



La biocalcification dans l'océan actuel à travers l'organisme modèle *Emiliana huxleyi*

Briac Le Vu

► To cite this version:

Briac Le Vu. La biocalcification dans l'océan actuel à travers l'organisme modèle *Emiliana huxleyi* : Quand la mer devient blanche. Océanographie. Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 2005. Français. NNT: . tel-02413831

HAL Id: tel-02413831

<https://theses.hal.science/tel-02413831>

Submitted on 16 Dec 2019

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

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

Université Paris VI – Pierre et Marie Curie

Thèse

Pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de l'Environnement d'Ile de France

Spécialité : **Océanographie**

Briac Le Vu

**La biocalcification dans l'océan actuel
à travers l'organisme modèle *Emiliana huxleyi***

Quand la mer devient blanche

Pr. Constant M.G. van den BERG	Directeur de thèse	(University of Liverpool, RU)
Dr. Diana RUIZ-PINO	Co-Directrice	(UPMC, Paris)

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2005

Jury composé de :

Pr. Marie-Christine MAUREL	Président du Jury	(UPMC, Paris)
Pr. Marta ESTRADA	Rapporteur	(CSIC, Espagne)
Pr. Luc BEAUFORT	Rapporteur	(CNRS, Aix en Provence)
Dr. Annick BRICAUD	Examineur	(CNRS, Villefranche)
Dr. Marie BOYE	Examineur	(CNRS, Brest)

Remerciements

Une thèse est une chance unique. Je remercie en tout premier lieu **Diana Ruiz Pino**, ma directrice de thèse à l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC), de m'avoir donné la chance de découvrir véritablement ce qu'est la science. Sa grande compétence en matière de biogéochimie m'ont permis de traiter ce sujet depuis l'échelle de la cellule vers l'échelle globale. Merci Diana pour ta disponibilité et ta confiance inconditionnelle en mon travail. Ton aide et ton soutien quotidiens m'ont permis de faire aboutir cette thèse. Cette thèse est l'expression de ce que tu as su m'apporter. Je te suis reconnaissant de m'avoir fait participer à des groupes de travail de niveau international à travers le programme IRONAGES (Iron Resources and Oceanic Nutrients : Advancement of Global Environment Simulations) et de m'avoir proposé un séjour chez mes cousins « grands-bretons ». Je tiens également à vivement remercier le professeur **Constant van den Berg**, mon directeur de thèse de l'Université de Liverpool, pour son soutien durant cette thèse et pour tout le savoir-faire qu'il a su me prodiguer concernant la délicate mesure de métaux en traces et de leur spéciation dans l'eau de mer. *Thank you Stan to have accomodated me as you accomodate all the students who come in your laboratory, with kindness and humanity.*

Une thèse se fait par l'apprentissage de l'acceptation des doutes et du partage des idées. Je remercie tout particulièrement Marie Christine Maurel, professeur à l'Institut Jacques Monod pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci, Mme Maurel pour votre patience et votre disponibilité lors de l'organisation de cette journée. Merci aux rapporteurs de ma thèse : Marta Estrada pour sa grande ouverture scientifique et sa contribution à faire de ma thèse une thèse honorable du point de vue écologique. Ses commentaires critiques et ses corrections ont enrichi mes connaissances de la physiologie d'*Emiliana huxleyi*. Merci à Luc Beaufort, pour son accessibilité et le grand intérêt qu'il a montré pour mes travaux. Ses questions durant ma soutenance ont grandement contribué à apprécier l'impact de ma thèse sous un jour nouveau : celui du paléocéan et des géochimistes. Merci aux examinatrices pour leur présence durant ma soutenance : Annick Bricaud pour ses commentaires et son esprit critique sur la partie de ma thèse traitant des images satellitaires ; Marie Boyé pour son investissement et les nombreuses remarques au sujet de la technique que j'ai développé pour mesurer la spéciation du fer. Leurs conseils me permettront d'approfondir la discussion pour les futures publications.

Une thèse constitue une expérience professionnelle. Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la chance d'avoir intégré le Laboratoire de Biogéochimie et Chimie Marines (LBCM), devenu le Laboratoire d'Océanographie et du Climat : Expérimentation et Applications Numériques (LOCEAN). Merci également à Hein de Baar pour m'avoir permis de participer au programme Européen IRONAGES. J'en profite pour remercier tous ceux qui m'ont financé pour que ces découvertes sur la « mer blanche » puissent avoir lieu : principalement l'Union Européenne (Contrat N° EVK2-CT-1999-00031), mais également l'UFR 924 de physique appliqué de l'UPMC et les fonds du LOCEAN qui m'ont donné un petit coup de pouce pour les deniers jours.

Une thèse est faite de rencontres inoubliables. Une infinie reconnaissance à mes frères de science et amis que sont Aurélien, Italo et Salem avec qui j'ai connu les joies du labeur scientifique. Notre cohésion nous a permis de ne pas couler alors même que le bateau prenait l'eau. Je garderais toujours cette solidarité comme un exemple de travail en équipe. Merci à vous trois d'avoir su, maintes fois, faire écho à mes interrogations. Sans vous cette expérience n'aurait pas été aussi inoubliable !

Une thèse est parfois faites de rencontres déterminantes. J'adresse un profond remerciement à ceux qui ont permis la rédaction de cette thèse en m'accueillant parmi eux et en me donnant un peu de leur force et de leur temps. Sans eux le climat de paix que nécessite une étape de rédaction n'aurait pas été possible au LOCEAN : Christine Provost toujours prête à faire le premier pas et qui a même été jusqu'à me faire une place dans son bureau ; Laurent Mortier pour son écoute et ses encouragements qui m'ont remonté le moral lors des moments difficiles ; Michel Crépon pour son optimisme et ses conseils avisés qui m'ont permis d'aller de l'avant lors des situations de conflits. Merci aussi à Véronique Garçon, Jean Claude Gascard et tout le comité de suivi pour qui la science est une question d'idées avant tout.

Une thèse est toujours un travail d'équipe. Je remercie, bien sur, les nombreuses personnes qui m'ont aidé à un moment ou un autre de ma thèse pour mes besoins techniques et logistiques. Un merci tout particulier à : Bernard Schauer, Joelle Fillaux et Anne Lorre pour leur temps et leurs conseils lors de l'achat de matériel ; M. Kees pour les clichés de mes cultures au microscope électronique ; Carmel Murphy pour avoir effectué les mesures de NO₃ ; Gabriel Billon pour les mesures de Calcium ; bien entendu Christian Brunet pour m'avoir sorti maintes fois de soucis informatiques ; merci enfin à Conrad Chapman, Damiano Monticelli, Luis Laglera et Doug Mackie pour m'avoir fait bénéficier de leur expérience en matière d'électrodes à mercure et initié aux subtilités de l'anglais de Liverpool. *See you men in June 2008 !* Je remercie aussi les personnes de l'administration pour leur disponibilité et leur amabilité : Annie Bacon et le secrétariat de l'UFR 924 ; le personnel du secrétariat du LOCEAN en particulier Dany Thomas de l'ex-LBCM ; enfin Paula Houghton du Laboratoire de Liverpool pour son flegme tout britannique en ce qui concernant les questions de remboursement.

Une thèse est avant tout faite de nombreuses rencontres et échanges scientifiques. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes collègues de l'ex-LBCM pour les discussions autour de mon sujet : Jeanne Laureillard, André Momzikoff, Nicolas Metzl, Ioanna Bouloubassi et Pierre Scribe. Cette thèse n'aurait pas été aussi enrichissante sans l'échange scientifique acquis au contact des membres d'IRONAGES : Christiane Lancelot et Bénédicte Pasquer, Dieter Wolf-Gladrow, Erik Buitenhuis, Julie Laroche et Olivier Aumont. Enfin, merci à ceux qui m'ont invité et ouvert la porte de leur laboratoire sans réserve : Jacques Giraudeau de l'université de Bordeaux pour m'avoir transmis un peu de ses connaissances en matière de reconnaissance des coccolithophoridés et impliqué dans ses recherches ; Chantal Billard et Aude Houdan de l'université de Caen pour m'avoir transmis un peu de leur savoir-faire en matière de biologie des coccolithophoridés et de leur mise en culture. Une pensée émue au souvenir des grands moments partagés avec tous ceux de l'école d'été SOLAS de 2003 à Cargèse (Corse). Merci en particulier à Corinne Le Quéré et Ray Najjar pour leur temps passé à me conseiller sur mon travail.

Cette thèse fut avant tout une aventure humaine intense. J'envoie mes plus chaleureuses pensées à ceux qui, extérieur à mon travail, ont à un moment ou un autre de ces cinq années partagé un peu de mon quotidien : merci à mes amis du Morbihan, de Paris, de Liverpool et d'ailleurs, à travers leur regard mon travail à pris un sens humain.

Enfin je ne remercierais jamais assez ceux qui ont cru en moi et m'ont supporté tout au long de cette période : parmi ceux non encore cités (la liste serait bien trop longue mais vous vous reconnaîtrez) j'embrasse tout particulièrement toute ma famille de Bretagne et des quatre coins de la France.

Last but not least, mes plus tendres sentiments vont à ma femme *Céline*, qui a partagé beaucoup de mes nuits blanches à corriger mes fautes d'orthographe, ou simplement à me soutenir. Nous savons à présent l'un et l'autre que nous allons entreprendre d'autres projets au moins de cette envergure avec un véritable bonheur.

À mon oncle Yves Moritz

Plan de la thèse

Introduction générale - p.9

Partie I – ECHELLE DE LA CELLULE

Chapitre 1 Qui est Ehux ? Sa stratégie de vie - **p.31**

Chapitre 2 Rôle des apports en fer sur les blooms d'*E. huxleyi* - **p.75**

Chapitre 3 La déplétion de NO₃, un facteur d'apparition de blooms
visibles par satellite - **p.129**

Partie II - ECHELLE DE L'OCEAN GLOBAL

Chapitre 4 Qu'est ce qu'un bloom ? Les prévoir - **p.173**

Références bibliographiques - p.199

Liste des tableaux et des figures - p.213

Liste sigles - p.215

Tables des matières - p.216

Annexe - p.219

Introduction générale

I. De l'importance du CaCO_3

A. Le CaCO_3 , acteur majeur du façonnage de notre planète

Le carbonate de calcium (CaCO_3) constitue un des composés fondamentaux impliqués dans la construction de notre planète. C'est un cristal très simple qui existe sous deux principales formes géométriques : trigonale (calcite) ou orthorombique (aragonite). La calcite tient son nom du mot grec *chalix*, signifiant « chaux », elle est le minéral le plus abondant de la terre, représentant 4% du poids de la croûte terrestre. La calcite se présente sous plus d'un millier de formes différentes et une de ses originalités est sa solubilité qui, contrairement à la majorité des cristaux, augmente avec une baisse de la température.

La précipitation de CaCO_3 remonterait à -3.5 milliards d'années, c'est-à-dire près d'1 milliard d'années après l'émergence de la vie. A ces époques anciennes, la précipitation de CaCO_3 devait être impossible spontanément à cause des conditions de sous-saturation en ions calcium [Ca^{2+}] de l'ordre de 10^{-6} M (Kempe et Kazmierczak, 1994), mais aurait pu être possible, en partie sous l'action d'organismes photosynthétiques, appelés stromatolithes (Walter, 1983). Ce phénomène, par son ampleur, aurait participé à un stockage du dioxyde de carbone (CO_2) fort dans l'atmosphère primitive et à la modification de la composition chimique des océans. Notamment pour l'océan une baisse de pH de 1.5 unités entre -4 et -1 milliard d'années a été estimée par Kempe et Kazmierczak, (1994). Ces modifications dans un paléocéan primitif, induites par la formation d'un grand réservoir de CaCO_3 , auraient permis le développement et le maintien de conditions propices à la vie (hypothèse du « soda ocean » proposée par Kempe et Degens, 1985).

Dans l'océan moderne (Ca^{+2} de 10^{-2} M), les conditions de sur-saturation de surface en CaCO_3 sont *a priori* propices à l'existence de sa précipitation chimique. Cependant, la précipitation du CaCO_3 dans l'océan depuis plus de 600 millions d'années est intrinsèquement liée à la vie, car celle-ci a lieu presque uniquement à travers le mécanisme de biocalcification (revue de Westbroeck *et al.* 1994). Ce contrôle biologique de la calcification se fait grâce à l'action de petits organismes marins qui se sont diversifiés au fil des âges, tels que des cyano-bactéries, du phytoplancton (coccolithophoridés), du zooplancton (foraminifères), mais aussi des organismes benthiques (coraux, éponges, vernaculaires). De nos jours, les traces de l'activité de ces petits organismes font partie intégrante du paysage, tel que les falaises calcaires (eg : Etretat en Normandie, France) issues des coccolithophoridés ou les récifs coralliens (eg : la grande barrière de corail d'Australie), témoins de l'ampleur colossale des forces géologiques mises en jeu à travers la précipitation du CaCO_3 . Le CaCO_3 est donc un composé unique qui relie la biologie à la géologie, et qui fait partie simultanément de 3 grands règnes : minéral (le cristal), végétal (coccolithophoridés) et animal (zooplancton, squelette des vertébrés).

Les raisons de l'apparition du CaCO_3 dans l'océan primitif et son utilité pour les organismes marins sont des questions qui restent ouvertes. Aujourd'hui, le CaCO_3 joue-t-il encore un rôle régulateur des conditions propices à la vie sur notre planète ?

Le CaCO_3 fait partie intégrante du cycle du carbone dont il constitue la partie inorganique solide. Le réservoir de CaCO_3 des couches géologiques ou plus généralement des roches carbonatées (Calcite et Dolomite), représente plus de 80% du cycle du carbone. Il est 5 fois plus important que le réservoir de carbone organique sous forme fossile (Fig. 0.1). Dans un système

équilibré les flux concernant le carbone inorganique sont de l'ordre de 0.2 GtC an^{-1} et sont équivalents aux flux entrant et sortant des autres réservoirs de carbone (volcanisme, biosphère continentale et océan). La particularité du carbone inorganique serait de fournir la majeure partie (85%) du carbone aux sédiments profonds (0.17 Gt an^{-1} ; Westbroeck *et al.* 1993), le plus important réservoir de carbone de l'océan. La participation de l'homme à ce cycle, par la libération du carbone fossile, dépasse ces flux naturels du CaCO_3 d'un facteur 10.

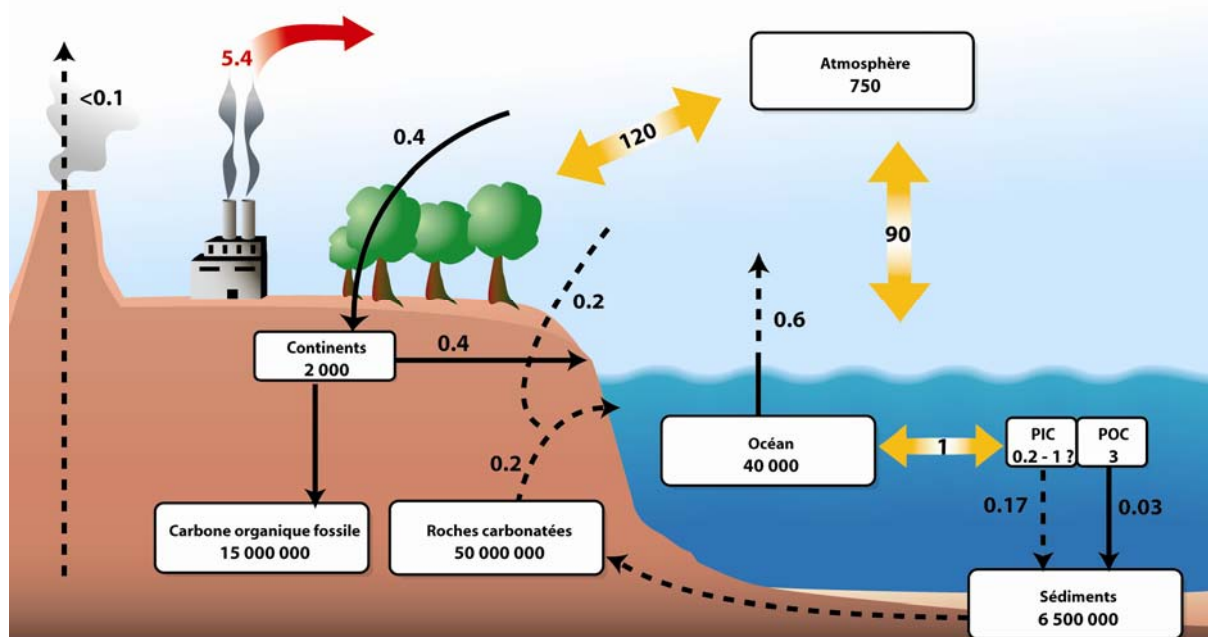


Figure 0.1 : Bilan global du carbone, incluant le CaCO_3 , adapté de Westbroeck *et al.* (1993). et de l'IPCC (2001). Réservoir en GtC et flux en continu en GtC an^{-1} . Les flux en pointillés concernent uniquement le CaCO_3 . Les flux doubles représentent les flux de carbone qui sont en équilibre à l'échelle de l'année (respiration-production végétale, échanges océan-atmosphère et échanges entre le carbone particulaire et dissous de l'océan). Le flux vers l'atmosphère en rouge représente la source annuelle due à la perturbation anthropique.

B. Le rôle du CaCO_3 océanique dans le climat

Le CaCO_3 océanique est un acteur majeur des conditions chimiques et biologiques régulant le climat de notre planète. Cette régulation est effectuée principalement à travers les interactions possibles et multiples entre le CaCO_3 et le CO_2 de l'atmosphère ($\text{CO}_{2\text{atm}}$), principal gaz à effet de serre. Le pouvoir d'absorption du CO_2 par les océans est fonction de nombreux paramètres : les facteurs hydrologiques (température et salinité) qui modifient la saturation du CO_2 en solution ; la circulation de masses d'eau (eg : remontées et formation d'eaux profondes) qui favorise les échanges entre l'océan de surface et l'océan profond. Enfin, la chimie du DIC, dite système des carbonates, modifie doublement le pouvoir d'absorption du CO_2 en surface, mais également dans l'océan profond. Ce système des carbonates dissous fonctionne comme un équilibre chimique des différentes formes du DIC, constituées à 90% par les bicarbonates (HCO_3^-), à 9% par les carbonates (CO_3^{2-}). Le CO_2 , seule forme de DIC échangée avec l'atmosphère, représente uniquement 1%. La production (ou précipitation en surface) et la dissolution (en profondeur) du CaCO_3 modifient cette chimie à cause de leurs interactions avec les trois formes de DIC. **La précipitation** d'1 mole de CaCO_3 en surface de l'océan absorbe 2 moles de HCO_3^- en échange d'une mole de CO_2 (cf. Eq. 0.1). Cette précipitation s'accompagne ainsi d'une baisse de 2 moles équivalentes d'alcalinité totale (AT), à cause de la charge négative du HCO_3^- qui intervient dans l'équation de formation du CaCO_3 . **La dissolution** du CaCO_3 produit l'effet inverse sur le

système des carbonates, diminue le CO_2 et augmente l'AT. Cette dissolution se produit dans des conditions de sous-saturation du CaCO_3 , qui dépendent des concentrations de $\text{CO}_3^{=}$ et de Ca^{2+} , mais également de la température, de la pression et surtout de la nature du CaCO_3 (aragonite ou calcite). Ces quatre paramètres conduisent à définir une profondeur vers 4000 m, appelée profondeur de compensation des carbonates (CDD), au-delà de laquelle le CaCO_3 se dissout.

L'importance de ces régulations du CaCO_3 océanique vis-à-vis du $\text{CO}_{2\text{atm}}$ avait été initialement proposée pour avancer dans la compréhension des changements climatiques aux échelles Glaciaires-Interglaciaires (10 milliers d'années). Elles sont résumées dans un modèle conceptuel adapté de Broecker et Peng (1982 ; Fig. 0.2).

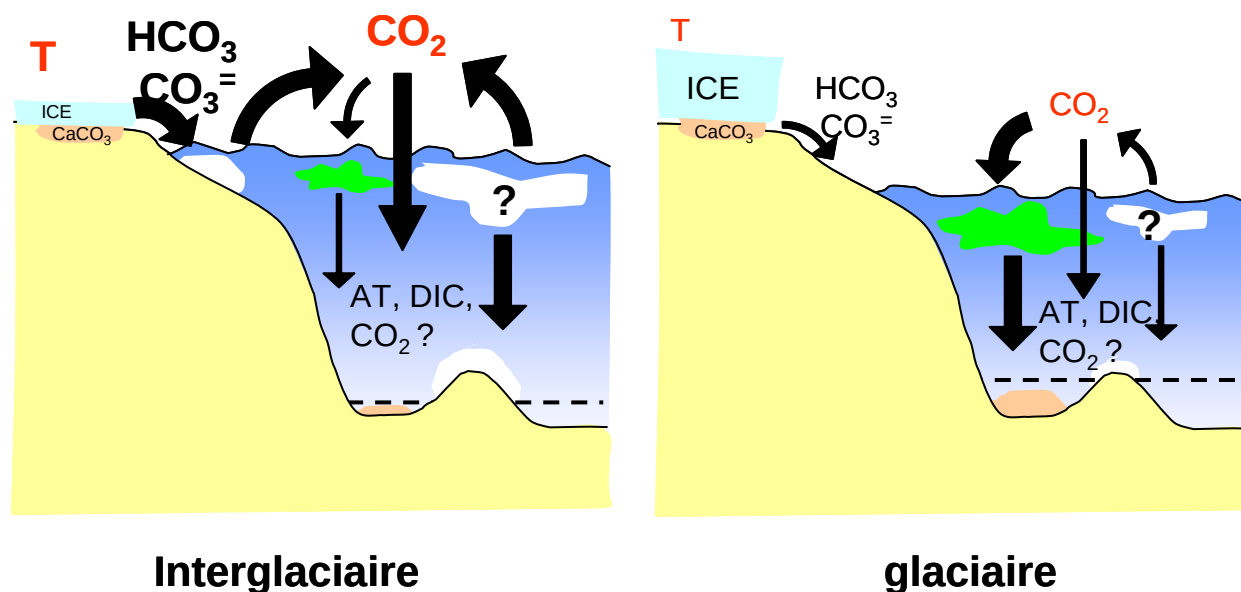


Figure 0.2 : Modèle conceptuel (non perturbé) Glaciaire-Interglaciaire

prenant en compte la modification du bilan des carbonates et des échanges de CO_2 entre les périodes Glaciaires-Interglaciaires (adapté de Broecker et Peng, 1982). Réservoir de carbone particulaire en blanc sous forme inorganique (CaCO_3) et en vert sous forme organique. En pointillés est définie la profondeur de la CDD. Les points d'interrogation définissent les évolutions n'étant pas connues.

Lors des époques glaciaires la température aurait été 6°C en moyenne plus faible (Petit *et al.* 1999) que celle des époques interglaciaires (tel que celle dans laquelle nous vivons au début de l'ère industrielle, 1800). Cette température serait due à un effet de serre réduit par des concentrations en CO_2 plus basses de 80 à 100 ppm par rapport aux époques chaudes (ou interglaciaires). Cela aurait induit directement ou indirectement une baisse du niveau des mers de 100 m (Lambeck, 1990) ; une dynamique de l'océan plus intense (avec par exemple des apports en nutritifs plus importants) ; des apports plus importants de poussières ou aérosols désertiques (en provenance par exemple du Sahara ou de Patagonie) ; une plus forte productivité primaire ; et un apport plus faible des carbonates et du calcium par les fleuves du à la formation de glaciers réduisant la surface des continents lessivés par les précipitations. Ce plus faible apport en provenance des continents aurait entraîné, en périodes glaciaires, une baisse des concentrations de calcium et de carbonates et donc de la préservation du CaCO_3 , principalement dans l'océan ouvert. Les traces dans les sédiments tendent à suggérer que le réservoir de CaCO_3 aurait été effectivement plus faible durant ces époques glaciaires (Francois *et al.* 1990). Mais, la quantité de CaCO_3 dissoute et donc la chimie des carbonates de l'océan profond, régulant le pouvoir d'absorption de l'océan profond vis-à-vis du CO_2 , reste inconnue. Cette quantité dissoute aurait été plus importante durant les époques glaciaires (puisque la dissolution était plus forte). Mais d'un autre côté, elle aurait pu être plus faible puisque la quantité CaCO_3 produite en surface aurait été réduite, notamment à cause d'un plateau continental plus réduit. Durant les époques interglaciaires, l'étude des sédiments marins et les

réécifs coralliens suggèrent une augmentation du réservoir de CaCO_3 avec une dominance de l'aragonite propre aux producteurs côtiers comme les coraux (Milliman, 1993). Les conditions d'AT mais aussi celles du DIC du passé ne sont pas connues. Les modifications du pouvoir d'absorption vis-à-vis du CO_2 de l'océan, dépendant à la fois de la production et de la précipitation du CaCO_3 associé à ces variations d'AT et de DIC, restent de grandes inconnues. La connaissance de la précipitation du CaCO_3 en surface et de sa dissolution dans l'océan moderne ouvert est une étape indispensable à la définition des conditions océaniques régulant le pompage (biologique et chimique) du $\text{CO}_{2\text{atm}}$ par l'océan. Ces conditions sont indispensables pour pouvoir remonter à une estimation comparative du rôle véritable de l'océan lors des climats passés. **Cet aspect inorganique du cycle du carbone est rarement pris en compte dans les modèles 3D incluant la vie marine et estimant le rôle de l'océan dans les évolutions climatiques (IPCC).**

C. Bilan et distribution du CaCO_3 dans l'océan

1^{ère} contradiction : La production exportée de CaCO_3 déduite de pièges à particules est inférieure à celle issue du bilan global d'alcalinité.

Diverses méthodes et types de données peuvent être utilisés pour estimer le flux global et analyser la distribution de CaCO_3 dans l'océan ouvert. Cette dernière, illustrée sur la figure 0.3, est différente selon le type de données utilisées. D'une part, les zones où les sédiments sont à dominance de CaCO_3 (Fig. 0.3a) suggèrent que cette production a lieu sous toutes les latitudes. Elle est concentrée autour des rifts océaniques et observée dans tous les océans, hormis dans le Pacifique Nord (Wollast, 1994). Par contre, le flux de CaCO_3 déterminé à partir des pièges à particules est le plus intense dans les régions d'upwelling de bord Est (Milliman, 1993). Certains modèles globaux de production de CaCO_3 simulent une production concentrée autour des régions des upwellings, mais également dans les régions subtropicales et tempérées (Moore *et al.* 2002 ; Fig. 0.3b). Ce type de modèles calibrés avec les données de pièges, reste en accord avec les informations fournies à échelle globale, par les pièges à particules (Milliman, 1993). Pour 0.13 GtC de carbone accumulé chaque année dans les sédiments profonds, Broecker et Peng (1982) et Wollast (1994) estiment, une production exportée de CaCO_3 à partir du bilan d'alcalinité à environ 0.78 GtC an⁻¹. Cette exportation calculée à partir du bilan d'AT actuel est 2 à 3 fois supérieure à celle estimée à partir de l'utilisation de la centaine de pièges existants actuellement et placés en général autour de 1000 m de profondeur (cf. synthèse par Milliman, 1993 et Broerse, 2000). Ces deux bilans proposent une production exportée de la couche de surface associée aux particules carbonatées d'environ 0.3 - 0.5 GtC an⁻¹.

Les causes des différences entre les flux du CaCO_3 sont liées aux incertitudes de chaque méthode et à la représentativité des différentes données utilisées. Dans cette étude ne seront pas analysées la totalité des sources d'incertitudes. Remarquons simplement que l'estimation de la production de CaCO_3 , à travers les pièges (Fig. 6 de Milliman, 1993) et les données dans les sédiments, souffre d'un sous-échantillonnage tant temporel que spatial. Ce sous-échantillonnage et la sous-représentation de certaines régions sont observables sur la figure de Milliman (Fig. 6, Milliman, 1993). C'est le cas par exemple de l'hémisphère sud, des régions oligotrophiques comme les gyres subtropicaux. Le calcul de la production exportée de la surface à partir des mesures dans les sédiments et des bilans d'alcalinité introduit également des incertitudes liées au manque de connaissances des mécanismes physico-chimiques et biologiques (cf. dissolution- Eq. 1.0) qui dans la colonne d'eau et dans les sédiments modifient le signal de préservation du CaCO_3 . Aux sédiments, d'autres processus spécifiques, comme la bioperturbation, peuvent modifier le signal et le calcul indirect du CaCO_3 formé à la surface de l'océan. Le CaCO_3 produit à la surface peut donc être affecté et varier d'un océan à un autre en fonction des conditions de saturation et de la qualité de la matière carbonée produite en surface (calcite ou aragonite et le type de matière organique et d'organismes planctoniques dominant).

La production de CaCO_3 dans la couche de surface à l'échelle globale a été estimée, à notre connaissance, uniquement à travers des modèles mathématiques et qui reposent sur des données du flux de CaCO_3 issues de pièges. Par exemple, ces modèles utilisent une dépendance de la production du CaCO_3 exclusivement à la température (Moore *et al.* 2002). Ce type de relation empirique ne prend pas en compte les processus de fabrication du CaCO_3 , dirigés par des effets physiologiques liés aux divers organismes responsables de la production du CaCO_3 (eg. coccolithophoridés, coraux, foraminifères). Ces relations empiriques ne peuvent donc pas être considérées comme une alternative robuste au manque de données sur le CaCO_3 de la colonne d'eau pour évaluer le bilan du CaCO_3 global, et/ou prédire l'évolution passée et future du CaCO_3 (sédiments ou récifs) due aux changements climatiques.

