-Q est extrait pour réaliser le lavage de l'Amberlite avec 1 mL de  $HNO_3$  à 1M. La résine est directement équilibrée dans le micro-tube à pH 8. Les 500  $\mu L$  issus de la dissolution de la calcite, déjà équilibré à pH 8, sont ajoutés dans le micro-tube. Le temps de chargement de la solution est de 4 heures (Douville et al. 2010).

Afin de récupérer uniquement la résine et les ions borates retenus (figure 3.4), des colonnes en PTFE universelles sont utilisées. Elles sont nettoyées préalablement à  $HNO_3$

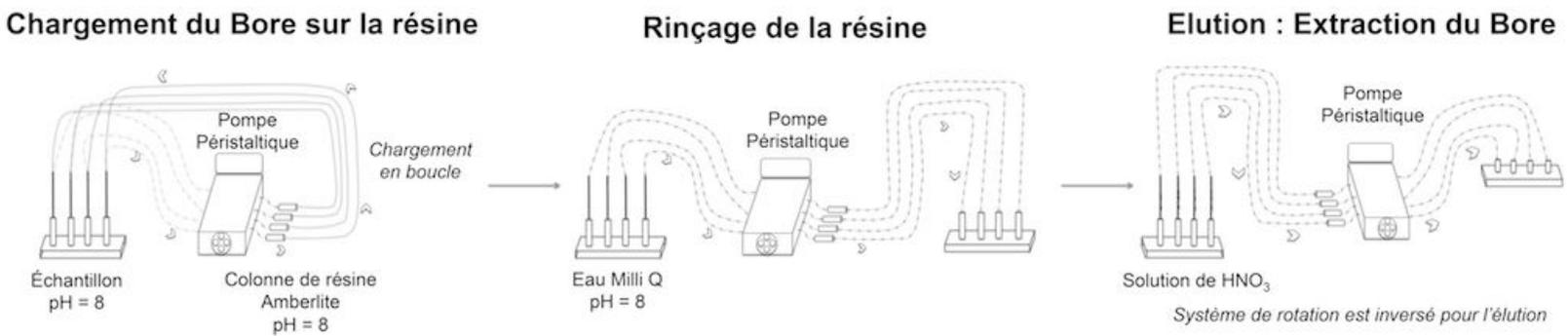


FIGURE 3-5 – Principe de l'extraction en ligne et en boucle des isotopes du bore sur colonne amberlite

puis lavées à l'eau Milli-Q (18.2  $\Omega$ ), et enfin à l'eau Milli-Q tamponnée à pH 8. Le volume de calcite dissoute et de résine sont alors ajoutés dans la colonne. Après chargement sur colonne, la solution surnageante (sans le bore) est extraite. La résine est ensuite rincée avec de l'eau MQ tamponnée à pH 8 pour éliminer les traces de calcium. Cette étape est essentielle car cela évite la formation de fluorure de calcium au cours de l'élution. L'étape d'élution est réalisée à l'aide d'une solution d'acide fluorhydrique (HF) à 0.3M (pH 2) qui est le pH optimal pour l'élution du bore fixé sur la résine (Misra et al. 2014b, Kaczmarek et al. 2016).

#### 1.4.4 Calcul de rendement / efficacité de la colonne

La difficulté dans l'extraction du bore sur colonne est de limiter le fractionnement isotopique afin de pouvoir quantifier exactement le  $\delta^{11}B$  de la calcite. Lorsque le rendement est compris entre 97% et 102%, on considère que le fractionnement isotopique du à l'extraction est négligeable (Sutton et al. 2017).

### 1.5 BLANCS DE PROTOCOLE, DE RÉACTIFS, DE MATÉRIEL ET LES LIMITES DE DÉTECTIONS

Le premier défi dans le développement du protocole d'extraction des coccolithes a été de réduire considérablement le niveaux des blancs pour permettre l'analyse de faibles quantités de bore (quelques ppb) présentes dans la calcite des coccolithes. En effet, dans le protocole initial, les blancs de protocoles étaient aussi élevés que le niveau des concentrations à mesurer dans les échantillons. L'optimisation de la méthode d'extraction des coccolithes a permis de réduire à plus de 47% les blancs de protocoles. Pour la méthode d'isolation par filtration avec le traitement alcalin et dissolution sous vapeurs d'acide de la calcite ces blancs sont en moyenne de  $0.639 \pm 3.98$  ppb ( $3\sigma$ ,  $n = 8$ ). La seconde méthode développée présente des valeurs de blancs plus faibles de  $0.341 \pm 0.791$  ppb ( $3\sigma$ ,  $n = 27$ ). Les blancs baissent encore pour l'extraction des coccolithes par centrifugation de l'ordre de 3% par rapport au premier protocole. L'utilisation de bouteilles en PFA a considérablement réduit (environ 90%) les blancs de réactifs (figure 3.6). Les limites de détection (LD =  $3\sigma$ ) pour les analyses élémentaires du bore restent relativement peu élevées pour une masse de calcite mesurée entre 20 et 200 mg.

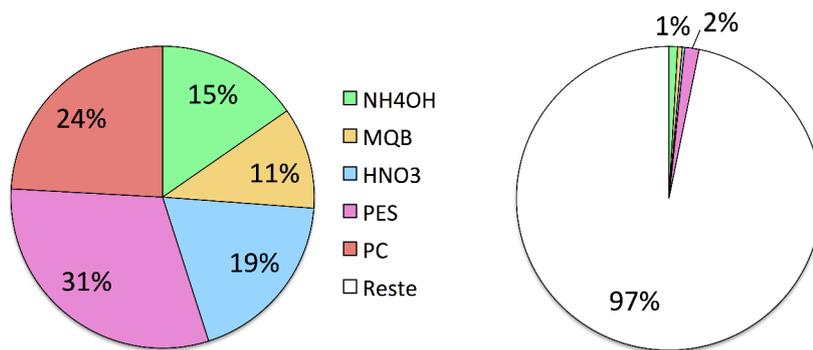


FIGURE 3.6 – Composition (en %) des blancs de réactifs et de matériels mesurés en bouteille PTFE (à gauche) et réduction des blancs par utilisation de bouteilles en PFA (à droite). Les pourcentages du diagramme (à droite) ont été calculés à partir des pourcentages du diagramme (à gauche).

L'étape d'extraction du bore par la résine Amberlite en utilisant la technique en boucle présente de faibles blancs (4%) mais un plus grand risque de perte de bore sur les parois des tuyaux en PFA et tygon. Les blancs du protocole par gravité présentent cependant des teneurs en bore plus fort ( $5.61 \pm 4.67$  ppb de bore).

## 1.6 RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSIONS

### 1.6.1 Récolte et isolation des coccolithes

Suite aux travaux de Marine Bretagnon, des premières conclusions sur la méthode par filtration ont été émises. Tout d'abord, l'utilisation de  $NH_4OH$  limite la contamination en bore, plus que l'utilisation d'une solution de soude (NaOH), pour le traitement alcalin. De plus la solution alcaline évite l'accumulation d'ion sodium sur le filtre. Cet ion présent dans l'eau de mer en concentration élevée interfère lors des analyses ICP-MS des éléments traces et notamment celle du bore en faible quantité dans la calcite des coccolithes. Concernant le choix des filtres PC ou PES, bien que tous deux aient une faible inertie pour les métaux traces, il apparaît que les filtres PES présentent une contamination en bore plus élevée que les filtres PC. Les premiers tests que nous avons menés ont confirmés les conclusions de M. Bretagnon sur le choix du type de filtre. Concernant l'utilisation de la pompe péristaltique au lieu de la seringue en PFA, elle permet en outre de limiter l'éclatement des cellules et donc d'augmenter le nombre de cellules retenues sur les filtres et donc la quantité de bore extraite.

La concentration de la solution alcaline ( $NH_4OH + H_2O_2$ ) était dans les travaux de

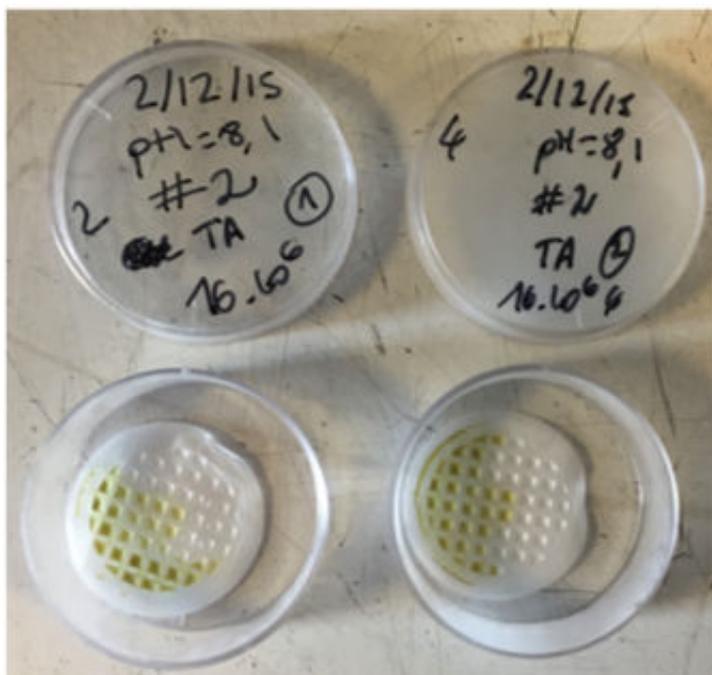


FIGURE 3.7 – Collecte de cellules de coccolithophoridés sur des filtres PC suite au traitement alcalin avec une solution à 0.5 M de  $\text{NH}_4\text{OH}$  et 2% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

M. Bretagnon de 0.1M de  $\text{NH}_4\text{OH}$  et 2% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Du fait du nombre plus important de cellules à isoler pour réaliser les mesures de  $\delta^{11}\text{B}$ , et donc par conséquent aussi de la matière organique, la concentration initiale de cette solution n'était plus adaptée. Une solution alcaline de plus forte concentration a été testée à 0.5M. La figure 3.7 montre les filtres après le traitement alcalin de la solution alcaline à 0.5M. Les filtres sont encore très vert présentant encore la présence de matière organique. Malgré cette augmentation le traitement alcalin n'était donc pas efficace.

Nous avons donc du opter pour une récupération des cellules récoltées par centrifugation.

### 1.6.2 Dissolution de la calcite

La dissolution de la calcite a été réalisée dans un premier temps sous vapeur d'acide nitrique. La température durant cette étape a été abaissée pour favoriser la dissolution totale de la calcite. De plus la molarité du  $\text{HNO}_3$  a été augmentée. L'étape d'évaporation prévue initialement a été éliminée pour éviter les pertes de bore. Bien que ce protocole ait été optimisé, l'observation des filtres au MEB, après cette étape de leaching, montrent une sorte de croûte sur les filtres (figure 3.7).

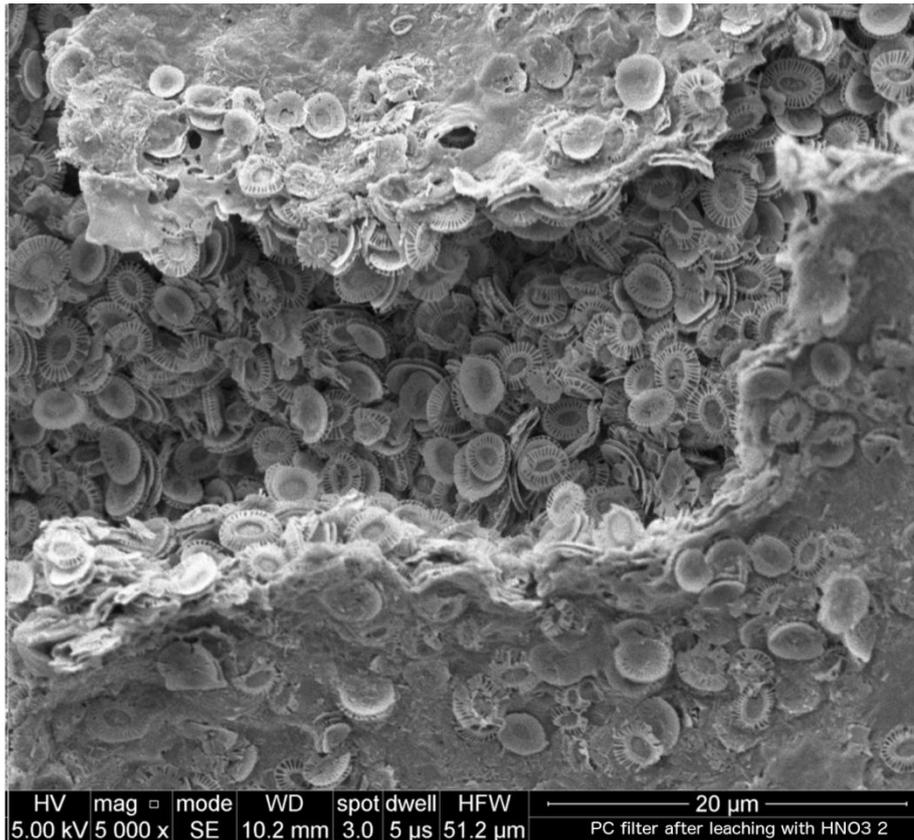


FIGURE 3.7 – Observation au MEB (N. Gayet, IFREMER) des filtres PC après l'étape de leaching

La dissolution de la calcite n'est donc pas complète et limite par conséquent la récupération totale des éléments contenus dans la calcite. Ceci implique des biais lors de la quantification des éléments contenu dans la calcite.

La procédure retenue pour mener cette étude est proche de celles développées par Blanco-Ameijeiras et al. (2012) et Foster et al. (2013).

### 1.6.3 Extraction du bore

Initialement l'extraction du bore de la calcite était envisagée par une technique en boucle proche du système de FIA. Cependant plusieurs difficultés nous ont conduites à abandonner cette option. Tout d'abord, le passage de l'échantillon dans plusieurs tubes et tuyaux augmente le risque d'adsorption du bore sur les parois, et donc le risque de contamination et de fractionnement isotopique du bore. La faible quantité de résine utilisée dans cette configuration n'assurait pas à 100% que tout le bore contenu dans l'échantillon soit retenu. Cette méthode était enfin très chronophage (plus de 24h par échantillon, sans avoir la possibilité de faire plusieurs échantillons à la fois). En effet, le chargement de

l'échantillon sur la résine, le rinçage de la résine et l'étape d'éluion du bore est réalisés à une vitesse de 3 rpm, avec des risques de fuite des tuyaux à cause de la pression. Nous avons donc opté pour la méthode par batch/gravité car la mise en oeuvre est plus facile et donne une meilleure reproductibilité. Cette technique permet de travailler par lot de 6, soit 4 échantillons, un blanc et un échantillon standard de référence (NEP).

## 1.7 CONCLUSION

Bien que les méthodes initialement prévues aient donné des résultats pour la mesure élémentaire (B, Ca), elles se sont avérées inadaptées pour les mesures du  $\delta^{11}B$  dans les coccolithes. Nous avons donc du les adapter ou les remplacer pour nous placer dans les conditions imposées par la mesure de la composition isotopique en bore dans la calcite (>50 ng). Il a de plus été nécessaire d'adapter les protocoles pour traiter plusieurs échantillons simultanément.

Les deux protocoles, celui mis au point pour l'isolation des coccolithes par méthode de centrifugation et celui d'extraction du bore par la méthode de batch/gravité pour aboutir aux mesures de B/Ca et  $\delta^{11}B$  ont fait l'objet d'un article à soumettre à Journal Geochemistry, Geophysics, Geosystems, *G*<sup>3</sup>.



# ANALYSES ICP-QMS ET MC-ICP-MS

# 2

Depuis environ 30 ans, et avec l'arrivée de nouveaux outils analytiques de nombreuses études se sont intéressées à la mesure des isotopes du bore dans les carbonates marins dans le but d'explorer cette information en paléoclimatologie pour reconstruire les variations passées du pH des océans (Foster et Rae 2016).

## 2.1 PRINCIPE DES MESURES ICP

Depuis le milieu des années 80, les analyses en spectrométrie de masse (ICP-MS : Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer) se sont répandues dans les laboratoires de géochimie. Ces appareils sont utilisés dans divers domaines d'application tels que la géochimie clinique, le nucléaire ou encore la métallurgie. L'intérêt de cet outil analytique est qu'il permet une détermination multi-élémentaire rapide des échantillons à un faible niveau de concentrations. Ces appareils sont capables de mesurer des concentrations de l'ordre du ppt au ppb. La spectrométrie de masse est donc parfaitement adaptée à la détection des faibles concentrations de bore contenues dans les coccolithes. Les ICP-MS fonctionnent sur la base d'une sublimation de l'échantillon dans le nébuliseur qui est ensuite transporté jusqu'à la torche à plasma, lieu où l'échantillon est ionisé ou atomisé à température élevée (de l'ordre de 6500°C à 10 000°C). Dans le cadre de cette thèse, afin d'estimer les concentrations en bore et en calcium, nous avons utilisé un ICP-QMS et pour déterminer  $\delta^{11}\text{B}$  nous avons utilisé un MC-ICPMS.

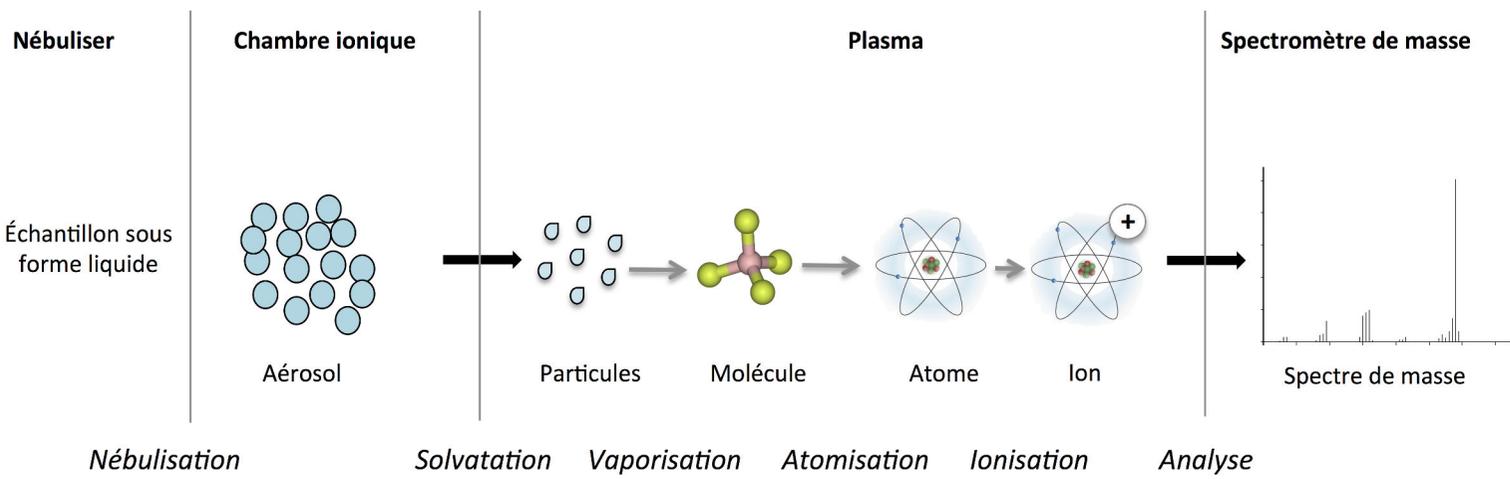


FIGURE 3-8 – Principe d'introduction d'un échantillon dans un spectromètre de masse

## 2.2 MESURE ÉLÉMENTAIRE AU SPECTROMÈTRE DE MASSE : ICP-QMS

Pour mesurer les éléments traces et les éléments majeurs contenus dans les carbonates biogéniques des coccolithophoridés, les concentrations en B et Ca, Sr, Mg, Li ont été mesurées par ICP-QMS. Le principe de ces mesures est détaillé en figure 3.8. Cet appareil permet de quantifier simultanément des éléments chimiques à des concentrations présents dans une gamme large allant du ppm au ppt. Plusieurs travaux ont montré que la matrice de calcium, composant la calcite, peut avoir une influence sur l'analyse des éléments traces (Yu et al. 2005, Misra et al. 2014a, Coadic 2013). Pour limiter ces effets sur la mesure, les standards sont calibrés avec une concentration constante en Ca, de l'ordre de 100 ppm. Cela permet d'obtenir une bonne reproductibilité sur les éléments traces et majeurs. De même, pour limiter les problèmes d'encrassement et d'effet mémoire du Ca et du B, une solution de rinçage ( $HNO_3$  à 2%) est passée 3 fois entre chaque échantillon. Une solution est préparée avec l'ensemble des éléments mesurés à une concentration de 1 ppb pour réaliser les réglages de l'appareil, elle est appelée solution «tune». Cette solution est passée tous les 10 échantillons pour estimer la dérive potentielle de la machine au cours de chaque séquence d'analyse. Cette solution contient l'ensemble des éléments à mesurer à une concentration de 1 ppb. Le barycentre des deux mesures de la solution tune sert à corriger chaque échantillon. Seule la mesure du dernier blanc de rinçage est retranchée à celle de l'échantillon, après la correction de la dérive de la machine.

Un standard de référence (JCp-1) aurait dû être utilisé pour à la fois valider le protocole opératoire lié à l'isolation des coccolithes, estimer les contaminations possibles et valider la méthode d'analyse en ICP-QMS. Cependant un problème de mesure de bore dans ce standard de référence nous a empêché la reproductibilité externe.

## 2.3 MESURE ISOTOPIQUE AU SPECTROMÈTRE DE MASSE : MC-ICPMS

La mesure de  $\delta^{11}B$  peut se faire par différents procédés. Le MC-ICPMS Neptune est un spectromètre de masse principalement utilisé pour déterminer la composition isotopique d'éléments inorganiques. Il permet de faire des mesures rapides à des niveaux de détection très faibles, de l'ordre du ppb.

L'utilisation du MC-ICPMS dans la mesure de la composition isotopique du bore a remplacé celle du TIMS (Thermal Ionization Mass Spectrometry) pour laquelle la correc-

tion du biais de masse est délicate. Le recours au MC-ICPMS s'est rapidement généralisé pour la détermination du  $\delta^{11}B$  dans les carbonates biogéniques d'organismes marins comme les coraux et les foraminifères (Foster 2008, McCulloch et al. 2014).

Cette technique nécessite au préalable une étape de purification du bore sur une résine Amberlite (voir partie 1, 1.4) qui permet d'obtenir une précision sur la mesure de  $\delta^{11}B$  de l'ordre de 0.25‰ (Foster et Rae 2016, Louvat et al. 2011, Douville et al. 2010, Foster 2008).

Foster et al. (2013) compare l'ensemble des méthodes utilisées en MC-ICPMS et en TIMS et notamment leur précision pour la mesure du  $\delta^{11}B$  dans les carbonates marins dans différents laboratoires. Cette synthèse donne une déviation standard moyenne de 1.46 ‰ et souligne le risque élevé de contamination au cours des différentes étapes de traitement des échantillons ainsi que les effets de matrices.

L'analyse de l'échantillon en MC-ICPMS se fait sous forme liquide dans une matrice de  $HNO_3$  2%/HF 0.03M. Comme décrit par la figure 3.8, l'échantillon est transporté vers le plasma par le gaz de nébulisation (Argon) où il est ionisé et analysé par le spectromètre de masse.

Afin d'améliorer la mesure de  $\delta^{11}B$  et corriger les écarts isotopiques (<2‰) chaque échantillon est analysé avec un standard NIST-SRM-951 à une concentration connue. Échantillons et standard sont mesurés successivement. Cette méthode est appelée la méthode de Sample-Standard-Bracketing (SSB) (Douville et al. 2010, Misra et al. 2014b, Kaczmarek et al. 2016).

## 2.4 EFFET MÉMOIRE DU BORE

Le problème majeur dans la mesure de la concentration élémentaire ou de la composition isotopique du bore est l'effet mémoire. Il est lié à l'adsorption du bore sur les parois observée notamment lors de l'introduction de l'échantillon dans la source de plasma. Pour palier à cet effet lors de la mesure de la concentration en bore en ICP-QMS, on réalise de long temps de rinçages que l'on répète au moins 3 fois. Dans le cas de la mesure de  $\delta^{11}B$  en MC-ICPMS, on utilise une solution de HF à faible concentration comme préconisé par Kaczmarek et al. (2016), Misra et al. (2014b), ce qui a pour effet de réduire considérablement les blancs et de permettre après plusieurs rinçages un retour à la ligne de base rapide.

## ANNEXE : PUBLICATION SCIENTIFIQUE

# 3

L'article qui suit présente le développement analytique pour mesurer le  $\delta^{11}B$  dans les coccolithes issue de la culture d'une souche d'*E. huxleyi*. La souche RCC-P41 a été collectée dans la zone de l'upwelling du péruvien. Les valeurs de  $\delta^{11}B$  et du ratio B/Ca ont été mesurées par, respectivement, MC-ICPMS et ICP-QMS. Leurs résultats sont comparés aux données déjà publiées aux autres organismes calcifiants. Cette nouvelle méthode de mesure de B/Ca et  $\delta^{11}B$  ouvre de nouvelles perspectives dans la mesure du bore dans des échantillons issue d'expériences de variations du système des carbonates. Ici, nous présentons ces expériences et abordons les questions dans le contexte de physiologie cellulaire et des potentielles applications en tant que paléo-proxy.



# $\delta^{11}\text{B}$ AND B/CA MEASUREMENTS IN COCCOLITH CALCITE BY MC-ICPMS AND ICP-QMS

*N. Delebecque*<sup>1</sup>, *M.A. Sicre*<sup>2</sup>, *G. Langer*<sup>3</sup>, *I. Probert*<sup>4</sup>, *J.N. Sutton*<sup>1</sup>, *E. Douville*<sup>5</sup>, *P. Montagna*<sup>5,6</sup> and *M. Boye*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> LEMAR CNRS/UBO/IRD/IFREMER, Plouzané, France

<sup>2</sup> LOCEAN, Sorbonne Universités, UPMC, 75252 Paris, France

<sup>3</sup> The Marine Biological Association of the United Kingdom, The Laboratory, Citadell Hill, Plymouth, Devon PL1 2PB, UK

<sup>4</sup> CNRS-UPMC, FR2424, Roscoff Culture Collection, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France

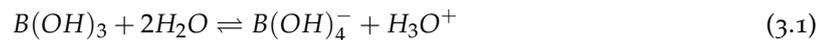
<sup>5</sup> Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, Institut Pierre Simon Laplace (LSCE/IPSL) Domaine du CNRS, UMR 8212, Av. de la Terrasse, 91198 Gif/Yvette, France <sup>6</sup> Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Gobetti 101, I-40129 Bologna, Italy

## ABSTRACT

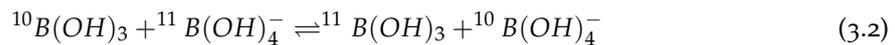
Since the beginning of the Industrial era, increased carbon dioxide emissions into the atmosphere due to human activities have led to the progressive acidification of the ocean. Decreasing seawater pH and subsequent undersaturation state in calcium carbonates are likely to affect marine calcifying organisms such as coccolithophores. An increasing number of studies have investigated the pH dependence of isotopic composition of boron ( $\delta^{11}\text{B}$ ) in marine biocarbonates. Most of them have focused on corals and foraminifera and only preliminary  $\delta^{11}\text{B}$  values of coccolithophore calcite are available in the literature. In this study, we present an analytical development to accurately measure  $\delta^{11}\text{B}$  in coccoliths performed on a culture of *Emiliania huxleyi* RCC-P41 originating from a sample collected in Peru coastal upwelling system.  $\delta^{11}\text{B}$  and the B/Ca ratio values were measured using MC-ICPMS and ICP-QMS respectively and results were compared with published data for other marine calcifiers.