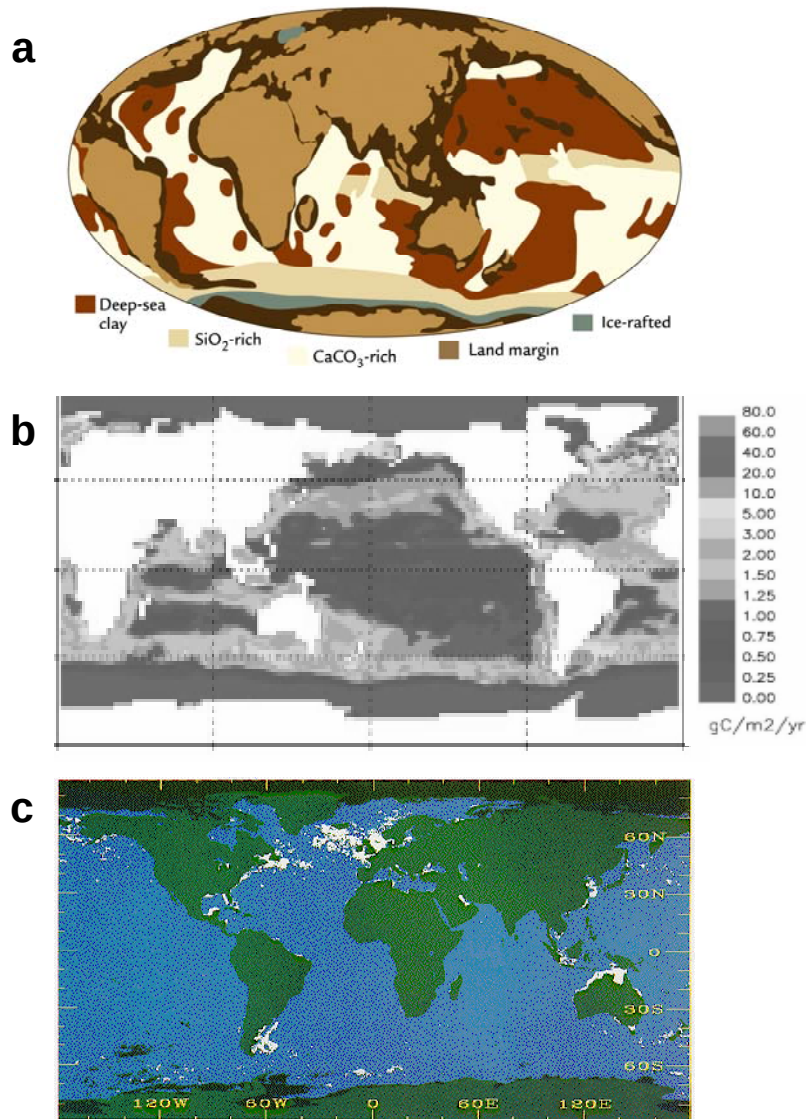


Figure 0.3 : Distribution du CaCO_3 dans les sédiments, par un modèle et par les satellites

a) Distribution par nature de sédiments ; b) exportation de CaCO_3 d'après le modèle de Moore *et al.* (2002) basé sur une relation de données de trappes et de la température ; c) distribution de la production des blooms de surface de coccolithophoridés d'après les images CZCS de 1979 à 1984 (Brown et Yoder 1994).

Pour avancer dans l'analyse de cette première contradiction, concernant le bilan du CaCO_3 global océanique, il serait nécessaire de pouvoir dissocier les processus biologiques (production), physiques (redistribution et sédimentation) et chimiques (dissolution) affectant les particules carbonatées dans la colonne d'eau. Nous proposons dans ce travail de thèse de nous focaliser sur le terme source de la production exportée de CaCO_3 dans l'océan ouvert, c'est-à-

dire les processus de formation de CaCO_3 dans la couche éclairée de surface de l'océan ouvert : la biocalcification pélagique.

D. La biocalcification, un processus océanique associé à divers organismes

Le processus de calcification dans l'océan moderne est un processus clé pour la compréhension des variations climatiques de notre planète. Mais, c'est également une force qui a joué, et qui joue probablement encore, un rôle géologique pour les équilibres biogéochimiques de la terre. La calcification est très complexe et existe actuellement presque uniquement à travers des mécanismes physiologiques liés à la vie marine, d'où son appellation de biocalcification. Malgré son importance dans le cycle du Carbone, la biocalcification a été relativement peu étudiée et reste peu connue (Synthèse sur la biocalcification ; Doumenge *et al.* 1994).

A la fin du Précambrien et au début du Cambrien, aux alentours de -600 millions d'années, bien avant l'apparition des organismes siliceux comme les diatomées (apparues au cours du jurassique vers -150 millions d'années, revue dans Amat, 2000), les organismes marins auraient développé un mécanisme leur permettant de s'adapter à une forte augmentation de la concentration de Ca^{2+} (jusqu'à 10^{-3} à 10^{-2} M) : la biocalcification (voir revue dans Kempe et Kazmierczak, 1994). Ce mécanisme aurait permis le contrôle dans le cytoplasme de la fixation du Ca^{2+} excédentaire ($>10^{-7}$ M), toxique pour l'activité métabolique normale des cellules, sous forme de CaCO_3 (Kazmierczak *et al.* 1985). Au Cambrien, la biocalcification aurait abouti, à l'événement majeur de la squelettisation (acquisition d'un squelette minéralisé) chez une grande variété d'organismes marins, comme les coraux, et plus récemment (-200 millions d'années) les coccolithophoridés. Dans l'océan actuel, les raisons du succès de ce mécanisme font l'objet de nombreuses hypothèses. La biocalcification aurait, par exemple permis de compenser le manque de CO_2 nécessaire à la photosynthèse durant les périodes chaudes grâce à la production de CO_2 lors de la précipitation de CaCO_3 . Il a été proposé également que la possession de tests calcaires des organismes calcifiants puisse constituer une protection contre les agressions physiques ou chimiques de l'environnement ou d'autres organismes comme les bactéries (cf. Kempe et Kazmierczak, 1994).

Le processus de biocalcification est une cristallisation canalisée par des enzymes inhibiteurs de la précipitation de CaCO_3 , (Berner *et al.* 1987). C'est un processus intracellulaire qui demande énormément d'énergie mais qui, en contrepartie, transforme des ions bicarbonates ou carbonates et produit du CO_2 directement utilisable par les cellules eutrophes. Cet avantage permet l'existence d'organismes symbiotiques (eg : symbiose entre des algues photosynthétiques et un animal) comme les coraux. Cette production de CaCO_3 serait donc intimement liée à l'environnement du système chimique des carbonates, mais également aux conditions qui perturbent la production de matière organique nécessaire au fonctionnement de la calcification. Par exemple, un fort couplage entre les processus de photosynthèse et de calcification a été proposé et discuté par Mc Connaughey (1994).

La prise en compte des aspects écologiques de la biocalcification est fondamentale. Les conditions environnementales diverses (température, luminosité, CO_2 , nutriments cf. §IIIB3) et biocalcification permettraient aux organismes associant la biocalcification de s'épanouir. Mais quels sont donc ces organismes ?

Les producteurs dans l'océan de CaCO_3 sont nombreux. Ils peuvent être côtiers (coraux), ou benthiques (éponges) ou encore pélagiques (foraminifères et coccolithophoridés). Les études de la production de CaCO_3 et de la contribution de chacun de ces types d'organisme à l'échelle de l'océan sont quasiment inexistantes. Peu d'études quantitatives sur l'abondance et la

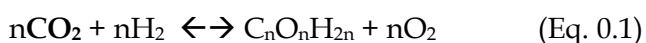
concentration de carbone particulaire organique (et de CaCO_3), existent dans la littérature sur les espèces fabriquant le CaCO_3 . Certaines études donnent parfois une proportion égale au zooplancton de la classe des foraminifères et aux coccolithophoridés (Atlantique Nord Ouest Subtropical ; Sprengel *et al.*, 2002). Le facteur biologique de cette production complexifie les mécanismes mis en jeu, puisque la production de CaCO_3 dépendra également du succès de ces divers organismes et de leur stratégie de vie face aux conditions environnementales. Compte tenu de la complexité associée à la diversité d'espèces capables de produire du CaCO_3 dans l'océan ouvert, une des voies les plus adaptées consiste à commencer cette démarche quantitative du bilan du CaCO_3 à partir d'un organisme marin *a priori* parmi les plus abondants et contribuant majoritairement à la formation du carbonate de calcium. Récemment, Amat (2000, dans son tableau 5.5) à travers une compilation de la distribution et de la production de CaCO_3 et de Carbone organique à l'échelle de l'organisme, estimait la proportion des différents organismes calcaires : les coccolithophoridés (28%), les foraminifères (22%) et les coraux (22%). Ces pourcentages se réfèrent au bilan de CaCO_3 global de 0.65 à 1.1 GtC an⁻¹ (Milliman, 1993 et Wollast, 1994). Les coccolithophoridés représenteraient une part importante de la biomasse à la fois inorganique (35%) et organique (22-29% ; cf. tableau 5.4 dans Amat 2000). Le carbone organique produit par les coccolithophoridés pourrait ainsi être similaire à celui du phytoplancton majoritaire des écosystèmes actuels et représenterait jusqu'à 40% de la productivité totale : les diatomées avec 1 GtC (Tréguer, comm. pers.). Ces bilans, bien que déterminés avec relativement peu de données (peu de données existent sur le CaCO_3 des différents organismes), suggèrent une participation fondamentale des coccolithophoridés au cycle pélagique du Carbone.

II. Les coccolithophoridés

A. Importance des coccolithophoridés

Nous avons choisi de focaliser cette étude sur la classe des nanoplanctons des coccolithophoridés de la famille des prymnésiophytes. La raison principale est, d'après les études de géologues (Wollast, 1994), que ce phytoplancton calcaire pourrait être un organisme clé pour une étude orientée vers l'amélioration de l'estimation du terme de production pélagique du CaCO_3 à échelle globale. Ce phytoplancton est par ailleurs réputé être le producteur majeur de calcite dans l'océan ouvert moderne (Berger, 1976) et confirmé récemment, tel que synthétisé dans le paragraphe précédent, d'après Amat (2000). Cependant, force est de constater (voir analyses antérieures dans §ID et §IIB) que la contribution des coccolithophoridés au cycle du carbone et du CaCO_3 a été très peu abordée dans la littérature et est par conséquent estimée avec des grandes incertitudes.

Par leur nature de producteur et de calcite et de carbone organique, l'ensemble des coccolithophoridés est à la fois puits et source de CO_2 . Ce double rôle, à la surface de l'océan, vis-à-vis du principal gaz à effet de serre, est une caractéristique unique comparée aux autres phytoplanctons. Le rôle du phytoplancton, est généralement considéré comme une «pompe biologique» à carbone ou puits exclusif de CO_2 , *via* le processus de photosynthèse (Eq. 0.1). Ce processus produit de l'oxygène (O_2) et de la matière organique carbonée à partir du CO_2 dissous dans l'eau de mer. Dans les cellules des coccolithophoridés, la photosynthèse est accompagnée du processus de calcification (Eq. 0.2) laquelle en fabriquant du CaCO_3 sous forme de calcite, à partir d'ions Ca^{2+} et des ions bicarbonates (HCO_3^-) libère simultanément du CO_2 dans l'eau.



Cette association d'absorption et de libération de CO₂ pourrait compenser du moins en partie le puits de CO₂ généré par la production de matière organique lorsque se développe un bloom de coccolithophoridés (Robertson *et al.* 1994, Buitenhuis *et al.* 2001). La présence de calcification constituerait alors une barrière à l'invasion du CO₂ atmosphérique par l'océan.

Les coccolithophoridés, à la fois source et puits de CO₂, seraient donc une composante fondamentale du puzzle de l'écosystème phytoplanctonique, de la pompe biologique à CO₂ de l'océan et de sa contrepompe liée au carbonates. Leur effet de rétroaction sur le CO₂ serait double et dépendant du poids de la photosynthèse et de la formation du POC par rapport au poids de la calcification et du PIC fabriqué.

A leur action double sur le CO₂, à la fois source et puits, propre aux coccolithophoridés, s'ajoute un effet sur l'albédo à travers un troisième processus d'action sur le climat. En tant que nanoplancton de la classe des prymnésiphytes comme *Phaeocystis spp.*, les coccolithophoridés participeraient à la production de diméthylsulfide (DMS). Ce DMS libéré dans l'atmosphère faciliterait la condensation des nuages et ainsi augmenterait l'albédo (Matrai et Keller, 1993). Cette production de DMS est donc un processus supplémentaire, en plus de la photosynthèse, à travers lequel les coccolithophoridés réduiraient l'effet de serre causé par le CO₂ et les autres composés atmosphériques. Cette possession de trois effets potentiels de rétroaction climatique des coccolithophoridés est une caractéristique unique pour le phytoplancton océanique.

Compte tenu de ces importants mécanismes et du réservoir carbonaté qu'ils représenteraient pour le cycle du carbone océanique, la réponse des coccolithophoridés aux changements climatiques anthropiques (ie. l'augmentation du CO₂) a commencé à être, durant la dernière décennie, une des préoccupations de la communauté océanographique. Les variations de la précipitation de CaCO₃ par les coccolithophoridés engendrées par une telle augmentation du CO₂, sont néanmoins contradictoires. Dans un premier scénario, la précipitation de CaCO₃ diminuerait de 12% à 19%, inhibée par la baisse de pH de 0.3 unité (Riebesell *et al.* 2000, Fig.0.4). Cette baisse de pH correspondrait à une concentration de CO₂ dans l'atmosphère future de 750 ppm, tel que proposée dans un des scénarios de l'IPCC pour l'an 2100. Selon d'autres hypothèses, la précipitation de CaCO₃ pourrait au contraire augmenter dans le futur, en raison d'une extension de l'habitat des coccolithophoridés, engendrée par l'augmentation globale de la stratification de l'océan (Broerse, 2000). Cette plus grande abondance des coccolithophoridés, prédite pour les décennies à venir, est supportée par des relevés sédimentaires qui suggèrent une plus grande abondance des coccolithophoridés lors des périodes chaudes ou interglaciaires (Francois *et al.* 1990).

De ces deux approches est déduite une autre contradiction :

2^{ème} contradiction : augmentation ou diminution de la précipitation de CaCO₃ global, conséquence de l'augmentation du CO₂ dans l'atmosphère d'origine anthropique, suivant si est considérée la stimulation de l'abondance des coccolithophoridés ou plutôt l'inhibition de leur calcification.

Enfin, l'étude de coccolithophoridés présente également divers intérêts du point de vue purement écologique. La compréhension de leur distribution et de leur variabilité dans l'océan peut nous aider à comprendre la dynamique des écosystèmes. De par sa diversité et son abondance, ce phytoplancton peut être en compétition avec de nombreuses autres espèces (dinoflagellés, diatomées, *Phaeocystis spp.*). La classe des coccolithophoridés est représentée par plus de 200 espèces connues (Winter et Siesser, 1994) qui sont réparties sous toute les latitudes et dans tous les océans, mais principalement sous les tropiques (Winter *et al.* 1994). Ainsi, en plus du lien direct avec le climat à travers le CO₂, la proportion, dans les sédiments, des différentes espèces de coccolithophoridés se présente comme un outil adapté aux reconstructions paléocéanographiques diverses. Les différentes espèces de coccolithophoridés se regroupent selon la physionomie de leurs coccolithes et coccosphères, ce qui leur confère un

intérêt écologique lié à l'adaptation des caractéristiques de cette coccosphère à l'environnement. Par exemple, certaines formes de coccolithes (eg. floriform) seraient plus adaptées pour diffracter la lumière et pourraient être majoritaires dans les zones tropicales (Young, 1994a). La compréhension des raisons de l'abondance de différentes espèces de coccolithophoridés dans les sédiments et océans modernes, peut aider à améliorer leur utilisation en tant que proxies du paléocéan, mais également, à aborder les raisons de leur apparition lointaine (200 millions d'années) et l'utilité du mécanisme mystérieux de biocalcification. L'effet de rétroaction du double rôle des coccolithophoridés vis-à-vis du CO_2 est à considérer dans un contexte de changement climatique associé à une augmentation du CO_2 , soit d'origine naturelle (eg : durant les dernières transitions Glaciaires-Interglaciaires) soit engendrée par les activités humaines. Force est de constater que le rôle explicite des coccolithophoridés n'est pas pris en compte actuellement dans les études du cycle du carbone océanique.

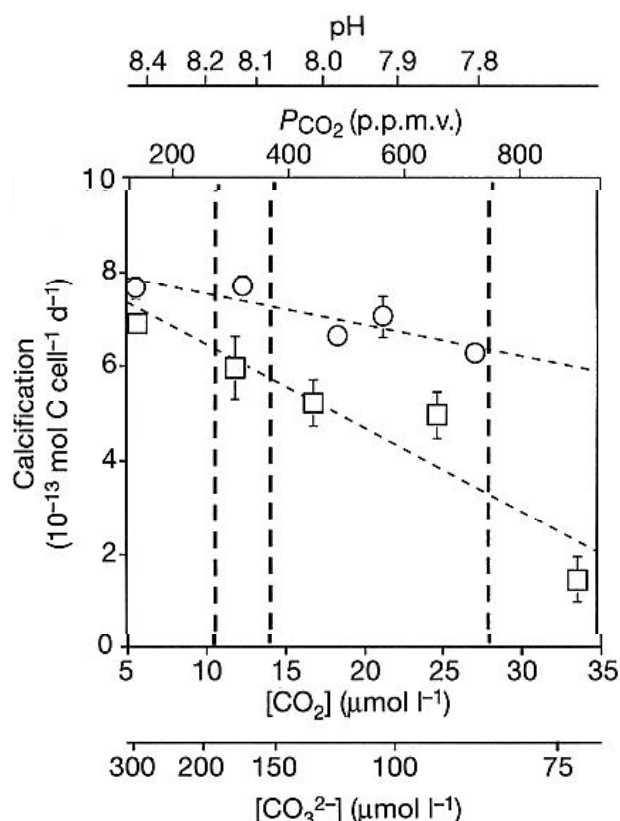


Figure 0.4 : Réduction de la calcification à l'augmentation de CO_2

Résultat des expériences en laboratoire de la réponse de la calcification des coccolithophoridés aux changements du CO_2 Glaciaires-Interglaciaires et anthropiques de l'ère industrielle (correspondant à la figure 1 de Riebesell *et al.*, 2000), entre un niveau interglaciaire (280 ppm) et une estimation du pCO_2 pour le siècle prochain (750 ppm). Les symboles carrés représentent la calcification de *Gephyrocapsa oceanica* et les ronds celle d'*Emiliana huxleyi*.

B. Contribution des coccolithophoridés au bilan de CaCO_3

La proportion que représentent les coccolithophoridés dans le bilan global de CaCO_3 n'est pas très bien connue. Ces organismes sont tout d'abord difficiles à échantillonner sur la totalité de la surface de l'océan. Les coccolithophoridés présentent l'avantage de pouvoir être documentés par différentes méthodes : carottages dans les sédiments (Fig. 0.3a), pièges à particules (Fig. 1.2a) ou données satellitales (Fig. 0.3c). Elles conduisent à des évaluations du bilan et à une distribution globale différente pour chaque méthode. Les données provenant des sédiments marins, nécessitent des approximations grossières (discutées précédemment dans le §IC) à cause, en particulier, de l'absence de différenciation des espèces de plancton dans les

sédiments. Dans un travail de synthèse récent, Broerse (2000), effectue le calcul de la participation des coccolithophoridés au bilan global à l'aide de la spéciation de cette classe dans 24 pièges à particules, répartis dans l'océan. Cet auteur conclut que le flux des coccolithophoridés correspond à une valeur de $56 \times 10^{-3} \text{ Gt an}^{-1}$, soit 19% du flux de CaCO_3 global de l'océan ouvert (de 0.29 GtC an^{-1} ; Milliman, 1993). L'estimation de la production globale que représente les coccolithophoridés, à partir des surfaces fournies par les satellites des blooms visibles estimés (ie. *Gephyrocapsa oceanica* et *Emiliania huxleyi*) grâce au premier satellite (CZCS, 1979-1985), a été complétée par une étude très critique sur cette distribution ($>50^\circ$; Brown et Yoder, 1994; Fig. 0.3c). La surface annuellement recouverte par ces blooms avait été estimée à 0.4% de la surface de l'océan global, soit $1.4 \times 10^6 \text{ km}^2$, pendant 30 jours. Une telle surface de blooms produirait une production annuelle de CaCO_3 de 0.6 à $1.5 \times 10^{-3} \text{ GtC an}^{-1}$, lorsque sont utilisées les estimations de production de PIC dans un bloom au Nord Ouest de l'Atlantique (Brown et Yoder, 1994) et dans la mer du Nord (Wal *et al.* 1995). La production de CaCO_3 durant ces blooms représenterait donc 0.5% du flux exporté de CaCO_3 . En combinant des études sur la concentration des cellules du coccolithophoridé d'*E. huxleyi* et sa biomasse, Amat (2000) estimerait par contre une production de 0.25 Gt an^{-1} soit près de 30% du CaCO_3 global produit. Le désaccord entre les résultats de ces trois méthodes, concernant la contribution de coccolithophoridés au bilan du CaCO_3 , peut être tout d'abord dû aux nombreuses hypothèses d'estimations des processus de production de CaCO_3 à l'échelle de la cellule (Tab. 3.2, Chap. 3). Enfin, les images des satellites se basent sur un signal ne représentant qu'une présence, à la surface (premiers mètres) de l'eau de mer, de particules de calcite, visibles uniquement lorsqu'elles sont fortement concentrées, et n'ont été appuyées par des observations adéquates sur le terrain uniquement sporadiques (Balch *et al.* 1991). Malgré sa diversité importante, la classe des coccolithophoridés peut être principalement représentée, en terme de CaCO_3 , par 4 ou 5 espèces qui dominent dans les pièges existants. Il s'agit de *Coccolithus pelagicus* et *Calcidiscus leptoporus* pour les hautes latitudes et *Gephyrocapsa oceanica* et *Gladiolithus flabellatus* pour les basses latitudes. L'espèce *E. huxleyi* est représentée sous toutes les latitudes et représenterait systématiquement une proportion notable en masse de CaCO_3 (8% en moyenne du CaCO_3 des coccolithophoridés) dans les pièges quelle que soit la région (Broerse, 2000). Cependant, cette espèce dominerait les assemblages en représentant en moyenne 70% du nombre total de coccolithes. Selon cet auteur, ces estimations de CaCO_3 , que représentent chaque espèce de coccolithophoridés, ont été réalisées à partir des pièges, presque dans leur totalité situés hors des épisodes de blooms visibles par satellites (Fig. 1.2a et b, Chap. 1), avec des durées de déploiement d'une année, et n'ont jusqu'à aujourd'hui permis de documenter que peu de zones de l'océan fortement productrices de CaCO_3 (6 pièges dans les hautes latitudes, cf. Fig. 1.1 dans Broerse, 2000).

Cette mésestimation serait due, premièrement, au fait que les distributions spatiales et temporelles de ces différentes espèces de coccolithophoridés sont quantitativement très peu connues (Winter *et al.* 1994). Deuxièmement, les études physiologiques et écologiques de ce phytoplancton calcifiant sont peu nombreuses, et par conséquent les causes de leur développement et de leur distribution dans l'océan actuel sont non connues (Holligan *et al.* 1993b). Afin d'améliorer la connaissance de la distribution des coccolithophoridés, leur variation dans le passé, ainsi que leur participation au cycle du carbone passé, présent et futur, de nombreux efforts ont été récemment soulignés par la communauté scientifique (CoccoCo conférence internationale, www.coccoco.ethz.ch). D'une part, la compréhension du cycle de vie des coccolithophoridés par des approches biologistes est une clé pour expliquer leur évolution ainsi que leur distribution. D'autre part, la méconnaissance des facteurs environnementaux déterminant leur distribution et production de POC et de PIC ne permet pas aujourd'hui de tenir compte de ce phytoplancton calcaire, de manière robuste, dans les modèles climatiques incluant le rôle de la biogéochimie

L'évaluation, à partir de données *in situ* représentatives, de la distribution des différentes espèces de coccolithophoridés à l'échelle globale, est fondamentale. Cette distribution, doit être connue en terme, non seulement de quantité de cellules, mais également de contribution à la fabrication de CaCO_3 . Un moyen de pallier le manque de données *in situ* peut être le développement d'un modèle mathématique, à l'échelle de la cellule du phytoplancton calcaire, auquel cette étude contribue (Chap. 1 ; base de données IRONAGES, www.nioz.nl). Un tel modèle devrait prendre en compte les liens avec les divers paramètres environnementaux perturbés lors de changements climatiques (eg. Température, couche de mélange, salinité, CO_2 , nutriments, chimie des métaux, scénario de l'IPCC, 2001). Pour développer un tel modèle quel coccolithophoridé choisir ?

III. *Emiliana huxleyi* : un coccolithophoridé modèle

A. De l'importance d'*Emiliana huxleyi* ?

Cette étude se focalisera sur le coccolithophoridé *Emiliana huxleyi* (Lohmann) que Hay et Molher décrivent pour la première fois en 1902, mais étudié du point de vue physiologique et de celui de sa distribution depuis seulement les années 60 (cf. Introduction, Chap. 1). Proche parent du coccolithophoridé *Gephyrocapsa oceanica*, *E. huxleyi* est jeune, âgé de seulement 278 000 ans (Thierstein *et al.* 1977) et domine les assemblages sédimentaires depuis les dernières 70 000 années (Bijma *et al.* 2001). *Emiliana huxleyi* se présente ainsi, comme un candidat idéal pour l'étude des coccolithophoridés dans l'océan moderne. De plus, en raison de ces propriétés optiques (cf. Chap. 4) et de sa capacité à former des blooms monospécifiques couvrant de grandes extensions (eg. supérieures à 10^5 km^2 dans l'Atlantique Nord, Fig. 4.1a) ce coccolithophoridé présente des propriétés qui facilitent sa détection dans l'océan. Les premières observations de ce phytoplancton avaient été fournies par des pêcheurs en océan Atlantique Nord (Westbroeck *et al.* 1993a). Le développement de grandes extensions ou « marées blanches » (white tide en anglais) visibles à l'œil nu, confèrent aux blooms d'*E. huxleyi* la possibilité d'être tout d'abord détectés, voire photographiés, depuis un bateau ou un avion (Berger, 1962). La figure 0.5b fournit un exemple de la couleur de l'eau blanche et brillante produite par un de ces blooms dans un fjord Norvégien.

Cette algue se présente sous la forme d'une sphère de quelques μm (Fig. 0.5a). Cette sphère appelée « coccosphère » est composée de plusieurs couches superposées de coccolithes ovales formés de CaCO_3 , sous la forme de calcite (cf. Fig. 1.1b, Chap. 1). Sous cette coccosphère se trouve une cellule eucaryote au sein de laquelle se produit la fabrication des coccolithes. La physiologie de ces cellules est complexifiée par la présence simultanée d'un réservoir carbonaté et organique. Il est connu aujourd'hui, par exemple, qu'une alternance dans le mécanisme de calcification d'*E. huxleyi*, lui permettrait de pouvoir être tour à tour une cellule calcifiante (C-cell), et une cellule nue (N-cell, sans coccosphère) ou flagellée (S-cell) (Klaveness, 1972). Ces changements seraient associés à un cycle de vie également complexe et relativement peu connu. D'après une synthèse récente (cf. CoccoCo conférence en 2002), il pourrait exister à l'intérieur de cette algue une alternance entre des phases de diploïdie (division cellulaire possible) et d'haploïdie (division cellulaire impossible). Le lecteur est renvoyé à la revue récente faisant état de l'art des particularités du cycle de vie d'*E. huxleyi* (Paasche, 2002).

L'étude d'*Emiliana huxleyi* présente des intérêts divers. Du point de vue climatique, l'intérêt d'*E. huxleyi* réside dans le fait que cette algue enferme en elle trois mécanismes de rétroaction possibles vis-à-vis du climat. Comme tous les coccolithophoridés, elle peut être à la fois puit (à travers la photosynthèse, Eq. 0.1) et source (à travers sa calcification, Eq. 0.2) de CO_2 . De plus, les blooms d'*E. huxleyi* seraient les événements majeurs par lesquels les coccolithophoridés

produisent également du DMS (Matrai et Keller, 1993). Déterminer et comprendre la distribution de cette algue et les processus qui, à l'échelle physiologique, interagissent avec les paramètres climatiques et environnementaux aidera, à plus long terme, à élaborer une stratégie adaptée à l'évaluation de ces trois effets possibles de rétroaction de la vie marine sur le climat. En plus de cette rétroaction possible sur le climat, *E. huxleyi* revêt également un intérêt pratique pour la reconstruction des conditions climatiques et paléocéanographiques à travers, par exemple, l'indice U_k^{37} des alkénones (traceur lipidique fabriqué par cette algue) présentant de nombreux avantages pour la reconstruction de la paléo-température (revue de Laws *et al.* 2001).