### 3.1 INTRODUCTION

The precise monitoring since the 1980s of surface water pH (Bates et al. 1996; 2012) has revealed changes in the carbonate system of the ocean as a result of increasing anthropogenic carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) in the atmosphere and its absorption by the ocean leading to the gradual lowering of shallow water pH, known as ocean acidification (Bates et al. 2012, Doney et al. 2009, Riebesell et al. 2010). Acidification itself or concomitant changes in the concentrations of bicarbonate ions, carbonate ions and  $\text{CO}_2$  will likely influence marine calcifying organisms such as the coccolithophores, which are the dominant group of calcifying marine phytoplankton. Several studies have shown that changes in seawater pH affect biocalcification rates with variable responses between species and strains (Riebesell et Zondervan 2000, Langer et al. 2009, Beaufort et al. 2012). It is still unclear which cellular processes underpin the sensitivity of coccolithophores to seawater carbon chemistry changes. It is plausible that the regulation of carbon chemistry within the so-called coccolith vesicle, in which the minute calcite platelets (coccoliths) are produced, is disturbed by seawater acidification. Unfortunately the fluid volume inside the coccolith vesicle is too small to be accessible by available microanalytical techniques such as fluorescent dyes. The incorporation of boron into coccolith calcite offers an indirect access to intra-coccolith vesicle carbon chemistry because boron speciation is pH dependent and only one boron species, i.e. borate, are incorporated into calcite (Hemming et Hanson 1992). Another important motivation for studying boron in biocarbonates is to assess the relationship between  $\delta^{11}\text{B}$  in coccolithophorid calcite and pH in order to develop a paleo-pH proxy. Boric acid  $\text{B}(\text{OH})_3$  and borate ion  $\text{B}(\text{OH})_4^-$  are the two predominant forms of boron in seawater. Their respective concentrations are given by the following equation (figure 3.9) (Zeebe et Wolf-gladrow 2002) :



Where the  $pK_B^*$  is the dissociation constant of boric acid in seawater ( $pK_B^* = 8.6$ , at  $25^\circ\text{C}$  and a salinity of 35) (Dickson 1990). As shown by eq (1), the incorporation of B in biogenic calcite depends on seawater pH. At pH values  $> 8.6$  the tetrahedral borate ion,  $\text{B}(\text{OH})_4^-$ , dominates in seawater, while below this value the trigonal  $\text{B}(\text{OH})_3$  is prevalent. In the ocean, the natural abundance of stable isotopes of boron,  $^{10}\text{B}$  and  $^{11}\text{B}$ , is approximately 20% and 80%, respectively. The isotopic equilibrium of boron isotopes in seawater is described by :



The fractionation factor,  $\alpha$ , associated with eq (2) is defined as :

$$\alpha = \frac{(^{11}\text{B}/^{10}\text{B})_{\text{B}(\text{OH})_3}}{(^{11}\text{B}/^{10}\text{B})_{\text{B}(\text{OH})_4^-}} \quad (3.3)$$

Values of  $\alpha$  have been determined by empirical or theoretical studies but today the experimentally derived value of Klochko et al. (2006) (4) is considered the best estimate :  $\alpha = 1.0272 \pm 0.0006 \text{ ‰}$

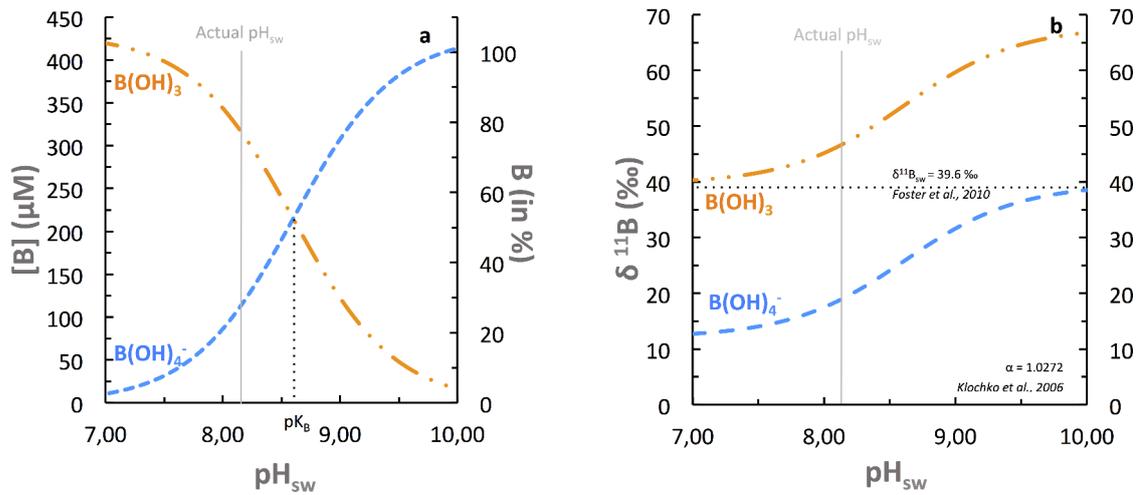


FIGURE 3.9 – B Speciation in borate ions ( $B(\text{OH})_4^-$ ) and acid boric ( $B(\text{OH})_3$ ) (a) and variations in isotopic composition these two B species with seawater pH (b). Calculations are based on equations (1) and (2) by Foster et al. (2010), Klochko et al. (2006), Dickson (1990).

in seawater at 25°C This value reflects the fact that  $B(\text{OH})_3$  is isotopically heavier than  $B(\text{OH})_4^-$ .  $\delta^{11}\text{B}$  is usually expressed relative to the standard reference material, SRM NIST 951 with a  $\delta^{11}\text{B} = 0\text{‰}$  and  $^{11}\text{B}/^{10}\text{B} = 4.04362 \pm 0.00137$  (Catanzaro 1970) :

$$\delta^{11}\text{B} = \left( \frac{(^{11}\text{B}/^{10}\text{B})_{\text{sample}}}{(^{11}\text{B}/^{10}\text{B})_{\text{NIST951}}} - 1 \right) * 1000 \quad (3.4)$$

Using  $\delta^{11}\text{B}_{\text{calcite}}$  the pH can be calculated from the following equation (Zeebe et Wolf-gladrow 2002) :

$$\text{pH} = \text{pK}_B * -\log \left[ -(\delta^{11}\text{B}_{sw} - \delta^{11}\text{B}_{ech}) / \delta^{11}\text{B}_{sw} - (\alpha * \delta^{11}\text{B}_{ech}) - ((\alpha - 1) * 1000) \right] \quad (3.5)$$

where  $\delta^{11}\text{B}_{sw}$  is the boron isotopic composition of seawater. The mean  $\delta^{11}\text{B}_{sw}$  of modern ocean has been estimated to  $39.61 \pm 0.20 \text{‰}$  (Foster et al. 2010, Misra et al. 2014b). In the recent years, incorporation of boron in marine carbonates has been investigated in the framework of seawater carbon chemistry reconstruction from B/Ca and  $\delta^{11}\text{B}$  of these carbonates. Studies have extensively reported on the  $\delta^{11}\text{B}$  in corals and foraminifera (Hönisch et al. 2004, Foster 2008, Douville et al. 2010, Rae et al. 2011, Trotter et al. 2011, McCulloch et al. 2012). By contrast, there is only one preliminary dataset on coccolithophores (Henehan 2015). The boron isotopic composition of coccolith calcite is, apart from its potential usefulness in proxy studies, very interesting from a cell physiological point of view. As mentioned above, knowledge about boron incorporation into coccoliths will help to constrain intra-coccolith vesicle carbon chemistry. In order to realize its full potential in this context both B/Ca and  $\delta^{11}\text{B}$  need to be measured. The only study published which explore the potential B/Ca, leaves us with considerable ambiguity in interpreting the results (Stoll et al. 2012) The first study analyzing both  $\delta^{11}\text{B}$  and B/Ca is therefore an important step, but the

results are preliminary and the author is very cautious in drawing his conclusions (Henehan 2015). Clearly a robust method for measuring  $\delta^{11}\text{B}$  in coccoliths is needed. Accurate measurements of  $\delta^{11}\text{B}$  of typical marine biogenic carbonates represent a challenge because of their low B content, i.e. 3-50 ppm (Foster et Rae 2016). The precise determination of  $\delta^{11}\text{B}$  requires a few mg of calcite for MC-ICPMS analyses (Misra et al. 2014b, Foster et Rae 2016, McCulloch et al. 2014).

Here, we report the analytical development for measuring  $\delta^{11}\text{B}$  the calcite coccolith of *Emiliania huxleyi* RCC-P41 collected in Peruvian upwelling waters and cultured under controlled conditions. Elemental B/Ca ratios were also measured to evaluate the incorporation pathway of B in biogenic calcite coccoliths.

## 3.2 MATERIAL AND METHODS

### 3.2.1 Culture conditions of the coccolithophores

Cells of *E. huxleyi* RCC-P41 collected from the Peru upwelling were obtained from the Roscoff Culture Collection ([www.roscoff-culture-collection.org](http://www.roscoff-culture-collection.org)). This strain was grown in diluted batch cultures (maximum cell density <50,000 cells/mL) at a temperature of 18°C and a salinity of 32 with a 14h/10h light/dark cycle at an irradiance level of 450  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Natural seawater collected offshore Argenton in the Iroise Sea (Brittany, France) was used for the culture experiments after filtration using 0.2  $\mu\text{m}$  porosity polycarbonate (PC) filters. Filter-sterilized seawater was then enriched with sterile macronutrients (nitrates, phosphates and silicates), vitamins (B12, biotin, and thiamine) and metals including trace metals without addition of Ethylene Diamine Tetra Acetic (EDTA) and stored in 13.3 L PC bottles. The pH was adjusted to  $8.13 \pm 0.04$  ( $2\sigma$ ,  $n = 6$ , total scale) to reflect the modern ocean pH by addition of HCl (1M) and/or NaOH (1M). Cells were then pre-acclimated to this medium in 20 mL flasks for at least 10 generations and then inoculated at very low cell density into 13.3 L bottles. After approximately 10 generations, cultures were harvested at a cell density lower than 50,000 cells/mL in order to ensure quasi-constant carbonate system conditions over the course of the experiment (Zondervan et al. 2002). Cells were sampled after 10 cell generations to perform triplicate analyses of B, Ca and  $\delta^{11}\text{B}$  (Langer et al. 2009).

### 3.2.2 Cleaning procedure

Sample handling was performed in a clean ISO-5 room. Prior to use, all containers (bottles, microtubes, vials, etc.) were successively washed with high purity 37% Normapur HCl and 37% Suprapur HCl diluted to 10% and then rinsed three times with 18.2 m $\Omega$  Milli-Q (MQ) water. This washing sequence minimized potential contamination of B, magnesium (Mg) and calcium (Ca). Pipette tips were rinsed three times with 10% Suprapur HCl and then three times with MQ

water. Standard solutions and SRM were prepared in Perfluoroalkoxy (PFA) bottles using MQ water and nitric acid ( $HNO_3$ , 67-69%, Trace Metal). An alkaline solution of 0.5M ammonium hydroxide ( $NH_4OH$ , 30%, reagent grade) and  $HNO_3$  at 2% were prepared under a clean hood and stored in pre-cleaned PFA bottles at room temperature after being placed in zip-lock plastic bags.

### 3.2.3 Standards preparation

For elemental ratio analysis, individual standard 1,000 ppm solutions of Ca, Li, Sr, B, Fe, Cd and Mg (AAS CRMs certified TraceCERT<sup>®</sup>) were prepared following the protocol of Yu et Elderfield (2007). From each of these solutions, multi-element solutions were gravimetrically prepared in clean PFA bottles using 2%  $HNO_3$  solution and stored at 2°C. Each solution was prepared to reach a Ca concentration of 100 ppm (Yu et Elderfield 2007). In addition, a solution containing all elements at 1 ppb of each element was prepared and used to monitor and correct for the instrument drift. A solution of NIST SRM 951 (NIST, Gaithersburg, MD, USA) was prepared with 0.5N  $HNO_3$  in PFA cleaned bottles for the determination of B concentration and  $\delta^{11}B$  in calcite and for estimating contamination in B or other elements for the entire analytical procedure (Holcomb et al. 2016). A modern marine carbonate *Porites sp.*; NEP, a coral standard provided by the University of Western Australia/Australian National University (McCulloch et al. 2014) was also analyzed for B/Ca and  $\delta^{11}B$  following the same procedure as for the samples.

### 3.2.4 Instrumentation - B/Ca and $\delta^{11}B$ measurements

#### 3.2.4.1 Boron concentrations

Concentrations of B, Ca, Mg, Sr, Li, Fe and Cd were measured using a ThermoFisher Inductively Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometer (ICP-QMS) X-Series<sup>II</sup>, operating at the Pôle Spectrométrie Océan in Brest, France. Operating conditions are summarized in Table 3.1. A quartz microcyclic spray chamber (ThermoElectron) was used to measure B/Ca ratios in a 0.5N  $HNO_3$  matrix. Drift of the ICP-QMS was corrected by running the 1-ppb standard multi-element solution (see section 2.3) was run every five samples. Three rinses were also performed between each sample to avoid B memory matrix effect and to reduce blank levels. Ordinarily, a measurement of reference solution gives an external reproducibility. Unfortunately, the weak quantity obtained of NEP wasn't enough for both analytical methods. Also, a problem on the Jcp-1 powder was detected and did not give the right concentration of boron.

#### 3.2.4.2 Boron isotope measurements :

Boron isotopes were measured using a ThermoScientific Neptune Multiple Collector-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (MC-ICP-MS) operating at IFREMER Geosciences

TABLE 3.1 – Settings of ICP-QMS for elementary analyses and MC-ICP-MS for boron isotopic analyses

Settings	Element Mode	Isotope mode
Spectrometer	ICP-Q-MS Xseries 2 Thermo Scientific	MC-ICP-MS Thermo
Plasma RF power	1200 W	1200 W
Spray Chamber	Quartz cyclonic type	PFA
Injector	Sapphire 1.8 mm	ESI Alumin
Sample Cone	Nickel XT ou XS	Jet Ni cone
Skimmer cone	Nickel XT ou XS	X Ni cone
Torche	Quartz type	Quartz type
Scan mode	Peak jumping	/
Detection mode	Pulse counting (only Li, B, Cd)/ ana- log (both for Ca, Mg, Sr)	Faraday Cage
Autosampler	SC-2 Fast ESI (Elemental scientific)	ASX-100 CETAC
Capillary	Teflon, internal diameter 0.25 mm	Teflon
Cooling gas	14 L/ min	
Auxiliary	0.8 L/min	
Nebulizer	[0.88 - 1.0] L/min	
Uptake mode	Peristaltic pump	Peristaltic pump
Uptake rate	1 mL / min	60 $\mu\text{L}/\text{min}$
Uptake time	125 sec.	40 sec.
Washout time	50 sec.	110 sec.
Sample matrix	HNO <sub>3</sub> 2%	HNO <sub>3</sub> 2% / HF 0.3 M
Multi-mode Analysis	CCT* (Fe) /without CCT (Standard)	/
CCT gas	He (93%)/ H <sub>2</sub> (7%)	Argon
flow rate for collision cel mode	[2.8 - 3.2] mL/min	
Delay between CCT / without CCT)	35 sec.	
Runs	3 (CCT), 3 (without CCT)	30 cycles
Sweeps number	80/run	
Dwell time		4 sec integration/cycle
Major elements (Mg, Ca, Fe, Sr)	10 milli-sec.	
Trace elements (B, Li, Cd)	30 milli-sec	125 sec.
Software version	PlasmaLab 2.6.2.337-July 2011	
* Collision Cell Technolog		

Marines Laboratory in, Brest, France. All samples and standards were analyzed in 0.3N HF matrix and 2%  $HNO_3$  to facilitate rapid B wash out (Misra et al. 2014b, Owen et King 1942, Kaczmarek et al. 2016). A Teflon chamber and a direct injection analyzer were used. Instrumental conditions for B isotope analyses are given in Table 3.1.  $\delta^{11}B$  values were corrected using the Sample-Standard Bracketing (SSB) technique. The external reproducibility of  $\delta^{11}B$  measurements was estimated from repeated analyses of the reference material, NEP ( $24.66 \pm 0.25 \text{ ‰}$ ,  $2\sigma$ ,  $n = 12$ ) as described in section 2.5.2.

### 3.2.5 Chemical treatment of the samples

#### 3.2.5.1 Coccolith isolation

The preparation of coccolithophore calcite was adapted from previous methods (Blanco-Ameijeiras et al. 2012, ?). 5L of culture medium at cell density  $< 50,000$  cell/mL yielded sufficient amount of coccolith calcite for chemical measurements. The culture was split into 500 mL tubes and centrifuged at 4600 rpm at  $10^\circ C$  to recover coccoliths. The supernatant was centrifuged twice to recover remaining coccoliths to ensure maximum recovery. To remove organic matter we used the same oxidative cleaning method of Barker et al. (2003). An alkaline solution of 0.5 M  $NH_4OH$  with 6% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was added to the tubes containing calcite and placed in a water bath at  $50^\circ C$  for one day. The tubes were subsequently centrifuged for 5 min at 4000 rpm at  $10^\circ C$ . This operation was repeated once. A new alkaline solution was used for each centrifugation sequence to minimize contamination. The organic-free coccoliths were then transferred to a new clean tube and dried under a laminar flow hood before dissolution in 1mL of 1M  $HNO_3$  solution. To avoid a memory effect, new tubes were used for this second step.

#### 3.2.5.2 Boron extraction and isotopic measurement

B/Ca ratios in coccolith calcite were determined from the purified calcite after dissolution in 1 mL 1M  $HNO_3$  following the method described by Sutton et al. (2017). This volume was then splitted into two parts. 0.5 mL was used for ICP-QMS elemental analysis using ICP-QMS and the other 0.5 mL for boron extraction and  $\delta^{11}B$  analyses by MC-ICPMS analyses of B isotopes. The pH of the latter 0.5 mL aliquot was adjusted to pH 8 with a 4M  $NH_4OH$  solution. After 24h of pH equilibration at room temperature, the sample was loaded in a 5 cm long column ( $\emptyset$  of 50 mm) packed with the boron-specific resin Amberlite IRA743 (Kiss 1988). Before use, the Amberlite resin was crushed (mesh 400) cleaned with gravimetrically concentrated  $HNO_3$  and buffered at pH 8. This ion exchange resin was used to retain  $B(OH)_4^-$ . The glutamine functional group of the Amberlite resin (N-Methylglucamine) forms a stable complex with  $B(OH)_4^-$  thereby retaining these ions. The resin was then rinsed to remove  $Ca^{2+}$  and all other ions. Boron elution was then

performed 4 times with 250  $\mu\text{L}$  of 0.48M  $\text{HNO}_3$  solution (pH 2) for 1 hour each to recover 100% B for further isotope analyses.

### 3.3 RESULTS

#### 3.3.1 Protocols development

##### 3.3.1.1 Blanks

Because of low B content of coccolithophorid calcite, coccolith isolation and B extraction from coccolith calcite require ultraclean conditions and rigorous blank controls. To avoid contamination sources, ultrapure reagents and cleaned PFA bottles were used. We rinsed samples 3 times with MQ-water to reduce contamination levels. At each step of the analytical protocol, control analyses were performed to evaluate B levels. The results of these tests on reagents and consumables are provided in Table 3.2. Blank levels were also estimated for the coccolith isolation protocol. Control analyses all resulted in negligible amounts of boron (< 1ng) and consequently sufficiently low to allow for accurate boron isotope measurements (Table 3.2).

TABLE 3.2 – Blank levels determined in solutions, consumables and analytical protocols

		B	$\pm$	$3\sigma$	n
		in ng			
Reagent	Alkaline solution	0.026	$\pm$	0.001	14
	Milli-Q water	0.057	$\pm$	0.108	14
	Nitric acid at 2%	0.03	$\pm$	0.03	16
	Buffered Milli-Q	0.018	$\pm$	0.018	12
Consumables	$\mu$ tubes	0.16	$\pm$	0.057	16
	tubes	0.041	$\pm$	0.016	5
Protocol blanks	Coccolith isolation	0.265	$\pm$	0.467	32
	B measurements	0.003	$\pm$	0.03	32
	Amberlite resin	0.001	$\pm$	0.007	12

##### 3.3.1.2 Removal of organic matter

The removal of organic matter without altering the calcite is a delicate procedure. Boron concentrations of a 98% calcium carbonate powder (Acros Organics) before and after the alkaline treatment indicated 27% (n =10) loss of B during this step (Table 3.3). To check for removal of organic matter and potential contaminations due to the alkaline treatment, Mg/Ca, P/Ca and

Fe/Ca ratios were calculated. Indeed, Mg in organic molecules can be 400 times higher in cells than in calcite (Blanco-Ameijeiras et al. 2012). The P/Ca ratio was selected because phosphorus (P) is an essential component of cell metabolism (nucleotides) and of the cell membrane. Fe/Ca is indicative of Fe-oxides bound to organic molecules. Table 3.4 gives the results of these measurements for the culture experiments with and without treatment. Based on these ratios we estimated a mean 94% removal of organic matter with the protocol applied here.

TABLE 3.3 – Effect of alkaline treatment on boron concentration with the cleaning coccoliths procedure

	[B]	±	3 $\sigma$	n
CaCO <sub>3</sub> powder	ppb		ppb	
Before Alkaline Treatment	3.42	±	3.16	10
After Alkaline Treatment.	2.5	±	0.53	7
B loss	27%			

TABLE 3.4 – Elemental ratios (Mg/Ca, P/Ca, Fe/Ca) measured in coccolithophore samples before and after alkaline treatment following our protocol and the estimation of recovery (%)

	Non-treated samples	Clean samples	% of removal
Mg/Ca (mmol/mol)	440 ± 95	15.37 ± 9,63	97%
P/Ca (mmol/mol)	19 ± 33	1.77 ± 0,82	91%
Fe/Ca (mmol/mol)	237 ± 236	14.18 ± 8,92	94%

### 3.3.1.3 Boron extraction

Extraction yields of B were calculated to evaluate the efficiency of the Amberlite resin (Table 3.5). B concentrations were analyzed by ICP-QMS before and after extraction. To ensure that B is fully retained and that there is no fractionation during this analytical step, yields should be comprised between 97% and 102% (Sutton et al. 2017). The solution containing the sample was checked after loading. B concentration was approximately  $0.04 \pm 0.09$  ppb ( $2\sigma$ ). Similarly, the solution used for resin rinsing at pH 8 was also analyzed after rinsing to check for the presence of B ( $0.07 \pm 0.1$  ppb,  $2\sigma$ ). These control tests confirmed that all B was loaded and retained on the resin and that Ca was completely removed. All boron analyses here indicate that the level of B contamination is low and does not affect precise  $\delta^{11}\text{B}$  analyses. As can be seen from Table 3.2, B contamination remains low enough. Our results also show that the developed cleaning procedure is efficient with a good recovery of boron and blank contribution is sufficiently low to perform boron isotope analyses (Table 3.5).

TABLE 3.5 – B/Ca and  $\delta^{11}\text{B}$  values measured in corals, foraminifera and coccolithophores

Sample	Mineralogy	B/Ca in $\mu\text{mol/mol}$	$\delta^{11}\text{B}$ ‰	References
Porite Coral	NEP-1	56 - 61.10 <sup>3</sup>	24.04 - 25.55	this study
Seawater	Argenton		38.10 - 40.59	this study
Coccolithophore	calcite	15.97 - 18.61	15.89 - 17.53	this study
Coccolithophore	calcite	5 - 56	/	Stoll et al. (2012)
Coccolithophore	calcite	3.7 - 28.0		Fernandez et al. (2015)
Modern Coral	Aragonite		23.0 - 24.7	Hemming et Hanson (1992)
Modern Coral	Aragonite	/	18.52 - 23.96	Holcomb et al. (2015)
Modern Coral	Aragonite		21.1 - 24.9	Hönisch et al. (2004)
Modern Coral	Aragonite		23.2 - 28.7	McCulloch et al. (2012)
Modern Coral	Aragonite	/	31.1 - 35.7	Rollion-Bard et al. (2011)
Modern Coral	Aragonite	/	18.6 - 30.6	Rollion-Bard et al. (2011)
Ancient Coral	Aragonite	[350 - 600]	23.6 - 27.1	Douville et al. (2010)
Benthic Foraminifera	Calcite	/	18 - 30.1	Rollion-Bard et Erez (2010)
Planktonic Foraminifera	Calcite	47.6 - 121.6	16.2 - 19.8	Foster (2008)
Planktonic Foraminifera	Calcite	/	20.8 - 23.3	Hönisch et Hemming (2004)
Planktonic Foraminifera	Calcite	/	21.7 - 23.4	Hönisch et al. (2004)
Benthic Foraminifera	Calcite	/	18.0	Kaczmarek et al. (2016)
Seawater	Seawater		39.9 - 40.2	Hemming et Hanson (1992)
Seawater	Seawater		37.7 - 40.4	Foster et al. (2010)
Porites coral	NEP-1		25.34 - 26.56	Sutton et al. (2017)
Porites coral	J Cp-1	465	24.24 - 24.65	Sutton et al. (2017)

### 3.3.2 ICP-QMS and MC-ICP-MS measurements

For each set of ICP-QMS and MC-ICPMS measurements, the same 0.5N HNO<sub>3</sub> or HNO<sub>3</sub>/HF solutions were used for sample dilution, standard preparation, tuning and rinsing. Because memory effects can introduce bias during ICP-QMS and MC-ICPMS analyses of B, these solutions were analyzed 3 times between each sample. ICP-QMS and MC-ICPMS systems were cleaned to reduce potential memory effects and to shorten the return time to the baseline after each analysis (Table 3.1). The 1 ppb multi-element solution was analyzed and NIST SRM 951 was added to the analytical sequence for evaluating drift and memory effects. Mass drift of  $\delta^{11}B$  was thus systematically controlled by standard-sample bracketing (SSB). The internal reproducibility and accuracy of the  $^{11}B/^{10}B$  ratios were calculated from repeated analyses of the NEP and measurements of the Argenton seawater. A mean  $\delta^{11}B$  value of  $39.48 \pm 0.18 \text{ ‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n=12$ ) was measured for Argenton seawater. Such value matches well the accepted oceanic value of  $39.61 \text{ ‰}$  (Foster et al. 2010). We used our seawater value for pH calculations (eq. (6)), a corresponding value of NEP ( $24.66 \pm 0.25 \text{ ‰}$ ,  $2\sigma$ ,  $n = 12$ ) was close to value from McCulloch et al. (2014) ( $25.96 \pm 0.30 \text{ ‰}$ ). All samples were measured at a precision of 96% of boron ( $n=36$ ) by ICP-QMS (ThermoFisher X-series).

### 3.3.3 Results of $\delta^{11}B$ in calcite

The  $\delta^{11}B_{\text{calcite}}$  data obtained from the coccolith calcite produced by *E. huxleyi* strain RCC-P41 in diluted batch cultures grown at pH 8.1 ( $T=18^\circ\text{C}$ ,  $S=32.6$ ) are shown in figure 2a. Values range from  $15.89 \text{ ‰}$  to  $17.53 \text{ ‰}$  with a mean value of  $16.73 \pm 1.20 \text{ ‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n=6$ ) (figure 3.10a). The  $\delta^{11}B_{\text{sw}}$  values of Argenton seawater used for the culture experiments measured with the same analytical method as for calcite are also reported in figure 3.10 2a. The mean  $\delta^{11}B_{\text{sw}} = 39.48 \pm 0.18 \text{ ‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n=12$ ) is comparable to the value published by Spivack et Edmond (1987) ( $39.7 \pm 0.6 \text{ ‰}$ ) and that recently compiled for the global ocean by (Foster et al. 2010) ( $39.61 \pm 0.04 \text{ ‰}$ ) (figure 3.9), attesting the reliability of the analytical measurements of  $\delta^{11}B$ . The average theoretical value of borate ion isotopic composition of Argenton seawater calculated from  $\delta^{11}B_{\text{sw}}$  at pH 8.1 is  $17.43 \pm 2.07 \text{ ‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n=12$ ,  $S = 32.6$  at  $18^\circ\text{C}$ ). The  $\delta^{11}B_{\text{sw}}$  was also measured at the end of each culture experiment. The mean value,  $39.97 \text{ ‰} \pm 0.78 \text{ ‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n=6$ ), which converts into a theoretical  $\delta^{11}B_{\text{borate}}$  of  $17.91 \pm 0.23 \text{ ‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n=6$ ) is indistinguishable from the initial value within measurement uncertainty.

## 3.4 DISCUSSION

### 3.4.1 $\delta^{11}B$ in coccolith calcite

Our  $\delta^{11}B_{\text{calcite}}$  values are thus lighter than expected from the Argenton seawater borate by  $0.66 \text{ ‰}$ , a difference that translate to about 0.05 pH unit. figure 3.10a. also shows the  $\delta^{11}B_{\text{borate}} - \text{pH}$  curves obtained using equation (6) for five published  $\alpha$  values derived from either empirical

methods or ab initio calculations (at  $T=25^{\circ}\text{C}$  and  $S=35$ ) (Klochko et al. 2006, Kakihana et al. 1977, Byrne et al. 2006, Palmer et al. 1987, Nir et al. 2015). Overall, these findings suggest the predominant incorporation of  $\text{B}(\text{OH})_4^-$  into coccolith calcite with a minor or non-existent contribution of  $\text{B}(\text{OH})_3$  in agreement with the model proposed by (Hemming et Hanson 1992) with the  $\alpha$  value of (Klochko et al. 2006). According to this model, only the charged species  $\text{B}(\text{OH})_4^-$  is incorporated into the calcite lattice through attraction at the crystal surface. Reoordination of boron from tetrahedral to trigonal may eventually take place, but with no fractionation (Noireaux et al. 2015, Foster et Rae 2016). For comparison with the  $\delta^{11}\text{B}$  values reported in other marine biogenic carbonates, figure 3.10a and b plot our  $\delta^{11}\text{B}_{\text{calcite}}$  data with values obtained from corals (*Acropora sp.*, *Porites sp.*), two foraminifera species (*Globigerinoides ruber* and *Globigerinoides sacculifer*) and inorganically-precipitated calcite at a pH close to 8.1 (from Dissard et al. (2012), Henehan et al. (2013), Sanyal et al. (2000), respectively). Corals and some foraminifera exhibit higher  $\delta^{11}\text{B}$  values than coccolithophores at similar pH conditions. It has been hypothesized that substantial offsets to heavier (higher) values result from either pH elevation at the site of calcification or symbiont activity changing the pH in the microenvironment above ambient seawater by these organisms to help carbonate precipitation (Sanyal et al. 2001, Hönisch et al. 2004, Henehan et al. 2013). Note that the  $\delta^{11}\text{B}$  of non-symbiotic foraminifera and the symbiotic benthic *Amphistegina lessonii* (Kaczmarek et al. 2016) reveal a similar offset to that of *E. huxleyi* (lighter values) (Foster 2008, Rae et al. 2011, Martínez-Botí et al. 2015). While the relatively light  $\delta^{11}\text{B}$  of benthic foraminifera was attributed to their habitat or their low photosynthesis to calcification ratio, the boron isotopic composition of RCC-P41 coccoliths (figure 3.10) might point to an intra coccolith vesicle pH equal to or even lower than that of normal surface seawater. The  $\delta^{11}\text{B}$  of NZEH (Henehan 2015) seems to be higher (heavier) and thus might indicate an elevated coccolith vesicle pH. This conclusion can be drawn from either nutrient limited cells or nutrient replete cells grown at pH 7.65. Both options are open to misinterpretation. Unfortunately, (Henehan 2015) does not report  $\delta^{11}\text{B}$  of nutrient replete cells at pH 8.1. This poses two important questions : 1) Is the coccolith  $\delta^{11}\text{B}$  at a given seawater pH strain-specific in *E. huxleyi*? 2) Is the coccolith  $\delta^{11}\text{B}$  in nutrient replete cells pH dependent? These questions cannot be answered in the framework of this study but we are currently performing experiments which will shed light on them.

### 3.4.2 B/Ca ratio in coccolith calcite

B/Ca ratio values were measured in the same samples. B/Ca ratio values for *E. huxleyi* RCC-P41 strain ranged from 15.97 to 18.61  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  (mean value =  $17.50 \pm 2.75 \mu\text{mol}/\text{mol}$ ,  $2\sigma$ ) (figure 3.11a). There is considerable scatter when these values are plotted together with B/Ca ratio values published for different strains/species of coccolithophores (Henehan 2015, Stoll et al. 2012) at pH values close to 8.1 (figure 3.11a). B/Ca ratios range from 2 to 45  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  which suggests strain dependency. The scatter in coccolithophore B/Ca is comparable to that in foraminifera (fi-

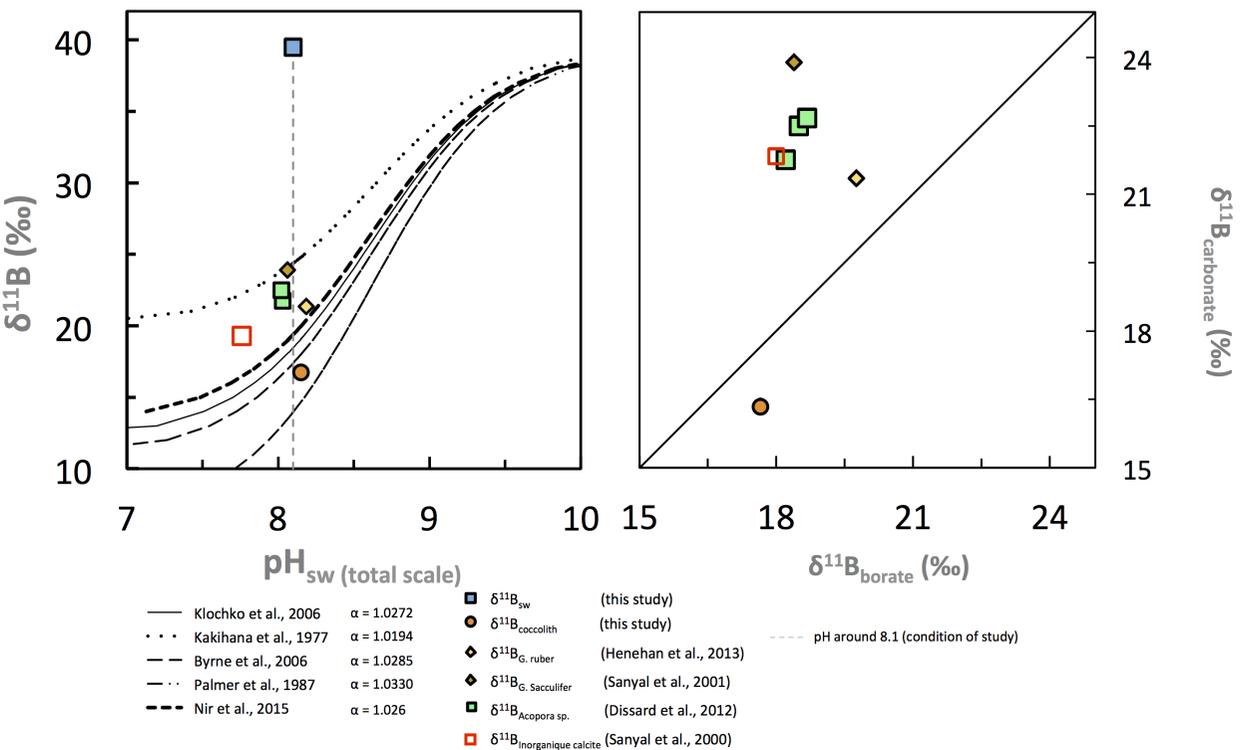


FIGURE 3.10 – (a) The lines indicate the theoretical  $\delta^{11}\text{B}$  values of borate in seawater with different values of  $\alpha$  (from the equation (6)). Also showing the  $\delta^{11}\text{B}$  measured in the coccolith calcite of *E. huxleyi* RCC-P41 at pH 8.1 (orange circles) and in the Argenton sea water (blue square) used as a medium for the cultures and data set at around same pH of foraminifera (*G. ruber*, Henehan et al. (2013) and *G. sacculifer*, Sanyal et al. (2001)) of coral (*Acropora* sp., Dissard et al. (2012) and inorganic calcite Sanyal et al. (2000) (b)  $\delta^{11}\text{B}_{\text{calcite}} - \delta^{11}\text{B}_{\text{borate}}$  for RCC-P41, foraminifera (*G. ruber* and *G. sacculifer*), coral (*Acropora* sp.) and inorganic calcite black line is 1 : 1  $\delta^{11}\text{B}_{\text{calcite}} - \delta^{11}\text{B}_{\text{borate}}$  relationship.

figures 3.11 a and b). B/Ca ratios in coccolithophore and foraminiferal calcite have been proposed as a potential proxy for seawater  $[\text{CO}_3^{2-}]$  (Stoll et al. 2012, Rae et al. 2011, Yu et Elderfield 2007). However, a correlation of B/Ca with  $[\text{CO}_3^{2-}]$  does not reflect a causal relationship but rests on the accidental correlation of  $[\text{CO}_3^{2-}]$  with  $[\text{B}(\text{OH})_4^-/\text{HCO}_3^-]$  (Kaczmarek et al. 2016). In coccolithophores the coccolith vesicle fluid  $[\text{B}(\text{OH})_4^-/\text{HCO}_3^-]$  determines the coccolith B/Ca (Stoll et al. 2012). This means that the coccolith B/Ca is influenced by both the coccolith vesicle pH and the coccolith vesicle DIC. Both parameters might change with seawater carbonate chemistry (Stoll et al. 2012). The data of Henehan (2015) suggest a complex relationship of B/Ca with seawater carbon chemistry depending on macro nutrient availability. Disregarding nutrient limitation, cells under nutrient replete conditions show a decrease in B/Ca with increasing seawater pH. Assuming that coccolithophores do not decrease coccolith vesicle pH with increasing seawater pH (Suffrian et al. 2011), that observation could point to an increasing coccolith vesicle DIC. This conclusion however is counterintuitive given that reduced  $\text{CO}_2$  availability under elevated seawater pH is more likely to lead to lowered coccolith vesicle DIC. Since the data of Henehan (2015) represent only two different seawater pH values and one single *E. huxleyi* strain, there is the obvious need for more data relating B/Ca to seawater carbon chemistry. Especially in combination with  $\delta^{11}\text{B}$ , the boron system has the potential to provide important new insights into coccolith vesicle carbon chemistry regulation under acidification scenarios. We are currently performing carbon chemistry manipulation experiments using two different *E. huxleyi* strains and will measure both B/Ca and  $\delta^{11}\text{B}$ . The new data will answer some important questions posed by this study and by the seminal studies of Stoll et al. (2012) and Henehan (2015).

### 3.5 CONCLUSION

This study reports one of the first  $\delta^{11}\text{B}$  measurements in biogenic calcite produced by coccolithophores. The analytical procedure was based on existing protocols used to measure  $\delta^{11}\text{B}$  in foraminiferal calcite and adapted to the extremely low B levels (<50 ppm). Our results suggest that  $\text{B}(\text{OH})_4^-$  is the major B species incorporated into the calcite lattice of coccoliths. Comparison of our data with theoretically seawater  $\delta^{11}\text{B}_{\text{borate}}$  indicates a shift to lighter values, which might indicate that coccolithophores do not elevate the pH at the site of calcification. The B/Ca ratios are within the range of those reported in coccolithophores and other marine calcifiers, such as foraminifera and corals. However, there is considerable scatter in B/Ca of one single species, *E. huxleyi*, suggesting that B/Ca is clone dependent. Also the response of the boron system,  $\delta^{11}\text{B}$  and B/Ca, to seawater carbon chemistry changes in coccolithophores is still an open question because very few data are published so far. Our new method for  $\delta^{11}\text{B}$  and B/Ca measurements in coccolith calcite opens up the possibility to analyze the boron system in samples from carbon chemistry

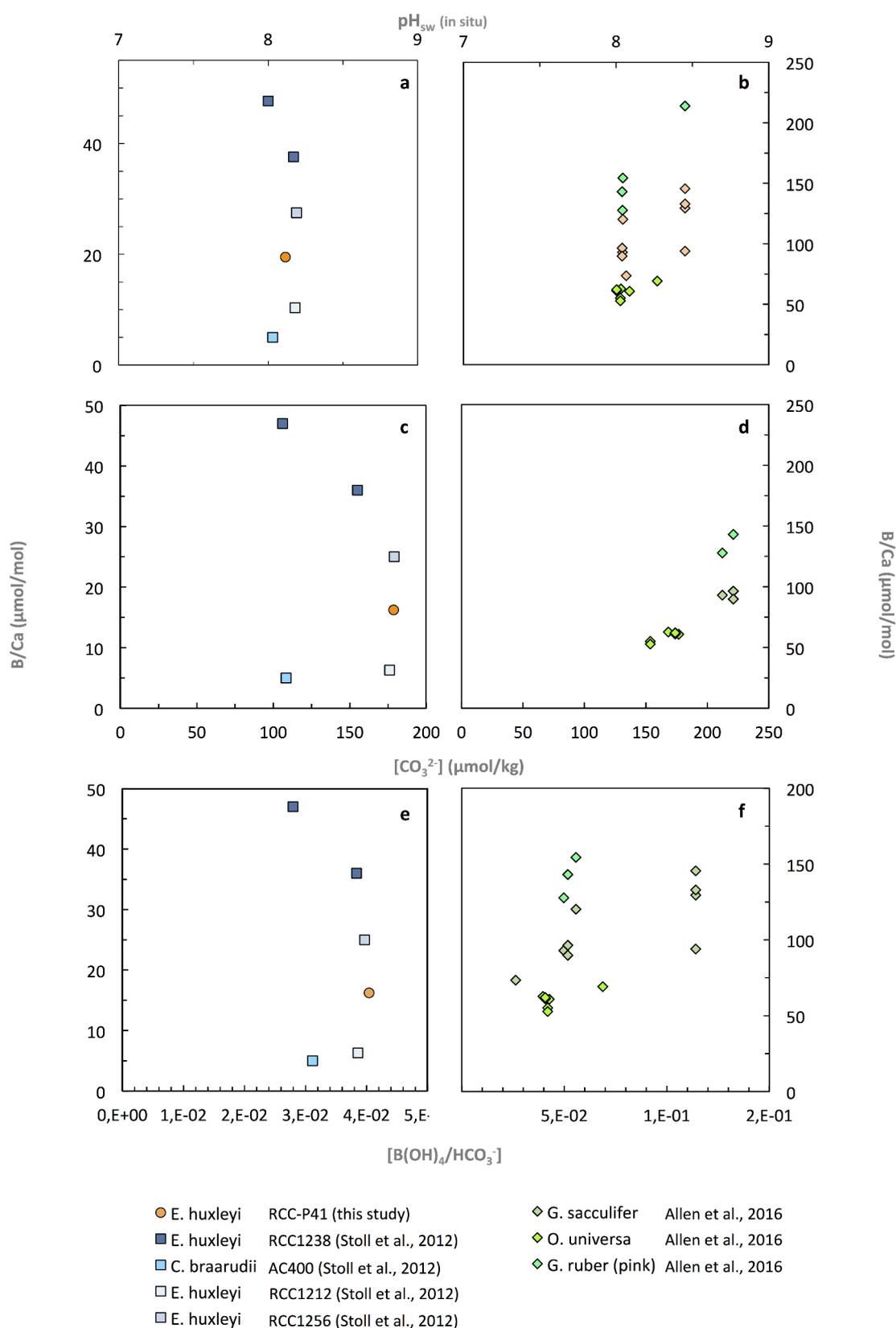


FIGURE 3.11 – Plots showing the B/Ca ratios in coccoliths of *E. huxleyi* P41 (orange symbols) at modern ocean pH value of 8.1 (a). Values of B/Ca measured (a) in coccoliths from Stoll et al. (2012) and (b) in foraminifera from Allen et al. (2016) are also shown. Plots of B/Ca against [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] for coccoliths (c) and foraminifera (d). Plots of B/Ca against [B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] for coccoliths (e) and foraminifera (f).

manipulation experiments. We are currently performing such experiments and will address these questions in the context of cell physiology and paleo-proxy applications.





# IV

**Le bore proxy du pH**



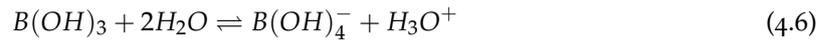
## 4.1 INTRODUCTION

Les coccolithophoridés sont des algues autotrophes calcifiantes. Leurs coccolithes en calcite sont formés à l'intérieur de la cellule dans la vésicule interne, la CV puis excrétés vers l'extérieur pour former la coccosphère (environ 12 à 15 coccolithes par cellule). Tout changement dans la production de calcite en réponse à l'OA aura des conséquences sur le cycle du carbone marin, sur l'export de carbone et infine sur le climat par des mécanismes de rétroactions. Il est donc important d'en comprendre et de quantifier les effets.

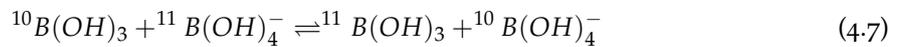
Ce chapitre discute les résultats de B/Ca et de  $\delta^{11}B$  obtenus sur deux souches d'*E.huxleyi*, RCC-P41 et RCC-P4, dans les trois conditions de pH énoncées précédemment (pH 8.6, pH 8.1 et pH 7.6). Ces résultats sont ensuite comparés à ceux obtenus en culture sur les foraminifères et les coraux ainsi qu'aux données préliminaires obtenues dans la calcite des coccolithophoridés.

### Rappels des réactions chimiques impliquant le bore (cf. chap. 1 sect. 4)

La dissociation de l'acide borique dans l'eau est décrite par la réaction à l'équilibre suivante :



où le  $pK_B^*$  est la constante de dissociation de l'acide borique dans l'eau de mer ( $pK_B^* = 8.6$  à  $25^\circ C$  pour une salinité de 35) (Dickson 1990). La distribution des isotopes stables du bore suit l'équation suivante :



Le facteur de fractionnement,  $\alpha$ , permet d'estimer le fractionnement isotopique de ces deux formes chimiques du bore dans l'eau de mer. Il est défini comme suit :

$$\alpha = \frac{(^{11}B/^{10}B)_{boric}}{(^{11}B/^{10}B)_{borate}} \quad (4.8)$$

Hemming et Hanson (1992) ont proposé un modèle d'incorporation du bore dans les carbonates reposant sur l'hypothèse que seuls les ions borates sont incorporés dans la calcite, selon l'équation suivante :



La composition isotopique du bore dans les carbonates et le pH sont donc reliés par la relation suivante : (Zeebe et Wolf-gladrow 2002) :

$$pH = pK_B * -\log[-(\delta^{11}B_{sw} - \delta^{11}B_{ech}) / (\delta^{11}B_{sw} - (\alpha * \delta^{11}B_{ech}) - 1000(\alpha - 1))] \quad (4.10)$$

## 4.2 RÉSULTATS DE $\delta^{11}B$ DE LA CALCITE DES SOUCHES RCC-P41 ET RCC-P4

### 4.2.1 Souche RCC-P41

La figure 4.1 montre les courbes théoriques de l'évolution de la composition isotopique des ions  $B(OH)_4^-$ , noté dans ce qui suit  $\delta^{11}B_{borate}$ , en fonction du pH de l'eau de mer pour plusieurs valeurs du coefficient de fractionnement,  $\alpha$ , déterminées par des méthodes empiriques ou théorique (Klochko et al. 2006, Kakihana et al. 1977, Byrne et al. 2006, Palmer et al. 1987, Nir et al. 2015). Celle proposée par Klochko et al. (2006) est la première mesure directe réalisée dans l'eau de mer et c'est aussi celle qui est utilisée comme valeur de référence par la communauté (Rae 2018). Les valeurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$  mesurées dans la calcite des coccolithophoridés se situent dans l'enveloppe de celles attendues si l'on considère que l'ion borate est la forme prédominante incorporée dans la calcite (environ entre 15 ‰ et 26 ‰ selon Hemming et Hanson (1992)). En effet, les valeurs moyennes mesurées sont  $21.04 \pm 3.78$  ‰;  $16.34 \pm 2.17$  ‰;  $8.76 \pm 0.89$  ‰, pour, respectivement, les valeurs de pH 8.62; 8.13 et 7.61. Les valeurs théoriques correspondantes sont  $24.45 \pm 0.60$  ‰;  $17.80 \pm 0.39$  ‰ et  $14.03 \pm 0.09$  ‰. La valeur moyenne de  $\delta^{11}B$  de l'eau d'Argenton utilisée pour réaliser les cultures,  $\delta^{11}B_{sw} = 39.48 \pm 0.183$  ‰ ( $2\sigma$ ,  $n=12$ ) est également reportée sur le graphique. Cette valeur est comparable mais légèrement inférieure à celle publiée par Spivack et Edmond (1987) ( $39.7 \pm 0.6$  ‰) ou encore à la valeur moyenne calculée pour l'océan global par Foster et al. (2010) ( $39.62 \pm 0.20$  ‰).

### 4.2.2 Souche RCC-P4

La figure 4.2 montre les résultats obtenus pour la souche *E.huxleyi* RCC-P4 ainsi que les courbes théoriques de  $\delta^{11}B_{borate}$  en fonction du pH et la valeur  $\delta^{11}B_{sw}$  de l'eau d'Argenton aux mêmes valeurs de  $\alpha$ . Seules les cultures menées à pH 8.6 et 8.1 ont permis de mesurer les valeurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$ . À pH 7.6, les quantités de bore dans la calcite des coccolithes étaient insuffisantes pour réaliser ces mesures. Les valeurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$  à pH 8.1 sont très inférieures à celles attendues en utilisant la valeur de  $\alpha$  de Klochko et al. (2006). Par contre celles obtenues à pH 8.6 sont plus conformes à la théorie et relativement comparables à celles de la souche RCC-P41 au même pH.

### 4.2.3 Condition de culture

Pour chaque échantillon, les volumes moyens utilisés sont de l'ordre de 5L (à une densité cellulaire d'environ 50,000 cellules/mL). Cependant les quantités de calcite recueillies sont différentes comme le montre les valeurs du tableau 4.1. En effet, pour la souche RCC-P41, les masses de calcite produites diminuent en fonction du pH, entre environ 100 mg à pH 8.6 et 40 mg à pH 7.6, de même pour le contenu en bore de la calcite. Pour, la souche RCC-P4, les quantités de calcite isolées aux différents pH sont nettement plus faibles mais comparable, de l'ordre de 50 mg, pour

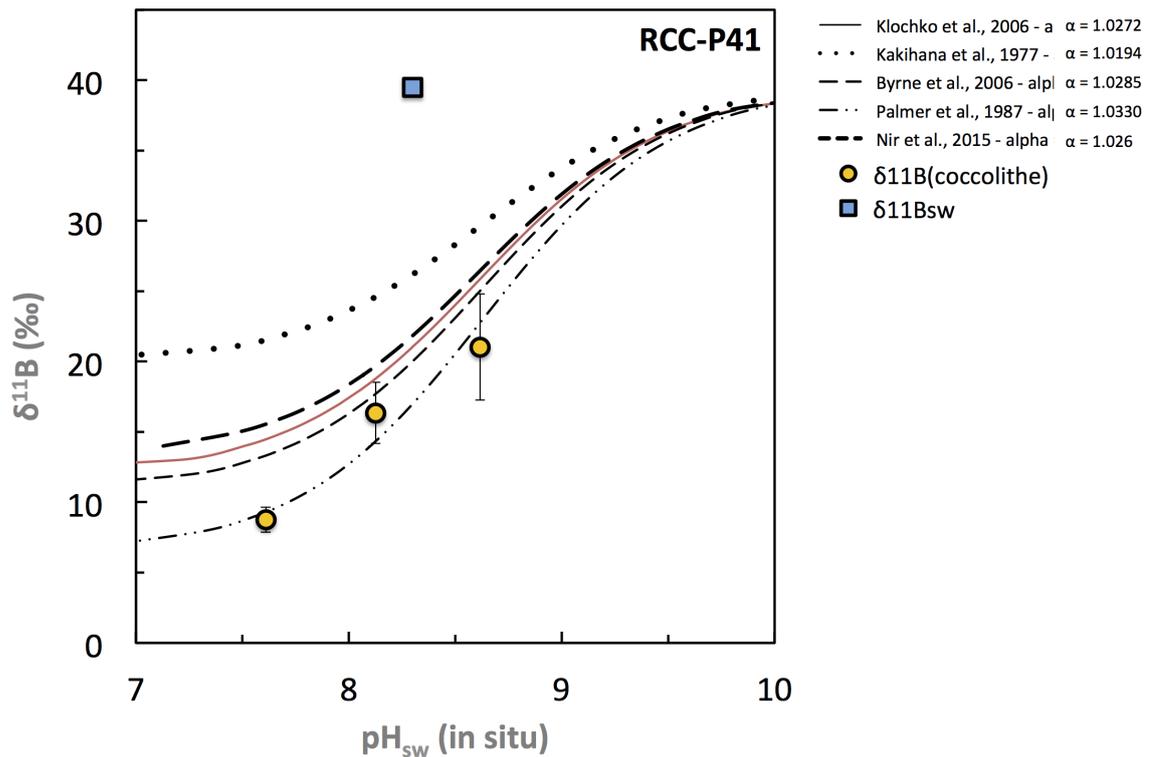


FIGURE 4.1 – Valeurs de  $\delta^{11}B$  mesurées dans la calcite de la souche RCC-P41 (cercles jaunes) et dans l'eau de mer utilisée pour l'expérience (carré). Courbes des valeurs de  $\delta^{11}B_{\text{borate}}$  en fonction du pH pour plusieurs valeurs de  $\alpha$  (Klochko et al. 2006, Kakahana et al. 1977, Byrne et al. 2006, Palmer et al. 1987, Nir et al. 2015).

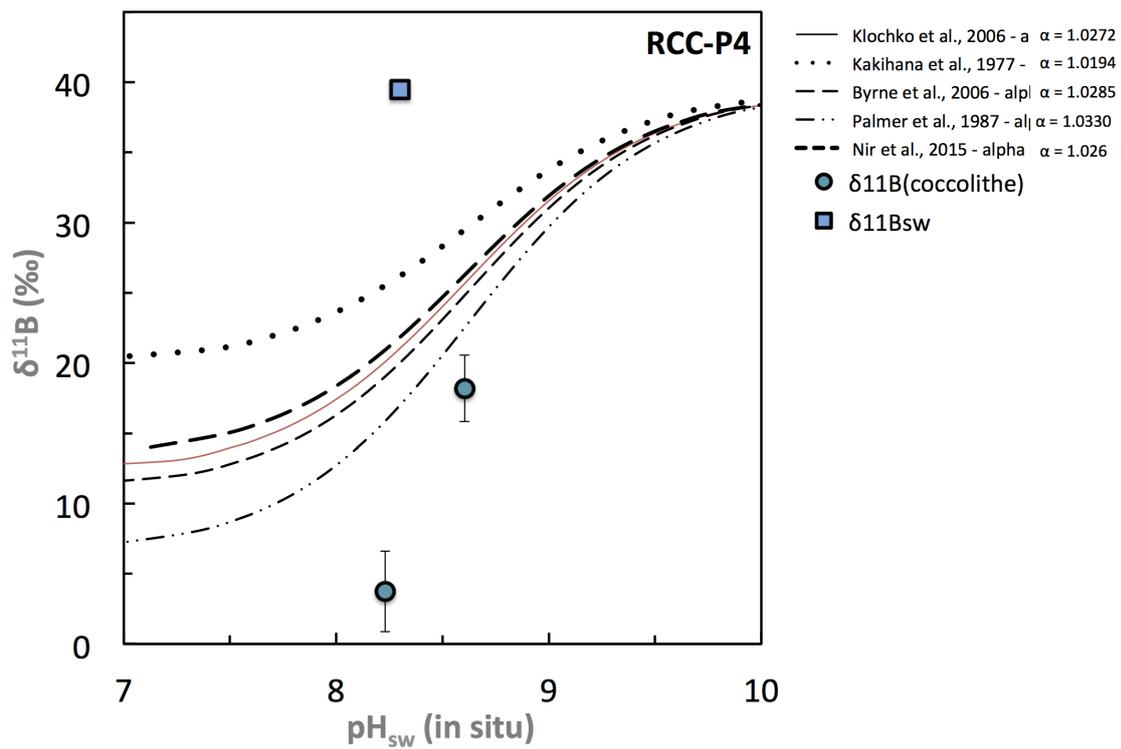


FIGURE 4.2 – Valeurs de  $\delta^{11}\text{B}$  mesurées dans la calcite de la souche RCC-P4 (cercles bleus) et dans l'eau de mer utilisée pour l'expérience (carré). Courbes des valeurs de  $\delta^{11}\text{B}_{\text{borate}}$  en fonction du pH pour plusieurs valeurs de  $\alpha$  (Klochko et al. 2006, Kakihana et al. 1977, Byrne et al. 2006, Palmer et al. 1987, Nir et al. 2015).

les deux valeurs de pH les plus élevées. Cependant la teneur en bore de la calcite semble aussi être plus faible et inférieure à celle observée dans la RCC-P41. Pour les deux souches les concentrations en bore mesurées dans la calcite indiquent donc une décroissance avec le pH. Elles varient en effet de 240 à 14 ppb pour la souche RCC-P41 et 39 à 5 ppb pour la souche RCC-P4, ce qui explique l'absence de mesures fiables pour la souche RCC-P4 à pH 7.6.

TABLE 4.1 – Concentration en bore (mesurée en ICP-QMS) et masse de calcite (pesée en fin d'expérience) pour chaque souche étudiée et pour chaque valeur de pH

Souche	pH	[B]	m(calcite)
		en ppb (mesurée)	en mg (pesée)
P41	8.62	237.80	99.56
P41	8.14	98.17	59.82
P41	7.61	13.50	39.75
P4	8.60	39.00	55.00
P4	8.23	4.67	53.00

#### 4.2.4 Composition isotopique et pH

D'après le modèle de Hemming et Hanson (1992), si l'incorporation du bore dans la calcite des coccolithes implique uniquement les ions borates et que ce processus ne s'accompagne pas d'un fractionnement isotopique, alors les valeurs théoriques de  $\delta^{11}B_{borate}$  doivent être de  $24.45 \pm 0.60\%$ ;  $17.80 \pm 0.39\%$  et  $14.03 \pm 0.09\%$  en allant vers des pH décroissants. La figure 4.3 montre les valeurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$  mesurées pour les souches RCC-P41 et RCC-P4 en fonction des  $\delta^{11}B_{borate}$  théoriques aux différents pH et pour  $\alpha=1.0272$ . Nos résultats suggèrent l'existence d'une relation linéaire entre les valeurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$  et le pH pour la souche RCC-P41. On note de plus que les valeurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$  sont toutes inférieures à ce que prédit le modèle de Hemming et Hanson (1992), et que la différence entre la valeur théorique et celle mesurée est constante et de l'ordre de  $3.25\%$ . Cet écart peut être traduit par l'équation suivante :

$$pH = pK_B * -\log[-(\delta^{11}B_{sw} - (\delta^{11}B_{calcite} - a)) / \delta^{11}B_{sw} - (\alpha * (\delta^{11}B_{calcite} - a)) - 1000(\alpha - 1)] \quad (4.11)$$

où  $a$  est la différence à la valeur théorique de  $\delta^{11}B$ . En effet, les valeurs mesurées de  $\delta^{11}B$  pour les pH 8.6, 8.1 et 7.6 sont plus légères que celles théoriques de  $\delta^{11}B_{borate}$  (respectivement  $24.45\%$ ,  $17.80\%$ ,  $14.03\%$ ) de l'eau de mer d'Argenton. Plus précisément, l'écart entre les valeurs de  $\delta^{11}B$  et de  $\delta^{11}B_{borate}$  varie entre  $5.27\%$  et  $1.07\%$  (moy.  $3.25\%$ ). Cette valeur moyenne peut être rapprochée de la valeur de la constante  $a$  de l'équation. Ce coefficient pourrait refléter l'existence d'effets vitaux, comme par exemple l'intervention de la CV dans le processus de calcification.