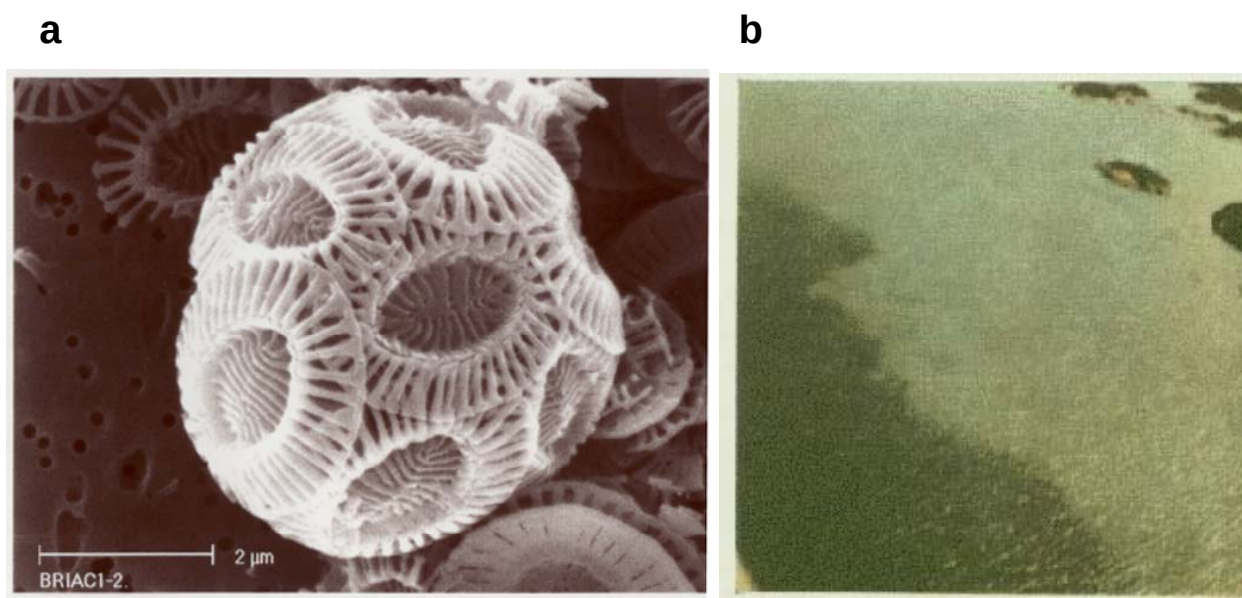


Figure 0.5 : Photos d'*Emiliania huxleyi*

(a) Photo au SEM d'une cellule d'*E. huxleyi* cultivée dans ce travail à Liverpool et prise par M. Kees. (b) Photo d'un bloom dans un fjord norvégien (vue d'avion ; Berge, 1962).

D'un point de vue écologique, *E. huxleyi* présente la spécificité d'être ubiquiste, c'est-à-dire de pouvoir grandir et être présent dans toutes les régions océaniques (voir la revue de Winter *et al.* 1994). Cette ubiquité fait de ce coccolithophoridé probablement l'organisme unicellulaire eucaryote le plus abondant de la planète (F. Morel, com. pers.). *Emiliania huxleyi* serait ainsi potentiellement une espèce représentative de chacun des régimes océaniques : oligotrophes et eutrophisés, allant des hautes latitudes aux régions tropicales et subtropicales. Enfin, *E. huxleyi* est présente dans la totalité de la couche lumineuse ou euphotique (de 0 à 200m ; Cortès *et al.* 2001). *Emiliania huxleyi* peut donc être considéré comme un phytoplancton à succès.

L'ubiquité d'*E. huxleyi* n'est pas la seule caractéristique qui reflète son succès dans l'océan moderne. C'est une des rares espèces de phytoplancton à parfois former des efflorescences (bloom) qui est une prolifération de cellules sur une grande étendue de manière abondante. Les situations de blooms pourraient produire les plus fortes biomasses carbonées de l'océan. L'étude de la distribution des blooms d'*E. huxleyi*, pourrait ainsi aider à mieux comprendre la stratégie de formation des blooms monospécifiques des écosystèmes océaniques en général (un des objectifs du programme IRONAGES, dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, à travers le développement d'un modèle d'écosystème ; de Baar et Veldhuis, 2005), tels ceux de diatomées, de *Phaeocystis* spp., de fixateurs d'azote comme *trichodesmium* et de dinoflagellés. *Emiliania huxleyi* dans les régions subpolaires par exemple, produirait des blooms en succession avec les diatomées (Tyrrell et Taylor, 1996). Cette succession d'espèces siliceuses (blooms de diatomées) au printemps et calcaires (coccolithophoridés) durant l'été dans l'océan actuel, offre l'opportunité d'étudier une succession, ayant probablement eu lieu lors de transitions Glaciaires-Interglaciaires.

A notre connaissance, en dehors du coccolithophoridé *Gephyrocapsa oceanica*, *E. huxleyi* est le seul coccolithophoridé capable de produire des blooms de grandes étendues visibles également par satellite. Cette détection est possible à travers la coloration blanchâtre principalement provoquée par le pouvoir de réflectance du contenu en calcite des coccolithes détachés ou libérés de la coccosphère (Holligan *et al.* 1983, Balch *et al.* 1991). Cette caractéristique qui conduit à une perturbation de l'eau de mer (par sa couleur mais aussi par son contenu en CaCO_3), concerne une grande surface de l'océan (ces signaux occupent $4 \times 10^6 \text{ km}^2$ dans l'atlantique nord et $6 \times 10^6 \text{ km}^2$ dans le sud ; cf. Fig. 4.1a et Tab. 4.1). La détection de la présence des blooms (tâches blanches) et l'étude de leur étendue et de leur variabilité à échelle globale ont pu être ainsi possible depuis les années 70 grâce aux données de satellites couleurs de l'océan (CZCS, Brown et Yoder, 1994 ; Fig. 0.3c et SeaWiFS depuis 1997, Fig. 4.1a).

Emiliana huxleyi posséderait donc une grande importance dans le cycle du carbone océanique, dans les interactions de la vie marine et du climat et dans l'étude écologique des blooms. Malgré cette importance potentielle, au démarrage de cette thèse, aucun modèle couplé océan-atmosphère (eg : modèles de l'IPSL, ou tous ceux utilisés pour les scénarios de l'IPCC) ne prend en compte le rôle d'*E. huxleyi*, ou d'un autre coccolithophoridé d'ailleurs, dans la réponse biologique à l'échelle de l'algue aux variations naturelles et anthropiques du CO_2 de l'atmosphère. Tel que Westbroeck *et al.* (1993) l'avaient proposé, *E. huxleyi* serait l'organisme par excellence dans l'océan actuel pouvant servir de champ d'investigation pour le développement d'un modèle mathématique à l'échelle cellulaire. En effet, un tel modèle serait l'outil adapté à la compréhension du fonctionnement de la vie marine et de ses liens avec les facteurs climatiques. Pour développer un tel modèle mathématique, il est indispensable de posséder une connaissance approfondie des divers processus physiologiques tel que la photosynthèse, la croissance, la calcification et les processus de perte (sédimentation, détachement de coccolithes) d'*E. huxleyi* (Chap. 1).

En plus de son ubiquité, de son abondance, et de sa qualité d'organisme modèle, *E. huxleyi* serait d'une excellente nature. Cela lui permettrait d'être relativement facile à être cultivée et maintenu en bonne santé longtemps en laboratoire (plusieurs dizaines d'années ; en France par le Laboratoire de Biologie et Biotechnologie Marines de l'Université de Caen, banque internationale de souches de coccolithophoridés du groupe Codenet). Ces particularités lui ont valu d'être utilisé initialement comme modèle de laboratoire pour les études descriptives de la structure des cellules calcifiantes (Klaveness, 1972). A partir des années 80, les études menées sur cette algue en laboratoire et sur sa physiologie ont progressé. Les données existantes de ce type de mécanismes physiologiques, qu'elles proviennent de laboratoires ou de mésocosmes (tel que nous le verrons par une synthèse de données existantes dans la littérature), vont être analysées pour tenter de construire un modèle mathématique de coccolithophoridé, en utilisant *E. huxleyi* comme un modèle de biocalcification (Chap. 1). La relative facilité d'*E. huxleyi* à être cultivé va nous permettre de mettre en œuvre des expériences nouvelles en conditions contrôlées (cultures en laboratoire) permettant d'avancer dans la compréhension du processus lui-même de biocalcification (Chap. 2 et 3).

B. La distribution d'*Emiliana huxleyi*

3^{ème} contradiction : Le CaCO_3 produit par *Emiliana huxleyi*, lorsque sont utilisées les données satellitales et celles des pièges à particules, conduit, à l'échelle de l'océan, à des valeurs et à une distribution différentes.

1. Où et quand se développe *Emiliania huxleyi* ?

Trois méthodes sont à notre disposition pour déterminer la distribution de cette algue : la biogéographie issue du comptage au microscope dans la couche de surface (identification et quantification du nombre de cellules), débutée à la fin des années 70 (voir review Winter *et al.* 1994) ; les données satellitales (restreintes à la couche supérieure de la surface, et que nous avons présenté au paragraphe précédent) ; et les données issues du comptage au microscope en provenance des pièges à particules (Broerse, 2000).

La distribution globale d'*E. huxleyi* représentée par le signal satellital (Fig. 0.3c), suggère qu'elle domine dans les régions tempérées et subpolaires des trois grands océans. Cette distribution est en accord avec celle issue de la biogéographie de l'océan Atlantique (Chap. 1 - Fig. 1.1a). La distribution globale de ces signaux blancs est similaire pour les deux satellites et les périodes existantes jusqu'à aujourd'hui, de 1979 à 1985 par le satellite CZCS (Brown and Yoder, 1994, Fig. 0.3c), et de 1997 à 1999 avec SeaWiFS (Iglesias-Rodriguez *et al.* 2002). Bien que la majorité des zones où apparaissent ces blooms suggèrent une intense présence d'*E. huxleyi*, ces signaux ont très rarement été corrélés à des données *in situ*, au cœur des blooms et correspondant à la période même du signal satellital. Cette distribution satellitale repose également sur l'hypothèse que les signaux blancs visibles détectés représenteraient systématiquement des blooms à l'apogée de la croissance d'*E. huxleyi*. Néanmoins, il est connu que le signal satellital est produit par les coccolithes libres (Holligan *et al.* 1983 ; Balch *et al.* 1991) ou détachés de la cellule en grande majorité et détectés grâce à leurs propriétés optiques d'absorption de la lumière. Ces signaux satellitales pourraient donc ne pas être nécessairement associés à un bloom de croissance de la population. Cette hypothèse est supportée par : (i) un nombre de coccolithes dans la couche de surface au minimum 10 fois supérieur au nombre de cellules (Balch *et al.* 1996 ; Fernandez *et al.* 1993) ; (ii) une fabrication de coccolithes par cellule découplée du processus de croissance et de calcification Paasche (1999). C'est cette hypothèse (1) que nous analyserons à la fois dans le chapitre 3 et dans le chapitre 4.

Hypothèse 1 : Les signaux visualisés par satellite, estimés être *Emiliania huxleyi* ne représenteraient pas des blooms dans le sens vivant ou production de CaCO_3

La distribution d'*E. huxleyi* dans la colonne d'eau montre un visage de sa distribution différent de celui fourni par les données satellitales. Les données *in situ* (Fig. 1.3) montrent qu'*E. huxleyi* peut être abondante non seulement en surface dans les régions des blooms visibles (Atlantique Nord, Holligan *et al.* 1993), mais également dans diverses autres régions : de l'équateur (Hagino *et al.* 2001) au cercle polaire antarctique (Eynaud *et al.* 1999) ; et en profondeur jusqu'à 200m tout le long de l'année dans les régions subtropicales (Hawaï, Cortès *et al.* 2001). La majorité de ces études sont qualitatives (proportion de cellules par rapport aux autres coccolithophoridés). Les observations *in situ* quantitatives, c'est-à-dire en terme de concentration de cellules, de coccolithes ou de PIC sont très peu nombreuses (cf. Fig. 1.3, Chap. 1 et Table 1 : *in situ* data, data base IRONAGES, www.nioz.nl). La production et la biomasse en terme de PIC et de POC n'ont été que rarement documentées, hormis pour les quelques zones de blooms documentées : celui de l'Atlantique Nord Ouest (Twonsend *et al.* 1994), Nord Est (Fernandez *et al.* 1993 ; Holligan *et al.* 1993), de la mer du Nord (Wal *et al.* 1995, Head *et al.* 1998) ou des fjords norvégiens (Kristiansen *et al.* 1994). Les données de terrain disponibles, sont-elles adaptées à l'évaluation à l'échelle globale de la distribution d'*Emiliania huxleyi* et de la production de CaCO_3 ?

2. *Emiliana huxleyi* et Bilan de CaCO_3 de l'océan ouvert

L'évaluation de la quantité de CaCO_3 produite par *E. huxleyi* montre une contradiction lorsque celle-ci est évaluée à partir de données satellitales et comparée à celle fournie par les pièges à particules. L'abondance d' *E. huxleyi* dans la production de CaCO_3 de l'océan estimée par des pièges à particules serait de 8% du CaCO_3 global des coccolithophoridés (Broerse, 2000), soit 4.35×10^{-3} GtC an⁻¹ (ie. soit plus de 1% de la production totale de CaCO_3 de l'océan ouvert ; cf. IIB). Les incertitudes sur l'évaluation de cette contribution d'*E. huxleyi* au bilan de CaCO_3 sont liées premièrement au sous-échantillonnage des pièges à particules (Fig. 1.1 de Broerse, 2000). En effet, cette estimation se base sur seulement 6 pièges répartis dans l'hémisphère Nord des différents océans, avec un échantillonnage discontinu dans le temps (Broerse, 2000). Cette production représenterait une production d'un facteur 3 plus forte que celle issue des blooms visibles d'*E. huxleyi*, estimée par satellite, qui représenterait jusqu'à 1.5×10^{-3} GtC an⁻¹ (cf. IIB).

La recherche de l'origine de cette contradiction révèle l'importance des incertitudes sur l'estimation de la contribution d'*E. huxleyi* à la production de CaCO_3 , et également remet en cause les méthodes utilisées. D'une part, malgré l'absence de déploiement de pièges durant les périodes de blooms visibles, la contribution d'*E. huxleyi* au flux de CaCO_3 pourrait atteindre jusqu'à 36% des coccolithophoridés comptés, soit une production de $1.37 \text{ gC m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ (station NABE-34 ; Broerse, 2000). Ce flux est du même ordre de grandeur, voire supérieur, au flux de CaCO_3 estimé durant le seul bloom visible d'*E. huxleyi*, et utilisé pour l'estimation de la production de CaCO_3 d'*Emiliana huxleyi* par les données satellites (Atlantique Nord Ouest ; Brown et Yoder, 1994). D'autre part, le flux de CaCO_3 durant un bloom visible peut encore être 2 à 3 fois supérieur avec un flux estimé de $3 \text{ gC m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ (eg. au sud de l'Iceland ; Holligan *et al.* 1993). Les flux importants relevés dans les pièges à particules en dehors des blooms visibles, ainsi que les incertitudes du flux calculé lors des blooms visibles, nous permettent de supposer que la participation d'*E. huxleyi* au CaCO_3 dont on dispose actuellement est sous-évaluée.

Cette espèce étant la seule visible par satellite il serait primordial pour une évaluation à échelle globale du CaCO_3 de connaître combien ce coccolithophoridé produit et comment son contenu en CaCO_3 varie. Pour cela il est indispensable à la fois d'utiliser les données du nouveau satellite SeaWiFS, couvrant toute la période des données récoltées (septembre 1997 à décembre 2004, Chap. 4), et permettant d'améliorer la compréhension de la production réelle de PIC dans la colonne d'eau. Cela peut être possible à travers des études conduisant à une meilleure compréhension du processus de biocalcification et de production des coccolithes fabriqués par *E. huxleyi* (Chap. 2 et 3). La synthèse à la fois des données de terrain (colonne d'eau) et de laboratoire concernant la totalité des processus physiologiques et des divers paramètres environnementaux qui affectent sa physiologie n'a pas, à notre connaissance, été effectuée. Cette synthèse est une étape indispensable pour une estimation plus robuste du poids d'*E. huxleyi* sur le CaCO_3 et pour l'analyse des incertitudes propres à chacune des méthodes utilisées.

3. Comment explique-t-on cette distribution d'*Emiliana huxleyi* ?

Le pourquoi d'une telle distribution d'*E. huxleyi* a fait l'objet de 2 études régionales (Atlantique Nord, Ackelson *et al.* 1989 ; Tyrrell et Taylor, 1996) et d'une autre très récente à échelle globale (Iglesias-Rodriguez *et al.* 2002) et de diverses expériences en batch cultures, chemostat ou en mésocosmes. De ces études, il en ressort, *premièrement*, que la **température** pourrait être un facteur important pour comprendre le succès de cette algue, tolérant des températures de 20°C (Paache, 1967), ou plus tempérées (8°-15°C ; Ackelson *et al.* 1989), et affectant probablement sa calcification (Watabé et Wilbur, 1966). Malgré l'importance du CO_2 dans les changements actuels, les conditions de **lumière** et de **stratification** fortes, ainsi que des concentrations en **phosphate** limitantes pour les autres phytoplanctons, constitueraient une

jonction de facteurs très avantageux pour *E. huxleyi*. Ce rôle potentiel de la luminosité et de la concentration en phosphates a été testé à travers un des premiers modèles mathématiques de croissance d'*E. huxleyi* et son application au bloom de l'Atlantique Nord (Tyrrell et Taylor, 1996). Pourtant les effets de la lumière sur la calcification, qui apparaissent à lumière faible parfois couplée (Paasche, 1963 ; Nimer et Merret, 1993), parfois découplée (Bleijswijk *et al.* 1994, Balch *et al.* 1992) à la photosynthèse, restent fortement incompris (Paasche, 2002). Il ressort, **deuxièmement**, que le CO₂, paramètre chimique d'importance majeure pour les changements climatiques peut affecter considérablement la calcification d'*E. huxleyi* et en déterminer ainsi la variabilité de sa distribution. Mais, les résultats des expériences en laboratoire concernant une augmentation du CO₂ sont contradictoires. D'un côté, un fort CO₂ (similaire à celui prévu par les scénarios de l'IPCC pour l'année 2100) inhiberait la calcification (Riebesell *et al.* 2000, Sciandra *et al.* 2003), d'un autre côté, l'augmentation du HCO₃⁻ (pas toujours associée à l'augmentation de CO₂), au contraire, stimulerait la calcification (Buitenhuis *et al.* 1999).

Des observations récentes confèrent un rôle possible aux nutriments (PO₄ et NO₃) sur la calcification. Nous focaliserons cette étude sur l'analyse de la variation, en particulier de deux paramètres chimiques, sur la croissance et les blooms d'*Emiliania* : un nutriment (les nitrates, NO₃) et un métal (le fer et sa spéciation), pour tester les 3 hypothèses proposées. Un stress en NO₃ (Paasche, 1998) ou en PO₄ (Bleijswijk *et al.* 1994), sur la croissance pourrait induire une stimulation sur le réservoir inorganique de ce coccolithophoridé. Les études sur le NO₃ montrent des effets divergents sur les réservoirs organiques et inorganiques. D'un côté, une seule expérience en laboratoire suggère qu'*E. huxleyi* est plutôt une espèce peu compétitive vis-à-vis des forts NO₃, limitée probablement par N et contrôlée par P (et non pas limité par P, Riegman *et al.* 1998, 2000). Cette cinétique (assimilation et besoins) des nutriments suggère que le succès de ce coccolithophoridé arriverait lorsque les NO₃ sont en excès par rapport au PO₄. L'effet de cette hypothétique limitation en NO₃ pour sa croissance reste à être compris et quantifié pour une gamme de NO₃ océanique. La limitation par les NO₃ dans l'évolution d'*E. huxleyi* est d'autant plus importante, qu'ils joueraient également un rôle sur le PIC/cell, en le stimulant (Paasche, 1998) ou en l'inhibant (Balch *et al.* 1992). Cet effet secondaire des faibles NO₃ sur la calcification, bien que suggéré, n'a pas encore été testé, les données de ces deux expériences étant produites en chemostat (Paasche, 1998) ou suggérées à partir d'un seul ajout de NO₃ (Balch *et al.* 1992). Quel effet produit une limitation de la croissance par les NO₃ sur la fabrication de blooms d'*E. huxleyi* et sur sa contribution au bilan de CaCO₃ ? Pour avancer dans la réponse à cette question nous partirons de l'hypothèse 2 dans la chapitre 3.

Hypothèse 2 : La limitation par les NO₃ contrôlerait le réservoir de PIC doublement, limitant les taux de croissance et de calcification
--

Les études récentes s'efforçant de démontrer l'effet des apports en fer artificiel sur la production océanique, n'ont pas démontré à ce jour, à notre connaissance, un effet positif sur les coccolithophoridés. Ces expériences de fertilisation artificielle ont été focalisées principalement sur la région Australe des océans, sud du front polaire (IronExII, Landry *et al.* 2000). Cette absence d'effet pourrait être dû au rôle d'un autre métal potentiellement limitant pour la croissance des coccolithophoridés tel que le cobalt (van den Berg, com. pers.), métal nécessaire à la croissance des coccolithophoridés (Sunda et Huntsman, 1995b). Néanmoins, d'autres observations appuient également l'hypothèse d'un rôle potentiel du fer sur les blooms d'*E. huxleyi*. Premièrement, les événements de blooms d'*E. huxleyi* détectés par satellite (Fig. 0.6a) seraient peu corrélés avec la concentration en fer de l'océan (Fig. 0.6b). Certaines régions de blooms visibles ne correspondent pas à des eaux riches en fer (Fig. 0.6b). C'est le cas par exemple du Pacifique Nord ou du sud de l'Océan Atlantique. Par contre, les apports de

poussières provenant des régions désertiques, comme la Patagonie ou le Sahara, sont caractérisés par une déposition annuelle intense de fer (Fig. 0.6c), et correspondent à des zones de blooms d'*E. huxleyi* détectées par les images satellitales (Fig. 0.6a)

Hypothèse 3 : Le fer en provenance des zones désertiques stimulerait l'extension des blooms d'*E. huxleyi* visibles par satellite et sa production en terme de PIC et de POC

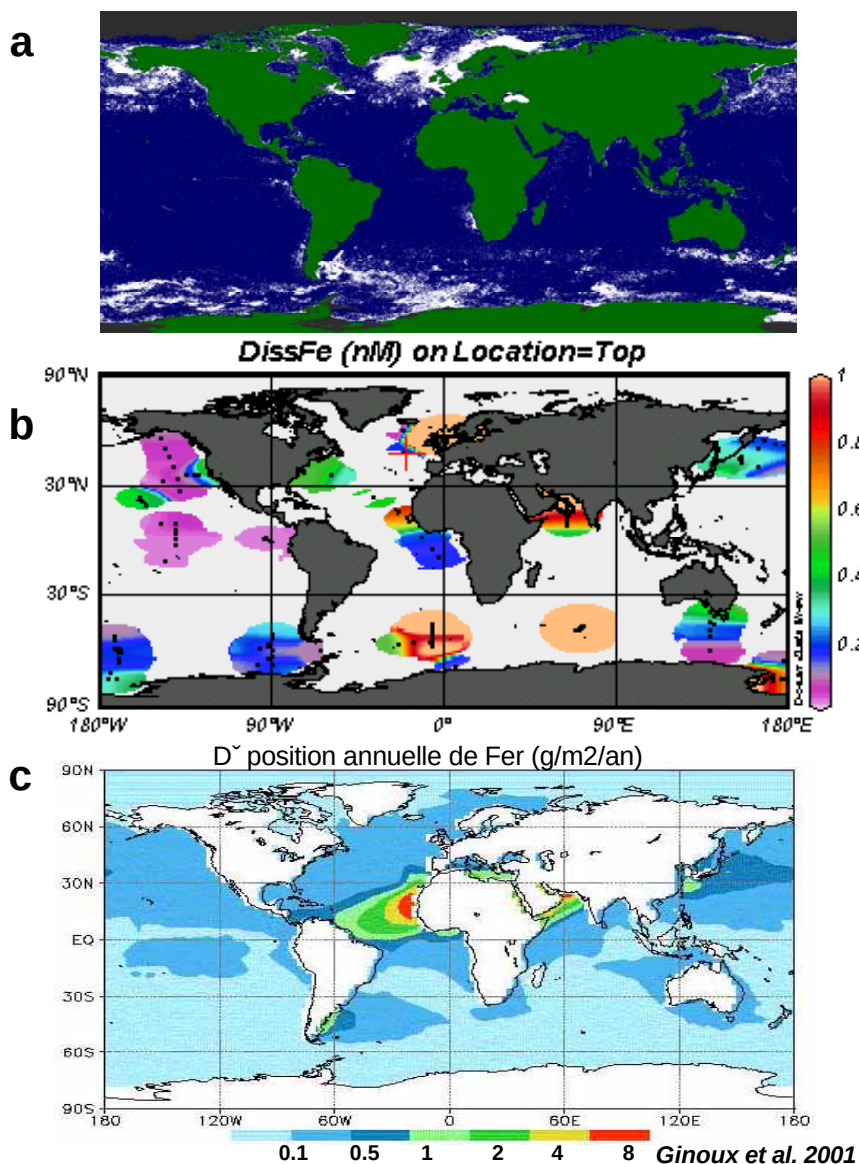


Figure 0.6 : Corrélation entre bloom d'*E. huxleyi* et apports de fer.

(a) SeaWiFS de 1997 à 2003 (Brown c.p.) de la présence des blooms visibles d'*E. huxleyi*; (b) distribution des concentrations de fer (Baar et Boyd, 1999); (c) apport simulés de poussière (Ginoux et al. 2001)

Les études en laboratoire de l'effet du fer sur *Emiliania huxleyi* sont peu nombreuses mais leurs conclusions s'accordent sur le fait que cette algue semble adaptée aux faibles concentrations en fer inorganique de l'ordre du 10 pM (faibles besoins en fer et une taille réduite lorsque le fer diminue; Sunda et Hunstman, 1995). Toutefois, la présence d'EDTA dans les expériences de Sunda et Hunstman ne permet pas d'étudier la stratégie de spéciation du fer.

Or, nous savons aujourd'hui avec « l'âge du fer » (Rue and Bruland, 1995), que l'important pour comprendre le rôle du fer sur le phytoplancton n'est pas seulement sa concentration totale mais principalement et surtout sa spéciation dont la biodisponibilité reste inconnue (Hutchins *et al.* 1999). Pour *E. huxleyi*, lorsque les expériences sont conduites en présence de fer organique dans la solution (spéciation du fer), celui-ci pourrait soit rendre *E. huxleyi* plus sensible aux apports simulés en laboratoire par des ajouts ponctuels de 1 nM (Boyé et Van Den Berg, 2000) soit inhiber sa croissance (Muggli et Harrison, 1996b). Ces contradictions, entre les deux seules expériences incluant la spéciation du fer, pourraient être dues à un protocole non adapté à la fois au maintien d'une chimie compliquée, celle de la spéciation du fer présent sous de multiples formes (fer total dissous -Fed- comprenant le fer inorganique oxydé Fe(III)- ou réduit -Fe(II)- et le fer organique -FeL- ; fer colloïdal, les oxydes de fer et les autres formes de fer inorganique ou organique particulière, Gerringa et al. 2000) ; et la bonne santé et la bonne calcification d'*E. huxleyi*. Effectivement la souche utilisée dans la seule étude, incluant la spéciation du fer organique dissous, de Boyé et van den Berg (2000) ne calcifiait pas normalement (Boyé, c.p.). Il apparaît donc indispensable de développer de nouveaux protocoles expérimentaux pour étudier simultanément le rôle du fer sur ce type d'organismes calcifiant et l'effet de rétroaction et la biodisponibilité du fer produit par leur bloom. C'est ce que nous ferons au chapitre 2.

A cet effet potentiel du fer sur la croissance s'ajoute un impact stimulant, mis en évidence rescemment (Schulz *et al.* 2004), de ce métal sur la calcification ou inhibant pour le PIC/cell (Muggli et Harison, 1997). Mais le fer utilisé, dans ces deux expériences était associé à de l'EDTA, il ne pouvait donc pas être identifié en tant que fer naturel et les résultats ne peuvent pas être extrapolés à l'océan qui ne contient pas d'EDTA. Pour déterminer l'effet du fer naturel (99% du fer naturel est organique et non détectable en présence de l'EDTA) sur la calcification en milieu naturel, de nouvelles expériences incluant la spéciation de fer avec des cellules calcifiantes apparaissent indispensables.

Objectif Général : Comprendre où, pourquoi et comment la mer devient blanche ?

Nous venons de voir dans l'introduction générale l'importance qu'aurait le phytoplancton calcaire (les coccolithophoridés) pour la production du CaCO_3 de l'océan pélagique. Cette thèse propose l'utilisation du coccolithophoridé *E. huxleyi*, comme organisme modèle pour à la fois l'amélioration de la compréhension du mécanisme de biocalcification et l'évaluation de sa contribution à échelle globale en terme de CaCO_3 .