L'écart moyen calculé sur l'ensemble de nos mesures de  $\delta^{11}B_{calcite}$  est de 2.13 ‰ donc inférieur à celui calculé entre  $\delta^{11}B_{calcite}$  et  $\delta^{11}B_{borate}$ . Les valeurs mesurées pour la souche RCC-P41 sont donc significativement plus légères que les valeurs théoriques ( $\approx 1.12$  ‰ plus légères).

Si on applique le même raisonnement sur la souche RCC-P4, les valeurs de  $\delta^{11}B_{borate}$  à pH 8.6 et 8.1 sont de  $23.52 \pm 0.35$  ‰ et  $18.31 \pm 1.90$  ‰. [Ces valeurs sont différentes de celles mesurées pour la souche RCC-P41 en raison du fait que l'eau de mer d'Argenton n'a pas été prélevée à la même période, les paramètres du système des carbonates ont changés, influençant la composition isotopique du bore] La figure 4.3, montre des résultats plus contrastés pour la souche RCC-P4. Si les valeurs de  $\delta^{11}B$  à pH 8.6 sont proches des valeurs attendues, celles mesurées à pH 8.1 sont nettement inférieures à ce que prédit le modèle d'incorporation. Elles présentent des écarts respectifs de 5.32 ‰ et 14.57 ‰ (moy. 9.95 ‰) de la composition théorique.

Dans ces conditions, il est difficile de conclure de manière définitive sur l'existence ou non d'une relation entre  $\delta^{11}B$  et le pH pour la souche RCC-P4 compte tenu du nombre limité de points.

La figure 4.3c compare les valeurs mesurées de  $\delta^{11}B_{calcite}$  pour les foraminifères (*G.ruber*, *G.sacculifer*) et les coraux (*Acropora sp.*). Les expériences ont été menées dans les mêmes conditions que les souches de cette étude, c'est à dire en culture. L'ensemble des résultats se situe au dessus de la droite, les valeurs mesurées sont donc plus lourdes que les valeurs mesurées de  $\delta^{11}B_{calcite}$  dans la calcite des coccolithes. Cela suggère que les coraux et certains foraminifères sont capables d'ajuster de manière interne leur pH.

#### 4.2.5 Résultats du ratio B/Ca dans la calcite des coccolithes

L'ensemble des valeurs du rapport B/Ca dans la calcite des coccolithophoridés pour les souches RCC-P41 et RCC-P4 présente les mêmes tendances. Le rapport tend à diminuer avec le pH (figure 4.4). Les graphiques de gauche présentent les valeurs mesurées de B/Ca pour la souche RCC-P41 en fonction du pH (a), du rapport  $B(OH)_4^- / HCO_3^-$  dans l'eau de mer (b) et de la concentration en  $CO_3^{2-}$  dans l'eau de mer (c). Les valeurs des  $HCO_3^-$  et  $CO_3^{2-}$  ont été calculées avec le logiciel *CO2sys* (Lewis et al. (1998)) à partir des valeurs de TA et du pH. Les graphiques de droite présentent les mêmes paramètres pour la souche RCC-P4 (respectivement d,e et f). Les valeurs mesurées à pH 8.6, pour les deux souches sont extrêmement élevées par rapport aux valeurs mesurées aux deux autres pH. Ce résultat suggère une incorporation importante de B sans doute associée à l'augmentation des ions borates à ces valeurs élevées de pH.

### 4.3 DISCUSSION

Selon Hemming et Hanson (1992) les ions borates seraient préférentiellement incorporés dans la calcite. La calcification chez les foraminifères et les coraux se fait par le processus d'endocytose

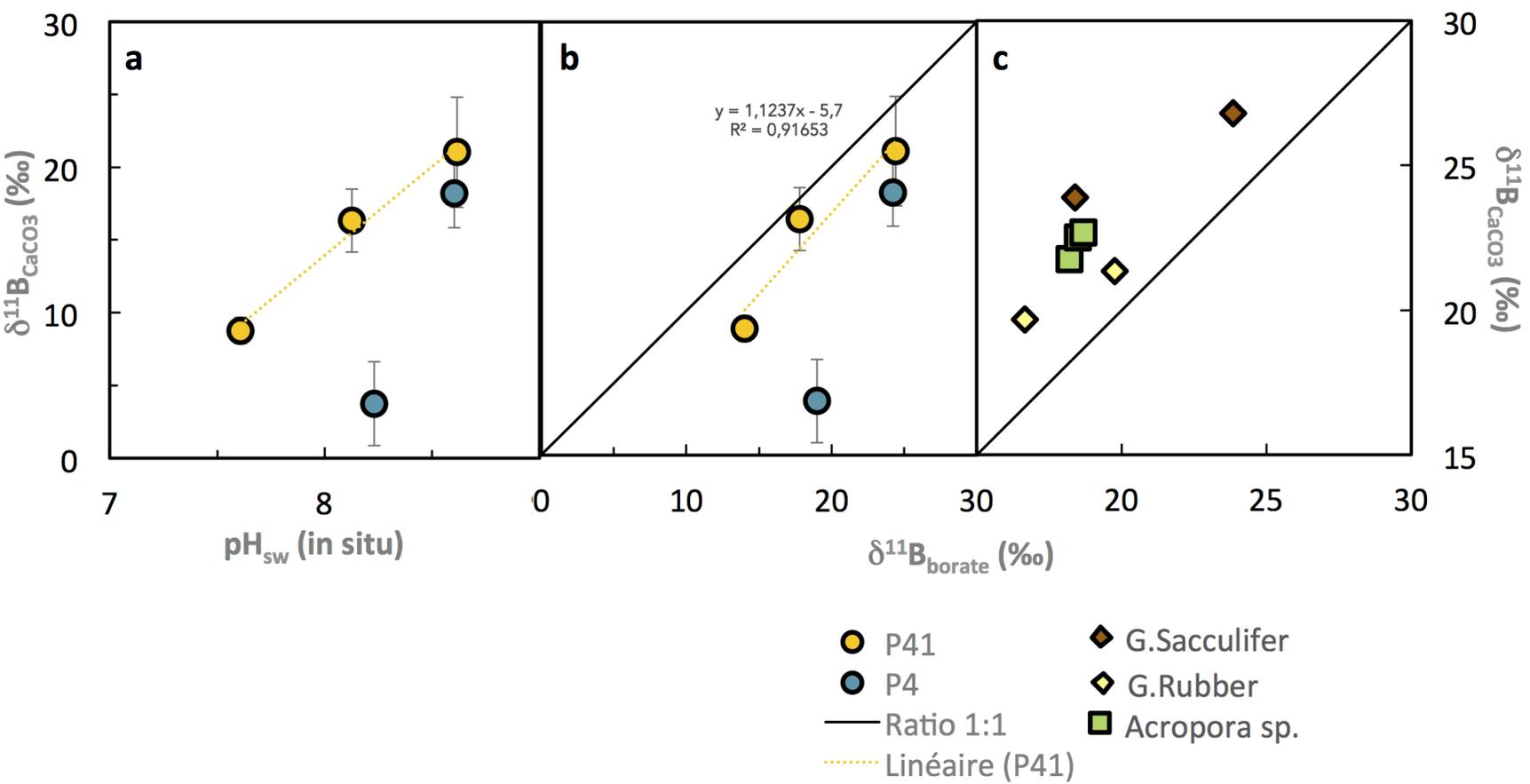


FIGURE 4.3 – (a)  $\delta^{11}\text{B-pH}$  (total scale) et (b)  $\delta^{11}\text{B}_{\text{Carbonate}}-\delta^{11}\text{B}_{\text{borate}}$ ; pour les deux genres les cercles bleus et jaunes correspondent respectivement aux souches de *E.huxleyi* (RCC-P41 et RCC-P4). Les losanges jaunes et marrons correspondent aux foraminifères (*G.ruber*, *G. sacculifer*) (*Henham et al. 2013*, *Sanyal et al. 2001*), les carrés verts correspondent aux coraux (*Acropora sp.*, (*Disard et al. 2012*)) - La droite noire correspond à pour un rapport de 1 : 1.

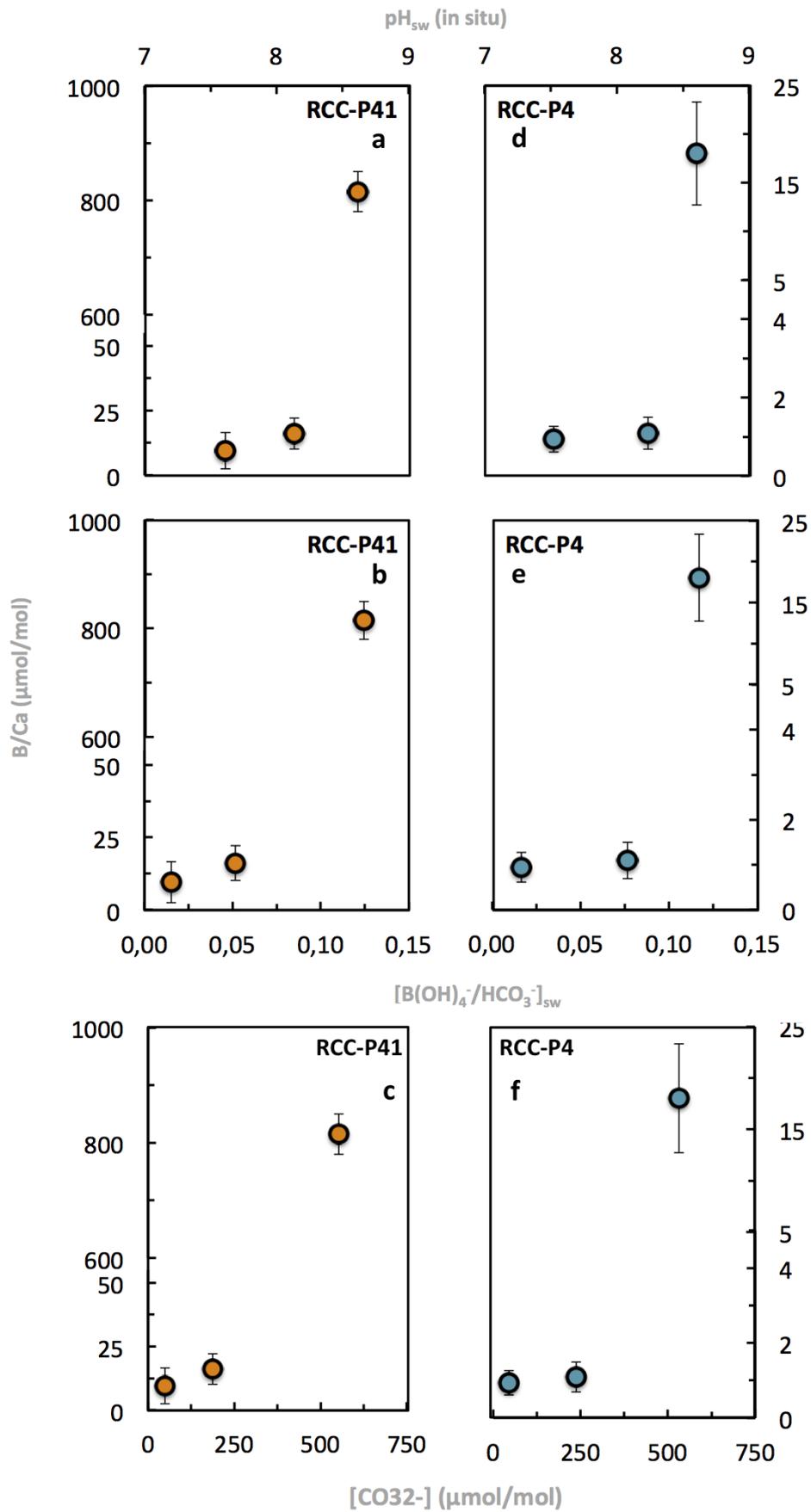


FIGURE 4.4 – Rapport de B/Ca pour les souches RCC-P41 (gauche) et RCC-P4 (droite) - Représentation en fonction du pH (a et d), en fonction de  $[B(OH)_4^-]/[HCO_3^-]_{sw}$  (b et e) et en fonction de  $[CO_3^{2-}]$  (c et f)

du DIC et du  $Ca^{2+}$  (de Nooijer et al. 2009). Dans le cas des coccolithophoridés, le processus est plus complexe. Il fait intervenir des mécanismes intracellulaires (Mackinder et al. 2010). L'utilisation du DIC et du  $Ca^{2+}$  du milieu extracellulaire dans la CV est difficile à appréhender. Des études génomiques ont permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes mis en oeuvre dans la cellule lors de la formation des coccolithes dans la CV (Mackinder et al. 2010). Les ions  $Ca^{2+}$  ainsi que le DIC sous la forme de  $HCO_3^-$  entreraient dans la cellule par diffusion (figure 4.5). La dissociation de  $HCO_3^-$  dans la cellule libère les ions carbonates en produisant des protons  $H^+$ . Les protons libérés au cours de la précipitation réagiraient avec les ions bicarbonates pour former du  $CO_2$  intracellulaire. :



La dissociation de l'acide borique dans la vésicule libère également des protons. Des valeurs de très faibles pH (6.3- 7.6) ont été mesurées à la sonde fluorescente dans le cytosol d'une souche de *C. braarudii*, pour un pH extérieur de l'eau de mer de 8.3 (Anning et al. 1996). Afin de maintenir un environnement favorable à la précipitation de la calcite dans la vésicule, les ions  $H^+$  doivent être extraits du lieu de production de la calcite (figure 4.5). Mackinder et al. (2010) a montré dans une étude récente que le pH de la vésicule est régulée afin de permettre la précipitation des carbonates. Les processus que nous venons de décrire ne sont encore qu'hypothétiques et les connaissances sur le mode de transport du DIC, du  $Ca^{2+}$  et du bore sont encore insuffisantes.

#### 4.3.1 Incorporation de l'acide borique dans la cellule

Le modèle proposé par Stoll et al. (2012) : pour expliquer l'incorporation du bore dans la calcite chez les coccolithophoridés s'appuie essentiellement sur des mesures du rapport de B/Ca réalisées sur plusieurs espèces. Selon ces auteurs, les ions  $HCO_3^-$  sont transportés dans la cellule par diffusion. Les ions  $HCO_3^-$  réagissent avec les ions  $Ca^{2+}$  en précipitant la calcite dans la CV lors de la formation des coccolithes. Toujours selon Stoll et al. (2012) : c'est l'acide borique qui serait transporté vers l'intérieur de la cellule et non les ions borates. L'acide borique se dissocierait ensuite dans la cellule pour donner les ions borates qui seraient ensuite intégrés dans la calcite en se substituant aux ions carbonates (Hemming et Hanson 1992). La concentration en acide borique serait identique dans la CV et dans le cytosol et donc à l'eau de mer. C'est le pH à l'intérieur de la CV qui déterminerait la composition isotopique des ions borates et donc celle de la calcite lors de la formation des coccolithes. Aux faibles valeurs de pH mesurées dans le cytosol (cytosol ou CV), l'acide borique serait présent dans des proportions comprises entre 93% à 97%. La pénétration de l'acide borique dans la CV se ferait aussi par diffusion. A l'intérieur de la vésicule la spéciation du bore se ferait selon les conditions de pH. Du fait des valeurs faibles du coefficient de partage

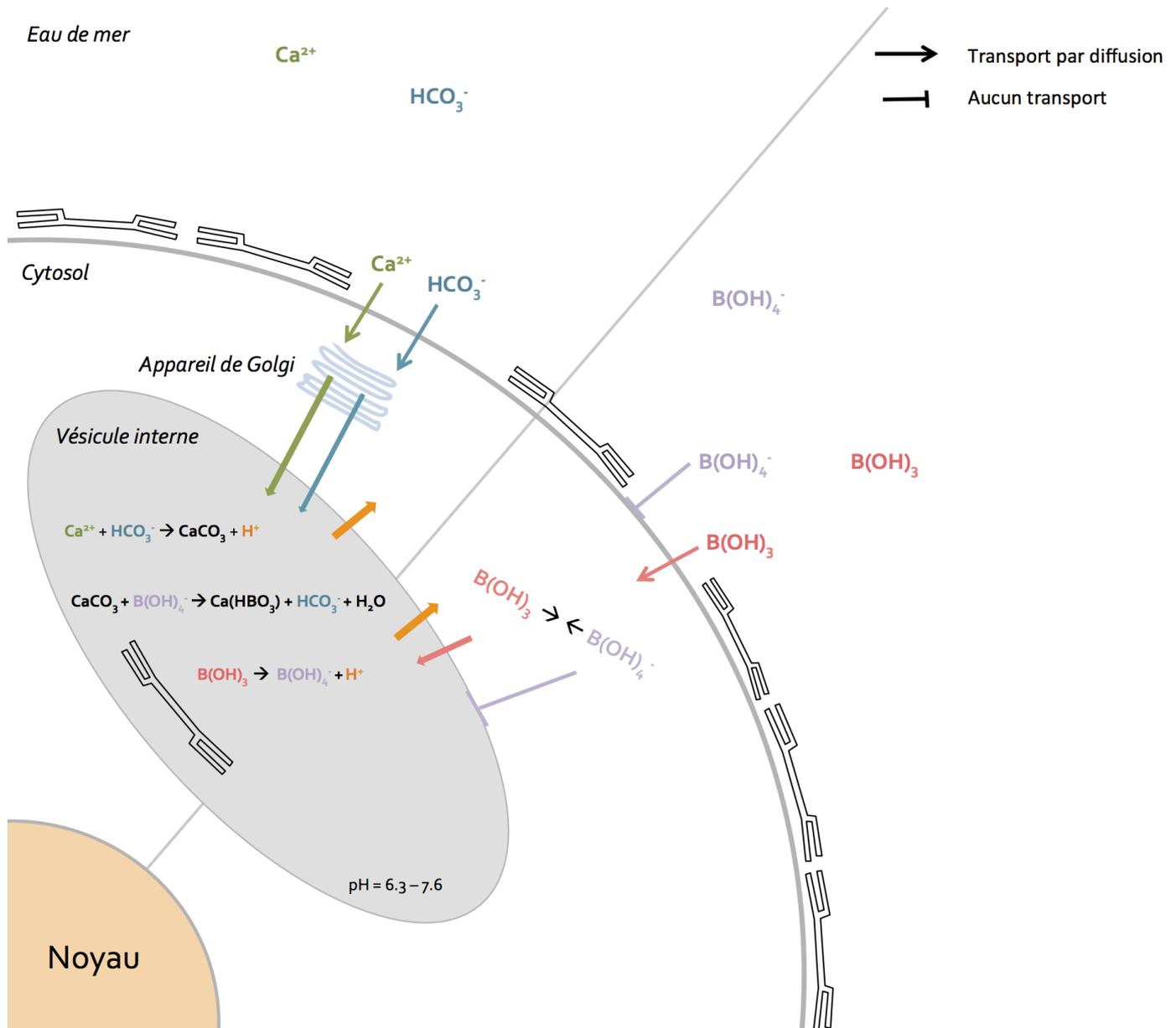


FIGURE 4.5 – Modèles des incorporations du carbone inorganique/calcium et du bore dans la cellule et la vésicule interne. Basée sur l'intégration des ions par diffusion et sur la potentielle recoordination de l'acide borique en ions borate.

de bore dans la calcite, la quantité de bore soustraite lors de la précipitation est infime vis-à-vis du contenu en bore de la vésicule. On peut donc faire l'hypothèse d'un transport à l'équilibre. Le pH de la CV déterminerait donc les quantités de borates et leur composition isotopique. La CV régulerait le pH et notamment vers des pH élevés pour limiter le transport de DIC et de  $Ca^{2+}$ . La CV maintiendrait des valeurs faibles de pH, comme celles mesurées à la sonde en phase de non calcification pour ne pas être en compétition avec la photosynthèse quant à la demande de  $CO_2$ . Les variations de pH de l'eau de mer influeraient cependant sur la régulation notamment dans l'expulsion des protons, comme par exemple en réduisant le gradient de pH extérieur/intérieur de la cellule dans le cas de l'OA. Le mécanisme d'incorporation de la calcite se ferait selon la réaction d'échange suivante :



Cette réaction dépendrait du rapport des concentrations ions borates/ions bicarbonates. Dans le cas de notre étude, on peut à partir des valeurs de  $\delta^{11}B$  calculer la valeur de pH qui serait, selon ce modèle d'incorporation, celle de la CV. Le pH (interne) calculé à partir de  $\delta^{11}B_{calcite}$  est de  $7.88 \pm 0.29$  pour un pH du milieu de culture de 8.1, ce qui est relativement proche de la valeur attendue du pH de l'eau de mer. La plage de variation mesurée du pH interne pour la souche *C. braarudii* est de 6.3 et 7.6. L'écart pour la souche RCC-P41 est donc moins élevé que celui mesuré par Anning et al. (1996). Les processus de régulation du pH interne varient vraisemblablement d'une espèce à l'autre. La souche RCC-P41 a la particularité d'être fortement calcifiante et a potentiellement la capacité à s'adapter aux variations de pH du fait de son origine de l'upwelling péruvien, ce qui peut expliquer les différences observées. Dans un contexte d'acidification, les concentrations en ions bicarbonates et d'acide borique seraient plus élevées dans l'eau de mer. La concentration en bore intégrée dans la cellule devrait alors augmenter (voir les figures 2.2 section 2 et 4.1a section 4 du chapitre 1) et le rapport B/Ca augmenter avec la diminution du pH de l'eau de mer. Or les tendances que nous observons sont contraires. Les deux souches étudiées montrent des valeurs de B/Ca plus faibles à pH faible (table 4.1). La diminution de l'incorporation de bore pourrait traduire une diminution de la calcification peut être du fait de la difficulté de la vésicule à équilibrer le pH interne ou tout simplement une concentration plus faible des ions borates à plus faible pH. Les concentrations extracellulaires, dans l'eau de mer, de  $HCO_3^-$  et de  $B(OH)_4^-$  ne sont pas équivalentes, elles sont respectivement  $2.38.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  et 4,33 ppm (voir chapitre 2). On peut donc supposer que la dissociation des ions bicarbonates contrôle la valeur du pH dans la vésicule.

#### 4.3.2 Comparaison au $\delta^{11}B$ d'hétérotrophes

Plusieurs études ont montré que la composition isotopique de la calcite biogénique ne reflète pas le pH de l'eau de mer mais le pH interne de la cellule ou celui du micro-environnement

créé au cours de la biocalcification (Hemming et Hanson 1992, Vengosh et al. 1991). Dans notre cas, les valeurs légèrement appauvries de  $\delta^{11}B_{calcite}$  par rapport à celles attendues de l'équilibre avec l'eau de mer et de l'incorporation des borates uniquement peut être rapprochées de celles mesurées dans *G. bulloides* (foraminifère phytoplanctonique) (Martínez-Botí et al. 2015). C'est une espèce non-symbionte qui révèle de faibles teneurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$ . Dans ce cas, la calcification fait intervenir la zone appelée Diffusive Boundary Layer (DBL) à faible turbulence où les éléments sont transportés par diffusion. Dans le cas de *G. bulloides*, il est possible que la respiration par la production de  $CO_2$  contribue à l'acidification de l'environnement immédiat du foraminifère et explique les valeurs plus légères de  $\delta^{11}B_{calcite}$ . Dans le cas des souches d'*E. huxleyi* RCC-P41 et RCC-P4, les valeurs isotopiques (figure 4.3b) révèlent, à la différence des foraminifères, un écart constant par rapport aux valeurs théoriques. On peut aussi faire l'hypothèse d'une calcification plutôt en phase nocturne ou la respiration domine dans le cas des coccolithophorides :



Cependant, nous ne disposons pas de données pour étayer cette hypothèse.

### 4.3.3 B/Ca dans la calcite

Grâce à l'utilisation du logiciel  $CO_2sys$  (Lewis et al. 1998), nous pouvons calculer l'état de saturation de la CV du milieu.

Dans tous les cas,  $\Omega$  reste supérieur à 1 garantissant une calcification aux 3 valeurs de pH. Cependant, les valeurs de B/Ca mesurées dans la calcite (figures 4.4 a,b,c et d) sont particulièrement élevées à pH 8.6, tout comme celles du rapport  $[B(OH)_4^- / HCO_3^-]$  et celles des ions carbonates.

A partir des valeurs de B/Ca mesurées dans la calcite des coccolithes et faisant l'hypothèse que le  $\delta^{11}B_{calcite}$  reflète le pH de la CV en utilisant l'équation suivante

$$K_D = \frac{[B/Ca]_{calcite}}{[B(OH)_4^- / HCO_3^-]_{aq}} \quad (4.16)$$

Nous pouvons calculer la concentration de  $B(OH)_4^-$  au sein de la CV. Nous avons ensuite utilisé un coefficient de partition,  $K_D$  de 0.0005 Stoll et al. (2012) pour calculer la concentration en ions bicarbonates, forme majoritaires du DIC dans cette gamme de pH. Le tableau 4.2 fournit les valeurs moyennes de l'ensemble de ces paramètres. Les concentrations calculées de  $HCO_3^-$  sont plus élevées que dans le milieu de culture initial.

L'examen de nos données suggère une régulation possible du pH en réponse aux changements du pH de l'eau des cultures. Compte tenu des valeurs de  $\delta^{11}B_{calcite}$  et de celles du DIC à pH 8.6, les rapports élevés de B/Ca s'expliquent donc par un ajustement du pH de la vésicule.

TABLE 4.2 – Composition hypothétique de la vésicule interne - Lieu de formation des coccolithes

	pH	B/Ca $\mu\text{mol/mol}$ <i>dans la calcite</i>	$\delta^{11}\text{B}$ ‰ <i>de <math>\delta^{11}\text{B}</math></i>	pH	$[\text{B}(\text{OH})_4^-]$ $\mu\text{mol/kg}$ <i>dans l'eau de mer</i>	$[\text{HCO}_3^-]$ $\mu\text{mol/kg}$ <i>du <math>K_D</math></i>	$[\text{HCO}_3^-]$ $\mu\text{mol/kg}$ <i>du milieu de culture</i>
<b>P41</b>	8.62	815.00	21.04	8.30	273.67	136	1487
	0.04	33.94	3.78	0.28	32.08		
	8.13	16.12	16.34	7.88	233.88	1887	1649
	0.04	5.98	2.17	0.29	18.41		
	7.61	11.03	8.76	7.63	169.65	1971	1961
	0.02	2.73	0.89	0.11	7.53		
<b>P4</b>	8.60	18.03	18.19	8.01	198.50	5620	1487
	0.03	5.31	2.36	0.32	166.99		
	8.23	1.08	3.74	8.01	127.08	46751	1649
	0.15	0.32	2.87	0.10	24.36		

#### 4.4 CORRÉLATION ENTRE LES PARAMÈTRES BIOLOGIQUES ET BIOGÉOCHIMIQUES

À partir des résultats présentés en partie 4.2 pour les souches calcifiantes (RCC-P41) et modérément calcifiante (RCC-P4), des corrélations peuvent être établies entre les paramètres biologiques et biogéochimiques. Cependant seules les données de la souche RCC-P41 peuvent être comparées. À partir du modèle défini par Stoll et al. (2012), il est proposé que les ions calcium et bicarbonate sont incorporés dans la cellule par processus de diffusion. Comme détaillé dans la partie 4.3.1, ces ions seraient incorporés dans la CV via l'appareil de Golgi. Dans la CV se déroule alors le processus de calcification. Cela reprend aussi le modèle décrit par Mackinder et al. (2010). Par ailleurs, le modèle défini par Stoll et al. (2012) considère que seul l'acide borique contenu dans l'eau de mer entrerait à l'intérieur de la cellule et de la CV. Cela implique que les concentrations en acide borique à l'extérieur (donc dans l'eau de mer) et à l'intérieur de la cellule sont égales. Tandis que les ions borates seraient, quant à eux bloqués, à chaque passage de membrane (plasmique et CV). La présence d'ions borates dans la cellule existe uniquement par la réaction d'équilibre chimique  $\text{B}(\text{OH})_3/\text{B}(\text{OH})_4^-$ . Nous pouvons donc supposer que la concentration en ions borates dans la cellule et donc dans la CV est différente de la concentration dans l'eau de mer.

En considérant l'équation (4.11), il est possible de calculer le pH qui pourrait être enregistré lors du processus de calcification à partir de la composition isotopique du bore mesuré dans la calcite des coccolithes.

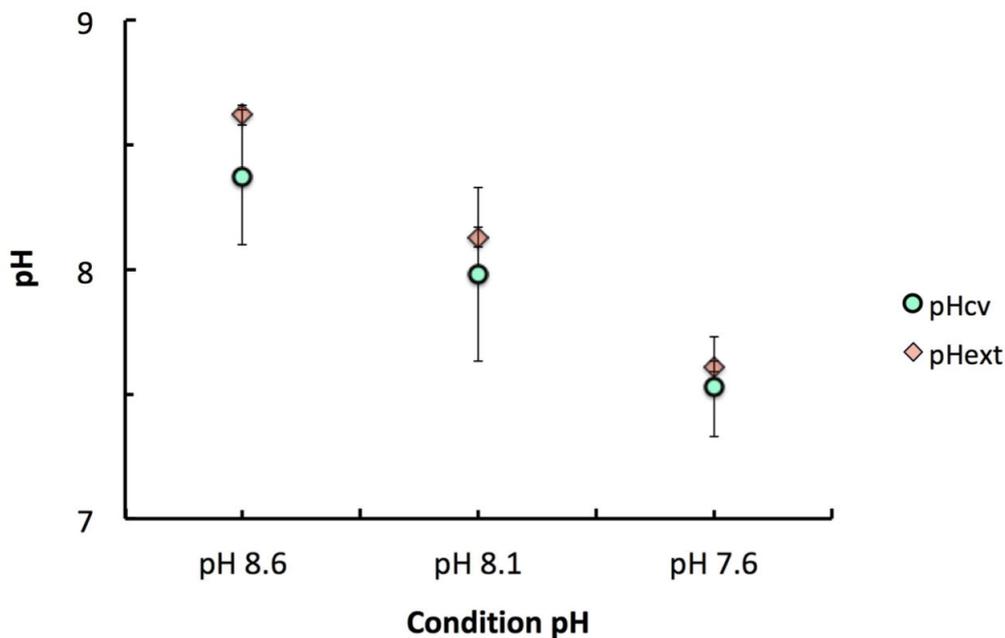


FIGURE 4.6 – Calcul de la valeur du pH à partir de la mesure de la composition isotopique du bore (rond vert) comparé aux valeurs de pH mesurées dans l'eau de mer (losange rouge) pour la souche RCC-P41.

La figure 4.6 montre les valeurs calculées de pH (ronds verts) et celles mesurées dans l'eau de mer (losanges rouges). Ces valeurs sont relativement proches si l'on considère la barre d'erreur des mesures. Cela indique que le pH calculé dans la vésicule, pour la souche calcifiante RCC-P41, évolue de manière parallèle au pH externe (pH de l'eau de mer). Aussi, en considérant la figure 4.3b, les valeurs  $\delta^{11}B_{calcite}$  mesurées dans la calcite des coccolithes sont proches des valeurs théoriques des ions borates. Cela peut donc s'expliquer par le fait que le pH de la CV est proche de celui du pH de l'eau de mer.

En reprenant le modèle de Stoll et al. (2012), si la forme de l'acide borique est uniquement intégrée dans la cellule, les valeurs de compositions isotopiques dans les coccolithes devraient être plus élevées. Cependant les valeurs mesurées sont proches, voir inférieures, aux valeurs des ions borates. Alors le modèle d'incorporation de Stoll et al. (2012) de l'acide borique ne peut alors pas expliquer les résultats obtenus pour la souche RCC-P41, souche calcifiante. Cela signifie alors que la réaction de substitution des carbonates par les ions borates se réalise dans la CV à un pH proche de celui de l'eau de mer. Il semblerait donc que la cellule ne réalise pas d'ajustement du pH.

Une seconde hypothèse pourrait être possible. La réaction d'incorporation du bore, par un mécanisme de substitution, pourrait se dérouler à l'extérieur de la cellule, c'est à dire une fois que le coccolithe est formé et qu'il est expulsé de la cellule pour former la coccosphère. L'ensemble de l'étude ne nous permet cependant pas d'avoir suffisamment d'éléments pour étayer cette seconde hypothèse

### Corrélation avec le pH

L'ensemble des données acquises sur la souche RCC-P41 fournissent un ensemble cohérent lorsque les valeurs de pH de l'eau diminuent. Nous avons mis en évidence une relation linéaire entre le  $\delta^{11}B$  et le pH. Cette relation semble se traduire par des changements morphologiques et une réponse que l'on retrouve dans la production de PIC et POC. Au contraire, la souche issue des eaux de l'océan ouvert semble répondre aux changements de pH, sans que l'on puisse dégager une tendance tant du point de vue de la production de PIC ou POC, que des paramètres biogéochimiques ou morphologiques. De ce constat nous concluons que cette souche de *E. huxleyi* ne semble pas répondre de manière linéaire aux perturbations induites, tout au moins dans les conditions d'acclimatation que nous avons mises en oeuvre.



**V**

**Réponses physiologiques d'*E. huxleyi* aux  
variations de pH**



## 5.1 INTRODUCTION

Les études pionnières de Riebesell et Zondervan (2000), ont montré que les coccolithophoridés diminuent leur taux de calcification quand le pH diminue. Elles ont de plus révélé une malformation des coccolithes et des coccosphères. D'autres études plus récentes (Langer et al. 2009, De Bodt et al. 2010) ont montré que la réponse de ces organismes aux changements de pH variait selon le type de coccolithophoridés et de souches au sein d'une même espèce.

Le but de ce chapitre est de discuter l'évolution des paramètres physiologiques aux différentes conditions de pH choisies. Ce chapitre comporte 5 parties : la *première* est consacrée au suivi de l'acclimatation et de la croissance des deux souches d'*E. huxleyi*, RCC-P41 et RCC-P4. La *seconde* présente les données relatives au système des carbonates en particulier le pH et l'alcalinité totale. La *troisième partie* décrit les quotas de carbone particulaire dans les différentes conditions de cultures. Dans la *quatrième partie*, nous discutons des altérations morphologiques de la cellule et nous terminons par une synthèse de l'ensemble des résultats.

## 5.2 PRÉSENTATION DES RÉSULTATS OBTENUS

Le comptage des cellules au cours des cultures a été réalisé quotidiennement au cytomètre en flux GUAVA (voir figure 2.8 du chapitre 2). Ces comptages ont permis de réaliser un suivi du taux de croissance des cultures au cours de l'expérience (figure 5.1). En moyenne, la durée de l'expérience était de 4 à 8 jours suivant les conditions de pH. Chaque jour, et pour chaque pH, un volume de  $3 \times 200 \mu\text{L}$  a été prélevé dans les cultures. Des mesures en cytométrie de flux ont été réalisées 3 fois sur un même volume de  $200 \mu\text{L}$  et pour chaque valeur de pH.

### 5.2.1 Les taux de croissance

Le taux de croissance ( $\mu$ ) a été calculé aux trois valeurs de pH et pour les deux souches. Le tableau 5.1 donne la moyenne et l'écart type de  $\mu$  pour chaque triplicat des souches étudiées. La figure 5.2b représente les valeurs de  $\mu$  moyen à chaque pH et chacune des souches. Comme les conditions de température, salinité, lumière, cycle jour/nuit et nutriments étaient identiques hormis le pH, les deux jeux de données peuvent être comparés.

La souche d'*E. huxleyi*, RCC-P41, a son taux de croissance ( $\mu$ ) qui augmente en réponse à la diminution du pH. La souche RCC-P4 montre une augmentation entre les pH 8.6 et 8.1 puis une légère diminution entre les pH de 8.1 et 7.6 (figure 5.1 and table 5.2).

### 5.2.2 Chimie des carbonates dans les expériences de cultures d'*E. hux*

Dans le cadre de notre étude conduite en batchs dilués, l'ajustement du pH est réalisé par l'ajout d'un volume d'acide ou de base à 1M. Les valeurs de DIC sont fixées. L'alcalinité totale est

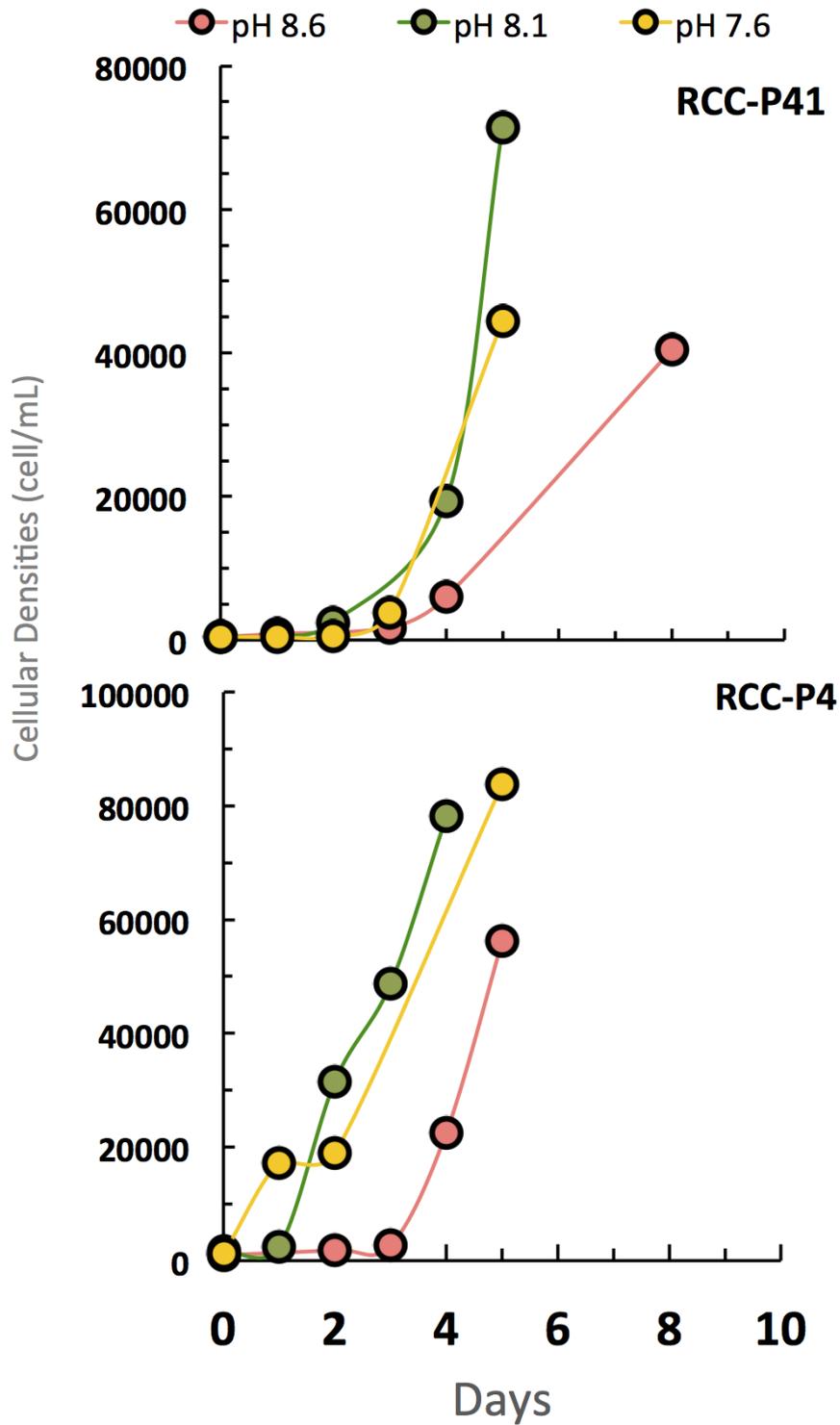


FIGURE 5.1 – Courbes montrant l'évolution de la densité cellulaire en cellules/mL en fonction du temps pour les trois valeurs de pH et les deux souches étudiées RCC-P41 (en haut) et RCC-P4 (en bas).

TABLE 5.1 – Données pour les deux souches d'*E. huxleyi* étudiées, RCC-P41 et RCC-P4. Valeurs moyennes des paramètres du système des carbonates, quotas taux de production de POC et de PIC, et paramètres morphologies des cellules pour chaque condition pH appliqué.

		P41			P4		
		a	b	c	a'	b'	c'
<i>Chime des carbonates</i>							
pH	total	7.61	8.13	8.62	7.51	8.23	8.60
Salinité	psu	32	32	32	32	32	32
TA	[ $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ]	2122	2121	2796	1636	2090	2786
DIC	[ $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ]	2060	1846	2039	1600	1764	2080
$\Delta\text{DIC}$		3%	8%	1%	5%	14%	8%
$\text{CO}_2$	[ $\mu\text{atm}$ ]	1130	314	87	1131	214	93
$\text{HCO}_3^-$	[ $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ]	1957	1649	1487	1520	1539	1567
$\text{CO}_3^{2-}$	[ $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ]	64	188	550	42	218	510
$\Omega_{\text{calcite}}$		2	5	13	1	5	12
<i>Quota et taux</i>							
$\mu$	$j^{-1}$	1.24	1.12	0.84	0.91	1.05	0.34
PIC	pg PIC/cell	13.08	10.54	4.79	8.19	13.18	7.97
	SD	0.11	1.05	1.42	0.44	2.10	0.12
POC	pg POC/cell	11.43	9.08	7.00	11.36	14.06	8.41
	SD	0.18	0.51	0.42	1.30	1.28	0.23
$\tau\text{PIC}$	pg PIC/cell/j	15.80	11.82	4.10	7.65	13.41	2.72
	SD	0.13	1.22	1.15	3.41	5.31	0.04
$\tau\text{POC}$	pg POC/cell/j	13.94	10.23	5.84	10.53	14.70	2.86
	SD	0.24	0.63	0.34	5.58	2.50	0.08
PIC/POC		1.15	1.17	0.72	0.73	0.94	0.95
	SD	0.02	0.07	0.23	0.05	0.16	0.04
<i>Morphologie</i>							
Sphère	$\mu\text{m}$	6.32	5.68	5.52	2.66	4.52	2.28
	SD	0.89	1.08	0.70	0.30	0.46	0.43
	n	223	331	335	379	272	288
Coccolithes	$\mu\text{m}$	1.22	1.64	2.37	1.40	2.43	1.35
	SD	0.13	0.36	0.36	0.16	0.27	0.14
	n	207	313	307	300	200	207

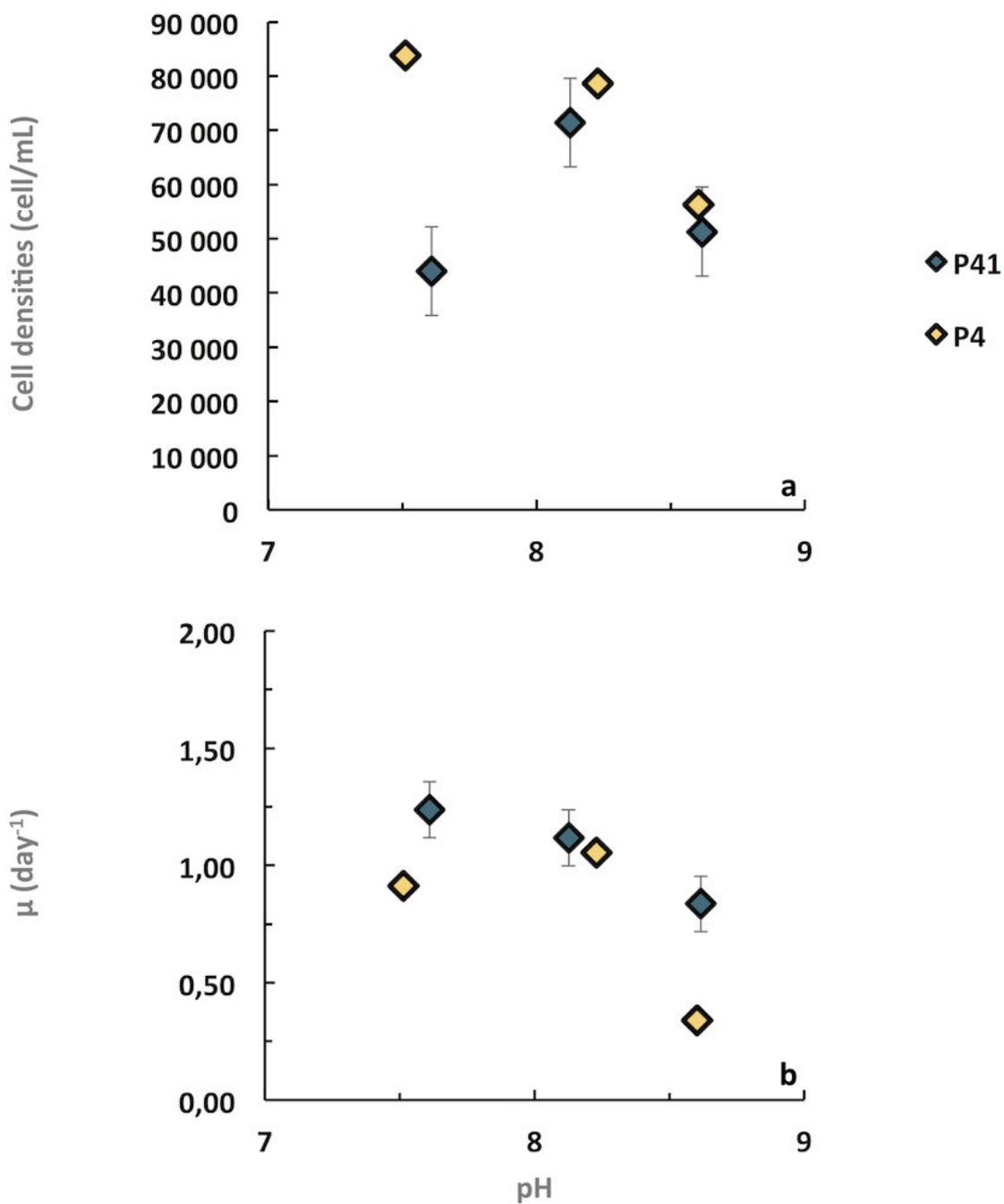


FIGURE 5.2 – Taux de croissance des expériences contrôles en batchs dilués pour les souches RCC-P41 et RCC-P4

le seul paramètre qui varie aux trois conditions de pH (voir figure 5.3). L'ajustement du pH est réalisé bouteille par bouteille. Les bouteilles sont rincées 3 fois à l'eau de mer d'Argenton avant l'ajustement, la valeur du DIC est de 1791  $\mu\text{mol/kg}$  pour la souche RCC-P41 et de 1822  $\mu\text{mol/kg}$  pour la souche RCC-P4. On observe une légère différence de la valeur du DIC de l'ordre de 3 à 10%, après ajustement du pH. Afin de pas modifier les conditions chimiques dans la bouteille, comme détaillé par Shi et al. (2009), les bouteilles de 13.3L sont totalement remplies. L'alcalinité est mesurée en tout début d'expérience (i.e. avant inoculation) et à nouveau en fin de l'expérience. La valeur du DIC ne doit s'écarter de plus 10% de la valeur initiale. Elles sont comprises entre 1% et 16% pour la souche RCC-P41 et entre 4% et 10% pour la souche RCC-P4 (Figure 5.3) Nous avons calculé l'état de saturation en calcium,  $\Omega_{\text{Ca}} = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]/K_{sp}$ , qui est un paramètre important car il indique la capacité des organismes calcifiants à produire leur coquille carbonatée. L'état de saturation  $\Omega_{\text{Ca}}$  diminue avec le pH du milieu. A noter que cet indice est supérieur à 1 pour chaque condition de pH de culture, y compris aux plus faibles valeurs de pH. Cela indique donc que les coccolithophoridés sont en mesure de produire de la calcite au cours de l'expérience. Les tableaux 5.2 et 5.3 regroupent l'ensemble des valeurs des paramètres du système des carbonates pour chaque valeur de pH auxquelles les souches RCC-P41 et RCC-P4 ont été soumises, en début et fin d'expérience. Le calcul  $\Delta\text{DIC}$  (DIC en fin d'expérience - DIC en début d'expérience) et  $\Delta\text{pCO}_2$  ( $\text{CO}_2$  en fin d'expérience -  $\text{CO}_2$  en début d'expérience) permet d'observer les changements qui sont intervenus durant l'expérience. On observe en règle générale qu'au cours de l'expérience le pH des cultures a légèrement augmenté, de même que le  $\Omega$  alors que les valeurs en DIC et  $\text{pCO}_2$  ont diminués. Les souches de coccolithophoridés inoculées dans les bouteilles réalisent deux activités métaboliques : la photosynthèse et la calcification. Lors de ces activités, le carbone inorganique est consommé ce qui engendre une diminution du DIC dans le milieu. Dans le cas de la photosynthèse, le  $\text{CO}_2$  est consommé ce qui tend à augmenter le pH du milieu. À l'inverse, le processus de calcification produit du  $\text{CO}_2$  dans le milieu ce qui a pour effet de faire diminuer le pH. La variation du pH observée reflète donc le bilan de la production de POC et PIC, donc du rapport PIC/POC.

La lecture du tableau 5.3 nous permet de conclure que les variations de DIC ont été faibles dans la majorité des cas. On note cependant quelques cas particuliers, celui d'une faible production de DIC par la souche RCC-P4 à pH 7.6 (4%), une consommation de 16% de DIC par la souche RCC-P41 à pH 7.6 et de 10% par la souche RCC-P4 à pH 8.6. Pour tous les autres cas, les valeurs demeurent inférieures à 5%.

### 5.2.3 Morphologie des cellules

La mesure du diamètre des cellules et de la longueur des coccolithes permet d'évaluer les comportements des deux espèces vis-à-vis des changements de pH et de les conforter aux données géochimiques. Un nombre important de mesures de ces caractéristiques morphologiques des deux

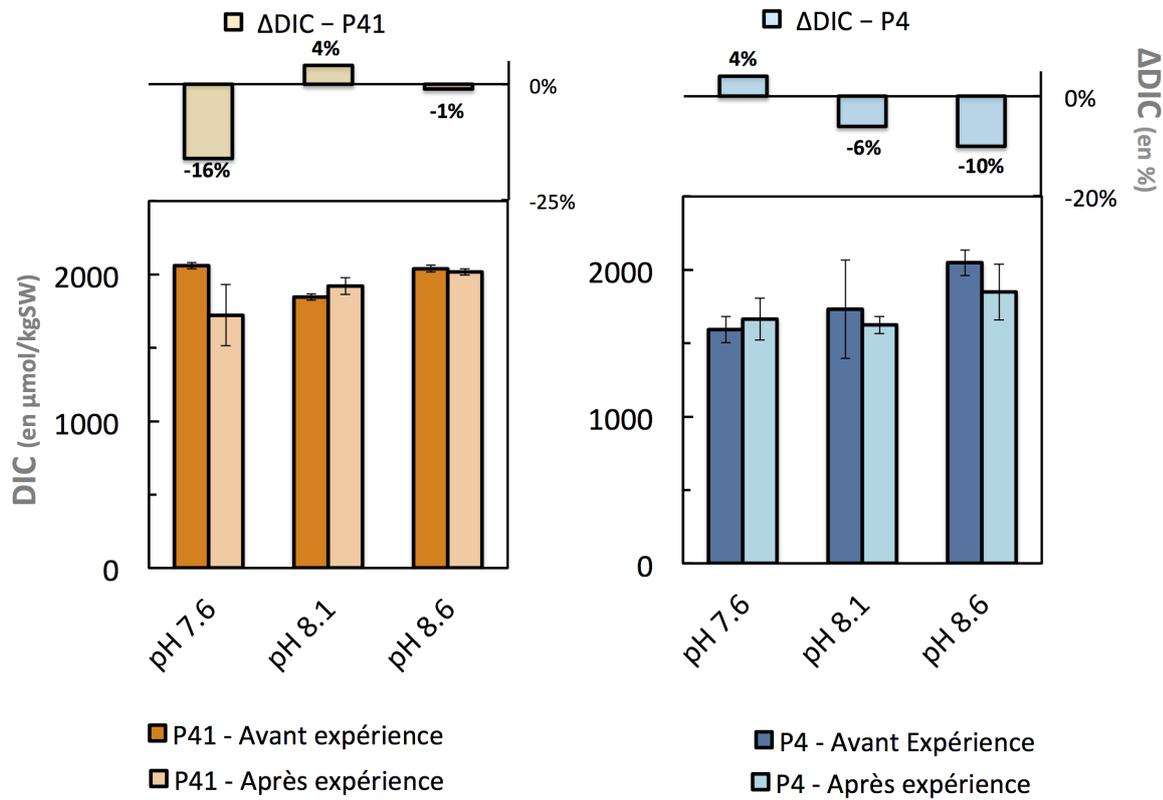


FIGURE 5.3 – Calcul du DIC à partir du logiciel  $\text{CO}_2\text{sys}$  avant et après expérience pour les souches RCC-P41 et RCC-P4. Calcul du  $\Delta\text{DIC}$  en pourcentage pour les deux souches

TABLE 5.2 – Résultats des mesures de DIC après ajustement du pH des cultures et état de saturation en calcium pour les milieux de cultures avant expérience. Les valeurs initiales de DIC étaient de  $1791 \mu\text{mol/kg}$  pour la souche RCC-P41 et de  $1822 \mu\text{mol/kg}$  pour la souche RCC-P4.

Strain	pH	$p\text{CO}_2$	DIC	$\Omega\text{Ca}$
			$\mu\text{mol/kg}\Omega$	
		total	$\mu\text{atm}$	
P41	8.61	87	2039	13.41
	8.10	313	1846	4.57
	7.61	1130	2060	1.56
P4	8.60	90	2049	13.03
	8.23	209	1733	5.77
	7.51	1143	1592	1.11

TABLE 5.3 – Valeurs de DIC et  $\Omega_{Ca}$  pour les milieux de cultures après expériences –  $\Delta pCO_2$  et  $\Delta DIC$  correspondent aux consommations au cours de l'expérience.

<i>Strain</i>	<i>pH</i>	<i>pCO<sub>2</sub></i>	$\Delta pCO_2$	<i>DIC</i>	$\Delta DIC$	$\Omega_{Ca}$ <i>in</i>
	total	$\mu atm$	%	$\mu mol/kgSW$	%	
P41	8.60	90	+3%	2018	-1%	11.92
	8.18	266	-15%	1920	+4%	4.86
	7.66	824	-27%	1723	-16%	1.44
P4	8.71	60	-34%	1848	-10%	13.97
	8.30	166	-21%	1625	-6%	5.92
	7.79	614	-46%	1664	+4%	2.13

souches a été réalisé (n = 100 par bouteille) soit environ 300 mesures pour chaque valeur de pH pour quantifier leur évolution. La troisième partie du tableau 5.1 donne les valeurs moyennes et écart-types du diamètre et de longueur des coccolithes pour chaque valeur de pH. Comme détaillé dans le chapitre 2 – partie 2.9, les mesures ont été réalisées par observation des filtres au MEB, les coccosphères et des coccolithes ont été mesurés et ces informations traitées par le logiciel ImageJ.

### 5.2.3.1 Le diamètre des coccosphères

La mesure du diamètre des coccosphères n'est qu'approximative. En effet, au cours de la filtration les cellules de coccolithophoridés peuvent avoir perdu une partie de leurs coccolithes, en particulier celles de grande taille ce qui a pour effet de réduire la taille réelle des coccosphères. De plus, certaines coccosphères peuvent être constituées de plusieurs couches de coccolithes, ce qui devrait être confirmé par les mesures d'épaisseur de la calcite en cours d'acquisition (CEREGE, L. Beaufort). Cela a pour conséquence une forme de la coccosphère qui n'est pas totalement sphérique et induit de ce fait un biais sur la mesure de son diamètre. Ces données nous donneront cependant une idée des tendances quant aux modifications morphologiques induites par les changements de pH. L'observation des filtres aux différents pH révèlent un certain nombre d'altérations dans l'aspect des cellules. Dans le cas de la souche RCC-P41, la taille de la coccosphère augmente de  $5.52 \pm 0.70 \mu m$  à  $6.32 \pm 0.89 \mu m$  lorsque le pH diminue. Cependant quelque soit la valeur du pH, les coccosphères conservent leur aspect sphérique.