Les objectifs généraux sont, pour *E. huxleyi* de : **(i)** déterminer et expliquer, sa distribution à l'échelle globale ; **(ii)** analyser les mécanismes physiologiques et leurs dépendances vis à vis de paramètres environnementaux qui, à l'échelle cellulaire, aideraient à comprendre son succès et la formation de grands blooms dans l'océan actuel. **Ce qui en d'autres mots revient à comprendre où, pourquoi et comment la mer devient blanche ?**

Ces objectifs s'inscrivent dans ceux de deux programmes. Un programme européen : Iron Resources and Oceanic Nutrients - Advancement of Global Environment Simulations

(IRONAGES⁽¹⁾ de 2000 à 2004 ; www.nioz.nl). A l'intérieur de ce programme notre étude avait comme rôle : **(i)** d'étudier les interactions entre le fer et *E. huxleyi*, **(ii)** d'apporter les connaissances nécessaires pour le développement d'un modèle mathématique en quota (eg. contenu particulaire en azote, en phosphore, en chlorophylle-*a* et en carbone inorganique par unité de carbone organique) pour les coccolithophoridés. Ce modèle est destiné à être inclus dans un modèle d'écosystème global qui prend en compte les autres espèces majoritaires de phytoplancton : diatomées, *Phaeocystis spp.*, *Trichodesmium spp.*, et le petit nano- et pico-plancton ; ainsi que la dépendance de leurs quotas en fonction de différents nutritifs (NO_3 , NH_4 , PO_4 et fer). Un programme national : ARGAU⁽²⁾ (PROOF- INSU 2000-2005), coopération avec l'Argentine pour l'étude de l'océan Atlantique Sud et de sa composante australe, pour lequel un des objectifs était d'étudier un des blooms de coccolithophoridés les plus intenses et des moins documentés, celui de l'océan Atlantique Sud Ouest ou de la Patagonie

Stratégie

Pour atteindre ces objectifs, cette thèse propose d'aborder une étude d'*E. huxleyi* à deux échelles, celle de la cellule (partie I) et celle de l'océan global et de l'écosystème (partie II)

L'échelle de la cellule sera étudiée à partir d'une synthèse des données de la littérature provenant des expériences en laboratoire : cultures en batch ou en chemostat et de mésocosmes (chapitre 1) et le développement de nouvelles expériences conduites en conditions entièrement contrôlées (batch cultures-chapitre 2 et 3). La synthèse des données de laboratoire permet la détermination des équations adaptées à la paramétrisation d'un modèle cellulaire en quota (voir IRONAGES sur le site www.nioz.nl) destinée à reproduire la distribution d'*E. huxleyi* à l'échelle globale. Pour les nouvelles expériences, qui présenteront l'étude du rôle du fer (chapitre 2) et le rôle des nitrates (chapitre 3) est défini un nouveau protocole expérimental. Ce protocole lie les contraintes biologiques (conditions axéniques) et les contraintes dues à la spéciation des métaux en trace comme le fer (conditions ultra propres et sans EDTA). La définition de la stratégie des expériences en conditions contrôlées se base sur l'analyse du manque de données mis en évidence à partir de la synthèse présentée au premier chapitre. Ces expériences ont la particularité d'être adaptées à la détermination de paramètres physiologiques à inclure dans un modèle mathématique d'*E. huxleyi* destiné à reproduire sa variabilité à l'échelle globale. Le protocole expérimental mis en place est commun aux études du fer et des nitrates et il est présenté de manière détaillée au chapitre 2 uniquement (cf. Chap. 2, §I). Pour l'étude de la spéciation du fer sur la biocalcification sont utilisés deux techniques analytiques : une pour la mesure du fer dissous total (Croot et Johansson, 2000) et une nouvelle méthode développée dans le cadre de cette thèse et présentée en annexe I et permettant la mesure des formes organiques de fer (FeL), adaptée aux faibles volumes d'eau (20 mL ; ie. 5 fois moindre que les techniques utilisées couramment ; cf. Croot et Johanson, 2000) et adaptée aux concentrations d'eau de mer de cultures en batch.

Une fois ces aspects physiologiques dégagés à l'échelle cellulaire, ils seront appliqués à l'échelle globale (Partie II) pour définir la niche écologique de ce coccolithophoridé. La niche écologique des blooms visibles par satellite sera définie (Chap. 4) et permettra d'entrevoir la véritable niche des blooms de production de CaCO_3 . La niche est définie à partir des résultats à l'échelle cellulaire de la partie I et elle est validée à échelle globale en utilisant des données

¹ : H. de Baar, Principal Investigator de ce programme. D. Ruiz Pino, Main Partner pour l'Université Paris 6 en charge des coccolithophoridés.

² : D. Ruiz-Pino, Principal Investigator pour l'UPMC. Laboratorio de Oceanica Dinamica et Servicio de Hidrologia Naval.

satellitaires (SeaWiFS, 1997-2004) et *in situ*. Les données *in situ* utilisées concernent : **(i)** *E. huxleyi* (sa présence et son abondance en terme de biomasse et de PIC) dont la synthèse a été effectuée dans le cadre de cette thèse (base de données IRONAGES, www.nioz.nl) ; **(ii)** les bases de données des paramètres environnementaux (température, salinité, nutriments ; World Atlas Ocean, 1998).

Cette stratégie a nécessité un travail qui s'est déroulé principalement au sein de deux laboratoires : Department of Earth and Ocean Science de l'Université de Liverpool (Prf. van den Berg, spécialiste de la mesure de la spéciation de métaux) et le LOCEAN de l'université de Paris VI (D. Ruiz-Pino, MC, UPCM) qui apportait son expertise sur le cycle du CO₂ dans l'océan et le rôle de la pompe biologique à carbone (différentes espèces de phytoplancton : diatomées, fixateurs d'azote) et sa modélisation mathématique. Enfin, ce laboratoire apportait son expérience sur la mise en place de protocoles expérimentaux d'organismes marins calcifiants comme les coraux (cf. thèse Amat 2000). Pour l'apprentissage de mise en culture d'*Emiliania huxleyi*, une coopération avec le Pr. C. Billard, du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, de l'Université de Caen, a été établie.

PARTIE I

ECHELLE DE LA CELLULE

Chapitre 1 : Qui est *Emiliana huxleyi* ? Sa stratégie de vie³

"Who" is *Emiliana huxleyi*? From a data synthesis to a growth quota model

LE VU Briac¹, Diana RUIZ-PINO¹.

¹ Laboratoire de Biogéochimie et Chimie Marines, case 134, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05.

Corresponding author: levu@ccr.jussieu.fr

Abstract

Emiliana huxleyi is an extremely cosmopolitan phytoplankton species, present in all but polar oceans. It reaches blooms (of 100×10^6 cell l^{-1}) in a few areas which can cover very large areas (10^5 km² in the North Atlantic Ocean). The importance of this marine calcifying phytoplankton is due to the significant environmental impacts of its blooms, via increased water albedo (reflectance), dimethyl sulfide (DMS) production, large fluxes of calcium carbonate out of the surface waters and changes in the oceanic uptake of CO₂. Associating photosynthesis and calcification, *E. huxleyi* is also used as a model for understanding both the bloom strategy for the main different phytoplankton species and the oceanic biocalcification process at the cell level. Which water conditions are most favourable for growth and blooms of *E. huxleyi*? Is it possible with the already published data to estimate parameter values allowing to constrain and to validate a quota model to simulate *E. huxleyi* global distribution? In an attempt to answer to these questions, a synthesis of more than 200 available publications concerning batch cultures, chemostats, mesocosms and in situ experiments is conducted in this study. Data from growth, photosynthesis, calcification, nutrient and iron uptake's kinetic, POC:PON:POP:PFe intracellular quotas, organic and inorganic carbon and chlorophyll-a contents and losses processes (detachment, grazing, respiration, sinking, dissolution and viral activity) in relation to physical (T, S, light) and chemical (NO₃, NH₄, PO₄, CO₂, iron) parameters are quantitatively compared. Reasons for observed differences and even contradictions between experimental data are also discussed. Finally, gaps were identified in the culture experiments allowing to perfect our current knowledge of *E. huxleyi* growth and calcification strategy. This work will contribute to a better understanding of the impact on the marine biota of the anthropogenically induced global change.

Introduction : Why include *Emiliana huxleyi* in an ecosystem model?

Emiliana huxleyi -*E. huxleyi*- (Lohmann), Hay and Molher (Lohmann, 1902), is an eukaryote and unicellular alga of small size (mean diameter 4 ± 1 μ m; Fig. 1.1a) of which the peripheral part is made up of calcite (calcium carbonate: CaCO₃). Placed in the division of the "haptophyta" and in the class of the prymnesiophyceae (cf. taxonomy review by Green and Jordan, 1994).

³ : Ce chapitre a fait l'objet d'une relecture interne au projet IRONAGES, par Wolf-Gladrow D., Le Quéré C., Lancelot C., Buitenhuis E. et La roche J. dans le cadre de la soumission d'une version raccourcie en décembre 2005 à la revue *Journal of Sea Research*, éditeur des autres synthèses du programme IRONAGES en 2005 (n°53).

Emiliania huxleyi is amongst the coccolithophorids and is considered as one of the most significant biocalcifiers of the open ocean (Westbroek *et al.*, 1993). *Emiliania huxleyi* is a relatively young algae, appeared only 278,000 years ago; the others coccolithophorids are 200 million years old. The relative abundance of *E. huxleyi* in the current ocean has been confirmed by its predominance in the "coccolithophorids assemblage" of marine sediments for 85,000 years (Thierstein *et al.*, 1977). Its internal and external structures show a high complexity of the *E. huxleyi* calcification and life cycle (eg: Klaveness, 1972; Westbroek *et al.*, 1984; Pienaar, 1994). *Emiliania huxleyi* can be permanently covered with 15 to a hundred calcite scales (coccoliths), which form the coccospheer. This coccospheer has a size proportional to the number of coccoliths, which accumulate around the cell (Fig. 1.1b). Coccoliths detach themselves from the coccospheer, particularly when the population is declining (end of the bloom). This "detachment" is an almost exclusive characteristic of *E. huxleyi*. (cf. II.F4).

Initially, interest in the study of *E. huxleyi* blooms was essentially due to its importance for paleoenvironmental and paleoceanographic reconstruction is recognized since 1954 (Bramlette and Riedel) and has increased with the discovery of alkenones (Brassell *et al.*, 1986) and their specificity with temperature (T).

The first coccolithophorid biogeographies of the Atlantic (McIntyre and Bé, 1967) and Pacific Northern Ocean (Okada and Honjo, 1973), revisited in 1994 by Winter *et al.*, based on number of cells and taxonomy, showed that: (i) their distribution is a function of the water masses (Fig. 1.2a) and environmental conditions, T and nutrients; (ii) The biggest species diversity is located in tropical and subtropical areas; (iii) *E. huxleyi* is the most ubiquist coccolithophorid, present in almost all the oceans except in the polar areas; (iv) *E. huxleyi* would be in abundance the dominating coccolithophorid in the Atlantic Ocean. Since these syntheses, sampling in South West Pacific (Findlay and Giraudeau, 2000) and Equatorial Pacific (Hagino *et al.* 2000) did not contradict this ubiquity. Deployment of particles traps evaluating the participation of coccolithophorids in CaCO_3 as well as the fixed points measuring the CaCO_3 are located almost exclusively in the Atlantic and North Pacific Ocean (fig. 1.2a). Flows from particles traps indicate a more important coccolithophorids abundance in the subtropics (Broerse, 2000).

In spite of its small size, *E. huxleyi* is known for the formation of great efflorescence making the surface of the ocean bright and whitish, observed for the first time by fishermen and yachtmen (Westbroek *et al.*, 1994a). Thanks to the optical properties of coccolith reflection it was possible to detect its blooms by satellite (Holligan *et al.*, 1983), to evaluate the surface of these blooms ($\sim 1.4 \times 10^6 \text{ km}^2$, ie. 0.4% of the world ocean; synthesis CZCS 1978-1986 -Brown and Yoder, 1994-) and to show that in spite of its presence almost everywhere, it produces blooms only in quite localised oceanic areas with a preference for temperate regions (eg: The North East and South West Atlantic, Fig. 1.2b). However, the signals known as "blooms" detected by the satellite imagery are due only to the "free or detached coccoliths" produced mainly at the end of the bloom (Balch *et al.*, 1991). The satellite signal appears when the cells are sufficiently calcified and leave a strong density of the free coccoliths at the surface water.

Various specific characteristics of this calcareous phytoplankton give to its blooms studies a major biogeochemical interest (review of Westbroek *et al.*, 1994b). *Emiliania huxleyi* is an organism gathering three major processes which impact the climate: photosynthesis, calcification and production of dimethylsulfoniopropionate -DMSP- (cf. review on haptophyte family: *E. huxleyi* and , Green and Leadbeater, 1994). Its blooms would contribute to an increase in the albedo through a significant emission of DMS (Matrai and Keller, 1993; Malin *et al.*, 1994) and to the atmospheric carbon dioxide ($\text{CO}_{2\text{atm}}$) variations (Robertson *et al.*, 1994; Crawford and Purdie, 1997). However, coupling photosynthesis and calcification, the role of this alga with respect to CO_2 can be double: source during calcification and sink through photosynthesis. The CaCO_3 precipitation by coccolithophorids is a significant mechanism in the comprehension of the atmospheric CO_2 increase during the glacial-interglacial climatic fluctuations (Berger, 1982;

Dymond and Lyle, 1985). But, the evaluation of CaCO_3 production through biocalcification is one of major uncertainties of 3D models aiming to predict the ocean role in the paleoclimatic variations of CO_2 (Archer, 1994; Archer *et al.*, 2000).

Concerning the present climatic perturbation associated to the atmospheric CO_2 increase, two different questions arise: **Will living coccolithophorids respond to the recent antropogenically induced global warming, and therefore, will changes in open ocean production induced by coccolithophorids have a (positive or negative) feedback on climate?**

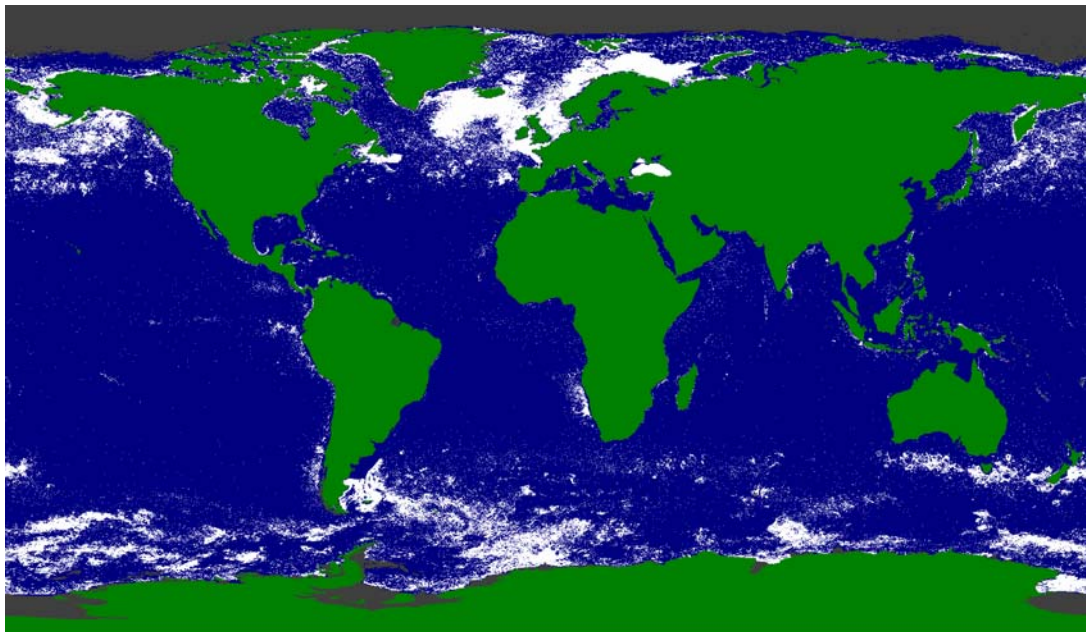
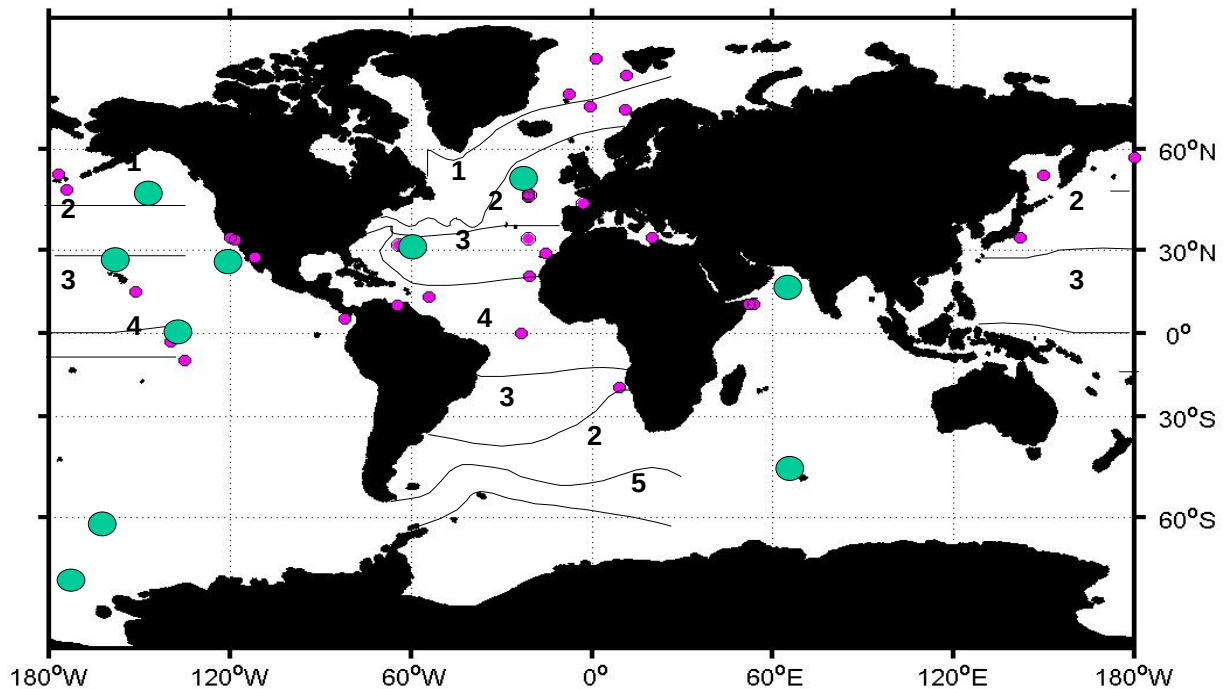


Figure 1.1 : Biogeography and blooms of coccolithophorids

a- Coccolithophorids biogeographic area (1: Subarctic, 2: Temperate, 3: Subtropical, 4: Tropical, 5: Subantarctic) in Atlantic and North Pacific Ocean from Winter *et al.* (1994) adapted from Okada and Honjo (1973) and McIntyre and Bé (1967) ; location available coccolithophores and CaCO_3 sediment traps data (pink dots, location from Ziveri and Broerse, 1997); and JGOFS long term station from Moore *et al.* (2002), Cortès *et al.* (2001), Haidar *et al.* (2001) and Ziveri *et al.* (1995). (green dots). b- Composites SeaWiFS global imagery of presumed *Emiliana huxleyi* surface bloom between 09/1997 and 09/2003 from Brown (c.p.).

The possible responses of coccolithophorids to a CO₂ increase diverge. In the first scenario, coccolithophorids will expand their habitat in response to global warming and CO₂ increase in the atmosphere (Buitenhuis *et al.*, 2001). However, Tyrrell (unpublished data) estimated that even a doubling in coccolithophorid abundance, will result in an insignificant addition of CO₂ to the atmosphere compared to industrial emissions. In a second scenario, coccolithophorid calcification will be disfavoured as a consequence of increasing CO₂ (Riebesell *et al.*, 2000; Zondervan, 2001). Here an increased CO₂ supply may lead to a response similar that of the coral (eg: review by Langdon, 2001). Coccolithophorid calcification, however, will probably be less affected than corals by an oceanic CO₂ increase, since their coccoliths are formed with low Mg-calcite minerals, which are less soluble than the high Mg-calcite and aragonite crystals produced by corals (Wollast, 1994). But, the global coccolithophorid biomass could change through modifications of other environmental parameters (such as T, stratification, nutrients...) due to climate change.

In spite of the importance of this calcareous phytoplankton, and various recent synthesis (eg: the strategy of *E. huxleyi* in mesocosms -Heimdal *et al.*, 1994-; the coccosphere role -Young, 1994a-; process of *E. huxleyi* blooms -Harris, 1996-; biology and physiology of the processes of calcification and photosynthesis -Paasche, 2002-), the factors determining its distribution and explaining the development of large blooms at the surface of the present ocean are still poorly known. A major role for phosphates (PO₄) was proposed as a key factor for the bloom development and modelled for the Norwegian fjord mesocosms (Aknes *et al.*, 1994) and for the North Atlantic Ocean (Tyrrell and Taylor, 1996). The effects of T on calcification on a global scale were also taken into account in a model coupling ecosystem-circulation and the carbon cycle (Moore *et al.*, 2002). We know a very little about the parameters responsible for the end of bloom (Egge and Heimdal, 1994; Bratbak *et al.*, 1996; Netjsgaard *et al.*, 1997) and about the role of coccolith detachment (Young, 1994a; Fritz, 1999). To be able to evaluate how various environmental and climatic parameters determine the *E. huxleyi* bloom distribution today, to evaluate its contribution in terms of CaCO₃ on a global scale and to predict its evolution and feedback effect for the past and future climate, a mathematical model at the cell level is essential (Westbroek *et al.*, 1994b).

The synthesis of Paasche (2002) is based on descriptive works of the *E. huxleyi* physiology. He details very well the laboratory knowledge about the life cycle transition between calcified (C-cell), no-calcified (N-cell) and flagellate (S-cell) form, the distribution and the characteristics of different morphotypes (A, B, C, R). He gives the state of the art about the response of the growth, the photosynthesis (P), the composition of the calcite around the cell (coccosphere) and the calcification (C) with environmental conditions (temperature, salinity, nutrients and light) and between the different clones used in laboratories (high and low calcified or from diverse origin). He discusses about the possible roles of the calcification and its interaction with photosynthesis in terms of the DIC, suggests the important processes for modelling and the direction of future experimental work to better understand the physiology and the mechanisms of calcification.

He reaches the following conclusions:

The type A is the most widespread morphotype and forming bloom in the North Atlantic. The morphotype, the origin and the life cycle of a cell have an influence on the specific growth rate, the life strategy, the chlorophyll-*a* (Chlo) and calcite content per cell and the calcification on photosynthesis ratio (C/P).

Emiliana huxleyi is a species typical of the rich areas with a high growth rate compared to the other coccolithophorids. The optimal temperature is around 20°C, but the range of adaptation is large from 1 to 30°C. The growth variations with temperature in the oceans are mostly due to the intraspecific characteristics of different strains and the salinity.

Emiliania huxleyi would be a weak competitor in front of NO_3 despite of its low half saturation constant ($0.2 \mu\text{M}$) and the use of organic nitrogen. It would be a very competitive in front of low PO_4 due to its possession of two alkaline phosphatases and it is not limited by low iron concentration due to its low requirement in comparison of coastal diatoms. *Ehux* needs also other trace element (like zinc and selenium) and some vitamins (thiamine but not vitamin B_{12}) to grow.

The competitiveness of *E. huxleyi* in the current ocean is explained by its low nutrient requirement but also its lack of photoinhibition and high saturation irradiance in comparison of the other dominating species (diatoms, dinoflagellates). The light saturation of the growth would decrease with the temperature. The photosynthesis is also regulated by the DIC but not the growth ($>1 \text{ mM}$).

It appears from the experiments and it is admitted in the current conceptual models that HCO_3 would be the carbon substrate used by the calcification. Like photosynthesis, calcification needs light, maybe for HCO_3 and Ca transport or the synthesis of organic compounds involved in the process. At the difference of the photosynthesis, the calcification shows a lower light saturation, would be stimulate in nutrients limited conditions, probably to dissipate the energy accumulate by cells and can occur during the night when cellule are not ready to be divided.

A coccolith, which form the coccosphere, is characterised by its structure and calcium content which are different for every morphotype of *E. huxleyi* and depend of the temperature, the salinity the light and nutrients limitation. Number of coccoliths, Ca content, volume and sinking rate. Role of coccosphere (probably not light protect or focus, nor advantageous after diatoms, may be grazing or virus protection, sinking regulation and “trash-can” to help photosynthesis).

The C/P ratio represents the part of CO_2 needs for photosynthesis provides by the precipitation of CaCO_3 . The remaining needs are provided by the utilisation of external CO_2 . The use of this external CO_2 is more important when salinity, temperature, pH or DIC decreases. When growth is limited by light, the calcification could sustain more efficiently the photosynthesis or less belong the experiments. Moreover these difference between experiments, the carbon needs for photosynthesis can be provided by the utilisation of HCO_3 , even at low C/P ratio, by the carbonic anhydrase. This enzyme has been detected at low DIC and low pH and when cell are in the last stage of growth (nutrient limited).

In order to evaluate the influence of *Ehux* on the C cycle in the long term, Paasche suggests to consider the particular following processes: the C/P ratio depending on the inherent population, the limitation by light (cell growing in the upper or lower part of the euphotic zone), the nutrient limitation, the respiration, the sink and the dissolution of coccoliths, coccospheres and organic matter in the euphotic layer. He suggests also that growth model should represent the influence of light on calcification, the calcification in the dark and the physiological heterogeneity in order to simulate a realistic bloom.

He points out the important studies to be focused on to better understand the physiology of *Ehux* and the calcification: the difference between strains based on genetic consideration; the influence of salinity on growth and calcification, which could be due to a competition between these two processes for the energy required to regulate the osmotic pressure inside the cell or the calcite production; the exact mechanisms of CO_2 entry and Ca and HCO_3 transport and their energetic cost, also the cost of organic compounds involved in the internal machinery of the calcification in order to explain the variation of the C/P ratio.

The construction of a model at the cellular level is often based on experimental results (cultures, mesocosms). Thanks to its facility to be maintained in culture, *E. huxleyi* is used since the 1960's (Paasche, 1962, 1964) to understand, the coccolithophorid functioning and life strategy. However, when the results of these experiments are compared quantitatively,

significant differences and even sometimes contradictions (cf. IIIA1) appear, which can be due to the culturing device and experimentation strategy (Paasche, 2002). To be able to choose among the various available experimental results those adapted to the *E. huxleyi* growth model parametrisations, it is necessary to understand the origin of these differences. In this work, the published data (from batch cultures, chemostat, cyclostat, mesocosms and *in situ*) are analysed having in mind to build and validate a quota model at the cell level allowing to simulate the *E. huxleyi* blooms and distribution in the present ocean. The quantitative comparison of results coming from controlled conditions experiment and mesocosms will focus on two main aspects: i) on the processes already taken into account for other algae (eg: diatoms) in the quota model at the cell level SWAMCO "Sea Water Microbial Community model" (Lancelot *et al.*, 2000); photosynthesis and respiration, growth rate (μ) dependence on T, quotas values (POC:PON:POP:PFe), nitrate (NO_3), PO_4 and dissolved iron (Fed) assimilation and losses terms (sinking, mortality and grazing); (ii) on physiological knowledge (eg: size, POC and Chlorophyll-*a* content variations, morphology, quota variability as a function of light (or Photon Flux Density -PFD-), T and nutrients; nutrients and Fe uptake's kinetic) and the variability of specific *E. huxleyi* processes (eg: calcification, coccoliths number and composition and their detachment) which while giving complementary information about life strategy and blooms will help to better constrain the mathematical model taking into account the physiology of this algae. iii) An inventory of available *in situ* information (sediment traps, satellite imagery, long time-series) allowing to describe *E. huxleyi* spatial and temporal distribution is also carried out. This *in situ* information could be used to validate a global carbon model including the coccolithophorids role. This synthesis allows us to analyse which are the environmental favourable or limiting conditions for *E. huxleyi* growth and calcification and to summarise "who" *E. huxleyi* is. Furthermore, hypotheses concerning *E. huxleyi* global distribution and bloom formation are also underlined.

In this synthesis several aspects will not be considered: the *E. huxleyi* composition in term of organic compounds (lipids, proteins and carbohydrates; Fernandez *et al.*, 1994, 1996a; Riebesell *et al.*, 2000b), specific pigments (fucoxanthin and its acyloxyed derivatives, Gieskes *et al.*, 1988, Jeffrey and Wright, 1994), alkenones (review carried out by Bijma *et al.*, 2001; Laws *et al.*, 2001), the DOC (Fernandez *et al.*, 1996b; Biddanda and Benner, 1997) and DMSP production (review carried out by Malin and Kirst, 1997; Simó, 2001), the life cycle and genetic aspects (recently reviewed by Paasche, 2002).

I. *Emiliana huxleyi* in the different oceans (global and blooms distribution)

The qualitative and quantitative description of the spatial and temporal distribution, as well as the intensity, not only of blooms but also of the *E. huxleyi* presence helps to constrain the equations used in a global model. Thus, *in situ* studies providing distribution data (number of cells, coccoliths, CaCO_3 known as PIC and calcification rate) are referred (www.nioz.nl).

The major bloom areas, observed by SeaWiFS (Fig. 1.2b) as well as CZCS, are: North Atlantic (south of Iceland Sea, North and Skaggeak Seas, fjords and Norwegian Sea, Barents Sea, Gulf of Maine), Black Sea, Bering Sea, South West Atlantic (along the Argentinean shelf and the Falkland Islands), Pacific Ocean between New Zealand and Tasmania, and North of the Antarctic Polar front in the three oceans (Atlantic, Pacific, Indian). The bloom situated south of Iceland, the most intensively studied, can cover a surface of 10^5 km^2 , last several weeks, reach concentrations of about $10 \times 10^6 \text{ cells/l}$ and been restricted between 50° and 70°N (Tyrrell and Taylor, 1996). Estimation of the global area covered by blooms seems to be higher with SeaWiFS (Fig. 1.1b) than CZCS (Brown and Yoder, 1994). If this changement reflects a real increase of coccolithophorids quantity or just differences between algorithms used by both satellites

remains an open question discussed in chapter 4I. No bloom is visible in the oligotrophic tropical ocean, in subtropical gyres and between 35°N and 35°S, except a few coastal regions (South Benguela and Antillas).

Emiliania huxleyi could be more abundant in middle spring in temperate regions and the Black Sea, during end of spring/beginning of summer in the Subpolar regions (eg: Iceland Sea, North of Polar Front) and in autumn at very high latitudes (eg: Barents Sea). This distribution could indicate an important role for light availability or temperature in the formation of blooms. Temporal variability as documented by satellite images has been validated by *in situ* data essentially in the North Atlantic (Armorican Shelf -Holligan *et al.* 1983-, Iceland Sea -Fernandez *et al.* 1993-, Gulfe of Maine -Twonsend *et al.* 1994-, North Sea -Head *et al.* 1998-, Norwegian Fjords -Kristiansen *et al.* 1994- and Norwegian Sea -Baumann *et al.* 2000-) and in the Southern hemisphere (South Africa -Mitchell-Innes and Winter, 1987-, South Benguela -Giraudeau and Goeffrey, 1995-, Argentina -Gayoso, 1995- and New Zealand -Rhodes *et al.* 1995-). Several satellite signals and conditions for formation and end of blooms remain however to be confirmed with *in situ* monitoring (eg: South West Atlantic, Barents Sea).

The available *in situ* data (Fig. 1.3) suggest that: (i) bloom density increases from low to high latitudes: low at the Equator (1×10^6 cells l^{-1} and 3×10^6 coccoliths l^{-1} -Hagino *et al.* 2000-), it is maximum in the Norwegian fjords (115×10^6 cells l^{-1} -Berge, 1962-) in August; (ii) temperate regions blooms density would be of the same order of magnitude (10×10^6 cells l^{-1}) and during the same period (end of spring) in the Northern (Holligan *et al.* 1993a et b) and Southern hemisphere (Rhodes *et al.* 1995); (iii) North Atlantic subpolar regions are documented with significant blooms in July (30×10^6 coccoliths l^{-1} , $3\,000 \times 10^6$ coccoliths l^{-1} -Fernandez *et al.* 1993- and a production of $0.27 \text{ pgC m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ -Brown and Yoder, 1994-), whereas under the same latitudes, but in the Southern Atlantic, no bloom has still been recorded (maximum measured: 0.6×10^6 cells l^{-1} -Gayoso, 1995-); (iv) *E. huxleyi* can be present all year round in the surface mixed layer (0-200m) in certain regions like the North Pacific (ALOHA, Cortés *et al.*, 2001) and the Sargasso Sea (BATS, Haidar *et al.*, 2001); (v) *E. huxleyi* sometimes presents larger concentrations at the subsurface (in both number of cells and content of calcite in Norwegian Fjords or South Western Atlantic; Kristiansen *et al.* 1994; Gayoso, 1995), and during certain periods such as autumn in Occidental Mediterranean Sea (Margalef, 1979); (vi) *E. huxleyi* is often predominant in phytoplankton blooms when diatoms are absent (Antilles, Winter, pers. comm.; North Atlantic, Fernandez *et al.*, 1993); (vii) the most intense *E. huxleyi* blooms (in density, concentration and size) develop after diatom spring blooms which are characteristic of temperate regions (Gulf of Maine -Balch *et al.*, 1991- and North Atlantic -Tyrrell and Taylor, 1996-); (viii) *E. huxleyi* is also present in high nutrient upwelling regions (eg: South Benguela -Giraudeau et Goeffrey, 1995-); (ix) a bloom in expansion is characterised by a high calcification rate and a low free coccoliths cell $^{-1}$ ratio (Fernandez *et al.* 1993), whereas an ending bloom present the opposite trends (Wal *et al.* 1995). The peak of subsurface is all the more important and less deep while going towards the high latitudes (cf. Fig. 1.3 and chapter 5).

The attempt to quantify the importance of coccolithophorids and *E. huxleyi* in the global CaCO_3 budget reveals contradictions : (i) whereas coccolithophorids are considered as the major open ocean calcareous phytoplankton by numerous works (Westbroek *et al.*, 1993; up to 50%, Sikes and Fabry, 1994), they could represent only 12 to 19% of the global CaCO_3 produced (as recently evaluated with data from 5 sediment traps and a synthesis of 18 other traps located mainly in the North hemisphere; Broerse, 2000); (ii) *E. huxleyi* blooms, estimated after satellite images, could represent $1.4 \times 10^{-3} \text{ GtC yr}^{-1}$ (CZCS; Brown and Yoder, 1994) and this value represents less than 0.2% of the global CaCO_3 production (0.64 GtC yr^{-1} ; Milliman, 1993); (iii) although *E. huxleyi* high contribution in number of coccoliths in the sediment traps (up to 70% in temperate and subtropical Atlantic regions), its low contribution (1% - 36%; Broerse, 2000) to the global open ocean CaCO_3 budget of coccolithophorids (from sediment traps) can be due

probably to the low CaCO_3 content of *E. huxleyi* coccoliths (cf. II.E). At these contradictions could be associated with the fact that no sediment deployed during *E. huxleyi* blooms were used for these budgets and that the relative abundance of coccolithophorids species, the cells and coccoliths numbers, their carbon and calcite contents are highly variable and depend also on environmental conditions (cf. II.E). To these two reasons should be added a carbon sedimentation dynamics which increases during *E. huxleyi* blooms (van der Wal *et al.*, 1995) and induces heavier faecal pellets containing coccoliths and a modification of the CaCO_3 :POC ratio with depth. To be able to clear up those contradictions, it is necessary to model the variations of organic and inorganic carbon, which represent not only *E. huxleyi* but probably also the other coccolithophorids at the global ocean scale.

II. Data description

A. Organic biomasses and quotas: a small species

1. Biomasses

E. huxleyi morphotype-A is a small size cell (from 2.5 to 4.5 μm in diameter), with low but highly variable POC and chlorophyll-a content per cell (POC/cell and Chlo/cell), ranging from 2.1 to 27.9 pgC cell^{-1} and from 20 (Riegman *et al.*, 1998) to 400 fgChlo cell^{-1} (Schofield *et al.*, 1990), respectively.

The **cell size** and **POC/cell** appeared to be positively correlated only with PFD, T and major nutrients variation, but negatively correlated with Fe' variation: an increase in diameter (of 1.5 μm) and POC/cell (by 5 pgC cell^{-1}) was observed for an eight-fold **PFD** increase (from 10 to 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), but both parameters reached saturation at PFD of 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bleijswijk *et al.*, 1994; Riegman *et al.*, 1998; Zondervan, 2001). A decrease in the cell volume (Kooijman *et al.*, 2001) was observed together with a 20% decrease of POC/cell (Bleijswijk *et al.*, 1994) when T increased by 5°C (from 10 to 15°C). During a major **PO_4 -stress** (as defined by $\text{PO}_4 < 0.1 \mu\text{M}$; Bleijswijk *et al.*, 1994), the cell diameter decreased by 20% and POC/cell by 30%. On the contrary, when the cell was grown under a **Fe' -stress** (Fe' decreases from 10 to 3 pM ; Sunda and Huntsman, 1995), POC/cell increase by 20% whilst cell volume decrease (by 20%). However, the results are far from being equivocal since **chemostat culture** experiments suggest that a **PO_4 -stress** could generate an increase of POC/cell (up to 50%) and a **NO_3 -stress** a decrease of this content (up to 30%; Riegman *et al.* 1998; Paasche, 1998), whereas **batch cultures** would indicate opposite variations (Bleijswijk *et al.* 1994; Fernandez *et al.* 1996b). These discrepancies could be due to the ability of *E. huxleyi* to synthesize and store higher amounts of neutral lipids during stationary growth (eg: chemostat) than during exponential growth (eg: batch, Fernandez *et al.*, 1996b). **These compounds may be linked to the cellular accumulation of carbon rich compounds**, as observed for *Phaeocystis* spp. grown under light and nutrients limitations (Lancelot and Mathot, 1985; Veldhuis *et al.*, 1986).

The Chlo by cell volume (**Chlo/CV**) variations depend also on the external parameters such as PFD, T , and the availability of major nutrients and Fe . These variations show a decrease of Chlo/CV by about 70% when the **daily light** (received in one day; noted DL in $\text{mol of photon m}^{-2} \text{day}^{-1}$ and $\text{DL} = \text{TL} \times \text{PFD}$) increases from 1 up to the saturation value of 20 $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (Paasche, 1967; Riegman *et al.*, 1998; Muggli and Harrison, 1996b); a decrease of 20% in average when T increases of 5°C (from 10 to 15°C; Paasche, 1967), and an increase of 2 mg ml^{-1} when Fe' decreases from 10 to 3 pM (Sunda and Huntsman, 1995). Moreover, a combined effect of Fe' and the **nitrogen (N) source** (NO_3 or ammonium $-\text{NH}_4-$) could also be observed on Chlo/CV since cells would maintain their Chlo/CV (as well as N, Fe, Mn and Cu) under strong Fe' -stress (ie.

Fed in presence of the EDTA chelators being < 0.8 nM) with being NO_3 the N source as a consequence of a drastic decrease of CV; this effect would not be observed when the source of N is NH_4 (Muggli and Harrison, 1996b).

2. Quotas

a. POC:PON

The nitrogen intracellular quota **POC:PON** varies widely between 5.3 and 34.2 mol mol⁻¹. This large range is the result of different experimental growth conditions regarding the calcified feature of the cells, T, light, nutrients and Fe. POC:PON reaches a maximum when Fe or NO_3 is the limiting factor of μ (Riegman *et al.* 1998, Sunda and Hunstman, 1995).

For type-A cells, POC:PON increases by about 10% at **PFD** of 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ when *T* increases from 10 to 15°C, but this quota does not vary with *T* at PFD of 8.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bleijswijk *et al.* 1994). The three studies on POC:PON variation as a function of PFD conducted so far under non-limiting nutrients (Fig. 1.4a), show that: (i) POC:PON is always lower than 7 mol mol⁻¹ at PFD $< 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; suggesting that this PFD may be the value from which the intracellular energetic reserves start to accumulate as carbon rich compounds (Riegman *et al.* 1998); (ii) POC:PON generally increases by 5 to 30% when PFD increases from 5 to 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with the latest value being the saturation PFD; (iii) POC:PON could decrease down to 20% with PFD increases from 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to a value lower as TL is higher (this value is between 200 and 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, or between 100 and 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, for TL of 18 or of 24 h d⁻¹, respectively; Nielsen, 1997). In addition to the light effect, **nutrients** and μ also play key roles on POC:PON. In **chemostat** with saturated PFD, it has been shown that POC:PON increases by 65% when cells are grown under NO_3 limiting conditions (25 μM) and by 55% under PO_4 limiting conditions (1 μM) while μ decreases from 0.6 to 0.15 day⁻¹ (Riegman *et al.* 1998). Moreover, in this study at high μ , the decrease of NO_3 (from 300 to 25 μM) does not modify the POC:PON unlike a decrease of PO_4 (from 25 to 1 μM) induces a POC:PON decrease by 13% (Riegman *et al.* 1998). In **batch cultures** with saturated PFD, under PO_4 limiting conditions ($< 0.1 \mu\text{M}$), POC:PON also increases by 15% when μ decreases from 0.8 to 0.45 day⁻¹ (Bleijswijk *et al.* 1994). The *Fe* effect on POC:PON has been studied so far in batch cultures under saturated PFD in presence of EDTA in combination with the effect of the **N source** (Muggli and Harrison, 1996b). This study has shown that: (i) with NO_3 , POC:PON increases by 70% when Fed (with EDTA) decreases from 100 to 0.8 nM, μ decreases in this case by 25%; (ii) with NH_4 , POC:PON increases by 40% when Fed (with EDTA) decreases from 100 to 0.8 nM, without modification of μ ; (iii) when μ is inhibited by Fe' limitation (Fed < 0.8 nM with EDTA), POC:PON is 14 mol mol⁻¹ with NO_3 , 25% higher than with NH_4 . A high POC:PON (10.8 mol mol⁻¹) features *E. huxleyi* blooms and would indicate a carbon accumulation as being mainly lipids. **Those low density compounds could greatly increase the residence time of *E. huxleyi* in surface waters** (Fernandez *et al.*, 1993).

b. POC:POP

The phosphorus intracellular quota **POC:POP** is given between 74 and 600 mol mol⁻¹. This large range of values could also be seen as the result of different light and nutrients growth conditions.

POC:POP is roughly minimum (< 100 mol mol⁻¹) under highly limiting **PFD** ($< 12.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Fig. 1.4b; Riegman *et al.* 1998) or when the cells turn-over is high ($\mu > 0.6$ day⁻¹). On the other hand, POC:POP is high (600 to 484 mol mol⁻¹) when the growth is limited by **PO_4** (0.64 and 1 μM) in chemostat (with $\mu = 0.67$ and 0.14 day⁻¹, as shown at Paasche and Brubak, 1994; Riegman *et al.* 1998). Generally when PFD is not limiting (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), POC:POP decreases by 44% at

low PO_4 and by 66% at low NO_3 when μ is tripling (Riegman *et al.* 1998). In chemostat, the dilution rate (similar to μ) induces a minimum POP:POC of 0.0018 mol mol⁻¹ in order to allow the growth to occur under PO_4 -limitation (Riegman *et al.*, 1998). That means a maximum POC:POP of 555 mol mol⁻¹ six times higher than POC:POP under non-limiting nutrient, coherent with the maximum POC:POP of 600 mol mol⁻¹ (see Paasche and Brubak, 1994) and indicates that the P requirements are low enough to sustain growth under very strong PO_4 -stress.

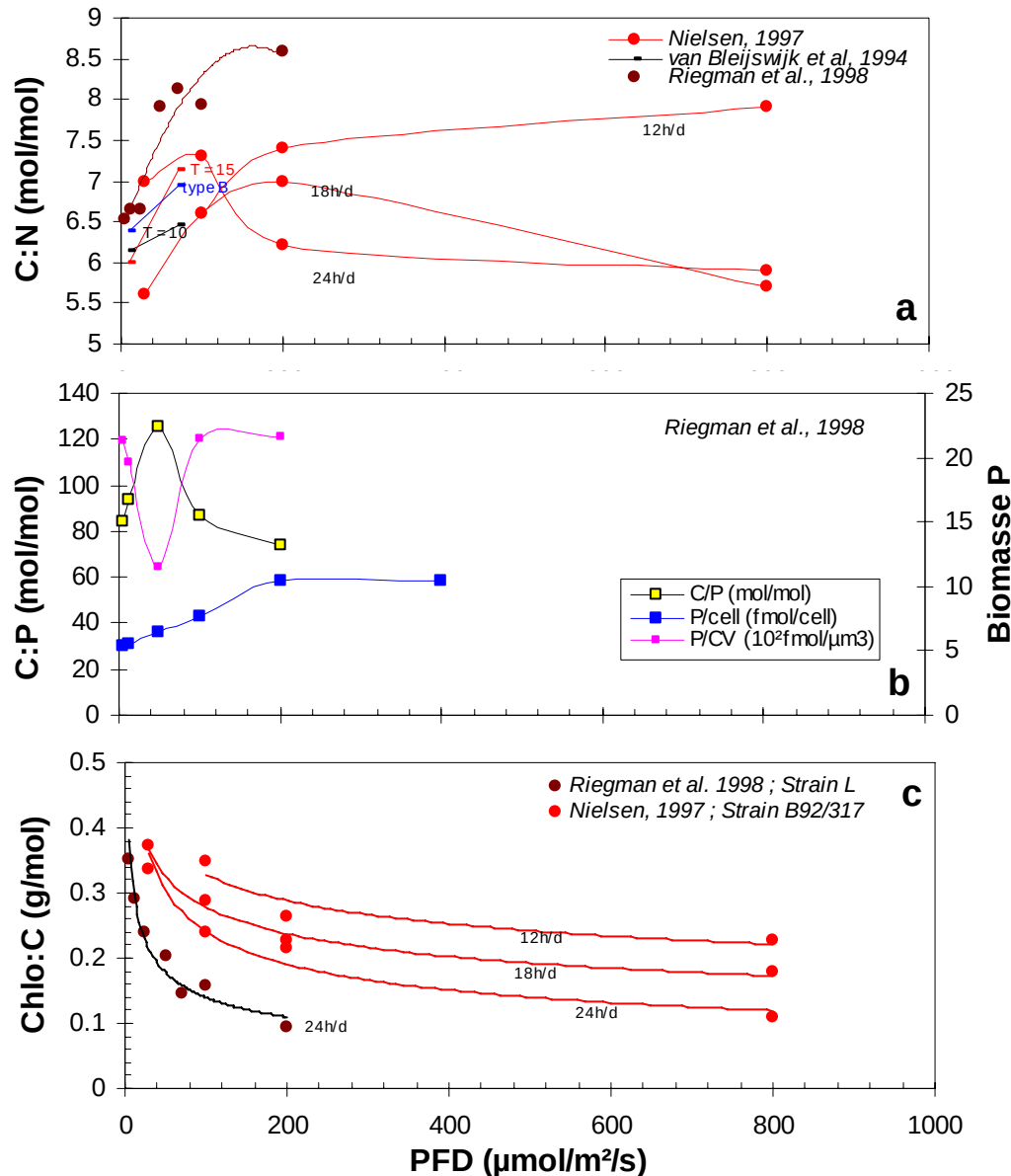


Figure 1.2 : Quotas in Ehux with light

a- Relation between internal quota of nitrogen (C:N) and the light intensity from 3 experiment conduct under no limiting nutrients conditions, but at different daylength (14 h d-1, Bleijswijk *et al.* 1994; 12-24 h d-1, Nielsen 1997; 24 h d-1, Riegman *et al.* 1998). The average curve between data obtained at daylength <16 h d-1 (Bleijswijk *et al.* 1994; Nielsen 1997) and represent the C:N dependence with light according to the daylength criteria (cf. III.A.2). This dependence shows a minimum nitrogen quota of 6 molC molN-1 (C:N, par. 7, Tab. 1.7). b- Relation between light intensity and P content per cell (in blue) and per cell volume (in pink) and the organic carbon content per P content (in white) from only one experiment (Riegman *et al.* ; 1998). These authors propose to parametrise C:P with the light intensity following an hyperbolic curve which give a minimal value for the phosphorus internal quota of 85 molC molP-1 (C:P, par. 8, Tab. 1.7). c- Relation between the Chl-a internal quota (Chlo:C) with the light intensity (PFD) at different daylength (TL). The maximum value at the lowest for the quota is 0.35 g mol-1 (par.10, Tab. 1.7)

c. PFe:POC

The iron intracellular quota **PFe:POC** varies by two orders of magnitude (from 3.1 to 160 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; Sunda et Huntsman, 1995; Muggli and Harrison, 1996b), depending on adsorbed Fe on the cell's surface (if taken into account), EDTA, on the strain, on the light conditions, on the N source and Fe'.

Fe is known to adsorb onto the cell surface (Sunda and Huntsman, 1995). This study indicates that the *intracellular Fe quota* (PFe_{int}:POC) is identical within an error of 15% (between 84% and 97%, Sunda and Huntsman, 1995) similar to the *total cellular Fe quota* (PFe_{total}:POC) which includes the Fe adsorbed onto the cell surface. The adsorbed Fe may be higher when EDTA is used at a low concentration. In fact, PFe_{total}:POC increases by seven times (from 22.2 to 160 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, Sunda and Huntsman, 1995; Muggli and Harrison, 1996b) with a 10 times EDTA decrease (from 100 to 10 mM). The PFe_{total}:POC variations could also be caused by the different *strain origin* (the PAPA Station -Muggli and Harrison, 1996b- compared to those from the Gulf of Maine -Sunda and Huntsman, 1995-). PFe_{int}:POC variation as a function of *PFD* are not yet known, it have been only studied for non-limiting PFD ($> 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). At limiting Fe' the extend PFe_{total}:POC decrease becomes a function of the *N source*, but with contradictory results: a study shows that the quota decrease by 4 times (when Fed decreases from 100 to $< 0.8 \text{ nM}$ with EDTA) is 2 times higher with NO_3 than with NH_4 (Sunda and Huntsman, 1995), while an other study indicates that this decrease (by an order of magnitude) is four times higher with NH_4 than with NO_3 (Muggli and Harrison, 1996b). PFe_{int}:POC increases from 4 to 15 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ when Fe' increase from 4 to 20 pM (Sunda and Huntsman, 1995). Interspecies comparison indicates that PFe_{int}:POC is 2.6 times higher for *E. huxleyi* than for an oceanic diatom at the same Fe' concentration (70 pM; Sunda and Huntsman, 1997). Moreover, the *E. huxleyi* minimum PFe_{int}:POC (1.23 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; Sunda and Huntsman, 1995) is 50% lower than that of coastal species (Sunda and Huntsman, 1997), **indicating lower Fe requirement for *E. huxleyi* than such diatoms**. The *E. huxleyi* PFe_{int}:POC variation as a function of Fe' is linear for Fe' between 3 and 20 pM (the positive slope is equal to $0.35 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{pM}^{-1}$, and thus PFe_{int}:POC ranges from 3.1 to 20 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) and PFe_{int}:POC is around 21 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ for Fe' $> 20 \text{ pM}$ (non-limiting PFD; Sunda and Huntsman, 1995).

d. Chlo:POC

Given values of the chlorophyll-*a* intracellular quota **Chlo:POC** range between 0.032 and 1.092 g mol^{-1} (Fig. 1.4c and Fritz and Balch, 1996; Riegman *et al.* 1998). Again this large range is a function of the light, the strain origin, the cultures techniques, Fe and N-source.

Chlo:POC is about 15% lower for the high than for the low calcified cells (Nielsen, 1995). This study also shows that Chlo:POC is independent of Dissolved Inorganic Carbon (DIC) concentration, but for DIC always higher than oceanic concentrations ($> 2.4 \text{ mM}$). Chlo:POC varies as a function of light with an inverse relationship: Chlo:POC decreases (from 0.37 to 0.1 g mol^{-1}) when *PFD* increases (from 8 to 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -Riegman *et al.* 1998-, and from 30 to 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -Nielsen, 1997-). This relationship is represented by an inverse exponential curve (Fig. 1.4c), but showing also that Chlo:POC decrease is higher as that TL is longer (Nielsen, 1997). If Chlo:POC is normalised to *DL* (Data not show), the Chlo:POC decrease as a function of DL becomes independent of TL. However, Chlo:POC differ by a factor of 2 - 3 between different experiments (Nielsen, 1997; Riegman *et al.* 1998; Sunda and Huntsman, 1995) for a similar and non-limiting DL received by the cells, at the same constant T of 15°C and under non-limiting nutrients conditions. The *strain origin* and/or the *cell size* could also caused Chlo:POC variations (as shown by the quota obtained for an oceanic North Atlantic strain - Nielsen, 1997- compared to a strain collected in a Norwegian fjord of 4.5 μm diameter - Riegman *et al.* 1998- and to one of the Gulf of Mexico of 3.5 μm - Sunda and Huntsman, 1995-). So could different

culturing techniques as well (as shown by results obtained in chemostats - Riegman *et al.* 1998- versus batch cultures - Nielsen, 1997 and Sunda and Huntsman, 1995-). Describing the biomass in term of carbon content, as well as volumetric unit would help to highlight the causes of the different results obtained in the previous studies. Fe' could in addition have an effect on Chlo:POC. In this respect, it has been shown that: i) Chlo:POC is constant and equal to about 0.3 g mol⁻¹ with a PFD of 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and to 0.45 g mol⁻¹ with a PFD of 175 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, when $Fe' > 20 \text{ pM}$, ii) Chlo:POC decreases down to 0.23 g mol⁻¹ when the *N source* is NO₃ and to 0.05 g mol⁻¹ when it is NH₄, when Fe' decreases from 20 to 3 pM (Sunda and Huntsman, 1995).

B. Growth : an example of adaptation

Despite these differences between strains from different origins, we show after a comparison of the studies on growth at different temperature that it is possible to propose an equation of the maximal growth rate with temperature (§IIIB2). We propose also that the effect of the stratification and the turbulence on the growth is determinant to explain the bloom distribution.

The comparison between studies which investigated the *E. huxleyi* growth at different T under non-limiting nutrients (Fig. 1.3) shows that: i) *E. huxleyi* is tolerant to a wide range of T, with absence of growth only for very low (2°C -Kooijman *et al.*, 2001-; 7°C -Mjaaland, 1956-) or very high T (24°C -Mjaaland, 1956-; 30°C -Rhodes *et al.*, 1995-). ii) *E. huxleyi* seems to prefer relatively warm T, with a maximum μ (between 0.8 day⁻¹ -Mjaaland, 1956- and 2.8 day⁻¹ -Price *et al.*, 1998-) which has been observed between 18°C and 24°C (Watabe and Wilbur, 1966, Fisher and Honjo, 1989), giving a growth optimal T of 21°C (corresponding to the average T for maximum μ).

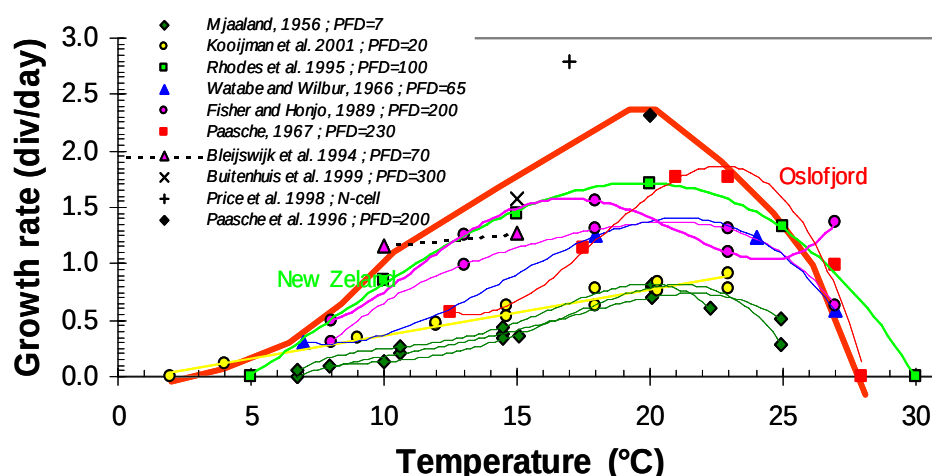


Figure 1.3 : Growth with temperature

Relation between specific growth rate and temperature for different strain of *Emiliana huxleyi* from different oceanic area. Growth rate from experiment to a variable Temperature (continuous line) and maximum growth rate corresponding to specific temperatures (constant). The bold curve corresponding to equation 1 proposed for SWAMCO model but to be calculated (see explanation how to calculate in the text III.B.2).

In the SWAMCO model are considered more than the effect of the temperature on growth. The effects of the light and of the nutrients are considered as well. The effect of light is described in §II.D.1 and the effect of nutrients in §II.C.

Turbulence and stratification in the euphotic zone also impact *E. huxleyi* growth. *Emiliana huxleyi* is an r-strategist (pioneer or opportunistic in comparison to the other coccolithophorids which are K-strategist -Young, 1994a-) and could therefore develop in a wide range of turbulence (from weak like dinoflagellates to strong like diatoms -Margalef, 1983-). However, dense *E. huxleyi* populations have been observed particularly in quite seas, when the water is

stratifying (South West Pacific Ocean -Rhodes *et al.*, 1995- Norwegian Fjords -Veldhuis *et al.*, 1994, van der Wal *et al.*, 1995).

C. Nutrient Kinetic: econome of rich areas

Through a more quantitative description of the kinetic parameters (uptake/assimilation) with nutrients, light and growth conditions, we reach the Paasche conclusions about PO_4 , but we show difference about the iron limitation and new hypothesis about blooms during conditions of regeneration.

1. NO_3 and PO_4 kinetics are very different

E. huxleyi is among the best adapted species to low NO_3 or NH_4 in the open ocean (Eppley *et al.*, 1967), with a low NO_3 and NH_4 uptake constant (K_{SNO_3} and K_{SNH_4} between 0.05 and 0.6 μM - Page *et al.*, 1999; Tab. 1.1). *Emiliana huxleyi* would not be a NO_3 opportunistic species with a weak maximal uptake rate ($V_{\text{NO}_3\text{max}}$, from 0.05 day^{-1} -Page *et al.*, 1999- to 1.68 day^{-1} -Riegman *et al.*, 1998-; Tab.1.1) and a medium affinity ($\alpha_{\text{NO}_3} = V_{\text{NO}_3\text{max}}/K_{\text{SNO}_3}$, of about 8 $\text{M}^{-1} \text{day}^{-1}$; Riegman *et al.*, 1998). These behaviours seem at the opposite of the diatoms (Sarothou *et al.*, this issue).