La taille des cellules de la souche RCC-P4 est plus importante à pH 8.1. Celle mesurée aux deux autres pH sont plus faible et du même ordre de grandeur (Figure 5.4). Ces mêmes tendances sont observées pour la taille des coccolithes. L'aspect des cellules montre des coccosphères rondes bien formées à pH 8.6. A pH 8.1, les coccosphères semblent être composées de plus de coccolithes mais gardent cependant leur aspect sphérique. Au pH le plus acide de 7.6, les coccosphères ne

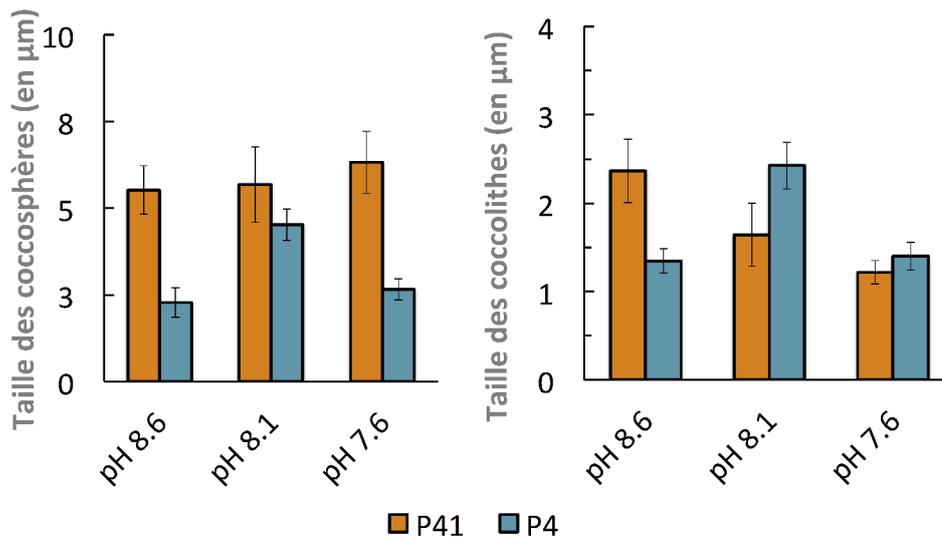


FIGURE 5.4 – Mesures de la taille (en  $\mu\text{m}$ ) des coccosphères et des coccolithes par le logiciel ImageJ pour les deux souches étudiées RCC-P41 et RCC-P4.

sont plus sphériques, il y a en apparence moins de couches de coccolithes, un résultat qui devra être confirmé par les mesures d'épaisseur de la calcite.

La figure 5.5 montre les photographies au MEB de l'aspect général des coccosphères aux différents pH pour les deux souches.

### 5.2.3.2 La taille des coccolithes : DSL

Déterminer la taille des coccolithes revient à mesurer la longueur distale des coccolithes (Distal Shield Length : DSL). Elle représente la plus grande longueur du coccolithe (cf figure 2.7 du chapitre 2).

La souche RCC-P41 voit la taille de ses coccolithes diminuer de  $2.37 \mu\text{m}$  à  $1.22 \mu\text{m}$ , lorsque le pH diminue. Aux pH plus basiques, les coccolithes sont bien formées et sphériques. On distingue bien la zone centrale du coccolithe qui est dentellée. Au pH le plus acide, les coccolithes sont mal formées et la zone centrale est indifférentiable du contour. On observe une accumulation de calcite sur cette zone (figure 5.5).

La souche RCC-P4 révèle les mêmes tendances pour les coccosphères et la taille des coccolithes. A pH 8.1, la cellule forme des coccolithes plus grandes ( $2.43 \mu\text{m}$ ) qu'aux pH 8.6 et 7.6 (resp.  $1.35 \mu\text{m}$  et  $1.40 \mu\text{m}$ ) (Figure 5.4b). Au pH de 8.6, les coccolithes sont complètes mais le contour semble moins épais qu'à pH 8.1. Au pH le plus acide, les coccolithes épaississent et la zone centrale semble être plus creusée (figure 5.5).

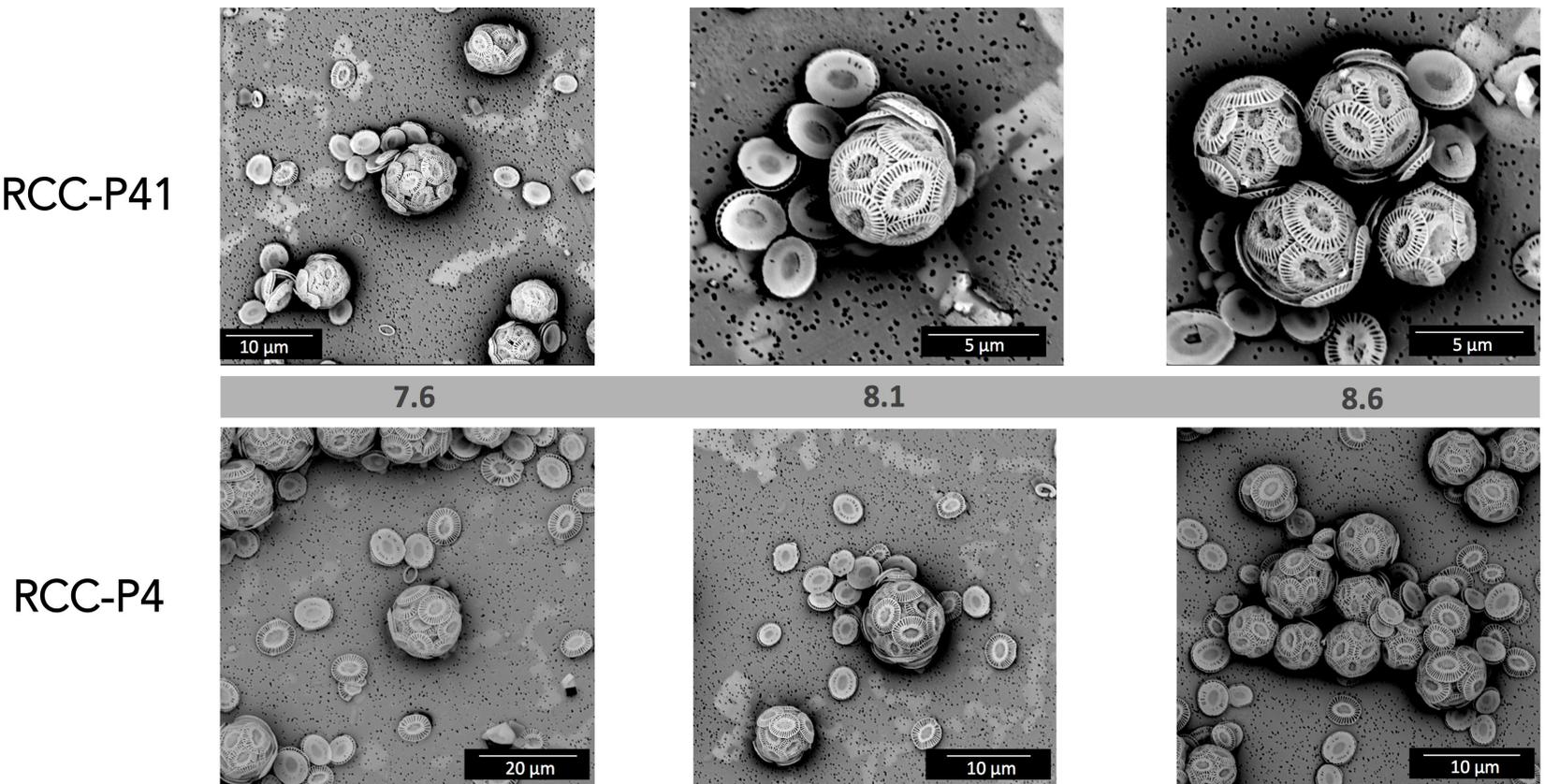


FIGURE 5.5 – Observation au MEB de l'allure des coccosphères et des coccolithes des souches RCC-P41 et RCC-P4 dans les différentes conditions de pH.

L'ensemble des observations fournies par le MEB aux différentes conditions de pH confirme que les deux souches continuent à calcifier comme l'indique les valeurs de  $\Omega$  calculé dans le système des carbonates. Cependant on distingue une différence dans la taille des coccolithes et des coccosphères. La souche RCC-P4 semble mieux adaptée au pH 8.1. Comme indiqué précédemment la souche RCC-P41 est une souche plus calcifiante comme l'indique les observations morphologiques. Il est possible que du fait de son origine dans l'upwelling, la souche soit capable de s'adapter à des variations de pH, et à pH plus acides. Ces conclusions sont dans ce qui suit confrontées aux analyses de carbone particulaire.

#### 5.2.4 Carbone Particulaire

Les mesures de POC sont détaillées dans le chapitre 2 – partie 2.6. Les mesures de TPC et de POC ont été utilisées pour calculer le PIC :

$$TPC = POC + PIC \quad (5.17)$$

Les résultats obtenus pour les souches RCC-P41 et RCC-P4 dans les 3 conditions de pH sont présentées dans la seconde partie du tableau 5.1.

#### Valeurs de POC et PIC

Les figures 5.6a et c présentent les valeurs de POC et PIC pour chaque souche aux différents pH. Pour la souche RCC-P41, on observe une augmentation des valeurs de POC de  $7.00 \pm 0.42$  pg.cell<sup>-1</sup> à  $11.43 \pm 0.18$  pg.cell<sup>-1</sup> et des valeurs de PIC  $4.79 \pm 1.42$  pg.cell<sup>-1</sup> à  $13.08 \pm 0.11$  pg.cell<sup>-1</sup> lorsque le pH diminue.

Les valeurs de POC et PIC pour la souche RCC-P4 suivent les mêmes tendances que les paramètres morphologiques précédemment décrits avec une augmentation entre les pH 8.6 et 8.1 ( $8.41 \pm 0.23$  pg.cell<sup>-1</sup> à  $14.06 \pm 1.28$  pg.cell<sup>-1</sup> et  $7.97 \pm 0.12$  pg.cell<sup>-1</sup> à  $13.18 \pm 2.10$  pg.cell<sup>-1</sup>) et une diminution entre les pH 8.1 et 7.6. Les valeurs de POC et PIC décroissent respectivement à  $11.36 \pm 1.30$  pg.cell<sup>-1</sup> et  $8.19 \pm 0.44$  pg.cell<sup>-1</sup>.

#### Production de calcification et de photosynthèse

À partir du taux de croissance,  $\mu$ , obtenu à chaque valeur de pH et pour les deux souches, les productions en POC et PIC peuvent être calculées grâce aux équations suivantes :

$$P_{POC} = \mu x POC \quad (5.18)$$

$$P_{PIC} = \mu x PIC \quad (5.19)$$

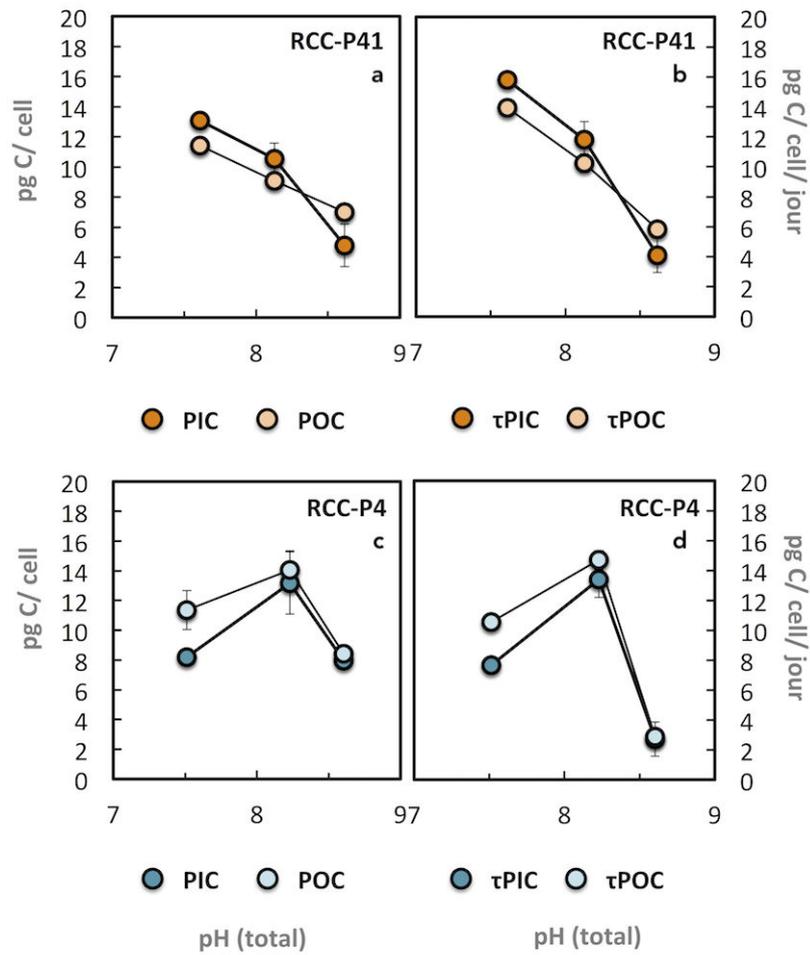


FIGURE 5.6 – Valeurs de PIC, POC, taux de production du PIC et du POC pour les souches RCC-P41 et RCC-P4.

Les productions en PIC et POC sont exprimées en pg POC/cell/jour. Les figures 5.6 b et d montrent les valeurs calculées à chaque pH pour la souche RCC-P41 (b) et la souche RCC-P4 (d). Les mêmes tendances sont observées pour les quotas de POC et PIC. On note donc une augmentation avec la diminution du pH pour la souche RCC-P41 et des valeurs les plus élevées à pH 8.1 pour la souche RCC-P4.

Ces variations soulignent donc une réponse différente des deux souches sur la gamme de pH considérée avec cependant des tendances identiques de la production de POC et PIC.

### Rapport de matière particulaire : PIC/POC

À partir des mesures calculées du POC et PIC en pg.cell<sup>-1</sup>, le rapport PIC/POC, appelé rain ratio en anglais, permet d'évaluer le mode d'assimilation du CO<sub>2</sub> et sa transformation en matière particulaire tout en s'affranchissant du nombre de cellule et du taux de croissance. Ces valeurs sont représentées par la figure 5.7 et fournies dans le tableau 5.1.

Pour la souche RCC-P41, le rain ratio augmente au fur à mesure de l'acidification des eaux de croissance des algues (de  $0.72 \pm 0.23$  à  $1.15 \pm 0.02$ ). A l'inverse, il diminue pour la souche RCC-P4 (de  $0.95 \pm 0.04$  à  $0.73 \pm 0.05$ ).

## 5.3 DISCUSSION

### 5.3.1 Réponse des souches de *E. huxleyi* lors de la variation du pH

Les souches RCC-P41 et RCC-P4 montrent des comportements métaboliques et une évolution de leurs caractéristiques morphologiques différentes en fonction des variations de pH traduisant des réponses et une adaptation différente des deux espèces, ceci dans des conditions de lumières, de température et de nutriments identiques. Meyer et Riebesell (2015) et Shi et al. (2009) ont montré que la méthode utilisée pour simuler les variations de pH (ajout d'acide/base ou bullage de CO<sub>2</sub>) n'influe pas sur la réponse des coccolithophoridés et n'introduit par conséquent pas de biais.

### 5.3.2 Réponses spécifiques des souches RCC-P41 et RCC-P4

Les souches étudiées sont toutes deux originaires de l'océan Pacifique sud. Elles ont fait l'objet d'une étude préalable (J. Sutton) afin d'en déterminer les morphotypes. La souche hypercalcifiante, RCC-P41, a été prélevée dans l'upwelling péruvien tandis que la souche modérément calcifiante est issue de la zone plus au large, hors de l'influence directe de l'upwelling. Ces deux souches sont de morphotype A. La souche RCC-P4 est qualifiée de morphotype A-OC (Open Central area) la souche RCC-P41 est de morphotype A-CC (Closed Central area) selon la classification de Westbroek et al. (1989), Young et al. (2003). L'étude de souches mono-clonale permet d'obtenir l'ensemble des informations physiologiques relative à l'espèce afin d'analyser ses réponses lorsque

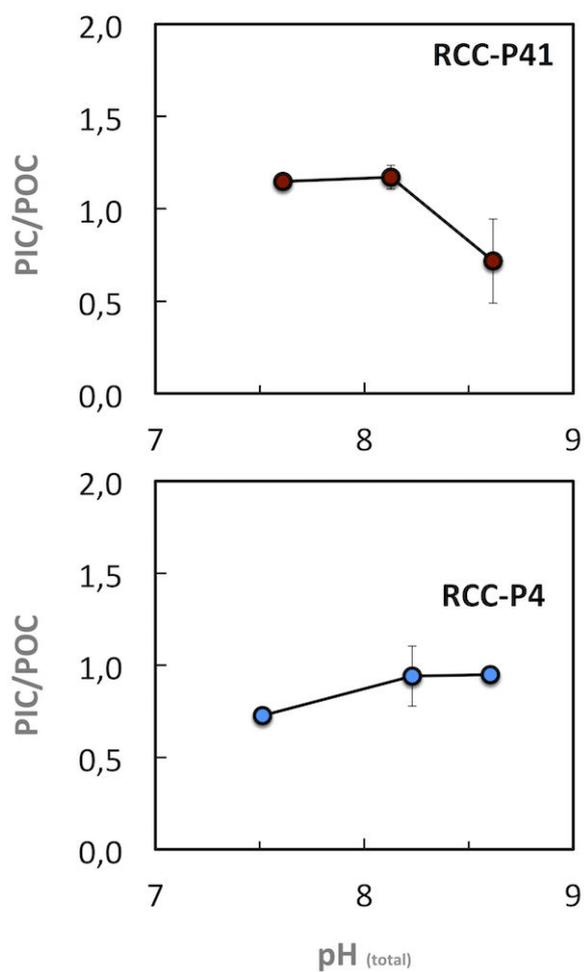


FIGURE 5.7 – Rain ratio, PIC/POC de chaque souche en fonction des différentes conditions de pH étudiées.

l'on applique un changement du pH au milieu de culture. Dans la zone de l'upwelling péruvien, le pH est compris entre 7.7 et 7.8 alors que dans les eaux hors upwelling, le pH il varie entre 8.3 et 8.5 (Simpson et Zirino 1980). Le biotope d'origine de ces souches induit probablement une adaptation distincte des deux souches et morphotypes que nous allons analyser.

### 5.3.3 Impact de la variation du pH

Contrairement à ce que l'on a pu observer dans certains cas (Langer et al. 2009, Bodt et al. 2010, ?, von Dassow et al. 2017) le taux de croissance des deux souches étudiées montrent ici en règle générale des valeurs qui augmentent lorsque le pH diminue. Les études menées par ? et von Dassow et al. (2017) sur des souches soit plutôt calcifiantes (respectivement NZEH et CHC<sub>342</sub>) soit moins calcifiantes (CHC<sub>428</sub> et CHC<sub>440</sub>) de *E. huxleyi* peuvent être comparées à nos résultats pour les espèces RCC-P<sub>41</sub> (calcifiante) et RCC-P<sub>4</sub> (moyennement calcifiante, table ??). Dans le cas de souches calcifiantes, les comportements décrits par les études antérieures sont identiques à ceux observés pour la souche RCC-P<sub>41</sub> dans cette étude. Les valeurs de PIC et POC et les taux de production de carbone inorganique et organique augmentent lorsque le pH diminue et se situent dans le même ordre de grandeur que nos données. Ces observations sont aussi associées à une augmentation aussi de la taille des coccolithes lors d'une diminution du pH du milieu de culture.

Dans le cas de souches modérément calcifiantes, le comportement de la RCC-P<sub>4</sub> est clairement différente de ce que décrit von Dassow et al. (2017). En effet, ces auteurs indiquent des valeurs de POC généralement croissante contrastant avec une légère diminution du PIC.

Cette réponse pourrait refléter une réponse plus lente des espèces peu calcifiantes vivant dans des eaux peu soumises à des variations de pH et donc peut être moins capable d'adapter leur calcification ou tout au moins de manière immédiate. Dans ce cas le nombre de génération atteint lors de la phase d'acclimatation pourrait influencer sur les résultats obtenus. Au contraire les souches hyper-calcifiantes se développant au coeur de l'upwelling s'adapterait plus rapidement aux variations de pH en augmentant leur taux de calcification, leur taille et le nombre de coccolithes produits. De ce fait, le nombre de générations nécessaire pour atteindre la phase d'acclimatation ne serait pas aussi important que pour les souches peu ou moyennement calcifiantes.

Les mesures de DSL réalisées sur les coccolithes des souches étudiées dans cette thèse sont différentes des mesures fournies dans la littérature. Dans un contexte d'acidification, la taille de coccolithes augmente de plus ou moins 10%, or les mesurées réalisées sur la souche RCC-P<sub>41</sub> mettent en évidence une diminution. La comparaison avec les autres souches montre clairement que la souche RCC-P<sub>41</sub> du fait de son origine dans l'upwelling péruvien présente des caractéristiques physiologiques qui ne sont pas retrouvés dans les autres souches calcifiantes.

TABLE 5.4 – Tableau de comparaison entre les souches étudiées dans cette thèse et les souches issues des travaux de von Dassow et al. (2017) et Rouco et al. (2013)

	Calcifying strains			Moderately calcifying strains	
	RCC-P <sub>41</sub>	Rouco et al., 2013	Von Dassow et al., 2017	RCC-P <sub>4</sub>	Von Dassow et al., 2017
Growth rate	↗		↘	↗	↘
$\tau$ PIC	↗	↗	↗	optimum at pH 8.1	↘
$\tau$ POC	↗	↗	↗	optimum at pH 8.1	↗
PIC/POC	↗	↘	↘	↘	↘
Diameter	↗			optimum at pH 8.1	
DSL (Coccoliths)	↘	↗	↗	optimum at pH 8.1	↘

### 5.3.4 Les souches RCC-P<sub>41</sub> et RCC-P<sub>4</sub> dans le cycle du carbone

La souche RCC-P<sub>41</sub> a été sélectionnée dans ce projet pour sa capacité à fortement calcifier. Nous avons vu que son taux de croissance augmente avec la diminution du pH, avec une augmentation du taux de production du POC que l'on peut assimiler au taux de photosynthèse. Le taux de production du PIC, i.e taux de calcification, augmente lui aussi mais dans des proportions moins importantes que le POC. Le rapport PIC/POC augmente donc avec l'abaissement du pH, et se stabilise autour de 1 au pH le plus acide. Ces résultats tendent tous à indiquer que la souche RCC-P<sub>41</sub> répond à l'acidification par une augmentation de la calcification mais que le rapport PIC/POC reste dans tous les cas inférieur à 1.

La souche RCC-P<sub>4</sub> quant à elle, indique des valeurs du rapport PIC/POC proche de 1 sauf au valeur de pH acide, ou il diminue et devient inférieur à 1 qui suggère un une tendance à ralentissement de la calcification et peut être à terme à ne plus calcifier. La souche RCC-P<sub>4</sub> semble donc adaptée aux conditions actuelles de pH dans l'océan ouvert mais peu adaptable au moins sur une dizaine de générations à des pH plus acides.

Contrairement à la souche d'upwelling, la souche RCC-P<sub>4</sub> pourrait représenter un puits de CO<sub>2</sub>.

## 5.4 CONCLUSION

L'étude des deux souches sélectionnées apporte des éléments de réponse sur le comportement spécifique des coccolithophoridés dans le contexte de l'acidification des océans. Nous avons choisi initialement deux souches distinctes du point de vue de la calcification, l'une hyper-calcifiante, la seconde modérément calcifiante. Les résultats contrastés obtenus sont intéressants pour com-

prendre l'impact à l'échelle globale de ces modification métaboliques sur le cycle du carbone dans le futur, mais aussi pour comprendre les possibles adaptations et résilience de chaque souche. Ce chapitre devrait faire l'objet d'une publication.





# VI

## Conclusions générales et perspectives



---

Ce travail de thèse apporte des nouvelles données sur l'isotopie du bore et constitue une contribution majeure à la compréhension de l'impact de l'acidification des océans sur les organismes calcifiants, dans le cas présent, les coccolithophoridés. Il fournit des éléments de réflexion sur la réponse physiologique de ces microalgues aux variations du pH. L'élaboration d'un plan d'expériences rigoureux (Chapitre 2) a permis d'établir des conditions de culture et d'analyses en laboratoire permettant l'acquisition de mesures de  $\delta^{11}B$  fiables pour étudier les mécanismes de bio-calcification des coccolithophoridés dans le contexte de l'acidification des océans (chapitre 5). Cela a nécessité la mise au point d'un protocole de traitement des échantillons exempt de toutes contaminations grâce à une maîtrise des blancs et des produits chimiques utilisés (Chapitre 3) qui ont permis de déboucher à l'issue de ces trois années de thèse sur des mesures uniques de  $\delta^{11}B$  dans la calcite des coccolithes. Les expérimentations menées en batchs dilués dans différentes conditions de pH ont abouti pour la première fois des valeurs de  $\delta^{11}B$  dans la calcite. Grâce à la mesure en parallèle de paramètres physiologiques et morphologiques nous avons pu approfondir la réflexion sur les mécanismes intracellulaires mise en oeuvre lors d'un stress pH.

## Des nouveaux traceurs biogéochimiques dans la calcite des coccolithophoridés

Le premier objectif de cette thèse était d'établir un protocole d'analyse des isotopes du bore dans la calcite des coccolithophoridés et de vérifier l'existence d'une relation entre le  $\delta^{11}B$  et le pH de l'eau de mer.

Les coccolithophoridés sont des organismes cosmopolites que l'on trouve dans les eaux de surface de l'océan mondial. Ces microalgues calcaires sont largement utilisées pour les reconstructions paléocéanographiques, comme par exemple celles de la température passée de l'océan de surface (SST) ou de la  $pCO_2$  à partir de l'utilisation des alcénones (UK'37) et de la composition isotopique en carbone de ces molécules organiques, photosynthétisées principalement par *E. huxleyi*.

Le  $\delta^{11}B$  fait l'objet d'une recherche active qui vise à comprendre les mécanismes d'incorporation du bore dans la calcite en fonction du pH de l'eau de mer (Foster et Rae 2016). L'étude des deux souches *E. huxleyi* et en particulier celle de la souche très calcifiante, RCC-P41, a mis en évidence l'existence d'une relation entre  $\delta^{11}B$  de la calcite des coccolithes et le pH. Elle montre aussi que l'appauvrissement observé entre les valeurs de  $\delta^{11}B$  et celles attendues par le modèle d'incorporation des ions borates de l'eau de mer dans la calcite est d'une valeur constante quelque soit la valeur du pH. Si cette hypothèse se confirme, le  $\delta^{11}B$  de la calcite des coccolithes pourrait permettre de déduire les valeurs de pH de l'eau de mer. Les mesures réalisées dans cette thèse sont les premières avec celles préliminaires et encore non publiées de Henehan (2015) (Figure 6.1). La technique utilisée pour l'isolation du bore est quasiment identique à celle employée par Henehan (2015) et détaillée dans le chapitre 3 - partie 3 (papier 1). Les mesures sont réalisées en MC-ICPMS.

Dans cette étude succincte, Henehan (2015) examine les effets de la limitation en nutriments sur  $\delta^{11}B$  et révèle un contraste intéressant. Les mesures réalisées à 3 pH différents (carré rouge) sont celles qui ont été obtenues à partir de cultures limitées en azote. Elles montrent que  $\delta^{11}B$  dans la calcite de la souche d'*E. huxleyi* est indépendante du pH. Or, comme détaillé dans la discussion du papier 1 si à pH 8.1, la composition isotopique de la souche RCC-P41 a des valeurs proches de celles mesurées par Henehan (2015), aux autres valeurs de pH et notamment celles de pH 7.6, elles sont extrêmement différentes.

Les mesures de  $\delta^{11}B$  ont été associées à celles du B/Ca afin d'estimer l'évolution des teneurs en bore dans la calcite, donc son incorporation, avec les changements de pH. Les seules mesures de rapport B/Ca dans la calcite des coccolithophoridés publiées sont celles de Stoll et al. (2012). Les valeurs B/Ca pour la souche RCC-P41 présentent des valeurs relativement faibles (de l'ordre de 10) pour les pH 8.1 et 7.6, mais qui augmentent fortement à pH 8.6 (au delà de  $800 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ ). Il en est de même pour la souche RCC-P4, avec des valeurs du B/Ca qui varient de 1 à presque 20  $\mu\text{mol.mol}^{-1}$  pour les mêmes valeurs de pH. Cette transition brutale à pH 8.6 observées dans les

deux souches suggère une incorporation plus forte des ions borates, sans doute liée à l'augmentation de leurs concentrations dans l'eau de mer à pH 8.6 qui pourrait témoigner d'un ajustement du pH de la vésicule interne sans modification sensible du DIC. Ces mesures, associées à celles de  $\delta^{11}B$ , permettent donc de préciser le processus de calcification.

Le protocole analytique présenté dans cette thèse fournira une base solide à l'étude d'autres souches avec la recommandation d'augmenter la quantité de calcite à isoler pour les souches les moins calcifiantes afin de se placer au dessus de la limite de détection en MC-ICPMS. Dans de futures recherches, il sera nécessaire de confirmer les résultats obtenus pour la souche RCC-P41, et notamment l'existence d'une relation  $\delta^{11}B$ -pH et celle d'un écart constant (valeur  $a$  dans l'éq 4.11). Dans le cas où les tendances observées seraient confirmées et généralisables à d'autres espèces, la mesure du  $\delta^{11}B$  dans la calcite d'*E. huxleyi* ouvrirait des perspectives pour appliquer de manière simple ce proxy sur les sédiments marins pour des reconstructions paléocéanographiques. En l'absence de réponse spécifique, la séparation par classe taille de coccolithophoridés (Stoll et Schrag 2000, Minoletti et al. 2009, Stoll et Ziveri 2002, Bolton et al. 2012). deviendrait inutile.