K_{SNO_3} and K_{SNH_4} depend neither on the concentration or the available N source (Page *et al.*, 1999), or μ (Riegman *et al.*, 1998). On the other hand, $V_{\text{NO}_3\text{max}}$ depends primarily on NH_4 (via the NO_3 uptake inhibition by NH_4 -Page *et al.*, 1999- see next paragraph) and on μ by the influence of the intracellular reserves (Eppley and Runger, 1974; Balch, 1986). In addition, $V_{\text{NO}_3\text{max}}$ during the night represent 30%- 50% of $V_{\text{NO}_3\text{max}}$ during the day and increases of 2 orders of magnitude, when μ decreases by 80% (Riegman *et al.*, 1998; Tab. 1.1). The activity of the enzymes involved in N uptake also increases during daytime, suggesting a greater N uptake during daytime for cells exposed to a day/night cycle (Eppley *et al.*, 1971). N assimilation contrary to the uptake is directly influenced by N-stress (Flynn *et al.*, 1999), but little documented. Moreover, during a day/night cycle, assimilation rates calculated for NH_4 and NO_3 are constant (0.026 and 0.0061 $\text{molN molNcell}^{-1} \text{h}^{-1}$; Eppley *et al.*, 1971) for an *E. huxleyi* monoculture with know NO_3 and NH_4 (0.14 and 0.13 μM respectively). **Although *E. huxleyi* seems adapted to low NO_3 concentration (low K_{SNO_3}), it shows a slow uptake for this nutrient (low $V_{\text{NO}_3\text{max}}$).**

E. huxleyi could adapt to high PO_4 , with relatively strong uptake constant (K_{SPO_4} between 0.1 and 0.47 μM , according to the only study on the *E. huxleyi* kinetic for PO_4 ; Riegman *et al.*, 1998 - Tab. 1.1). However, *E. huxleyi* could also be competitive under low PO_4 , with a half saturation constante for growth very low (ie. 1nM), a high maximum uptake rate ($V_{\text{PO}_4\text{max}}$, between 90 and 215 /day; Tab. 1.1, Riegman *et al.* 1998) and a strong affinity ($\alpha_{\text{PO}_4} = V_{\text{PO}_4\text{max}}/K_{\text{SPO}_4}$, between 290 and 940 $\text{M}^{-1} \text{day}^{-1}$; Tab. 1.1, Riegman *et al.* 1998).

These differences in the PO_4 uptake's kinetic parameters (K_{SPO_4} , $V_{\text{PO}_4\text{max}}$, α_{PO_4} - Tab. 1.1) would be due to the intracellular POP that the cell can contain (Q_{max}) which decreases from 80 to 30 fmolP cell^{-1} when μ increases from 0.14 to 0.59 day^{-1} (Riegman *et al.* 1998). For this same μ variation, during the day, K_{SPO_4} decreases by 20%, $V_{\text{PO}_4\text{max}}$ by 50% and α_{PO_4} by 40%; and during the night, K_{SPO_4} decreases by 50%, $V_{\text{PO}_4\text{max}}$ by 15% but α_{PO_4} increases by a factor 1.3. Moreover, K_{SPO_4} is about 40 to 70% and $V_{\text{PO}_4\text{max}}$ about 10% to 50% lower, but α_{PO_4} is 3 times stronger during the night compared to the day. **The *E. huxleyi* kinetic for PO_4 appears very active, with a particularly strong affinity for this element (two orders of magnitud stronger than for NO_3).**

Table 1.1: Kinetic parameters

Values of maximum uptake rate (V_{max}), maximum uptake per unit area of cell ($V_{max}/\text{Cell S}$, in the case of inorganic iron), uptake half saturation constant (K_s) and affinity ($\alpha = V_{max}/K_s$) from published literature for : ammonium (NH_4), nitrate (NO_3), phosphate (PO_4) and inorganic Iron (Fe). In addition of the reference where data are from is indicated and also the culture installation (batch and chemostat), the strain used during culture experiment, the constant experimental conditions with temperature (T in $^{\circ}\text{C}$), light intensity (PFD in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) and variable or important conditions at the same experimental conditions like growth or dilution rate (μ in $1/\text{day}$). μ indicated the dilution rate in the chemostat culture and the growth rate in the culture with EDTA. Even if the assimilation is used into the model instead of the uptake; the uptake half saturation constant of nitrate is proposed for the assimilation half saturation constant of nitrate (K_N , par. 2, Tab. 1.7) due to a lack of data about the growth rate variability at different NO_3 concentration.

Nutrient	Strain or Origin	Conditions	$K \frac{1}{2}$ μM	V_{max} /day	Alfa = $V_{max}/K \frac{1}{2}$ / $\mu\text{M}/\text{day}$	Remarks	Reference
NO ₃	BT-6 Sargasso Sea	18°C 90 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ N-limited	0.1			Batch Large incertitud (0.3)	Eppley et al. 1969
	F-5 Oslo Fjord	18°C 90 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ N-limited	0.1			Batch Large incertitud (1.6)	Eppley et al. 1969
	L Oslo Fjord	15°C 200 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ 24h/24 P-limited	0.18- 0.24	1.68	0.29-0.39	Chemostat $\mu =$ 0.14-0.59 /day	Riegman et al. 1998
	L Oslo Fjord	13°C 150 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ 12h/24 N-limited	0.05-0.4	0.05-0.45	0.5-4	Batch	Page et al. 1999
NH ₄	BT-6 Sargasso Sea	18°C 90 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ N-limited	0.1			Batch Large incertitud (0.7)	Eppley et al. 1969
	F-5 Oslo Fjord	18°C 90 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ N-limited	0.2			Batch Large incertitud (0.9)	Eppley et al. 1969
	L Oslo Fjord	13°C 150 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ 12h/24 N-limited	0.05- 0.38	0.75-2	3-40	Batch	Page et al. 1999
PO ₄	L Oslo Fjord	15°C 200 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$ 24h/24 P-limited	0.34- 0.44	103.2- 213.6	485.5- 303.5	Chemostat $\mu =$ 0.14-0.59 /day	Riegman et al. 1998
Inorganic Fe	A1387 Gulf of Mexico	20°C 175/500 $\mu\text{Ei}/\text{m}^2/\text{s}$	2.10-6	1.21	0.605.10 ⁻⁶	Batch	Sunda and Huntsman 1995

2. A preference for the regenerated conditions

The essential N source of *E. huxleyi* would be NH_4 . NO_3 uptake strongly decreases with NH_4 , even at low NH_4 ($< 0.5 \mu\text{M}$) and is completely inhibited at $\text{NH}_4 = 2.2 \mu\text{M}$ (Varela and Harrison 1999). Moreover, a small f-ratio is characteristic of the areas where *E. huxleyi* is (0.27 station PAPA -Boyd *et al.*, 1996, Varela and Harrison 1999-); this ratio is even weaker (0.08) at bloom's peak (Fernandez *et al.*, 1996c). These observations suggest a bloom maintenance by NH_4 .

Although *E. huxleyi* can use **organic N sources** (such as urea -Brand, 1994-) which sometimes are in large quantities during bloom periods (Fernandez *et al.*, 1996c), these use would be restricted to limiting N conditions (Riegman *et al.*, 1998). The organic sources would thus not prevent *E. huxleyi* to be limited by N. However, *E. huxleyi* is able to efficiently use **organic phosphorus** (DOP; Kuenzler and Perras, 1965; Brand, 1994) due to the existence of two alkaline phosphatase systems (only species among the 10 phytoplanktonic species studied by Riegman *et al.*, 1998): - "the constitutively synthesised system" producing continuously at a constant rate and - "the inducible system" producing in a linear way when μ decreases. The uptake of a DOP substance (ie. methylfluoresceinophosphate -MFP-) can be from 3.6 times (when $\mu = 0.59 \text{ day}^{-1}$) to 10 times higher (when $\mu = 0.14 \text{ day}^{-1}$) than $V_{\text{PO}_4\text{max}}$ (Tab. 1.1, Riegman *et al.* 1998). According to the Riegman *et al.* (2000) calculation, at equivalent DOP and PO_4 (of the order of the nanomolar, very low PO_4), DOP could support 40% of *E. huxleyi* growth. If DOP is 10 times higher than PO_4 , it could support up to 90% of the growth and contribute to support *E. huxleyi* blooms. Areas with large new nutrients contributions would not allow *E. huxleyi* to strongly develop, as suggested by bloom formation in mesocosms only under low Si ($< 2 \mu\text{M}$; Egge and Aknes, 1992). It is recognised that *E. huxleyi* needs thiamin but not vitamin B12 (Carlucci and Bowes, 1970). Consequently, the presence of other phytoplankton species and their exudate products would provide essential elements for *E. huxleyi*, thus contributing to bloom formation. **With a particular nutrition (using NH_4 and DOP) and vitamin needs, *E. huxleyi* would have a natural predisposition to grow significantly under strong remineralisation conditions and organic matter production in the euphotic layer.**

3. Unknown role of iron on blooms

The Fe uptake of a planktonic community varies with the cell surface and favours small algae (Hudson and Morel, 1990). This assumption was validated for *E. huxleyi* by comparing it theoretical curve of Fe' uptake normalised to the cell surface (estimated in presence of EDTA by Sunda and Huntsman, 1995) with that for dinoflagellates and coastal diatoms of various sizes (3.5 to 32 μm) as proposed by Sunda and Huntsman (1997). An increase in the Fe' uptake is observed when Fe' increases and reaches a saturation ($V_{\text{Fe}'\text{max}}$) of about 1250 $\text{nmolFe m}^{-2} \text{d}^{-1}$, with an uptake constant ($K_{\text{SFe}'}$) around 0.05 nM of Fe' and an affinity ($\alpha_{\text{Fe}'} = V_{\text{Fe}'\text{max}}/K_{\text{SFe}'}$) around $25 \times 10^3 \text{ L m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (Tab. 1.1, Sunda and Huntsman, 1995). $K_{\text{SFe}'}$, $V_{\text{Fe}'\text{max}}$ and $\alpha_{\text{Fe}'}$ are 10 times weaker, comparable and 10 times respectively higher for *E. huxleyi* than for coastal diatoms. Moreover, μ dependence on Fe' obtained with EDTA gives also a very low half saturation constant for growth (ie. 2.1 pM -Sunda and Huntsman, 1995-) giving to *E. huxleyi* the capacity to grow in relatively high Fe' area ($> 3 \text{ pM}$ -typical North Atlantic concentrations-), but a possible limitation in very low Fe' region like HNLC areas ($< 4 \text{ pM}$, Boyé, 2000). **These Fe kinetic patterns would help to understand why *E. huxleyi* is blooming in rich Fe' area and why is present in very impoverished Fe' ocean areas such as the Pacific Equatorial, but without forming blooms.**

For *E. huxleyi*, FeL could or not be directly available. If *E. huxleyi* would use FeL, which is not sure, it would be only in small amounts. The study of Boyé and van den Berg (2000) shows on the one hand that *E. huxleyi* μ is null for a Fe_d of about 1 nM containing 99.9% of FeL; and on the other hand that μ and its production of organic ligands (L) complexing Fe would be stimulated by Fe addition (1 nM). This strategy would be opposed to that usually adopted by organisms in impoverished Fe_d areas, which produce ligands (as siderophores), non available for eukaryotes (like *E. huxleyi* -Hutchins *et al.*, 1999-) when Fe_d is very low (Iron Ex II, Equatorial Pacific; Rue and Bruland, 1997). The purpose of this *E. huxleyi* strategy would be to bind the added Fe and thus maintain Fe bioavailable by avoiding Fe precipitation in the colloidal form (Boyé and van den Berg, 2000).

In situ, it is not known if Fe-fertilisation stimulates or not the coccolithophorids development. The only monitoring of coccolithophorids has been performed in the south of the polar front (south of Australia -Boyd *et al.*, 2000, SOIREE-), where the lack of coccolithophorids whatever the addition can be due to other environmental parameters (like a low T or a low concentrations of some other metals; eg: Cobalt -Sunda and Huntsman 1995b-). **Due to its ability to produce organic ligands after an addition and its apparent low ability to assimilate organic iron in low iron area, the role of punctual addition of iron by dust and the global change of Fe_d on the *E. huxleyi* response in term of growth, calcification and of feedback on FeL remains to be resolved.** But, the effect of Fe_d and nutrients (NO₃ and PO₄) on calcification (§II.D) and PIC (§II.E) would be also to consider when trying to understand the bloom formation.

D. Photosynthesis and calcification: animator of the oceanic carbon

The following comparison of the environmental conditions and experimental protocols during the quantification of photosynthesis and calcification with light, give us the knowledge to propose an adapted parametrization and data for these processes in SWAMCO (cf. §III.B.4), despite of the contradiction raised by Paasche (C/P could increase or decrease in low light).

1. P - light

a. Process of photosynthesis versus light intensity (P-PFD) is very variable and *E. huxleyi* would be low photoinhibited

Optimal specific photosynthesis rate (K_{max}), photosynthetic efficiency (α), light adaptation parameter ($I_K = K_{max}/\alpha$) and photoinhibition coefficient (β , Tab. 1.7), from the literature, characterizing the P-PFD relation (Tab. 1.6), are given in Tab. 1.2 and the resulting curves on figure 1.4a. These parameters depend on the experimental conditions (cell type, T, NO₃, DIC, pH), the light conditions under which cells are cultivated (PFD -Nielsen, 1997 and Riegman *et al.* 1998-; TL -Nielsen, 1997- and the light wavelength -Schofield *et al.* 1990-) and of the incubation duration for the measurements (between 2 minutes -Nielsen, 1997- and 5 hours -Nielsen, 1995-).

Many experimental conditions are to be considered for photosynthesis.

Highly calcified cells have a photosynthesis rate in terms of Oxygen 30% higher than **lowly calcified** ones (Nielsen, 1995). In term of carbon, this difference could be twice, by using a ratio (P in term of POC / P in term of O₂) of 2 moles/1 mole and 1 mol/1 mol for high and low calcified cells, respectively (Nimer and Merret, 1993). Whatever the PFD, photosynthesis seems, contrary to μ , half lower when T increases from 15° to 20°C (Balch *et al.* 1992). At 2 mM of DIC, the photosynthesis rate at 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ is 1.7 times higher than at 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Nimer and Merret, 1993). But, photosynthesis could be limited by DIC under saturated light and by light under saturated DIC (but not in the oceanic DIC range). Indeed, under non-limiting PFD (> 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the photosynthesis rate increases of 2 mgC mgChlo⁻¹ h⁻¹ per mM of DIC for DIC between 0.1 and 0.5 mM (Nimer and Merret, 1993) and only of 0.12 mgC mgChlo⁻¹ h⁻¹ per mM of DIC between 7.4 and 12.4 mM (Nielsen, 1995). A DIC increase above 0.5 mM and 2.4 mM does not affect the photosynthesis rate at 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Nimer and Merret, 1993; Nielsen, 1995, respectively).

Table 1.2: Photosynthetic parameters

Parameters used for the relation Photosynthesis Vs Irradiance (P-PFD), photosynthetic efficiency (row 6 et 7), optimal specific rate (row 4 et 5) and light adaptation parameter (row 8), either provide by authors (line 2, 3 and 5 to 7), or estimated here (line 1 and 4), in the units used into experiments (row 5 and 7) and normalised into a standard unit for SWAMCO (mgC/mgChlo/h -row 4- and mgC/mgChlo/h/($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) -row 6-). Approximation are used to obtain parameters in the correct unit thanks to data from different authors (C/O₂ by Nimer and Merret, 1993 and Chlo/cell at high light intensity of 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ by Riegman *et al.* 1998). The whole of these experiments are from culture on North Atlantic strains of *E.hux*, with: i) 5 studies (line 1 to 6) used the Platt *et al.* formulation (1980, Equ.1.3, Tab.1.7), characterised by the optimal specific rate of photosynthesis (K_{max} , par.12), the photosynthesis efficiency (alfa, par.13), the photoinhibition coefficient (beta, par.15) and the light adaptation parameter ($I_k = K_{\text{max}}/\text{alfa}$, par.14); ii) 1 study used an hyperbolic relation characterised by the maximum photosynthetic rate (P_m) and a photosynthesis half saturation constant (K_{pi} , line 7). The experimental culture conditions are given (row 1) and defined like in the table 1.1, the light adaptation conditions (row 2) before incubation (PFD and TL are in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and hour of light/24 hours). The influence of these experimental and adaptation conditions on the P-PFD parameters are described in §IID, but these parameters are not proposed for the model (see §5 for explanation) because data for parameters are in term of production (Zondervan, 2001, Fig.4a).

Conditions			Maximum rate= K_{max}		Efficiency photo=alfa			References
Experimental	Light adaption	remarcks	Normalised	measured	Normalised	measured	$I_k = K_{\text{max}}/\text{alfa}$	
			mgC/mgChlo/h		$\mu\text{gC}/\text{mgChlo}/\text{h}/(\mu\text{molphot}/\text{m}^2/\text{s})$		$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	
T=18.5 incubation time = 4-6 hours	PFD = 24	beta=0.02 μgC/mgChlo/h/(μmol/m²/s)	1.3		35		37	Paasche 1963
T=18° incubation time = 45 min	PFD=50 ; 24h/d White source of light	White source Blue-Green source	2.05 2.02	157 (a) 152.5	38 55	2.9 (c) 5.92	54.6 36.5	Schofield et al., 1990 culture BT6
T=18° incubation time = 45 min	PFD=50 ; 24h/d Blue Green source	White source Blue-Green source	1.99 1.97	148.5 146	46 51	1.57 1.58	43.1 38.2	f/2 media seawater
T = 15°C T = 20°C NO ₃ -0 NO ₃ =2μM	PFD = 1160 " " "	incubation time = 3.5 h " incubation time = 5 h "	6 (**) 1.92 (**) 1.08 (**) 4.32 (**)	25 (a) 8 4.5 18	0.5 (**) 0.26 (**) 0.26 (**) 0.48 (**)	0.025 (c) 0.013 0.013 0.024	1000 6153 346 750	Balch et al., 1992 culture Strain 88E
T = 15°C ; high calcif incubation time = 3hours	PFD=50	DIC=2mM béta=0.0006	2.9 (e)	41.1 (a)	30 (e)	0.42 (c)	97	Nimer et Merret 1993 Culture strain 88E
T=15° ; low calcif PO ₄ =36.2 μM Incubation time = 2 min	PFD = 80 ; 18h/day	DIC = 2.4mM 7.4 mM 12.4 mM	1.776 (*) 2.58 (*) 3.42 (*)	148 (b) 215 285	19 (*) 36 (*) 47 (*)	1.6 (d) 3 3.9	92.5 71.6 73	Nielsen, 1995 culture, μ=0.69 Strain B 92/317
T=15° ; high calcif PO ₄ =36.2 μM Incubation time = 2 min	PFD = 80 ; 18h/day	2.4 mM 7.4 mM 12.4 mM	5.76 (***) 7.78 (***) 8.35 (***)	240 324 348	48 (***) 80 (***) 104 (***)	2.1 3.4 4.3	114.3 95.3 80.9	Keller medium
T=15° PO ₄ =36.2 μM Incubation time = 2 min	PFD=100 ; 12h/day 200 ; 12h/day 800 ; 12h/day	μ=0.64/day 0.73 0.8	11.136 (***) 12.528 15.648	464 (b) 522 652	92 (***) 76 72	3.76 (d) 3.16 3.02	123.4 165.2 215.9	Nielsen, 1997 culture Strain B 92/317
T=15° PO ₄ =36.2 μM Incubation time = 2 min	PFD=30 ; 18h/day 100 ; 18h/day 200 ; 18h/day	0.27 0.68 0.75	8.88 10.44 11.328	370 435 472	76 68 68	3.18 2.84 2.85	116.3 153.2 165.6	Keller medium High calcif
T=15 PO ₄ =36.2 μM Incubation time = 2 min	PFD=30 ; 24h/day 100 ; 24h/day 200 ; 24h/day	0.3 0.66 0.72	4.248 4.32 5.136	177 180 214	32 28 32	1.26 1.24 1.37	140.5 145.1 156.2	
	800 ; 24h/day	0.87	5.64	235	20	0.78	301.3	
T=15° PO ₄ =25μM ; NO ₃ =300μM Incubation time = 3 min	PFD=5.6 ; 24h/day 12.5 25 50 100 200	Photo = Pm*PFD /(Kpi+PFD) + Rd Kpi = 54μmol/m²/s	1.512 (*) 2.904 4.116 2.856 1.512 2.088	126 (b) 242 343 238 126 174				Riegman et al., 1998 culture Strain L

(*) conversion with C/O₂ = 1/1 (Nimet and Merret 1993)

(**) Chla/cell = 50 fg/cell from Riegman et al. 1998.

(***) C/O₂ = 1/2 (Nimet and Merret 1993)

in bold : maximum and minimum vaues

(a) fmolC/cell/h

(b) μmolO₂/mgChlo/h

(c) fmolC/cell/h/(μmolphot/m²/s)

(d) μmolO₂/mgChlo/h/(μmolphot/m²/s)

(e) conversion with Chlo/cell=170fg/cell (Riegman et al. 1998)

K_{max} and α vary from 1.1 to 18.3 mgC mgChlo⁻¹ h⁻¹ (Balch *et al.* 1992 and Schofield *et al.* 1990) and from 0.26 to 104 µgC mgChlo⁻¹ h⁻¹ (µmol⁻¹ m⁻² s⁻¹), respectively (Balch *et al.* 1992 and Nielsen, 1995; Tab.1.2). This difference of one and three orders of magnitude between experiments could be due to variations in the experimental conditions: i) K_{max} and α increase respectively by a factor of 3 and 2, when T decreases from 20° to 15°C and by a factor of 4 and 2 when NO₃ increases from the NO₃ detection threshold to 2 µM (Balch *et al.* 1992). ii) K_{max} and α would be 3 and 2.3 times higher for **highly calcified cells** compared to lowly calcified ones (Nielsen, 1995) iii) K_{max} and α increase by a factor of 1.5 and 2.5 when DIC increases from 2.4 to 12.4 mM (Nielsen, 1995); but these concentrations largely exceed the oceanic concentrations (< 2.4 mM). iv) K_{max} is constant whatever the light wavelength; but the cells react better at low PFD when culture PFD is blue-green compared to white (α is up to 45% higher - Schofield *et al.* 1990-).

I_K (Tab. 1.2) is also influenced by the experimental conditions and it can be deduced from the same studies. I_K varies of 2 orders of magnitude (36-1,000 µmol m⁻² s⁻¹), as follows: (i) I_K like α , doubles when T decreases of 5°C and when NO₃ increases of 2 µM (Balch *et al.* 1992), suggesting that K_{max} is responsible for the K_{max}/α ratio variations. (ii) In the same way, I_K is 30% higher for **highly calcified cells** compared to the low ones (Nielsen, 1995). (iii) Whereas K_{max} and α increase with the DIC, it appears that I_K decreases of 30% to 40% when DIC increases in 10 mM (Nielsen, 1995).

The culture light conditions are of great importance (Tab. 1.2)

TL influences K_{max} and α in similar way: K_{max} and α drop on average of 10% and 15% when TL increases from 12 to 18 h d⁻¹ and of 50% and 60% when TL increases from 18 to 24 h d⁻¹ (Nielsen, 1997), respectively. The consequence of this over-exposure is an inhibition which result in a photosynthesis at all PFD for cells cultivated under TL of 24 h d⁻¹ around 50% of those cultivated with a day/night cycle. **Culture PFD** influences K_{max} and α in opposite way: when PFD increases from 100 to 800 µmol m⁻² s⁻¹, K_{max} increases between 30% and 75% whereas α drops between 10% and 40% (Nielsen, 1997). As a result photosynthesis is: i) at high PFD, higher for cells cultivated under high PFD than under low PFD and ii) at low PFD higher for cells cultivated under low than under high PFD. This property could explain the very low photosynthesis increase with PFD observed for the cells cultivated at 1160 µmol m⁻² s⁻¹ (α = 0.5 µgC mgChlo⁻¹ h⁻¹ (µmol⁻¹ m⁻² s⁻¹) -Balch *et al.* 1992-). However, for cells cultivated in a continuous light cycle, **the maximal photosynthetic rate (Pm; Riegman *et al.* 1998)** does not show a clear trend with culture PFD and is: i) minimal (1.5 mgC mgChlo⁻¹ h⁻¹) for culture PFD of 5.6 and 100 µmol m⁻² s⁻¹ and ii) maximum (between 2.9 and 4.1 mgC mgChlo⁻¹ h⁻¹) for PFD between 12.5 and 50 µmol m⁻² s⁻¹. I_K increases by a factor of 2 when PFD increases from 100 to 800 µmol m⁻² s⁻¹ and only of 40% when TL increases from 12 to 18 h d⁻¹. On the other hand, it remains stable under TL of 24 h d⁻¹ for PFD between 5.6 and 200 µmol m⁻² s⁻¹ (Nielsen, 1997 and Riegman *et al.* 1998), but increases by a factor of 2 when PFD increases to 800 µmol/m²/s (Nielsen, 1997). In addition, in spite of a culture PFD of the same order of magnitude, I_K is 50% weaker for Schofield *et al.* (1990) than for Nielsen (1997). This difference could be related to a T difference of 3°C between both studies.

b. The saturation PFD

The saturation PFD (Isat) seems weakly affected by the light culture conditions or the strain origin. The estimated culture PFD for which the photosynthesis rate (in term of POC or O₂ -row 3-) is maximum (Isat), is very close to I_K . Isat varies between 85 (Balch *et al.* 1992) and more than 2,000 µmol m⁻² s⁻¹ (Balch *et al.* 1992). But no trend about the Isat variability appears. Indeed, for PFD ~ 50 µmol m⁻² s⁻¹, Isat can vary by a factor of 5 (85 µmol m⁻² s⁻¹ for a PFD of 62 µmol m⁻² s⁻¹ - Paasche, 1964- and 400 µmol m⁻² s⁻¹ for 50 µmol m⁻² s⁻¹ -Nimer and Merret, 1993-) with an average Isat close to 200 µmol m⁻² s⁻¹.

The comparison of photosynthesis between PFD studies, suggests that no photosynthesis decrease when PFD increase (ie. **photoinhibition**) was observed during culture measurements (in term of O₂ or of POC) and this even for the highest PFD recorded in the first meters of the temperate regions euphotic layer (1,700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Nielsen, 1995). On the opposite, an inhibition of photosynthesis for a PFD corresponding to the top of the euphotic layer (600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -Holligan *et al.* 1993a-) was observed *in situ*.

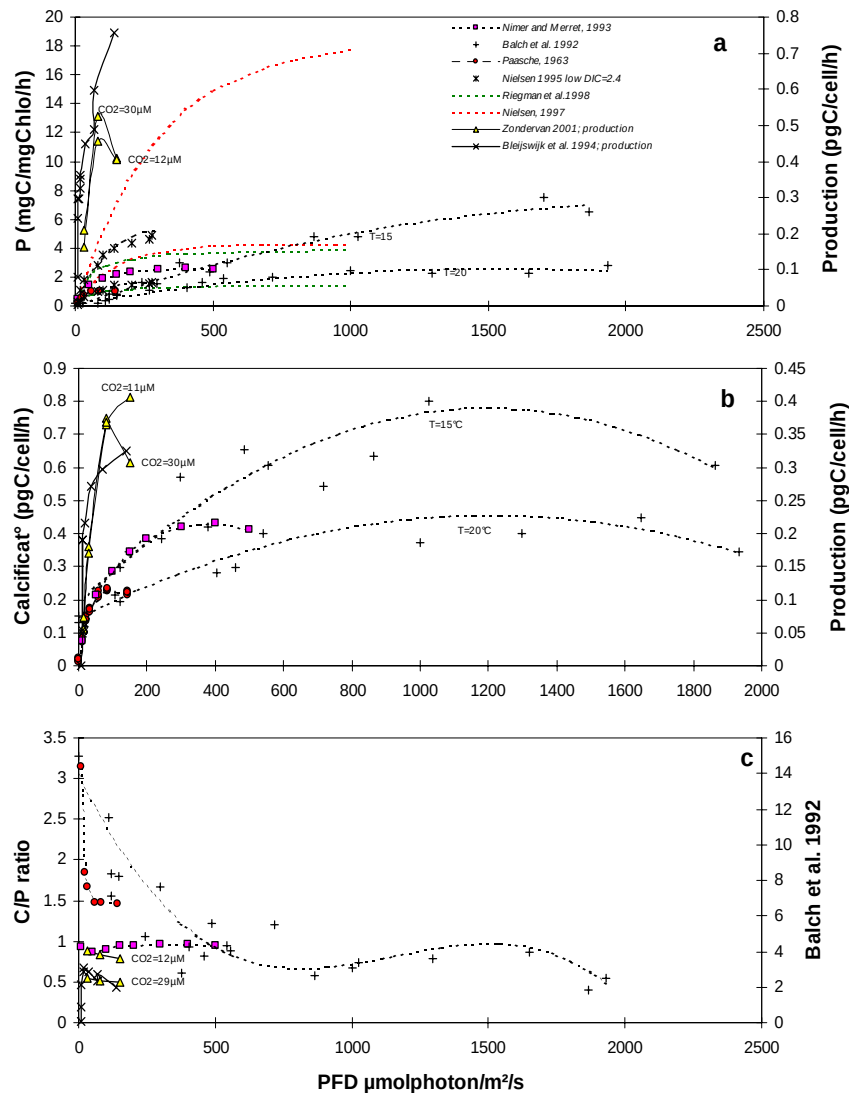


Figure 1.4 : Photosynthesis (P), Calcification (C) and C/P ratio with light

Carbon organic content allows to compare in a) and b) data production from Bleijswijk *et al.* (1994) with data from Zondervan *et al.* (2002) is 13 pgC cell⁻¹. Relation between light intensity (PFD) and: a- photosynthesis (P) or Carbon organic production (right scale) for all literature available experiment. Parameters and chlorophyll and oxygen units conversion allowing to compare quantitatively the photosynthesis are given in Tab.1.2. Curves corresponding to extreme value of parameters are shown (Nielsen, 1995, 1997; Riegman *et al.* 1998). Data proposed to Eq. 1.3 for SWAMCO model are from Zondervan, 2001 (or *et al.* 2002) and associate parameters (12, 13, 14, 15; Tab. 1.7 for their definition) are to be calculated. b- Calcification (C) or calcite production (right) for available data. Data of inorganic carbon (Bleijswijk *et al.* 1994; Zondervan *et al.* 2002) are chosen for the model. Calcite production answer to light intensity can be represented by a Michaelis Menten equation (Eq. 1.4, Tab. 1.7) using Bleijswijk *et al.* (1994) and Zondervan *et al.* (2002) data. For the equation 1.4 parameters, the minimal threshold for production (IC_{min}=10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, par. 19) is evaluated using Bleijswijk *et al.* (1994) data ; and the maximum rate (C_{max}, par. 17) and half saturation constant of light (I_{Kc}, par. 20) of production could be evaluated in the future using Zondervan *et al.* (2002) data. c- C/P ratio or Organic/Inorganic production ratio and C/P from Balch *et al.* (1992, right) The C/P chosen for model (Bleijswijk *et al.* 1994 ; Zondervan *et al.* 2002) increase with decreasing light from 150 to 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, decrease until 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and is null under 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (see text §III.B.4 for explanation of the data choice and how to calculated parameter).