Des séparations par classe de taille ont déjà été réalisées pour notamment la détermination du rapport Sr/Ca (Ziveri et al. 2007) ou la mesure des isotopes stables de l'oxygène (Ziveri et al. 2003, Hermoso et al. 2014).

L'adaptation du protocole de Minoletti et al. (2009) par N. Sabata (Stage Master 2, 2016) pour isoler les coccolithes dans le sédiment marin et les séparer par classe de taille a mis en évidence la difficulté de s'affranchir des argiles. Le traitement chimique nécessaire peut altérer les signaux isotopiques et élémentaires du bore. Cependant avant toute application du proxy aux sédiments, il sera important de s'assurer que la relation  $\delta^{11}B$ -pH est extrapolable aux espèces fossiles contenues dans le sédiment et qu'il n'y a par conséquent pas d'altérations par diagenèse post-dépôt. Il faudra également s'assurer que soit le site et en particulier le statut des nutriments, cette relation est stable, car les données de Henahan (2015) suggèrent des biais dans des conditions de limitation en nutriments.

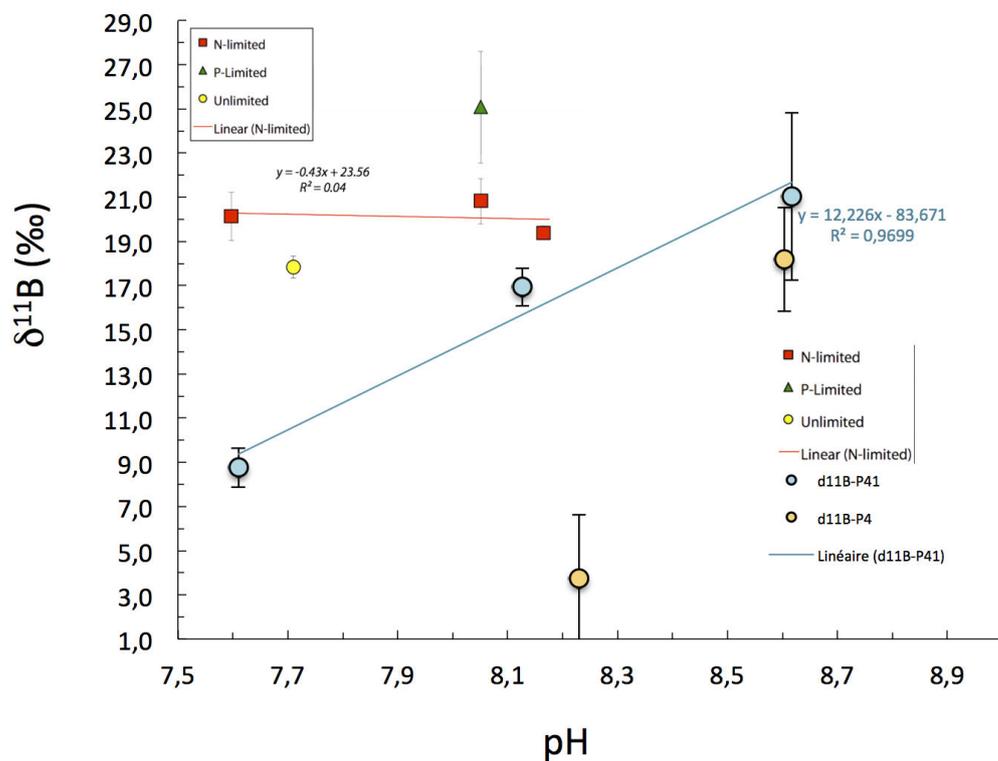
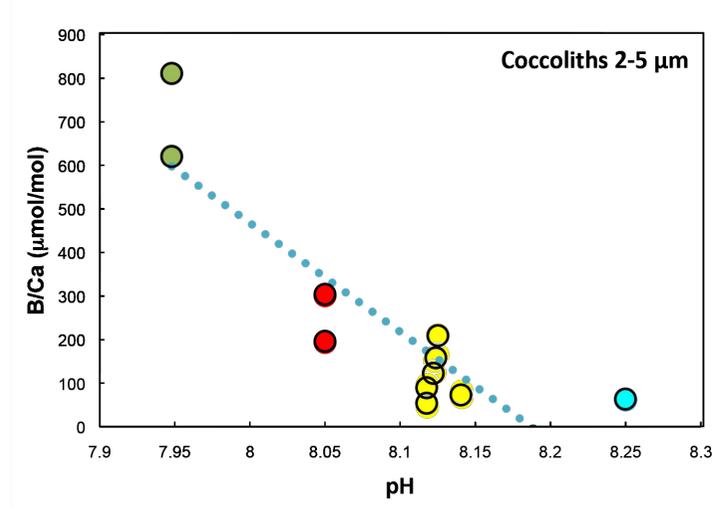
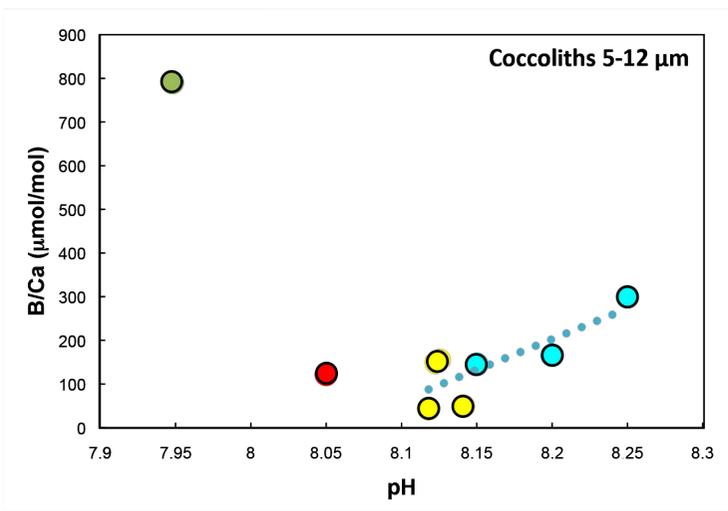


FIGURE 6.1 – Composition isotopique du bore en fonction du pH pour les deux souches étudiées RCC-P<sub>41</sub> et RCC-P<sub>4</sub> et valeurs mesurées par M. Henehan sur une souche de *Emiliana huxleyi* (2015)

FIGURE 6.2 – Résultats préliminaires du ratio B/Ca dans les sédiments marins



## Réponses des coccolithophoridés face à l'acidification des océans

Le second objectif de cette thèse était de **comprendre la réponse physiologique de deux souches, en réponse aux variations de pH.**

Ce volet de notre étude sur la réponse des coccolithophoridés aux variations de pH s'ajoute à des études existantes (Langer et al. 2009, Riebesell et Zondervan 2000, Bach et al. 2015, Bodt et al. 2010) dont certaines réalisées sur des souches très calcifiantes, comme la RCC-P41 (Rouco et al. 2013, von Dassow et al. 2017). Elle suggèrent que l'acidification des eaux de surface de l'océan activerait la photosynthèse et diminuerait la calcification (Riebesell et Zondervan 2000). Concernant la calcification, nos travaux sont en accord avec les études de Langer et al. (2009), Beaufort et al. (2011). La réponse de la souche fortement calcifiante, RCC-P41 est différente de celle de la souche moyennement calcifiante, RCC-P4. Cependant pour cette dernière, les conditions de mesures n'ont pas été totalement satisfaisantes et nécessitent d'être vérifiées avant de conclure à une réponse spécifique .

La souche fortement calcifiante a montré une augmentation de son taux de croissance, une augmentation de la photosynthèse et du taux de calcification lorsque le pH diminue avec un "rain ratio" qui se stabilise à pH 7.6. Ces observations confortent celles de Rouco et al. (2013) sur la souche très calcifiante, NZEH. [Il se trouve que les mesures de composition isotopique en bore réalisées par M.Henehan correspondent à la souche NZEH.] La souche modérément calcifiante présente des variations des paramètres physiologiques peu attendues par rapport aux résultats publiés sur des souches du même type. Elle montre une diminution du "rain ratio" donc une diminution de la calcification aux pH le plus acide. Aux deux autres valeurs de pH, plus élevées, le "rain ratio" est proche de 1 mais associé cependant à une production de PIC et POC très faibles. Cette espèce ne semble s'adapter ni à des pH plus acides, ni à des pH plus basique que ceux de l'océan actuel.

## Perspectives

Le sujet traité par cette thèse se situe dans les préoccupations actuelles de la communauté internationale et notamment dans l'agenda 2030 des Nations Unies sur le développement durable. En effet, l'acidification est au coeur des objectifs de l'ODD14. La question de l'augmentation du CO<sub>2</sub> et son impact sur la baisse du pH des océans est ici étudiée à l'échelle cellulaire. L'espèce choisie, *E. huxleyi* est cependant très répandue sur le globe ce qui en fait un acteur important du cycle du carbone marin et donne toute sa justification à ce travail. Parce qu'exploratoire les résultats de cette thèse ouvrent de nombreuses perspectives pour les années à venir.

D'un point de vue méthodologique, nous avons vu la difficulté à réaliser des mesures de bore dans des matrices à faibles teneurs et de petites tailles (à l'inverse des coraux et des foraminifères). Des pistes sont à l'étude pour mesurer de très petites quantités de bore en MC-ICPMS en deçà de la limite de 50 ng. Cette alternative proposée par Lloyd et al. (2017) consisterait à appliquer une augmentation de la résistance à 10<sup>13</sup> Ohm sur la cage de Faraday du spectromètre de masse permettant de mesurer des quantités de l'ordre de 0.8 ng de bore. Cette technique, encore récente, constituerait une avancée majeure pour la mesure de la composition isotopique du bore dans les coccolithes. D'autres méthodes sont proposées, comme de réaliser la mesure directement sur la poudre de calcite ce qui réduirait le risque de contamination lié à l'utilisation des tubes et diverses solutions chimiques. Cette méthode par micro-sublimation est en cours de développement au laboratoire des Domaines Océaniques (IUEM, Plouzané, France). Sur un autre plan, il serait utile de développer un standard "in-house" composé de calcite biogénique. A l'heure actuelle, les standards existants sont en faibles quantités notamment le Jcp-1 et le Jct-1 et seront bientôt épuisés.

Malgré le caractère cosmopolite d'*E. huxleyi* qui justifie pleinement le choix de nos deux souches, ce type d'étude doit être poursuivie et étendue à d'autres souches de la même espèce et à des espèces de plus grandes tailles comme *C. leptoporus* ou de petite taille, comme *C. braarudii*. Il est en effet critique d'explorer plus avant la généralisation de nos résultats à d'autres espèces tant du point de vue de la compréhension de l'impact de l'acidification sur les organismes calcifiants et les rétroactions que cela implique sur le climat, que sur les aspects d'adaptation et de résilience afin d'évaluer les conséquences de l'acidification sur la biodiversité marine. Enfin, il est important d'asseoir la calibration que nous avons établie pour la souche RCC-41 pour des études paléoclimatiques futures afin de prospecter ce champ d'application de l'isotopie du bore. Cela nécessite aussi de s'assurer que des biais ne sont pas introduits lors de la diagenèse précoce, comme par exemple la dissolution.



# VII

## Annexes



Table 1: Tableau descriptif des souches étudiées, localisation, nombres de générations et mode de culture

<b>Species</b>	<b>Strain Code</b>	<b>Calcification</b>	<b>Morphotype</b>	<b>Origin</b>	<b>Generations</b>	<b>Culture techniques</b>	<b>Exper.</b>	<b>Number of replicates</b>
<i>E. huxleyi</i>	RCC-P41	Calcifying	Morphotype A.	Peruvian Upwelling	11	Batch	2017	3
<i>E. huxleyi</i>	RCC-P41	Calcifying	Morphotype A.	Peruvian Upwelling	11	Batch	2017	3
<i>E. huxleyi</i>	RCC-P41	Calcifying	Morphotype A.	Peruvian Upwelling	11	Batch	2017	3
<i>E. huxleyi</i>	RCC-RCC-P4	Moderated calcifying	Morphotype A.	Pacific Ocean/ West Coast	7	Batch	2017	3
<i>E. huxleyi</i>	RCC-RCC-P4	Moderated calcifying	Morphotype A.	Pacific Ocean/ West Coast	7	Batch	2017	3
<i>E. huxleyi</i>	RCC-RCC-P4	Moderated calcifying	Morphotype A.	Pacific Ocean/ West Coast	7	Batch	2017	3
<i>E. huxleyi</i>	RCC-P41	Calcifying	Morphotype A.	Peruvian Upwelling	around 10	Turbidostat	2016	1
<i>E. huxleyi</i>	RCC-P41	Calcifying	Morphotype A.	Peruvian Upwelling	around 10	Turbidostat	2016	1

Table 2: Paramètres de culture

Species	Strain Code	Growth rate $\mu$	Cells densities (cell/mL)	Temp. $^{\circ}C$	Salinity	pH	$2\sigma$
E. huxleyi	RCC-P41	0.77	45 393	18.6	32.43	8.62	0.04
E. huxleyi	RCC-P41	0.77	45 393	18.6	32.6	8.13	0.04
E. huxleyi	RCC-P41	0.8	58 000	18.6	32.26	7.61	0.02
E. huxleyi	RCC-P4	0.36	55 478	18	32.42	8.6	0.02
E. huxleyi	RCC-P4	0.36	55 478	18	32.62	8.23	0.16
E. huxleyi	RCC-P4	0.37	54 689	18	32.62	7.51	
E. huxleyi	RCC-P41	0.4	116 000	18.5		8.1	-
E. huxleyi	RCC-P41	0.51	118 000	18.5		7.9	-

Table 3: Système des carbonates de l'eau de mer utilisée pour chaque condition de pH, mesurée en fin d'expérience

Strain Code	Culture	TA	DIC	$CO_2$	$HCO_3^-$	$CO_3^{2-}$	$\Omega_{calcite}$
		( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{atm}$ )	( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	
RCC-P41	Batch	2795	2039	87	1487	550	13.41
RCC-P41	Batch	2121	1846	313	1649	188	4.57
RCC-P41	Batch	2122	2059	1130	1957	64	1.56
RCC-P4	Batch	2786	2048	90	1513	533	13.03
RCC-P4	Batch	2089	1732	209	1489	237	5.77
RCC-P4	Batch	1636	1592	1142	1510	46	1.11
RCC-P41	Turbidostat	-	-	-	-	-	-
RCC-P41	Turbidostat	-	-	-	-	-	-

Table 4: Paramètres physiologiques pour chaque condition de pH pour la culture en batch et en turbidostat

Strain Code	Culture	pH	$2\sigma$	$\mu$	PIC	POC	$\tau$ PIC	$\tau$ POC	PIC/POC	Coccolith size ( $\mu\text{m}$ )	$2\sigma$
					(pg/cell)	(pg/cell)	(pg/cell *day)	(pg/cell*day)			
RCC-P41	Batch	8.62	0.04	0.91	13.08	11.43	15.8	13.94	1.15	1.22	0.13
RCC-P41	Batch	8.13	0.04	1.05	10.54	9.08	11.82	10.23	1.17	1.64	0.36
RCC-P41	Batch	7.61	0.02	0.34	4.79	7	4.1	5.84	0.72	2.37	0.36
RCC-P4	Batch	8.6	0.02	1.24	8.19	11.36	7.63	10.53	0.73	1.4	0.16
RCC-P4	Batch	8.23	0.16	1.12	13.18	14.06	13.41	14.7	0.94	2.43	0.27
RCC-P4	Batch	7.51		0.84	7.97	8.41	2.72	2.86	0.95	1.35	0.14
RCC-P41	Turbidostat	8.1	-	0.4	16.47	11.72	6.59	4.69	1.41	-	-
RCC-P41	Turbidostat	7.9	-	0.51	23.87	10.38	12.17	5.29	2.3	-	-

Table 5: Paramètres géochimiques mesurés  $\delta^{11}B$  et B/Ca dans la calcite des coccolithes dans les différentes conditions de pH pour les cultures en batchs et en turbidostat.

<b>Strain Code</b>	<b>Culture</b>	<b>B/Ca (<math>\mu\text{mol/mol}</math>)</b>	<b><math>2\sigma</math></b>	<b><math>\delta^{11}B</math> (<math>\text{‰}</math>)</b>	<b><math>2\sigma</math></b>	<b><math>\delta^{11}B_{\text{borate}}</math> (<math>\text{‰}</math>)</b>	<b><math>2\sigma</math></b>	<b><math>pH_{CV}</math></b>	<b><math>2\sigma</math></b>	<b><math>\Omega_{CV}</math></b>
RCC-P41	Batch	815.01	35.1	21.04	3.79	24.45	0.6	8.37	0.27	5.15
RCC-P41	Batch	16.12	6	16.73	1.2	17.8	0.39	8.04	0.25	29.27
RCC-P41	Batch	9.55	7	8.76	0.88	14.03	0.09	7.53	0.2	26.84
RCC-P4	Batch	19.79	3.4	18.19	2.36	24.24	0.44	8.67	0.15	437
RCC-P4	Batch	1.07	0.4	3.74	2.88	19	1.93	8.25	0.24	1462.5
RCC-P4	Batch									
RCC-P41	Turbidostat	11	2	(- 0,57)	-	-	-	-	-	-
RCC-P41	Turbidostat	21	2	(-3,23)	-	-	-	-	-	-

Table 6: Tableau de comparaison entre les souches etudiees dans cette these et les souches issues des travaux de von Dassow et al. (2017) et Rouco et al. (2013)

	Calcifying strains			Moderately calcifying strains	
	RCC-P41	<i>Rouco et al., 2013</i>	<i>Von Dassow et al., 2017</i>	RCC-P4	<i>Von Dassow et al., 2017</i>
Growth rate	↗		↘	↗	↘
$\tau$ PIC	↗	↗	↗	optimum at pH 8.1	↘
$\tau$ POC	↗	↗	↗	optimum at pH 8.1	↗
PIC/POC	↗	↘	↘	↘	↘
Diameter	↗			optimum at pH 8.1	
DSL (Coccoliths)	↘	↗	↗	optimum at pH 8.1	↘



# BIBLIOGRAPHIE

- Allen, Katherine A., Hönisch, Bärbel, Eggins, Stephen M., Haynes, Laura L., Rosenthal, Yair, et Yu, Jimin. Trace element proxies for surface ocean conditions : A synthesis of culture calibrations with planktic foraminifera. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 193, p. 197–221, 2016. ISSN 00167037.
- Anning, T., Nimer, N., Merrett, M. J., et Brownlee, C. Costs and benefits of calcification in coccolithophorids. *Journal of Marine Systems*, 9(1-2), p. 45–56, 1996. ISSN 09247963.
- Archer, David. *The global carbon cycle*. Princeton University Press, 2010.
- Bach, Lennart Thomas, Riebesell, Ulf, Gutowska, Magdalena A., Federwisch, Luisa, et Schulz, Kai Georg. A unifying concept of coccolithophore sensitivity to changing carbonate chemistry embedded in an ecological framework. *Progress in Oceanography*, 135, p. 125–138, 2015. ISSN 00796611. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2015.04.012>.
- Barker, S., Greaves, M., et Elderfield, H. A study of cleaning procedures used for foraminiferal Mg/Ca paleothermometry. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 4(9), p. 1–20, 2003. ISSN 15252027.
- Bates, N. R., Best, M. H P, Neely, K., Garley, R., Dickson, A. G., et Johnson, R. J. Detecting anthropogenic carbon dioxide uptake and ocean acidification in the North Atlantic Ocean. *Biogeosciences*, 9(7), p. 2509–2522, 2012. ISSN 17264170.
- Bates, Nicholas R., Michaels, Anthony F., et Knap, Anthony H. Seasonal and interannual variability of oceanic carbon dioxide species at the U.S. JGOFS Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography*, 43(2-3), p. 347–383, 1996. ISSN 09670645. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967064595000933>.
- Beaufort, L, Bernard, O, Pedrotti, M L, Talec, A, et Sciandra, A. Influence of CO<sub>2</sub> and nitrogen limitation on the coccolith volume of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). pages 4155–4167, 2012.
- Beaufort, L, Probert, I, de Garidel-Thoron, T, Bendif, E M, Ruiz-Pino, D, Metzl, N, Goyet, C, Buchet, N, Coupel, P, Grelaud, M, Rost, B, Rickaby, R E M, et de Vargas, C. Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. *Nature*, 476(7358), p. 80–83, 2011. ISSN 0028-0836.

- Bendif, E M. *De la macroevolution à la microévolution chez le phytoplankton : le cas des Isochrysidales (Haptophyta)*. PhD thesis, 2011.
- Bichon, Sabrina, Savoye, Nicolas, et Garcia, Nicole. Détermination des  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  de la matière organique particulaire. *Protocole national SOMLIT*, 2013.
- Blanco-Ameijeiras, S., Lebrato, M., Stoll, H., Iglesias-Rodriguez, M. D., Méndez-Vicente, A., Sett, S., Müller, M. N., Oschlies, A., et Schulz, K. G. Removal of organic magnesium in coccolithophore calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 89, p. 226–239, 2012. ISSN 00167037.
- Bodt, C De, Oostende, N Van, Harlay, J, Sabbe, K, et Chou, L. Individual and interacting effects of p CO<sub>2</sub> and temperature on *Emiliana huxleyi* calcification : study of the calcite production , the coccolith morphology and the coccosphere size. 106(1), p. 1401–1412, 2010.
- Bolton, Clara T, Stoll, H., et Mendez-vicente, Ana. Vital effects in coccolith calcite : Cenozoic climate- p CO<sub>2</sub> drove the diversity of carbon acquisition strategies in coccolithophores? 27 (November), p. 1–16, 2012.
- Bopp, L, Bowler, C, Guidi, L, Karsenti, E, et de Vargas, C. The Ocean : a Carbon Pump. *Ocean Climate*, pages 12–17, 2015. URL <http://www.ocean-climate.org/wp-content/uploads/2015/03/ocean-carbon-pump{ }ScientificItems{ }BD-2.pdf>.
- Bown, P R, Lees, J A, et Young, J R. *Calcerous nannoplankton evolution and diersity through time*. 2004. ISBN 3642060161.
- Broecker, Wallace S, Peng, Tsung-Hung, et al. Tracers in the sea. 1982.
- Brownlee, Colin et Taylor, Alison. Calcification in coccolithophores : a cellular perspective. Dans *Coccolithophores*, pages 31–49. Springer, 2004.
- Byrne, Robert H., Yao, Wensheng, Klochko, Kateryna, Tossell, John A., et Kaufman, Alan J. Experimental evaluation of the isotopic exchange equilibrium  $^{10}\text{B}(\text{OH})_3 + ^{11}\text{B}(\text{OH})_4^- = ^{11}\text{B}(\text{OH})_3 + ^{10}\text{B}(\text{OH})_4^-$  in aqueous solution. *Deep-Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers*, 53(4), p. 684–688, 2006. ISSN 09670637.
- Caldeira, Ken et Wickett, Michael E. Oceanography : anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425(6956), p. 365, 2003. ISSN 0028-0836.
- Catanzaro, Edward John. *Boric acid : isotopic and assay standard reference materials*, volume 260. National Bureau of Standards, Institute for Materials Research, 1970.
- Coadic, Romain. *Le rapport B / Ca des foraminifères : un proxy pour le cycle du carbone dans l'océan*. PhD thesis, Université Paris Sud, 2013.

- Cros, L., Kleijne, A., Zeltner, A., Billard, C., et Young, J. R. New examples of holococcolith-heterococcolith combination coccospheres and their implications for coccolithophorid biology. *Marine Micropaleontology*, 39(1-4), p. 1-34, 2000. ISSN 03778398.
- De Bodt, C, Van Oostende, N, Harlay, J, Sabbe, K, et Chou, L. Individual and interacting effects of pCO<sub>2</sub> and temperature on *Emiliana huxleyi* calcification : Study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size. *Biogeosciences*, 7(5), p. 1401-1412, 2010. ISSN 17264170.
- de Nooijer, L. J., Toyofuku, T., et Kitazato, H. Foraminifera promote calcification by elevating their intracellular pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), p. 15374-15378, 2009. ISSN 0027-8424. URL <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904306106>.
- de Vargas, Colomban, Aubry, Marie Pierre, Probert, Ian, et Young, Jeremy. Origin and Evolution of Coccolithophores. From Coastal Hunters to Oceanic Farmers. Dans *Evolution of Primary Producers in the Sea*, Chapitre 12, pages 251-285. 2007. ISBN 9780123705181.
- Denman, Kenneth L, Brasseur, Guy, Chidthaisong, Amnat, Ciais, Philippe, Cox, Peter M, Dickinson, Robert E, Hauglustaine, Didier, Heinze, Christoph, Holland, Elisabeth, Jacob, Daniel, et Others. Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. *Climate change*, 2007, p. 541-584, 2007.
- Dickson, A G et Millero, F J. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 34(10), p. 1733-1743, 1987.
- Dickson, Andrew G. Thermodynamics of the dissociation of boric acid in synthetic seawater from 273 . 15 to 318 . 15 K. *Deep Sea Research*, 37(5), p. 755-766, 1990.
- Dissard, D., Douville, E., Reynaud, S., Juillet-Leclerc, a., Montagna, P., Louvat, P., et McCulloch, M. Light and temperature effects on  $\delta^{11}\text{B}$  and B / Ca ratios of the zooxanthellate coral *Acropora* sp. : Results from culturing experiments. *Biogeosciences*, 9(11), p. 4589-4605, 2012. ISSN 17264170.
- Doney, Scott C, Balch, William M, Fabry, Victoria, et Feely, Richard. Ocean Acidification A Critical Emerging Problem. *Oceanography*, 22(4), p. 16-25, 2009. ISSN 10428275.
- Douville, E., Paterne, M., Cabioch, G., Louvat, P., Gaillardet, J., Juillet-Leclerc, A., et Ayliffe, L. Abrupt sea surface pH change at the end of the Younger Dryas in the central sub-equatorial Pacific inferred from boron isotope abundance in corals (*Porites*). *Biogeosciences*, 7(8), p. 2445-2459, 2010. ISSN 17264170.

- EPICA community members. Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature*, 429(6992), p. 623–628, 2004. ISSN 0028-0836. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02599>.
- EPOCA et Union, Publications Office of the European. Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting. page 260, 2010.
- Feely, R A, Doney, S, et Cooley, S R. Ocean Acidification. *Marine Biology Research*, 7(4), p. 418–419, 2009. ISSN 1745-1000.
- Fernandez, Silvia Diez, Encinar, Jorge Ruiz, Sanz-Medel, Alfredo, Isensee, Kirsten, et Stoll, Heather M. Geochemistry, Geophysics, Geosystems. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 16, p. 2005–2014, 2015.
- Foster, G. L., Pogge Von Strandmann, P. A E, et Rae, J. W B. Boron and magnesium isotopic composition of seawater. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 11(8), p. 1–10, 2010. ISSN 15252027.
- Foster, Gavin L., Hönisch, Barbel, Paris, Guillaume, Dwyer, Gary S., Rae, James W B, Elliott, Tim, Gaillardet, J?r?me, Hemming, N. Gary, Louvat, Pascale, et Vengosh, Avner. Interlaboratory comparison of boron isotope analyses of boric acid, seawater and marine CaCO<sub>3</sub> by MC-ICPMS and NTIMS. *Chemical Geology*, 358, p. 1–14, 2013. ISSN 00092541. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.08.027>.
- Foster, Gavin L. et Rae, James W.B. Reconstructing Ocean pH with Boron Isotopes in Foraminifera. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 44(1), p. 207–237, 2016. ISSN 0084-6597. URL <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-earth-060115-012226>.
- Foster, G.L. Seawater ph, pco<sub>2</sub> and [co<sub>3</sub><sup>2-</sup>] variations in the caribbean sea over the last 130 kyr : A boron isotope and b/ca study of planktic foraminifera. *Earth and Planetary Science Letters*, 271 (1-4), p. 254–266, 2008. ISSN 0012821X.
- Gattuso, J.-P. et Lavigne, H. Technical Note : Approaches and software tools to investigate the impact of ocean acidification. *Biogeosciences*, 6(10), p. 2121–2133, 2009. ISSN 1726-4189. URL <http://www.biogeosciences.net/6/2121/2009/>.
- Giraud, Mélanie, Boye, Marie, Garçon, Véronique, Donval, Anne, et De La Broise, Denis. Simulation of an artificial upwelling using immersed in situ phytoplankton microcosms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 475, p. 80–88, 2016.
- Hemming, N G et Hanson, G N. Boron isotopic composition and concentration in modern marine carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56, p. 537–543, 1992.
- Henehan, Michael J. *Ground-truthing the Boron-based Proxies*. PhD thesis, 2015.