2. C - light

a. Calcification, a process closely coupled with the luminous mechanisms

The specific calcification rate measured is very variable and can reach values of $0.25 \text{ pgC cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for *in situ* conditions (Maranon *et al.* 1996), of $0.45 \text{ pgC cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in mesocosm (Maranon and Gonzalez, 1997) and of $1.6 \text{ pgC cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in monospecific cultures (Fritz, 1999). This variability can be due to light, T, nutrients or carbonates system influences. Calcification increases quickly for $\text{PFD} < 100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ with a slope of $\sim 1 \text{ pgC cell}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ (Fig. 1.4b). This trend is similar for all the *E. huxleyi* strains studied in laboratory. The calcification saturation PFD is variable from one study to another, between $50 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Paasche, 1963; Bleijswijk *et al.*, 1994) and $150 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Nimer and Merret, 1993; Zondervan, 2001), with an average saturation PFD of $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (twice higher than the photosynthesis one). This is in agreement with the generally accepted fact that **light requirements for calcification are smaller than for photosynthesis** (Paasche, 1964; Balch *et al.*, 1992; Fernandez *et al.*, 1993; Bleijswijk *et al.*, 1994; van der Wal *et al.*, 1994; Riebesell *et al.*, 2000). A weak inhibition of calcification can appear at PFD of $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Paasche, 1963), $400 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Nimer and Merret, 1993) or $1,700 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Balch *et al.*, 1992). Calcification can occur without light (Balch *et al.*, 1992) or not at PFD lower than a threshold value ($\sim 7 \text{ } \mu\text{mol of photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Bleijswijk *et al.*, 1994). This contradiction is also raised by Paasche (2002) with data from experiments with short incubation duration (Paasche, 1964; Balch *et al.*, 1992; Nimer and Merret, 1993).

b. Calcification depend strongly on photosynthesis at depth

For non-limiting PFD ($> 300 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C/P is around the unit (Nimer and Merret, 1993; Balch *et al.*, 1992; Fig. 1.4c). This ratio is higher under low PFD ($< 300 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) non null. This shows a variation of the coupling between both processes with light. But, C/P ratio would decrease up to 30% when PFD increases of $90 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ from the saturation PFD ($40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Bleijswijk *et al.*, 1994). Without light, a contradiction appears between authors using short incubation duration (a few hours) to measure both processes C and P, and which obtain a C/P ratio higher than 3 (Paasche, 1962; Balch *et al.*, 1992), and those using an incubation duration of one day and observe a null C/P ratio (Bleijswijk *et al.*, 1994; Balch *et al.*, 1996). **This observation could mean that calcification can use stored energy, but only during a short time.** Moreover, when μ is strongly reduced by light-stress ($\sim 0.1 \text{ day}^{-1}$), C/P drops (Balch *et al.*, 1996). The last studies on the effect of light on calcification show that culture PFD is of primary importance, but this effect was not quantified: whereas cells cultivated under high PFD (high energy) present an increase in C/P when they are exposed to lower PFD; in the opposite, cells maintained under low PFD (low energy) present a low C/P ratio under low as well as high PFD (Paasche, 1999). **In conclusion, cells cultivated (or adapted) under a very low PFD (ie. on the depth) would have a weaker calcification due to a lack of energy whatever the PFD decrease but fast and cells cultivated (or adapted) under high PFD (high energy, ie. on the surface) would have an enhanced calcification (compared to the photosynthesis) following a fast and short PFD decrease thanks to the use of stored energy.**

E. Inorganic quota: generous to give coccolith

The intracellular process of inorganic carbon production (eg: calcification) is one of the most intricate aspect to understand the life strategy of *E. huxleyi*. From the calcification efficiency depend the coccoliths production, the loss of these coccoliths from the cell (detachment) and the coccosphere size. As Paasche has ever described in details the coccoliths and coccosphere structure and composition, we are more focused on the parameters susceptible to be use in

SWAMCO (PIC content per cell, cell volume) and their variation with the environmental conditions

Table 1.3: Size and inorganic carbon content of the cell

Size of the coccosphere in term of volume and Inorganic biomass quantity in term of inorganic carbon per organic carbon biomass (PIC:POC) obtained by Ca measurement (Paasche and Brubak, 1994), or by difference between total carbon of the cell (TPC) and organic carbon (Muggli and Harrison, 1996a et b). Culture conditions are similar that for Tab. 1.1 and their effect on carbon inorganic/organic ratio (PIC:POC, par. 11, Tab. 1.7) is described in §II.E. The average size of the coccosphere (4,6µm) is used §III.B.5 and 6 to calculate the sinking rate (SR, par. 23, Tab.1.7).

Strain or Origin	Conditions	PIC Pg/cell	PIC :POC	Coccospher Volume µm ³	Remarks	Reference
Oslo Fjord	20°C		0.4	65.4	Batch	Paasche 1962
	20°C	7.38	0.9		Batch	Paasche and Brubak 1994
	20°C P-limited	17.38	1.42		Chemostat µ=0.67 /day	
	10°C 70 µEi/m ² /s	6.75-12.2	0.51-0.65	32.25-54.33		
	15°C 70 µEi/m ² /s	8.16-11.98	0.69-0.73	43.07-79.58		
	10°C 8.7 µEi/m ² /s L-limited	3.40-5.80	0.26-0.31	22.43-26.08	Batch	Bleijswijk et al. 1994 14h/24
	15°C 8.7 µEi/m ² /s L-limited	4.23-4.54	nd-0.41	28.26-30.8		
A1387 Gulf of Mexico	10°C 70 µEi/m ² /s P-limited	11.4-15.1	1.16-1.47	31.4-50.27		
	20°C 175-500 µEi/m ² /s 14h/24			13.2-22.9	Batch	Sunda and Hunstman 1995
	B92 15°C 80 µEi/m ² /s 18h/24		0.96-0.89		Batch	Nielsen 1995
88E	L-limited	2.5-3	0.3-0.34		µ=0.24-0.75 /day	Fritz and Balch 1996
	P-limited	4.5	0.44		µ=0.44 /day	24h/24 Chemostat
	P-limited	11.5	2.14		µ=0.99 /day	17°C 75 µEi/m ² /s
Station P	16°C 180 µEi/m ² /s 24h/24 Fe-limited	0.7-4	0.056-0.49	38-41	Batch	Muggli and Harrison 1996a
	Fe-limited	7.5-18	0.42-1.29	33.8-53	Batch N=NH4	Muggli and Harrison 1996b
	Fe-limited	0.5-13.7	0.04-0.99	24.9-48.9	Batch N=NO3	16°C 150 µEi/m ² /s 14h/24
	16°C 185 µEi/m ² /s 14h/24 L-limited			27-43.5		Muggli and Harrison 1996c
L Oslo Fjord	5.6-400 µEi/m ² /s L-limited	1.48-8	0.27-0.93	25.5-55.9	µ=0.14-0.63 /day	Riegman et al. 1998 15°C
	200 µEi/m ² /s P-limited	2.1-7.6	0.23-0.5	47.3-67.6	µ=0.14-0.63 /day	Chemostat 24h/24
	200 µEi/m ² /s N-limited	3.1-3.4	0.4-0.5	28.5-50.6	µ=0.15-0.6 /day	
St P	10.5°C 180 µEi/m ² /s 14h/24			31-47	Batch	Varela and Harrison 1999

The coccosphere: different parameters to quantify this inorganic pool

Different definitions are given in the literature to define the coccosphere. The coccosphere could be defined with units of coccoliths number (coccoliths/cell); inorganic carbon content per cell (PIC/cell), per coccosphere volume (PIC/CV), or per POC (PIC:POC); calcium content per POC (Ca:POC); or with its size. The calcite around the cell is an important parameter since it can help to estimate: the coccosphere size, and thus the sinking rate (Balch *et al.*, 1993; cf. §II.F.3), the number of free coccoliths which is used to compare different *in situ* data (which often only gives free coccoliths numbers) and the optical signal detected by the satellites.

1. Inorganic carbon per cell

PIC/cell of type-A cells ranges between 0.5 and 18 pgC cell⁻¹ (Muggli and Harrison, 1996b), but under non-limiting nutrients and Fed it is, in general, between 5 and 10 pgC cell⁻¹ (Paasche and Brubak, 1994; Bleijswijk *et al.* 1994; Fritz and Balch, 1996). For type-A cells, the variation of PIC content per cell is a function of PFD, PO₄ or NO₃-stress, μ and the time of the day at which the measurement is made, but it depends also slightly on T between 10 °C and 15 °C (Bleijswijk *et al.* 1994).

PIC/cell varies as follows: (i) it increases by 5 pgC cell⁻¹ with **PFD** from a strict limiting (< 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to a saturating PFD of 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bleijswijk *et al.*, 1994; Zondervan, 2001). (ii) This increase is twice higher at the end of the day of a **day/light cycle** than at its start. This could be due to cellular division which is not concomitant with the beginning of the light period (Bleijswijk *et al.*, 1994). (iii) PIC/cell could vary by two under a same PFD (Riegman *et al.* 1998) when the light is continuous (no day/night cycle). (iv) It could reach 60 to 120 pgCa cell⁻¹ (eg: 18 to 36 pgC cell⁻¹; Anderson, 1981) in **PO₄** limited cultures. (v) It could be twice lower when **Fed** drops from 100 nM (abundant Fe-supply) to far below 0.8 nM (Fe-limitation) in cultures using EDTA and NH₄ as the **N source** (30 μM), but decreases sharply (0.5 pgC cell⁻¹) with NO₃ (Muggli and Harrison, 1996b).

2. Inorganic carbon per coccosphere volume

PIC/CV ranges between 0.02 and 0.34 pgC μm^{-3} , for both low or high calcified cells. The relative variation of PIC/CV around the average is 0.6, independent on PFD and twice less than the PIC/cell one. This indicates that the calcite amount is positively correlated to CV.

3. Inorganic carbon per organic carbon (Tab. 1.3)

PIC:POC ranges between 0.04 and 2.14 mol mol⁻¹ and depends on light, T, nutrients and strain origin.

For the usually **calcified cells** (type-A), the PIC:POC increase -around 0.2 mol mol⁻¹ - is similar for a **PFD** increase from 10 to 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a T increase of 5°C (Bleijswijk *et al.* 1994). This ratio seems to reach saturation for a PFD around 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Zondervan, 2001). PIC:POC is twice higher under **PO₄** limitation (< 0.1 μM) and this result is in agreement with the results of Paasche and Brubak (1994). High NO₃ (300 μM) used in other experiments (Riegman *et al.*, 1998) in chemostat could have induce calcification restriction or inefficiency of the coccoliths to remain attached to the cell (Riegman *et al.* 1998). However this effect is not observed in the work of Fritz and Balch (1996). **Fe** availability could also induce PIC:POC variations. Indeed this ratio represents 50% and 3% under Fe'-limitation (Fe_d < 0.8 nM, with EDTA) compared to a full Fe-supply (100 nM), depending on the N source (NO₃ or NH₄, respectively; Muggli and Harrison, 1996b).

4. Calcium per organic carbon

An additional criterion can help to define the degree of calcification. It is the calcium per organic carbon ratio (**Ca:POC**; Paasche *et al.*, 1996). This ratio is used to quantify the effect of a nutrients-stress on calcite production (Paasche, 1998). Ca:POC depends on strain origin, light, S and nutrients availability. Ca:CO increases: (i) by 30% with a **S** increase from 17 to 34 (Paasche *et al.*, 1996); (ii) from 40 to 80% (depending on the strain used) with a **PFD** increase from 18 to 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Paasche, 1999); (iii) by 37% with a **day/light cycle** (compared to a continuous light cycle; Paasche, 1998); (iv) from 1 to 1.4 mol/mol (with $\mu = 0.46 \text{ day}^{-1}$; Paasche, 1998) for cells grown in chemostat with a **PO₄** limitation. This last increase could partly be due to an increase in the number of coccoliths cell⁻¹ (2.5 times more), such as already observed on the same strain (BOF 92), with an increase from 0.9 to 1.42 mol mol⁻¹ (Paasche and Brubak, 1994).

5. Coccosphere size (Tab. 1.3)

The coccosphere size of a type-A cell depends on the accumulation of layers of coccoliths (Balch *et al.*, 1993). In monospecific culture of *E. huxleyi*, the diameter of the coccosphere (supposed to be spherical) ranges from 2.9 μm (Sunda and Huntsman, 1995) to 5.2 μm (Bleijswijk *et al.* 1994). The coccosphere size depends on T, light, nutrients, μ and Fe availability.

Within a day/light cycle, the cell diameter increase by 10% with a **T** increase of 5°C (from 10 to 15°C; Bleijswijk *et al.* 1994). The variations of the diameter with **PFD** are not linear: the diameter strongly increases (from 3.5 to 4.5 μm -Riegman *et al.* 1998, Bleijswijk *et al.*, 1994-) between a very low ($< 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and a higher PFD (25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). It reaches a constant value (4 to 5 μm) grown under PFD from 70 to 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Balch *et al.* 1993; Muggli and Harrison, 1996b, Riegman *et al.* 1998). The effect of **nutrients** availability on the cell size has been poorly investigated so far. The few existing studies suggest that the coccosphere diameter ($\sim 4.5 \mu\text{m}$) remains relatively constant with nutrients variations (either with NO₃ of 30 to 10 μM - Bleijswijk *et al.* 1994- or of 300 to 25 μM - Riegman *et al.* 1998-; or with PO₄ of 0.4 to $< 0.1 \mu\text{M}$ - Bleijswijk *et al.* 1994- or of 25 to 1 μM -Riegman *et al.* 1998- for a constant μ -Riegman *et al.* 1998-). However, the cell diameter varies daily by 10-20% with the **growth daily cycle** (Bleijswijk *et al.*, 1994; Varela and Harrison, 1999) with a minimum at the end of the night period and during the 2 first hours of the light period, and an increase during the light period (when the cellular division is nearly zero). During the transition stage between exponential and stationary growth phase (due to the decrease of dilution rate from 0.6 to 0.15 day⁻¹), the diameter decreases by 15% in a chemostat limited by NO₃ (inlet concentration = 25 μM), but increases by 15% in a chemostat limited by PO₄ (inlet concentration = 1 μM ; Riegman *et al.* 1998). With a decrease of **Fed** from 100 to 0.8 nM (below the threshold for Fe' limitation) using EDTA, the cell diameter decreases by 20% (Muggli and Harrison, 1996b). With NO₃ as **N source**, the cell diameter decrease could be seen as the result of an almost complete loss of all the calcite (from 13.7 to 0.5 pgC cell⁻¹, using the difference between TPC and POC). On the other hand, with NH₄, the total calcite could remain high (8.5 pgC cell⁻¹; Muggli and Harrison, 1996a; Tab. 1.3).

F. Looses mainly at the end of the bloom

E. huxleyi does not produce much organic matter compared to bigger species like diatoms or , but it also does not loose much of it during bloom formation periods either by grazing (Tab. 1.5), sinking (Tab. 1.6) or lysis (Egge and Heimdal, 1994; Netjsgaard *et al.*, 1997). At the end of a bloom, the situation is reversed with a slower inorganic production and a higher cell mortality which redistributes the coccosphere inorganic pool towards free coccoliths, aggregates and dissolved matter. This shift in regime could be caused by a low PO₄, a high viral activity and/or an increase in grazing once *E. huxleyi* predominates the planktonic community. The existence of

a coccosphere imposes to consider the losses for coccolithophorids differently than for other phytoplanktonic classes. On one hand, according to Young's review (1994b), the coccosphere could protect from grazing and bacteria and could regulate size and sinking. On the other hand, *E. huxleyi* is one of rare coccolithophorids species producing free coccoliths, via the detachment process. The importance and variations of coccoliths detachment patterns during the different bloom phases could influence the calcite distribution between free coccoliths and coccospheres and could therefore modify the sinking rate of the cells; but, this process is poorly known.

Table 1.4: Respiration rate

Respiration rate in Carbon units per cell (row 5); O₂ units per Chlo weight (row 7) and relative unit of carbon by biomass (row 8). The culture conditions are defined like table 1.1; growth rate and the capacity to calcify of the cells used is also given. The average respiration rate in relative unit give the parameter R (par. 21, Tab. 1.7) as is explained in III.B.6.

Culture conditions			Remarks	In light 10 ⁻⁴ -2pgC/cell/h	In dark 10 ⁻⁴ -2pgC/cell/h	respiration rate μmolO ₂ /mgChla/h	rate in carbone /day	References
Constants	Variables	μ div/day						
T=15° ; PFD=50 DIC=2 pH=8.3	PO4=100 ; NO3=20μM	phase expo	Low calcified	0,6		0,5		Nimer & merret, 1995 culture
	"	"	High calcified	4,7		3,8		
	PO4=100 ; NO3=0μM	"	"	6,9		2,8		
	PO4=0 ; NO3=20μM	"	"	6,4		2,2		
	PO4=100 ; NO3=20μM	phase station	"	1,8		1,3		
T=15° ; PFD=50 DIC=2 pH=6.5	PO4=100 ; NO3=20μM	phase expo	Low calcified	0,6		0,5		
	"	"	High calcified	7,2		2,9		
	PO4=100 ; NO3=0μM	"	"	-		-		
	PO4=0 ; NO3=20μM	"	"	-		-		
	PO4=100 ; NO3=20μM	phase station	"	1,8		1,4		
T=15° ; PFD=80 18h / 24 of light Keller medium PO4=36,2 μ=0,69 /day	DIC = 2,40 mM		Low calcified			30	0,21	Nielsen, 1995 culture Strain B 92/317
	7,40					33	0,23	
	12,40					41	0,28	
	DIC = 2,40 mM		High calcified			31	0,20	
	7,40					39	0,20	
	12,40					36	0,22	
T=15° PO4=36.2 μM 12h / 24 of light T=15° PO4=36.2 μM 18h / 24 of light T=15° PO4=36.2 μM 24h / 24 of light	PFD =100	0,64				22	0,18	Nielsen, 1997 culture Strain B 92/317, High calcif Keller medium
	200	0,73				40	0,25	
	800	0,8				42	0,23	
	PFD = 30	0,27				14	0,13	
	100	0,68				28	0,19	
	200	0,75				46	0,24	
	800	0,85				48	0,21	
	PFD = 30	0,3				16	0,13	
	100	0,66				32	0,17	
	200	0,72				43	0,24	
	800	0,87				65	0,17	
	PFD = 5,6	0,14				13,13	0,11	
T=15° PO4=25 ; NO3=300 24h / 24 of light	12,5	0,28				47,00	0,33	Riegman et al., 1998 chemostat Strain L
	25	0,4				72,61	0,42	
	50	0,53				99,45	0,49	
	70	0,57				-	-	
	100	0,65				67,22	0,25	
	200	0,63				111,70	0,25	
	400	0,61				-	-	

1. The dark respiration rate

The **dark respiration rate** has been measured in only three studies, at 15°C, and on *E. huxleyi* stains from North Atlantic (Tab. 1.4). Respiration varies by one order of magnitude, from 13.1 to 111.7 μmolO₂ mgChlo⁻¹ h⁻¹ or of a factor of 5, from 0.11 to 0.49 day⁻¹. This variability in term of carbon is due to the differences in the experimental conditions: (i) low calcified cells respiration is 5% to 20% higher than high calcified cells one (Nielsen, 1995). (ii) An increase in DIC of a factor of 5 (from 2.4 to 12.4 mM) induces an increase in respiration for low calcified cells (30%) but not for the high calcified ones (Nielsen, 1995). (iii) For high calcified cells under high PFD (800 μmol m⁻² s⁻¹), respiration rate increases of 20% for a doubling of TL, whereas under low PFD (< 200 μmol m⁻² s⁻¹) no variation as a function of TL is observed (Nielsen, 1997). (iv) High calcified cells respiration rate can double for an increase of PFD of a factor of 7 (Nielsen, 1997). For low calcified cells, the increase in respiration can be of a factor of 5 when PFD is multiplied by 9 (Riegman *et al.* 1998), ie. an increase twice the one for the high calcified cells. (v) At another hand, when PFD > 200 μmol/m²/s, a decrease of 30% in the respiration rate is observed for PFD

increase by a factor 4 (high calcified cells; Nielsen, 1997); when PFD > 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respiration rate decreases of 50% when PFD doubles (low calcified cells, Riegman *et al.* 1998), ie. a decrease 3 times larger than for high calcified cells.

2. The grazing rate

The **grazing** would not control *E. huxleyi* growth but could be more important during blooms. Grazing rate was estimated in monocultures and in mesocosm in Norwegian fjords, for different potential predators and concentrations (Tab. 1.5). Conditions and predator species for these experiments are summarized in column 4. This rate is a function of the predator type and the *E. huxleyi* cells concentration. It varies from 0 to 100×10^3 cells $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$, depending on the season. These experiments show that *E. huxleyi* can be grazed by micro- as well as mesozooplankton (Harris, 1994), up to a rate of 100×10^3 cell $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ for *Calanus helgolandicus* (Nejstgaard *et al.*, 1997). For this particular mesozooplankton, the ingestion rate at a concentration of 24×10^3 cells of *E. huxleyi* per mL is 4 times higher during spring than summer and reaches a saturation in summer of 60×10^3 cells $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ at 100×10^3 cells mL^{-1} (Harris, 1994; Nejstgaard, 1997). Such high concentrations can be observed during exceptional blooms (Huskin *et al.* 2000). During autumn, no significant grazing by *C. helgolandicus* was observed before the *E. huxleyi* concentration reaches 36×10^3 cells mL^{-1} (Huskin *et al.* 2000). At this same *E. huxleyi* concentration, grazing becomes similar to summer values (10×10^3 cells $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ -Harris, 1994-), characterized by a linear relationship between ingestion and cells concentration (ingestion = $0.558 \times [E. huxleyi]$ -Harris, 1994-), independent of the predator type (either *C. helgolandicus* or *Pseudocalanus elongatus*).

Table 1.5: Grazing rate

Data about grazing rate (row 6) of a population (concentration, row 2) by different species of zooplankton (row 4) in different season (row 3) and other culture conditions (row 1), are obtain in culture (line 1, 2, 3 et 6) or in mesocosm (line 4, 5) at different temperature (15°C -line 3, 6- ; 20°C -line 1, 2-).

Constants	cell concentration cells/ml	Season	Zooplankton	Remarks	Feeding rate cells/cope/h	References
T = 20°C	260		<i>A. tonsa</i>		2.6×10^4 /d	Honjo, 1976 culture
T = 20°C	1000		<i>Calanus finmarchicus</i>		equal for calcified or no calcified	Sikes & Wilbur, 1982 culture
T = 15°C ; PFD =100 12h/d	10000	summer	<i>Calanus helgolandicus</i>		4300	Harris, 1994 culture
	20000	"	"		11200	
	10000	"	<i>Pseudocalanus elongatus</i>		6500	
	20000	"	"		11000	
	50	spring	<i>C. finmarchicus</i>	barely ingested at all	320	Nejstgaard et al., 1997 mesocosm
	1000	"	"	significant grazing by	0	
	12000	"	"	micrzooplankton	60000	
	22000	spring	<i>Pseudocalanus elongatus</i>		54000	Nejstgaard, 1997 mesocosm
	90000	"	"		96000	
T = 15°C	12000	late fall - early winter	<i>Calanus helgolandicus</i>		700	Huskin et al. 2000 culture
	24000	"	"		600	
	36000	"	"		15500	
	24000	"	"		600	culture
	36000	"	"		15500	

Grazing could be important during the end of a bloom, as deduced from the presence of ciliates like *Strombidium* or *Lohmaniella*, observed during the last days of an *in situ* experiment in the Atlantic (Marañón *et al.*, 1996). Grazing by protozoans and microzooplankton was efficient in the Atlantic oceanic waters (Hooligan *et al.*, 1993). However, during an *E. huxleyi* bloom in mesocosm, the microzooplankton population decreased (its growth could not been sustained by the food available), in contrast to the heterotrophic dinoflagellates which are particularly

resistant to the lack of food, Nejstgaard *et al.*, 1997). This would induce that *E. huxleyi* is not a major source of food for microzooplankton, even when very abundant and predominant.

It is possible that during spring and summer, an *E. huxleyi* bloom could be particularly rich in lipids and thus highly nutritional to sustain a high copepod population and a consequent egg production. This effect has been observed with *Calanus finmarchicus* egg production in summer, thanks to *E. huxleyi* (Harris, 1994), but none in autumn (Huskin *et al.*, 2000). This pattern could be due to an ingestion rate by *C. finmarchicus* higher at the end of spring and summer because either of a warmer T or more energetic requirements (Nejstgaard *et al.*, 1997).

The **faecal pellets** produced by copepods when feeding on coccolithophorids seem smaller and more often damaged, but more numerous, than when no coccolithophorids are present (Nejstgaard *et al.*, 1997). According to a culture experiment by Harris in 1994, ingestion of PIC by copepods could be similar (44-73%) to the one of POC (50-82%), due to a digestion and used by copepods which seems to dissolve organic as well as inorganic matter.

During a spring mesocosm experiment (Nejstgaard *et al.*, 1997), *E. huxleyi*, when present at low concentrations, is less grazed than other phytoplankton (diatoms and). Mesozooplankton and *C. finmarchicus* populations are 3 times larger when an *E. huxleyi* bloom is present (12,000 cells mL⁻¹ corresponding to 51% of the biomass, with 74% of the total ingested carbon coming from *E. huxleyi*) than when diatoms are predominant. During this same spring mesocosm bloom, *E. huxleyi* grazing by microzooplankton did not seem to be responsible for the end of the bloom. This is because *E. huxleyi* should be less grazed than other small phytoplankton and that grazing by microzooplankton would never outdo *E. huxleyi* μ . This grazing behaviour is the opposite of diatoms. Moreover, the important selective grazing of the other phytoplankton could favour *E. huxleyi* growth by a "cascade-effect", as proposed by Nejstgaard *et al.* (1997). These observations, suggest that *E. huxleyi* would not be "grazers controlled" in contrast to diatoms.

3. The sinking rate

E. huxleyi **sinking rate** measured in the laboratory and in natural conditions is relatively low and very variable (between 0.04 m d⁻¹ and 1.4 m d⁻¹, Tab. 1.6). This wide range of an order of magnitude could be due to the growth phase, but mainly to the variability in volume and density of the particle chosen for the estimation: number of coccoliths, C- or N-cells, faecal pellets or aggregates. The highest sinking rate (1.3 m d⁻¹, Eppley *et al.* 1967) could be overestimated (as thought by Bienfag, 1981). The main laboratory study on sinking rates in batch cultures with two *E. huxleyi* cell types from station PAPA (C- and N-cell; Lecourt *et al.*, 1996, Balch *et al.* 1996) shows a decrease: (i) between 30% and 60% when PFD increases from 20 to 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (ii) between 40% and 80% when nutrients increase from detection limit to 30 μM for N and to 2 μM for PO₄. This result is in opposition to the sinking rate which doubles doubles when μ triples in a chemostat culture (Fritz and Balch, 1996). (iii) A decrease between 10% and 50% was observed when cultures were growing in NO₃ compared to NH₄ as N source.

In addition, N-cells could sink 30% to 70% slower than calcified ones; except for cultures in exponential growth phase (non-limiting nutrients N = 30 μM and PO₄ = 2 μM) and under low PFD (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) where N-cells sink 50% to 100% faster per volume unit than C-cells. C-cells ($\text{Ø}6.5 \mu\text{m}$ -cf. III.B.6-) can sink up to 5 times faster than N-cells ($\text{Ø}5.2 \mu\text{m}$, Eppley *et al.* 1967). Fe_d seems not to influence the sinking rate. Indeed, for a decrease from 1000 to 0.9 nM with 10 μM EDTA, the sinking rate does not vary (0.1 m d⁻¹) in a culture of calcified *E. huxleyi* (Muggli and Harrison, 1996c).