- Henehan, Michael J, Rae, James W B, Foster, Gavin L, Erez, Jonathan, Prentice, Katherine C, Kucera, Michal, Bostock, Helen C, Martínez-Botí, Miguel A, Milton, J Andy, Wilson, Paul A, et others. Calibration of the boron isotope proxy in the planktonic foraminifera *Globigerinoides ruber* for use in palaeo-CO<sub>2</sub> reconstruction. *Earth and Planetary Science Letters*, 364, p. 111–122, 2013.
- Hermoso, Michaël, Horner, Tristan J., Minoletti, Fabrice, et Rickaby, Rosalind E M. Constraints on the vital effect in coccolithophore and dinoflagellate calcite by oxygen isotopic modification of seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 141, p. 612–627, 2014. ISSN 00167037.
- Holcomb, M., DeCarlo, T. M., Gaetani, G. A., et McCulloch, M. Factors affecting B/Ca ratios in synthetic aragonite. *Chemical Geology*, 437, p. 67–76, 2016. ISSN 00092541. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2016.05.007>.
- Holcomb, M, Decarlo, T M, Schoepf, V, Dissard, D, Tanaka, K, et McCulloch, M. Cleaning and pre-treatment procedures for biogenic and synthetic calcium carbonate powders for determination of elemental and boron isotopic compositions. *Chemical Geology*, 398, p. 11–21, 2015. ISSN 0009-2541. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.01.019>.
- Hönisch, B., Hemming, N. G., Grottoli, A. G., Amat, A., Hanson, G. N., et Bijma, J. Assessing scleractinian corals as recorders for paleo-pH : Empirical calibration and vital effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(18), p. 3675–3685, 2004. ISSN 00167037.
- Hönisch, Bärbel et Hemming, N Gary. Ground-truthing the boron isotope-paleo-pH proxy in planktonic foraminifera shells : Partial dissolution and shell size effects. *Paleoceanography*, 19(4), 2004.
- Hoppe, C J M, Langer, G, et Rost, B. *Emiliana huxleyi* shows identical responses to elevated pCO<sub>2</sub> in TA and DIC manipulations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 406(1-2), p. 54–62, 2011. ISSN 00220981. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.008>.
- Houghton JT, Y, Ding, DJ, Griggs, M, Noguier, PJ, van der Linden, X, Dai, K, Maskell, et C, Johnson. Climate Change 2001 : The Scientific Basis. *Climate Change 2001 : The Scientific Basis*, page 881, 2001. ISSN 0521 80767 0.
- Hutchins, David a., Pustizzi, Frances, Hare, Clinton E., et DiTullio, Giacomo R. A shipboard natural community continuous culture system for ecologically relevant low-level nutrient enrichment experiments. *Limnology and Oceanography : Methods*, 1, p. 82–91, 2003. ISSN 1541-5856.
- Hönisch, B., Ridgwell, a., Schmidt, D. N., Thomas, E., Gibbs, S. J., Sluijs, a., Zeebe, R., Kump, L., Martindale, R. C., Greene, S. E., Kiessling, W., Ries, J., Zachos, J. C., Royer, D. L., Barker, S., Marchitto, T. M., Moyer, R., Pelejero, C., Ziveri, P., Foster, G. L., et Williams, B. The Geological Record of Ocean Acidification. *Science*, 335(6072), p. 1058–1063, 2012. ISSN 0036-8075.

- Kaczmarek, Karina, Nehrke, Gernot, Misra, Sambuddha, Bijma, Jelle, et Elderfield, Henry. Investigating the effects of growth rate and temperature on the B/Ca ratio and  $\delta^{11}\text{B}$  during inorganic calcite formation. *Chemical Geology*, 421, p. 81–92, 2016. ISSN 00092541.
- Kakihana, Hidetake, Kotaka, Masahiro, Satoh, Shohei, Nomura, Masao, et Okamoto, Makoto. Fundamental Studies on the Ion-Exchange Separation of Boron Isotopes, 1977. ISSN 0009-2673.
- Khatiwala, S., Tanhua, T., Mikaloff Fletcher, S., Gerber, M., Doney, S. C., Graven, H. D., Gruber, N., McKinley, G. A., Murata, A., Ríos, A. F., et Sabine, C. L. Global ocean storage of anthropogenic carbon. *Biogeosciences*, 10(4), p. 2169–2191, 2013. ISSN 17264170.
- Kiss, E. Ion-exchange separation and spectrophotometric determination of boron in geological materials. *Analytica Chimica Acta*, 211, p. 243–256, 1988.
- Kleypas, J A, Feely, R A, Fabry, V J, Langdon, C, Sabine, C L, et Robbins, L L. Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers : A Guide for Future Research - St Petersburg report. Rapport Technique January, 2006.
- Klochko, Kateryna, Kaufman, Alan J, Yao, Wengsheng, Byrne, Robert H, et Tossell, John A. Experimental measurement of boron isotope fractionation in seawater. *Earth and Planetary Science Letters*, 248(1), p. 276–285, 2006.
- Langer, G, Nehrke, G, Thoms, S, et Stoll, H. Barium partitioning in coccoliths of *Emiliana huxleyi*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(10), p. 2899–2906, 2009. ISSN 00167037.
- Langer, Gerald, Gussone, Nikolaus, Nehrke, Gernot, Riebesell, Ulf, Eisenhauer, Anton, Kuhnert, Henning, Rost, Björn, Trimborn, Scarlett, et Thoms, Silke. Coccolith strontium to calcium ratios in *Emiliana huxleyi* : The dependence on seawater strontium and calcium concentrations. *Limnology and Oceanography*, 51(1), p. 310–320, 2006. ISSN 00243590.
- Le Moigne, Frederic AC, Villa-Alfageme, M, Sanders, Richard J, Marsay, C, Henson, S, et García-Tenorio, R. Export of organic carbon and biominerals derived from  $^{234}\text{Th}$  and  $^{210}\text{Po}$  at the porcupine abyssal plain. *Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers*, 72, p. 88–101.
- Le Quéré, C, Raupach, MR, Canadell, JG, et Al., Et. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature Geo*, 2(12), 2009.
- Lee, Kitack, Kim, Tae Wook, Byrne, Robert H., Millero, Frank J., Feely, Richard A., et Liu, Yong Ming. The universal ratio of boron to chlorinity for the North Pacific and North Atlantic oceans. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(6), p. 1801–1811, 2010. ISSN 00167037. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2009.12.027>.

- Lemarchand, D., Gaillardet, J., Göpel, C., et Manhès, G. An optimized procedure for boron separation and mass spectrometry analysis for river samples. *Chemical Geology*, 182(2-4), p. 323–334, 2002. ISSN 00092541.
- Lewis, E, Wallace, D, et Allison, L J. *Program Developed for CO<sub>2</sub> System Calculations ORNL/CDIAC-105, Carbon Dioxide Information Analysis Centre*,. Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy, 1998., 1998.
- Lloyd, Nicholas S., Sadekov, Aleksey Yu., et Misra, Sambuddha. Application of 10<sup>13</sup> ohm Faraday cup current amplifiers for boron isotopic analyses by solution mode and laser ablation MC-ICP-MS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017. ISSN 09514198. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.8009>.
- Louvat, Pascale, Bouchez, Julien, et Paris, Guillaume. MC-ICP-MS Isotope Measurements with Direct Injection Nebulisation (d-DIHEN) : Optimisation and Application to Boron in Seawater and Carbonate Samples. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 35(1), p. 75–88, 2011. ISSN 16394488.
- Mackinder, Luke, Wheeler, Glen, Schroeder, Declan, Riebesell, Ulf, et Brownlee, Colin. Molecular mechanisms underlying calcification in coccolithophores. *Geomicrobiology Journal*, 27(6-7), p. 585–595, 2010. ISSN 01490451.
- Manton, I. Functional parallels between calcified and uncalcified periplasts. *Biom mineralization in Lower Plants and Animals. Systematics Association Special Volume, London*, pages 157–172, 1986.
- Martínez-Botí, M. A., Marino, G., Foster, G. L., Ziveri, P., Hennehan, M. J., Rae, J. W. B., Mortyn, P. G., et Vance, D. Boron isotope evidence for oceanic carbon dioxide leakage during the last deglaciation. *Nature*, 518(7538), p. 219–222, 2015. ISSN 0028-0836. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14155>.
- McCulloch, Malcolm, Trotter, Julie, Montagna, Paolo, Falter, Jim, Dunbar, Robert, Freiwald, André, Försterra, Günter, López Correa, Matthias, Maier, Cornelia, Rüggeberg, Andres, et Taviani, Marco. Resilience of cold-water scleractinian corals to ocean acidification : Boron isotopic systematics of pH and saturation state up-regulation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 87, p. 21–34, 2012. ISSN 00167037.
- McCulloch, Malcolm T., Holcomb, Michael, Rankenburg, Kai, et Trotter, Julie A. Rapid, high-precision measurements of boron isotopic compositions in marine carbonates. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(24), p. 2704–2712, 2014. ISSN 10970231.
- Mehrbach, C., Culberson, C. H., Hawley, J. E., et Pytkowicz, R. M. Measurement of the Apparent Dissociation Constants of Carbonic Acid in Seawater At Atmospheric Pressure<sup>1</sup>. *Limnology and*

- Oceanography*, 18(6), p. 897–907, 1973. ISSN 00243590. URL <http://doi.wiley.com/10.4319/lo.1973.18.6.0897>.
- Meier, K. J S, Berger, C., et Kinkel, H. Increasing coccolith calcification during CO<sub>2</sub> rise of the penultimate deglaciation (Termination II). *Marine Micropaleontology*, 112, p. 1–12, 2014. ISSN 03778398. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.marmicro.2014.07.001>.
- Meyer, J et Riebesell, U. Reviews and syntheses : Responses of coccolithophores to ocean acidification : A meta-analysis. *Biogeosciences*, 12(6), p. 1671–1682, 2015. ISSN 17264189.
- Minoletti, Fabrice, Hermoso, Michaël, et Gressier, Vincent. Separation of sedimentary micron-sized particles for palaeoceanography and calcareous nannoplankton biogeochemistry. *Nature protocols*, 4(1), p. 14–24, 2009. ISSN 1754-2189.
- Misra, Sambuddha, Greaves, Mervyn, Owen, Robert, Kerr, Joanna, Elmore, Aurora C, et Elderfield, Henry. Determination of B/Ca of natural carbonates by HR-ICP-MS. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 15(4), p. 1617–1628, 2014a.
- Misra, Sambuddha, Owen, Robert, Kerr, Joanna, Greaves, Mervyn, et Elderfield, Henry. Determination of  $\delta^{11}\text{B}_{\text{byHR}} - \text{ICP} - \text{MS}$  from mass limited samples : Application to natural carbonates and waters samples. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 140, p. 531 – 552, 2014b.
- Mucci, Alfonso. The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure. *American Journal of Science*, 283(7), p. 780–799, 1983.
- Müller, M N, Lebrato, M, Riebesell, U, e Ramos, J, Schulz, K G, Blanco-Ameijeiras, S, Sett, S, Eisenhauer, A, et Stoll, H. Influence of temperature and CO<sub>2</sub> on the strontium and magnesium composition of coccolithophore calcite. *Biogeosciences Discussions*, 10(10), p. 15559–15586, 2013.
- Müller, Marius N, Trull, Thomas W, et Hallegraef, Gustaaf M. Independence of nutrient limitation and carbon dioxide impacts on the Southern Ocean coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *The ISME Journal*, 11(8), p. 1–11, 2017. ISSN 1751-7362. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/ismej.2017.53>.
- Nir, Oded, Vengosh, Avner, Harkness, Jennifer S., Dwyer, Gary S., et Lahav, Ori. Direct measurement of the boron isotope fractionation factor : Reducing the uncertainty in reconstructing ocean paleo-pH. *Earth and Planetary Science Letters*, 414, p. 1–5, 2015. ISSN 0012821X. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.epsl.2015.01.006>.
- Noireaux, J., Mavromatis, V., Gaillardet, J., Schott, J., Montouillout, V., Louvat, P., Rollion-Bard, C., et Neuville, D. R. Crystallographic control on the boron isotope paleo-pH proxy. *Earth and*

- Planetary Science Letters*, 430, p. 398–407, 2015. ISSN 0012821X. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.epsl.2015.07.063>.
- Owen, BENTON BROOKS et King, EDWARD J. The Effect of Sodium Chloride upon the Ionization of Boric Acid at Various Temperatures. *Journal of the American Chemical Society*, 65(5), p. 1612 – 1620, 1942.
- Palmer, M R, Spivack, A J, et Sciences, Planetary. Temperature and pH controls over isotopic fractionation during adsorption of boron on marine clay. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51, p. 2319–2323, 1987.
- Poulton, Alex J, Young, Jeremy R, Bates, Nicholas R, et Balch, William M. Biometry of detached *Emiliania huxleyi* coccoliths along the Patagonian Shelf. *Marine Ecology Progress Series*, 443, p. 1–17, 2011. ISSN 01718630.
- Prahl. Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone compositions for palaeotemperature assessment. *Nature*, 329, p. 855–857, 1987.
- Rae, James W B, Foster, Gavin L, Schmidt, Daniela N, et Elliott, Tim. Boron isotopes and B/Ca in benthic foraminifera : Proxies for the deep ocean carbonate system. *Earth and Planetary Science Letters*, 302(3-4), p. 403–413, 2011.
- Rae, James WB. Boron isotopes in foraminifera : Systematics, biomineralisation, and CO<sub>2</sub> reconstruction. Dans *Boron Isotopes*, pages 107–143. Springer, 2018.
- Rajiv, Muniyappan, Viswanathan, Natrayasamy, et Meenakshi, Sankaran. Adsorption mechanism of hexavalent chromium removal using Amberlite IRA 743 resin. *Ion Exchange Letters*, 3(January), p. 25–35, 2010.
- Raven, John, Caldera, Ken, Elderfield, Harry, Hoegh-Guldberg, Ove, Liss, Peter, Riebesell, Ulf, Shepherd, John, Turley, Carol, Watson, Andrew, Heap, Richard, Banes, Robert, et Quinn, Rachel. *Ocean acidification due to increasing*. Numéro June. 2005. ISBN ISBN 0 85403 617 2. URL [www.royalsoc.ac.uk](http://www.royalsoc.ac.uk).
- Riebesell, U., Fabry, Vj J., Hansson, L, et Gattuso, Jean-Pierre. *Guide to Best Practices in Ocean Acidification Research and Data Reporting*. 2010. ISBN 9789279111181.
- Riebesell, Ulf et Zondervan, Ingrid. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO<sub>2</sub>. 407(September), p. 2–5, 2000.
- Rohm and Haas Company. Boron Removal Using Amberlite IRA743. Rapport technique, 2003.

- Rollion-Bard, C. et Erez, J. Intra-shell boron isotope ratios in the symbiont-bearing benthic foraminiferan *Amphistegina lobifera* : Implications for  $\delta^{11}\text{B}$  vital effects and paleo-pH reconstructions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(5), p. 1530–1536, 2010. ISSN 00167037.
- Rollion-Bard, Claire, Blamart, Dominique, Trebosc, Julien, Tricot, Grégory, Mussi, Alexandre, et Cuif, Jean Pierre. Boron isotopes as pH proxy : A new look at boron speciation in deep-sea corals using  $^{11}\text{B}$  MAS NMR and EELS. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(4), p. 1003–1012, 2011. ISSN 00167037.
- Rouco, Mónica, Branson, Oscar, Lebrato, Mario, et Iglesias-Rodríguez, M. Débora. The effect of nitrate and phosphate availability on *Emiliana huxleyi* (NZEH) physiology under different  $\text{CO}_2$  scenarios. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUN), p. 1–11, 2013. ISSN 1664302X.
- Sabine, Christopher L, Feely, Richard A, Gruber, Nicolas, Key, Robert M, Lee, Kitack, Bullister, John L, Wanninkhof, Rik, Wong, C S, Wallace, Douglas W R, Tilbrook, Bronte, Millero, Frank J, Peng, Tsung-hung, et Kozyr, Alexander. The Oceanic Sink for Anthropogenic  $\text{CO}_2$ . *Science*, 307, 2004.
- Sanyal, A, Bijma, J, Spero, H, et Lea, D W. Empirical relationship between pH and the boron isotopic composition of *Globigerinoides sacculifer* : Implication for the boron isotope paleo-pH proxy. *Paleoceanography*, 16(5), p. 515–519, 2001. ISSN 08838305.
- Sanyal, A., Nugent, M., Reeder, R. J., et Bijma, J. Seawater pH control on the boron isotopic composition of calcite : Evidence from inorganic calcite precipitation experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(9), p. 1551–1555, 2000. ISSN 00167037.
- Schiebel, Ralf. Planktic foraminiferal sedimentation and the marine calcite budget. *Global Biogeochemical Cycles*, 16(4), p. 3–13–21, 2002. ISSN 08866236. URL <http://doi.wiley.com/10.1029/2001GB001459>.
- Sheldon, R. W., Prakash, A., et Sutcliffe, W. H. The Size Distribution of Particles in the Ocean. *Limnology and Oceanography*, 17(3), p. 327–340, 1972. ISSN 00243590. URL <http://doi.wiley.com/10.4319/lo.1972.17.3.0327>.
- Shi, D, Xu, Y, et Morel, F M M. Effects of the pH /  $\text{pCO}_2$  control method on medium chemistry and phytoplankton growth. *Biogeosciences*, 6(7), p. 1199–1207, 2009. ISSN 17264170. URL <http://www.biogeosciences.net/6/1199/2009/bg-6-1199-2009.pdf>.
- Shutler, J. D., Land, P. E., Brown, C. W., Findlay, H. S., Donlon, C. J., Medland, M., Snooke, R., et Blackford, J. C. Coccolithophore surface distributions in the North Atlantic and their modulation of the air-sea flux of  $\text{CO}_2$  from 10 years of satellite Earth observation data. *Biogeosciences*, 10(4), p. 2699–2709, 2013. ISSN 17264189.

- Sicre, Marie Alexandrine, Jacob, Jérémy, Ezat, Ullah, Rousse, Sonia, Kissel, Catherine, Yiou, Pascal, Eiríksson, Jón, Knudsen, Karen Luise, Jansen, Eystein, et Turon, Jean Louis. Decadal variability of sea surface temperatures off North Iceland over the last 2000 years. *Earth and Planetary Science Letters*, 268(1-2), p. 137–142, 2008. ISSN 0012821X.
- Siegenthaler, U., Stocker, TF, Monnin, E, Luthi, D, Schwander, J, Stauffer, B, Raynaud, D, Barnola, JM, Fischer, H, Masson-Delmotte, V, et Jouzel, J. Stable Carbon Cycle-Climate Relationship During the Late Pleistocene. *Science*, 310(5752), p. 1313–1317, 2005. ISSN 0036-8075. URL [http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/310/5752/1313\\$%delimitter%026E30F\\$nhhttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1120130](http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/310/5752/1313$%delimitter%026E30F$nhhttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1120130).
- Simpson, James J et Zirino, Alberto. Biological control of pH in the peruvian coastal upwelling area. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 27(9), p. 733–743, 1980.
- Solomon, Susan. *Climate change 2007-the physical science basis : Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC*, volume 4. Cambridge University Press, 2007.
- Spivack, A. J. et Edmond, J. M. Boron isotope exchange between seawater and the oceanic crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51(5), p. 1033–1043, 1987. ISSN 00167037.
- Stocker, Thomas. *Climate change 2013 : the physical science basis : Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, 2014.
- Stoll, H. et Schrag, Daniel P. Coccolith Sr/Ca as a new indicator of coccolithophorid calcification and growth rate. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 1(5), 2000.
- Stoll, H. et Ziveri, P. Separation of monospecific and restricted coccolith assemblages from sediments using differential settling velocity. *Marine Micropaleontology*, 46(1), p. 209–221, 2002.
- Stoll, Heather, Langer, Gerald, Shimizu, Nobumichi, et Kanamaru, Kinuyo. B/Ca in coccoliths and relationship to calcification vesicle pH and dissolved inorganic carbon concentrations. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 80, p. 143–157, 2012. ISSN 00167037. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2011.12.003>.
- Suffrian, Kerstin, Schulz, Kai G, Gutowska, MA, Riebesell, Ulf, et Bleich, Markus. Cellular pH measurements in *emiliana huxleyi* reveal pronounced membrane proton permeability. *New Phytologist*, 190(3), p. 595–608, 2011.
- Sutton, Jill N., Liu, Yi-Wei, Ries, Justin B., Guillermic, Maxence, Ponzevera, Emmanuel, et Eagle, Robert A.  $\delta^{11}\text{b}$  as monitor of calcification site pH in marine cal-

- cifying organisms. *Biogeosciences Discussions*, (May), p. 1–34, 2017. ISSN 1810-6285. URL <http://www.biogeosciences-discuss.net/bg-2017-154/{%}5Cnhttps://www.biogeosciences-discuss.net/bg-2017-154/>.
- Tans, DP et Keeling, DR. Trends in atmospheric carbon dioxide. noaa/esrl; scripps institution of oceanography, 2014.
- Taylor, Alison R., Chrachri, Abdul, Wheeler, Glen, Goddard, Helen, et Brownlee, Colin. A voltage-gated H<sup>+</sup> channel underlying pH homeostasis in calcifying Coccolithophores. *PLoS Biology*, 9 (6), p. 1–14, 2011. ISSN 15449173.
- Thierstein, Hans R et Young, Jeremy R. *Coccolithophores : from molecular processes to global impact*. Springer Science & Business Media, 2013.
- Trotter, Julie, Montagna, Paolo, McCulloch, Malcolm, Silenzi, Sergio, Reynaud, Stéphanie, Mortimer, Graham, Martin, Sophie, Ferrier-Pagès, Christine, Gattuso, Jean-Pierre, et Rodolfo-Metalpa, Riccardo. Quantifying the pH ‘vital effect’ in the temperate zooxanthellate coral *Cladocora caespitosa* : Validation of the boron seawater pH proxy. *Earth and Planetary Science Letters*, 303(3), p. 163–173, 2011.
- Vengosh, Avner, Kolodny, Yehoshua, Starinsky, Abraham, Chivas, Allan R, et McCulloch, Malcolm T. Coprecipitation and isotopic fractionation of boron in modern biogenic carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55(10), p. 2901–2910, 1991.
- von Dassow, P., Díaz-Rosas, F., Bendif, E. M., Gaitán-Espitia, J.-D., Mella-Flores, D., Rokitta, S., John, U., et Torres, R. Overcalcified forms of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in high CO<sub>2</sub> waters are not pre-adapted to ocean acidification. *Biogeosciences Discussions*, 2017, p. 1–28, 2017. URL <https://www.biogeosciences-discuss.net/bg-2017-303/>.
- Weiss, R F. Carbon dioxide in water and seawater : The solubility of non-ideal gaz. *Marine Chemistry*, 2, p. 203–215, 1974.
- Westbroek, P, Young, JR, et Linschooten, K. Coccolith production (biomineralization) in the marine alga *emiliana huxleyi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 36(4), p. 368–373, 1989.
- Winter, A, Jordan-R. et Roth, P. H. *Coccolithophores*. Cambridge University Press, 1994.
- Young, J R, Geisen, Markus, Cros, Lluisa, Kleijne, a, Sprengel, Claudia, Probert, Ian, et Østergaard, J. A guide to extant coccolithophore taxonomy . *Journal of Nannoplankton Research*, (Special Issue 1), p. 125, 2003.
- Young, Jeremy R. Semi-automated morphometrics on coccoliths using imageJ, 2015.

- Yu, Jimin, Day, Jason, Greaves, Mervyn, et Elderfield, Henry. Determination of multiple element/calcium ratios in foraminiferal calcite by quadrupole ICP-MS. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 6(8), p. 1–9, 2005. ISSN 15252027.
- Yu, Jimin et Elderfield, Henry. Benthic foraminiferal B/Ca ratios reflect deep water carbonate saturation state. *Earth and Planetary Science Letters*, 258(1-2), p. 73–86, 2007. ISSN 0012821X.
- Zeebe, Richard E. Stable boron isotope fractionation between dissolved  $B(OH)_3$  and  $B(OH)_4^-$ . *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(11), p. 2753–2766, 2005. ISSN 00167037.
- Zeebe, Richard E. History of Seawater Carbonate Chemistry, Atmospheric  $CO_2$ , and Ocean Acidification. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 40(1), p. 141–165, 2012. ISSN 0084-6597. URL <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-earth-042711-105521>.
- Zeebe, Richard E et Caldeira, Ken. Close mass balance of long-term carbon fluxes from ice-core  $CO_2$  and ocean chemistry records. *Nature Geoscience*, 1(5), p. 312–315, 2008.
- Zeebe, Richard E et Wolf-gladrow, Dieter. Book review. *Journal of Marine Systems*, 36, p. 269–270, 2002.
- Ziveri, P, Stoll, H, Probert, I, Klaas, C, GEISEN, M, Ganssen, G, et Young, J. Stable isotope ‘vital effects’ in coccolith calcite. *Earth and Planetary Science Letters*, 210(1-2), p. 137–149, 2003.
- Ziveri, Patrizia, de Bernardi, Bianca, Baumann, Karl-Heinz, Stoll, Heather M, et Mortyn, P Graham. Sinking of coccolith carbonate and potential contribution to organic carbon ballasting in the deep ocean. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography*, 54(5), p. 659–675, 2007.
- Zondervan, I, Rost, B, et Riebesell, U. Effect of  $CO_2$  concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272(1), p. 55–70, 2002.



**Titre** Etude de la bio-calcification des coccolithophoridés dans un contexte d'acidification des océans - Calibrations de proxies (B/Ca et  $\delta^{11}B$ ) du pH dans les coccolithes

**Résumé** Environ 30% du dioxyde de carbone produit par des activités humaines est absorbé par l'océan menant à une diminution de pH d'eau de mer et de l'état de saturation de carbonate de calcium ( $CaCO_3$ ). La acidification des océans engendrera probablement de profonds changements dans les écosystèmes marins, en particulier chez les organismes marins calcifiants. Les coccolithophoridés produisent avec les foraminifères plus de 90% des carbonates pélagiques dans l'océan actuel. Les expériences de culture ont montré que la réponse des coccolithophoridés à l'acidification des océans varie au sein d'une même espèce ce qui complique l'estimation de l'impact global sur le cycle de carbone et des rétroactions sur le climat. En effet, la sensibilité des organismes et les réponses vis-à-vis de l'augmentation du  $CO_2$  dissous dans l'océan et donc de la diminution du pH de l'eau de mer sont différentes. Les conséquences de la calcification sur les coccolithophoridés sont encore très peu décrites et quantifiées. Les coccolithes sont formés à l'intérieur de la cellule dans une vésicule interne. Le pH à l'intérieur de cette vésicule est un paramètre central qui détermine la précipitation de la calcite et donc de la formation des coccolithes. Actuellement, le pH de la vésicule ne peut pas être précisément mesuré et c'est la mesure indirecte de paramètres géochimiques qui nous permet d'estimer ces processus. La capacité de réguler le pH de la vésicule vis-à-vis des changements du pH d'eau de mer permet la précipitation de calcite et détermine l'adaptation potentielle de certains coccolithophoridés à l'acidification des océans. Deux souches d'*E. huxleyi* ont été cultivées dans des cultures en batch dilués dans trois conditions pH différentes afin d'évaluer les modalités de réponse aux variations du pH de l'eau de mer. Des paramètres physiologiques incluant le taux de croissance, le POC et le PIC et ont été examinés, en parallèle aux mesures de B/Ca et  $\delta^{11}B$  dans la calcite des coccolithes pour progresser sur la compréhension de ces mécanismes intracellulaire et sur l'existence d'une relation entre ces paramètres et le pH pour évaluer le potentiel de l'isotopie du bore comme proxy du paleo-pH.

**Mots-clés** Acidification des océans, coccolithophoridés,  $\delta^{11}B$ , B/Ca, calcification

**Title** Bio-calcification of coccolithophores in Ocean Acidification context - Calibration of proxies (B/Ca and  $\delta^{11}B$ ) of pH in coccoliths.

**Abstract** About 30% of the carbon dioxide produced by human activities is absorbed by the ocean leading to a decrease of seawater pH and saturation state of calcium carbonate ( $CaCO_3$ ). The subsequent ocean acidification is likely to result in profound changes in marine ecosystems, in particular among the marine calcifiers. Coccolithophorides together with foraminifera produce more than 90% of the pelagic carbonate in the modern ocean. Culture experiments have shown that the response of coccolithophores to pH varies between and within species, thus complicating our understanding of the overall impact biological response on the carbon cycle and feedbacks on climate. Indeed, different sensitivities to increase dissolved  $CO_2$  and decrease seawater pH, and their consequences on calcification exist among coccolithophores, but they are still not fully described nor quantified. Calcareous coccoliths are formed inside the cell in an internal vesicle called the coccolith vesicle. The pH inside the coccolith vesicle would be a key parameter in determining calcite precipitation and therefore coccolith formation. Currently the coccolith vesicle pH cannot be accurately measured and thus estimates have to be based on indirect geochemical evidences. The capacity of the coccolith vesicle to regulate pH allowing for calcite precipitation could explain the resilience of some coccolithophores to ocean acidification. To further explore this hypothesis, two strains of *E. huxleyi* were grown in batch cultures under three different pH conditions to assess their response to changing seawater pH. Physiological parameters including growth rate, POC and PIC were examine, in addition to assessing changes in the vesicle pH by measuring B/Ca and  $\delta^{11}B$  in coccolith calcite and evaluate the potential of boron for paleo-pH reconstruction.

**Keywords** Ocean Acidification, coccolithophores,  $\delta^{11}B$ , B/Ca, calcification