The variations in *E. huxleyi* sinking rates with Fe_d changes are small, in contrast to diatoms (formation of macroaggregates to leave an unfavourable environment by increasing the sinking rate, Smetacek, 1985). When Fe_d-stress, *E. huxleyi* volume decreases in half to maintain its low

sinking rate (0.1 m d^{-1}), whereas the volume of the diatom *Actinocyclus* sp. ($\text{Ø}20 \text{ }\mu\text{m}$) does not change and sinking rate is multiplied by 5 when Fe_d drops from 1000 to 0.9 nM with $10 \text{ }\mu\text{M}$ EDTA (Muggli *et al.*, 1996c). In high NO_3 and low Fe_d regions like north of the Polar Front, the size reduction mechanism could be an advantage for *E. huxleyi*, which reduces needs in Fe, C and N (Muggli *et al.*, 1996c) and sinking.

Table 1.6: Sinking rate

Values of the sinking rate given in published papers for *E.hux* (row 5), the cell volume associated (CV, row 6) and the sinking rate by cell volume calculated (sinking rate/CV,row 7). This rate is estimated for coccospheres alone (line 6, 8), the aggregates (line 3) and faecal pellets (line 4, 5), which content mainly *E.hux* coccoliths and coccospheres. The coccospheres sinking rates ($0.1\text{-}1\text{m/d}$) from all the studies (culture, in situ, Atlantic and Pacific strains) are in the same order than the sinkink rate calculated for the model (SR - par.23, Tab.1.6- see text for the comparison II.F).

Constants	Variables	μ div/day	Remarks	sinking rate m/d	Cell Volume μm^3	Sinking/CV mm/d/ μm^3	References
				5000m in 10yr (c) 1.400			Bramlette 1961 in situ
T = 18 ; PFD = 160 12h/d			with cocco	1.300	143.72	9.05	Eppley et al., 1967 culture
$\text{NO}_3 = 250$; $\text{PO}_4 = 25$			cocco removed	0.280	73.58	3.81	Strain of Paasche
in situ			macroaggregats	100			Smayda 1971
T = 5			Fecal pellets Fecal pellets	50 - 225 160			Honjo, 1976 culture
			<i>Calanus helgolandicus</i> <i>Pseudocalanus elongatus</i>	50 - 275 >100			Harris 1994 culture
T=16 ; PFD=145 14/24h of light	Fe = 1000nM		EDTA = $10\mu\text{M}$	0.115	34.05	3.39	Muggli & Harrison, 1996c culture
$\text{NH}_4=30$; $\text{PO}_4=2\mu\text{M}$	Fe << 0.8nM		"	0.090	18.38	4.88	Station P 145°W, 50°N, nov 91
		Stokes law		0.110 1.4 (d)	1-3 μm (if spheres)		Balch et al. 1996 culture
T = 17 ; 24h/d $\text{NO}_3=30$; $\text{PO}_4=2\mu\text{M}$	PFD = 20 150	phase expo	C-cell	0.106 0.073	25.00 25.83	4.24 2.84	Lecourt et al., 1996
"	PFD = 20 150	"	N-cell	0.106 0.041	16.25 19.17	6.52 2.13	culture Station P 145°W, 50°N, nov 91
"	PFD = 20 150	phase senescente	C-cell	0.462 0.148	26.53 26.11	17.40 5.68	
"	PFD = 20 150	"	N-cell	0.140 0.099	14.32 16.00	9.79 6.18	
T = 17 ; 24h/d $\text{NH}_4=30$; $\text{PO}_4=2\mu\text{M}$	PFD = 20 150	phase expo	C-cell	0.090 0.122	25.83 32.50	3.47 3.76	
"	PFD = 20 150	"	N-cell	0.139 0.057	19.17 25.42	7.23 2.25	
"	PFD = 20 150	phase senescente	C-cell	0.478 0.313	22.74 26.95	21.02 11.62	
"	PFD = 20 150	"	N-cell	0.297 0.124	15.16 20.63	19.57 5.99	
				0.8 - 1.1	180 - 1400	0.57 - 6.11	Geisen et al., 1999 culture

(c) densest part of the bloom

(d) cultured cells

in bold : maximum and minimum

Coccospheres are not the only particles to consider to understand *E. huxleyi* sinking, *Aggregates* of size $100\text{-}200 \text{ }\mu\text{m}$ with 15×10^3 of intact *E. huxleyi* cells embedded in mucus could also exist, as observed after a bloom with a density of $1.45 \times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$ (Cadée, 1985). The formation of TEP (transparent exopolymer particles) could influence the formation of these aggregats and increase with CO_2 increase (Engel, 2002). Sinking rate of these aggregats can be

as high as 100 m d⁻¹ (Smayda, 1971) and be of the same order of magnitude than sinking of *faecal pellets* containing digested cells (50-225 m d⁻¹, Honjo, 1976). These two alternatives forms of sinking should be the way allowing CaCO₃ associated with *E. huxleyi* to reach the ocean floor sediments. Sinking of free *coccoliths* is unknown and difficult to estimate *in situ* as their residence time in the surface layer also depends on their detachment rates (see below).

4. The pool of detached coccoliths depends on detachment and dissolution

In situ and laboratory data are contradictory. In cultures, data concerning number of detached coccoliths are scarce; the ratio between detached coccoliths and cells remains < 30 (cf. Chap. 3; Tab. 3.2). *In situ*, this ratio can reach several thousands (Fernandez *et al.*, 1993). These discrepancies could be due to: (i) a high cell destruction in natural conditions which could be the main cause of high density of free coccoliths at the surface; (ii) the difficulty to distinguish between attached and detached coccoliths in cultures (Paasche and Brubak, 1994); (iii) the detachment process of coccoliths from the coccosphere which is poorly known; (iv) the cell autolysis (which could be significant at the end of a bloom because of viral activity but is not well quantified yet).

The **detachment** process is when coccoliths detach themselves from the coccosphere and join the pool of free coccoliths. The detachment rate varies between 0.7 and 14 coccoliths cell⁻¹ d⁻¹, according to the only culture studies which quantified it (Balch *et al.* 1993, Fritz and Balch, 1996, Fritz, 1999). For cells in exponential growth phase, it could triple when μ increases from 0.35 to 1 day⁻¹ (Fritz and Balch, 1996) or would not present any dependence on μ , but would be on average of 7 to 8 coccoliths cell⁻¹ h⁻¹ (Fritz, 1999). In stationary growth phase, this rate would be double (Balch *et al.* 1993). This detachment process could be the reason of the increase of the free coccoliths/cell ratio with the aging of the population. A best knowledge of the free coccoliths/cell ratio would allow to quantify the number of *E. huxleyi* cells at the surface using satellite imaging during bloom periods.

The end of a bloom could be characterised by a partial **dissolution** of coccoliths and coccospheres as observed by Young (1994b) but not quantified.

The important **destruction** of cells in natural conditions could explain that the detached coccoliths/cell ratio increases with the aging of the population *in situ* (Balch *et al.*, 1991; Bleijswijk *et al.*, 1994b). Thus, in the North Sea, this ratio was 30 coccoliths cell⁻¹ during a bloom in July 1991 (Holligan *et al.*, 1993) and 300 at the end of the bloom in July 1993 (van der Wal *et al.*, 1995). The massive cell destruction at the end of a bloom could be caused by a virus proliferation amongst the populations.

Studies on **viral activity** have been mainly conducted in mesocosm (Bratbak *et al.*, 1993; Egge and Heimdal, 1994) and during *E. huxleyi* bloom in Norwegian coastal waters (Bratbak *et al.*, 1995). Particles thought to be viruses (VLP: Virus-Like Particles), able to destruct *E. huxleyi*, were isolated from *E. huxleyi* monocultures: these particles specific to *E. huxleyi* could belong to two major size class (140 and 140 nm in diameter) but they have not been evidenced as truly viruses yet (Bratbak *et al.*, 1996).

During a mesocosm bloom where PO₄ was not limiting, viruses were estimated to be responsible of 25% to 100% of the net mortality of *E. huxleyi* cells at the end of a bloom (Bratbak *et al.*, 1993). This result was deduced from a positive correlation between number of cells and VLP. However, during the end of a bloom in two different mesocosm studies, a negative correlation between VLP and cell number was observed (Bratbak *et al.*, 1993, 1995). One possible explanation could be that the cell death induces a massive release of free VLP (Bratbak *et al.*, 1996). Similarly, in some of the Norwegian fjords sampled (Bratbak *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 1996c), as well as in the mesocosm studied by Bratbak *et al.* (1993), a negative correlation between VLP and *E. huxleyi* cells during the end of the bloom would suggest that viruses could

be the main cause. Moreover, in the North Sea where VLP are of same size and morphology as in fjords, viral infection could play a role in the control and ending a bloom (Bratbak *et al.*, 1996).

Accumulation of VLP in a mesocosm rich in PO_4 could prevent the development of a bloom. In contrast, the viral activity could be reduced when PO_4 are lower than $0.8 \mu\text{M}$, independent of the NO_3 -stress (Bratbak *et al.*, 1993). *VLP could be the main cause of the end of blooms in rich PO_4 seawater.*

III. Model consideration

A. Are the experimental datas adapted to constrain a growth model for *E. huxleyi* at the cell level? And new criteria

In order to include explicitly the coccolithophorids role in a quota model to be extended at global scale, with *E. huxleyi* as the model organism, the definition of the equations and parameters must meet the following requirements: (i) use parameterisations representing *E. huxleyi* behaviour in the global ocean and its position in trophic food web; (ii) cover the range of the environmental parameters (T, nutrients, light) of all oceanic regions where this algae not only grows but also produces blooms.

1. Differences related to the experimental approaches

The construction of mathematical models at the cellular level (equations representing each process, eg: growth, calcification and detachment- and values of the associated parameters) often depends on the knowledge obtained in experimental controlled conditions. Thanks to *E. huxleyi* facility to be cultivated and compared to the others coccolithophorids, many results coming from experiments in batch and chemostat cultures exist in the literature. This makes possible to study the effects on *E. huxleyi* of various conditions: carbonates system (Paasche, 1964; Nimer and Merret, 1993; Buitenhuis *et al.*, 1999; Riebesell *et al.*, 2000), light (Paasche, 1967, 1999), T (Kooijman *et al.*, 2001), salinity (noted S; Mjaaland, 1956; Paasche, 1967; Fisher and Honjo, 1989; Brand, 1984), nutrients (Paasche and Brubak, 1994; Fernandez *et al.*, 1996c) and Fe (Boyé and van den Berg, 2000; Sunda and Huntsman, 1995; Muggli and Harrison, 1996b). Altogether, data gathered in laboratory show both a strong control by the various environmental conditions on *E. huxleyi* (cf. II.A to II.D; Fig. 1.2 to 1.4, and Tab. 1.1 to 1.3) and a complex coupling between growth processes (cellular division and photosynthesis) and calcification (cf. II.D; Fig. 1.4c).

The quantitative comparison of the experimental data (batch, chemostat, cyclostat and mesocosms), carried out here using more than 200 published papers, shows that organic biomasses and intracellular quotas (POC:PON:POP:PFe:Chlo; cf. II.A), T dependence of growth (cf. II.B), nutrients uptake's kinetic (cf. II.C), photosynthesis and calcification variations with light and carbonate system (cf. II.D), inorganic pool (cf. II.E) and losses terms (eg: respiration, grazing, sinking and detachment; cf. II.F) can be very different from a study to another. The differences and contradictions which appear between experimental results, in accordance with the Paasche (2002) conclusions, are often due how the system is disturbed and the experimental device performed (eg: Isotopic labelling of ^{14}C or ^{45}Ca for the determination of photosynthesis and calcification). To be able to choose the right parameterisations for an *E. huxleyi* model of global applicability among different or contradictory results, in each section of this work a detailed analysis about the origin of these discrepancies is carried out. The mains, more general and recurrent differences among the experiments are:

(i) the cultivated cells, which are differentiated according to their calcified feature (or their phase of the life cycle). The C-cells are in a calcified phase, the S-cells are in a flagellated phase, that is not calcified (Klaveness, 1972), while N-cells are not calcified and do not have flagella. Moreover, the growth of N-cells can be twice that of C-cells (Price *et al.*, 1998; Fig. 1.3). They would grow under very low T ($< 4^{\circ}\text{C}$, Kooijman *et al.*, 2001; Fig. 1.3) and have a photosynthesis half that the C-cells (Nielsen, 1995; Tab. 1.2 and Fig. 4a).

(ii) The various strains used, which can originate from different oceanic regions (for example, North East Atlantic -Paasche, 1999- have a growth twice that the ones of the Gulf of Mexico - Sunda and Huntsman, 1995). Among the strains already isolated and studied in laboratory, type-A and -B cells from North East Atlantic (Bleijswijk *et al.*, 1991) have particularly distinguished. Type-B cells are 50% larger) and 100% more calcified (Tab. 1.3; Bleijswijk *et al.* 1994 than type-A cells.

(iii) The daily light exposure time (TL in hours/day) in to which the cells are cultivated. TL of 18 and 24 h d⁻¹, would induce photoinhibition, which results in a reduction of the POC:PON (Fig. 1.2a; Nielsen, 1997; Riegman *et al.* 1998) and POC:POP (Fig. 1.2b; Riegman *et al.* 1998) quota beyond 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, not like a TL of 12 h d⁻¹ (Fig.1.2a; Nielsen, 1997). In addition, an optimal specific photosynthesis rate (K_{max} ; Tab. 1.2) approximately half lower is observed at all the light intensity (Photon flux Density -PFD- in $\mu\text{mol of photon m}^{-2} \text{second}^{-1}$) for cells cultivated in a continuous light cycle (TL of 24 h d⁻¹) compared to those cultivated in a day/night cycle (Tab. 1.2, Nielsen, 1997).

(iv) The PFD under which the cell is cultivated and adapted (culture PFD). At 20°C, μ is low (0.8 day⁻¹) when associated with low PFD (7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Mjaaland 1956 -Fig. 1.3-) and high (1.8 day⁻¹) with high PFD (230 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Paasche, 1967 -Fig. 1.3-). K_{max} can increase by a factor of 2 when culture PFD increases from 5.6 to 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Riegman *et al.* 1998) or from 30 to 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Nielsen, 1997). The light adaptation parameter (I_K , Tab. 1.2) for cells cultivated under very high PFD (1160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Balch *et al.* 1992) is ten times higher than for cells cultivated under low PFD (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Nimer and Merret, 1993). Moreover, calcification (C) compared to photosynthesis (P) could be stimulated in darkness (C/P = 3) when the culture PFD is high (1160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Balch *et al.*, 1992 -Fig. 1.3c).

(v) The incubation duration allowing to measure the growth processes (cellular division, P and C). Variation of the C/P ratio with the PFD (Fig. 1.3c) according to the incubation duration are as follow: - for a few minutes of incubation, increase of C/P from 1 to 2 when PFD decrease (from 100 to 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Paasche, 1963); - for a few hours of incubation, C/P around 1 whatever the PFD (Nimer and Merret, 1993); - for one day or more of incubation, increase of C/P from 0.5 to 1 when PFD decreases (from 150 to 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Riebesell *et al.*, 2000), but C/P = 0 for PFD lower than 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bleijswijk *et al.*, 1994).

(vi) The presence of ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) in the culture medium which complexes metals, in particular Fe and keeps it available for the cell in the inorganic form (Fe³⁺). The growth can decrease by 50% when EDTA concentration increases (from 1 to 100 μM), whereas the total dissolved iron (Fed) increases (from 82 to 8200 nM; Muggli and Harrison, 1996a). This result is in agreement with the cellular inhibition (reduction of 50% of coccolithophorids in culture) produced by the presence of EDTA in large quantity (Sunda and Huntsman, 1995).

(vii) Chemical treatments carried out on the cells for the total calcite (attached and detached coccoliths) evaluation. Calcite content determined by analysis of the Ca-CaCO₃ dissolved after an exposure to acid (Bleijswijk *et al.*, 1994) is 20% weaker than the inorganic carbon content (PIC) obtained by difference between total carbon (TPC) and organic carbon (POC) weighed after exposure to acid (Zondervan, 2001). This result is in agreement with the elemental analysis

of coccoliths, which show a Ca/PIC ratio of approximately 0.8 mol mol⁻¹ (Fagerbakke *et al.*, 1994).

(viii) Techniques of measurement used to quantify free coccoliths and coccosphere. The number of free coccoliths is obtained directly by counting using a polarized light microscope (Townsend *et al.*, 1994) or a light-scattering photometer (Balch *et al.*, 1991). But, the calcite which represent the free coccoliths cannot be distinguished directly from the total calcite, because coccolith size is too close to the cell one (cf. II.E) and can be separated by filtration only with difficulty. In the majority of the *in situ* experiments, no distinction between the attached and detached pools for the calcite and the number of coccoliths has been done. On the contrary, in *in vitro* experiments the number of coccoliths on each coccosphere is estimated with the Transmission Electron Microscopy (Linschooten *et al.*, 1991) or by difference between the number of free coccoliths before (detached only) and after the organic cell destruction (attached plus detached; Paasche *et al.*, 1996; Fritz and Balch, 1996). Thus the calcite of each coccoliths and of each pool (attached and detached) is calculated from the total calcite (cf. vii) above) and the number of coccoliths in each pool. In addition, the various measurement techniques could induce extra detachment (by stressing the alga during the chemical treatments). It would lead to use various units and different pool (free coccoliths and coccospheres) for the inorganic pool description (cf. II.E).

2. New criteria for modelling *E. huxleyi*

a. Criteria provided for Swamco

Among all the experimental approaches described above, only the data corresponding to the criteria imposed by SWAMCO, will be firstly retained to calculate the parameters adapted to the model: (i) in order to reach the possible maximum growth of the organism, give μ under non-limiting nutrients and light; (ii) obtain the intracellular quotas of the cell functional elements by preventing a reserve accumulation by the organism; these data must be obtained under non-limiting nutrients but limiting light conditions and at the optimal T for growth; (iii) study the *E. huxleyi* kinetic with respect to Fe_d without EDTA, which makes it possible to control Fe', but masks the possible availability of the organic iron (noted FeL).

b. New criteria resulting from the synthesis

From the comparison of the experimental conditions, some new constraints for the choice of the parameters are pointed out. These new criteria of data selection consider at one hand the *E. huxleyi* particularities (eg: calcified feature and possession of a calcite layer formed by coccoliths) and the culture conditions close to those *in situ*, on the other hand. Favoured data are: (i) from experiments on C-cells (N-cells would be mutant laboratory cells obtained by a very long exposure to strong nutrients; Guillard, 1975, Andersen, 1981) and in particular type-A cells which form blooms like in the Northern Atlantic Ocean (type-B cells are mainly present in the North Sea, and do not form blooms -Bleijswijk *et al.*, 1991-); (ii) realistic culture conditions with: - TL < 16 hours and PFD about 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ corresponding to temperate regions light; - a culture sea water similar to the natural environment of the strain and not enriched too much in nutrients (lower than the oceanic maximum concentrations); (iii) during measurements of processes (μ , P and C), incubations under PFD close to those of culture (allowing to have cells well adapt to the incubation conditions) with a duration of 24 hours (allowing to consider a whole growth daily cycle). Indeed, the growth daily cycle has a variability in term of biomasses (organic and inorganic) and of growth (cellular division and P; Bleijswijk *et al.*, 1994, Varela and Harrison, 1999) due to the existence of an internal clock when a day/night cycle is imposed to the algae (Brand, 1982); iv) determination of calcite by measurement of calcium (Ca²⁺) instead of

calculation of PIC (from TPC-POC). The measurement by Ca^{2+} would allow to get only the inorganic part of the coccosphere, which would also have an organic carbon part (Ca/PIC of the coccosphere $< 1 \text{ mol mol}^{-1}$) and prevent to over-estimate the calcite present around the cell.

Only the data meeting all the criteria mentioned above will be used to estimate the parameters intended to constrain the *E. huxleyi* growth model. Experimental approaches will be proposed if no available data corresponds to the defined criteria. When various data meet the criteria for the model and represent different strains or oceanic regions; it is the maximum or the average of the values covering all the range of the oceanic variability which will be used (as specified in the following sections).

B. Model parametrisation: model SWAMCO parametrisation

1. The quotas suggested

The quotas suggested for the modelling (Tab. 1.7) corresponding to a $T = 15^\circ\text{C}$, and are as following: $\text{POC}:\text{PON} = 6 \text{ mol mol}^{-1}$ (obtained at a limiting PFD of $8.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and a TL of 14 h d^{-1} ; Fig. 1. 2a; Bleijswijk *et al.* 1994); $\text{POC}:\text{POP} = 85 \text{ mol mol}^{-1}$ (obtained at a limiting PFD of $5.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and a TL of 24 h d^{-1} ; Fig. 1.2b, Riegman *et al.* 1998) not know for other TL; $\text{PFe}:\text{POC} = 25 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (obtained for a non-limiting PFD of $175 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and a TL of 14 h d^{-1} ; Fig. 1.2c, Sunda and Huntsman, 1995) since no information is available for limiting PFD; $\text{Chlo}:\text{POC} = 0.35 \text{ g mol}^{-1}$ (obtained at a limiting PFD and when the quota variation is independent of TL; Fig. 1.2d, Nielsen, 1995; Riegman *et al.* 1998). $\text{POC}:\text{PON}$ and $\text{Chlo}:\text{POC}$ are thus the two only quotas well defined to draw up the modelling (as defined in III.A.2).

2. The growth as a function of temperature

To parameterise the *Emiliania huxleyi* growth as a function of temperature, it is proposed to calculate an equation with data (Fig. 1.3) corresponding to the model criteria (light and nutrients non limiting, calcified C-cells of type A, c.f. §II.C). When criteria are not respected or when it exists more than one data for the same temperature we propose to take data as following:

(i) Kooijman *et al.*'s data (2001) obtained at T between 2°C and 6°C are used in the calculations of the equation, as they mirror an ability of *E. huxleyi* to grow relatively fast (0.3 day^{-1}) at very low T ($< 6^\circ\text{C}$), even under low PFD ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), even if the calcified feature of their cells is unknown.

(ii) Price *et al.*'s data (1998) obtained at T of 17°C is not taken into account for the equation because the strains used by him was not a C-cell but N-cell, which ones are not representative for a model of the role of *E. huxleyi* on calcification. The high growth rate of this strain (2.8 day^{-1}), could favored *E. huxleyi* at the beginning of a bloom when cells are low calcified, like suggested by Lecourt *et al.* (1996).

(iii) Amongst the data obtained at a high PFD and non-limiting nutrients for each T , the ones corresponding to the most intense μ were chosen. This choice takes into account our main hypothesis: - the cells growing in the ocean at a given T have a potentially higher μ than cells non-adapted to this T . This hypothesis considers that each *E. huxleyi* strain would be the best adapted (maximum growth) to the environmental conditions it usually lives in (Brand 1984). As the response of all the *E. huxleyi* strains living in the ocean is not known, choosing the maximum μ measured during all the existing experiments would, at least, represent in the best way the potential *E. huxleyi* μ for each ocean T .

(iv) Therefore, the equation should represent the higher maximum μ , obtained during experiment at constant T, that μ obtained during experiment under variable T: 1.15 day⁻¹ (at 10°C -Bleijswijk *et al.*, 1994-), 1.58 day⁻¹ (at 15°C -Buitenhuis *et al.*, 1999) and 2.35 day⁻¹ (is the maximal μ at optimal T of 20°C, $\mu_{\max}$ -par.1, Tab. 1.7; Paasche *et al.*, 1996-).

3. How modelling the nutrients and iron kinetics

a. NO₃

For the NO₃ half *uptake/assimilation* constant (K_{SNO_3} , par.7), the average half uptake constant calculated by Riegman *et al.* (1998) can be retained, because measured in stable conditions (chemostat) with a non significant standard deviation (between 0.18 and 0.24 μ M; Tab. 1.1), in opposition to conditions in batch culture which contain cells in a transitory state and can induce a standard deviation 10 times stronger (Eppley *et al.*, 1969 -Tab. 1.1). It has to be noticed that this constant is deduced from the uptake and its half growth remains to be measured.

b. NH₄

The NO₃ *uptake inhibition* with the NH₄ (equ.2 -Tab. 1.7-, par.8 and 9) obtained on a strain from PAPA station is according to the only study existing (Varela and Harrison, 1999) and is represented by a modified Michaelis Menten equation. The parameters of this equation, for $V_{\max} = 53.26 \pm 0.24$ fmolNO₃ cell⁻¹ d⁻¹ at 10°C, are: the maximum inhibition coefficient ($I_{\max} = 100\%$, par.8) and the inhibition constant ($K_i = 0.24 \pm 0.004$ μ molNH₄, par. 9, Tab. 1.7).

c. PO₄

The PO₄ half *uptake/assimilation* constant (K_{SPO_4} , par.10 -Tab. 1.7-) comes from the only study measuring such constant (Riegman *et al.*, 1998). It is recommended to represent's kinetic with the half growth constant (1 nM) and not with the uptake constant of PO₄ uptake because it allows to take into account indirectly the very effective use of Porga under strong PO₄stress periods, thank to the two enzymatic systems of *E. huxleyi* (Riegman *et al.*, 2000).

d. Fe

The Fe_d half *uptake/assimilation* constant (K_{SFe} , par.11 -Tab. 1.7-) is estimated from the only Fe' half growth constant existing (2.1pM -Sunda and Huntsman, 1995-) and with an estimation of the equivalent Fe_d assimilation. By supposing that Fe' *in situ* accounts in average for 1% of the Fe_d (between 0.1 and 10%; Boyé 2000) and that the possible uptake of other Fe species (as FeL) can be neglected for *E. huxleyi* (see the Fe kinetic, §II.B), then K_{SFe} is around 100 fold high than 2.1pM.

It has to be notified that the temperature of theses experiment (but not for Fe') are not the optimal temperature for growth (20°C) recommended to be inside the criteria (with 15°C for the uptake/assimilation constant and 10°C for the NO₃ uptake inhibition by NH₄).

Table 1.7 : Equation and advice for the SWAMCO model.

NO₃ and PO₄ assimilation equations, NO₃ uptake inhibition by ammonium (Equ.1.2, Harrison *et al.*1989; parameters are explained IIIB) and Photosynthesis Vs Irradiance (Equ.1.3, Platt *et al.* 1980; parameter to be calculated from Zondervan *et al.* 2002 -Fig. 1.4a- as is explained III.B2) are ever used by SWAMCO; Growth rate Vs Temperature (Equ.1.1, to be calculated from Figure 1.3 data as is explained in IIIB2) is a new equation proposed from this synthesis for existing SWAMCO dependencies; Fe assimilation, Calcification Vs Irradiance (Equ.1.3, parameter to be calculated from Zondervan *et al.* 2002 -Fig. 1.4b- as is explained III.B2) are new dependencies proposed in this work for a quota model. Parameters chose values and ranges proposed to SWAMCO model; new values for SWAMCO constants (par.7, 10, 21, 23); new constants to be introduced in SWAMCO to take into account the Inorganic quota (par.11). The experimental results used to choose or estimated the adapted values for each parameter are also indicated. The description why and how this choose was performed is described in the text §IIIB.

Processes	Equation	Parametrisation					Source and reference
		Symbol and meaning	Range	Units	Value for model	Remark	
Growth rate μ (day ⁻¹)	$\mu = \mu_{\max} \cdot f(T) \cdot X / (X + KX)$ Cohen and Parnas, 1976	$\mu_{\max}$ = Maximal growth rate	0-2.8	day ⁻¹	2.35 (par.1)	at Topt = 20°C	c.f. III.B.2 (Paasche et al. 1996)
		f(T) = Temperature dependance	0-1	n.d.	-	To be calculated	c.f. Fig. 1.3 (envelopp data)
	X = Limiting Nutrient = NO ₃ , PO ₄ or Fed Eq.1.1	K _{NO3} = Half saturation constant of NO ₃	0.05-0.4	μM	0.2 (par.2)		c.f.Tab. 1.1; III. B.3a (Riegman et al. 1998)
		K _{PO4} = Half saturation constant of PO ₄	0.1-0.47	μM	0.001 (par.3)		c.f. Tab. 1.1; III. B.3c (Riegman et al. 1998)
		K _{Fed} = Half saturation constant of Fed	-	nM	~0.21 (par.4)	Evaluated in this study	c.f. Tab. 1.1; III. B.3d (Sunda and Huntsman, 1995)
		NO ₃ = Nitrate Oceanic range	0-35	μM	-		WOA data base
		PO ₄ = Phosphate Oceanic range	0-3	μM	-		WOA data base
		Fed = Total Dissolved Iron Oceanic range	0-4	nM	-		WOA data base
Inhibition by NH ₄ of the NO ₃ assimilation (f _{NO3} n.d.)	$f_{NO3} = 1 - I_{\max} \cdot NH_4 / (NH_4 + K_i)$ Eq.1.2 Harrison et al. 1996	I _{max} = Maximal uptake inhibition by NH ₄	-	molN molN ⁻¹	1 (par.5)		Cf III.B.3b (Varela and Harrison, 1999)
		K _i = half inhibition constant by NH ₄	-	μM	0.24 (par.6)		Cf III.B.3b (Varela and Harrison, 1999)
		NH ₄ = Ammonium Oceanic range	0-30	μM	-		WOA data base
Cellular elemental ratios C:X (mol mol ⁻¹)	C:X = constant X = Elemental component = Chlo, N, P, Fe	C:N = N quota	5.3-34.2	mol mol ⁻¹	6 (par.7)		c.f. Fig. 1.2a; III. B.1 (Bleijswijk et al.1994)
		C:P = P quota	78-600	mol mol ⁻¹	85 (par.8)		c.f. Fig. 1.2b; III. B.1 (Riegman et al. 1998)
		Fe:C = Intracellular Fe quota	3.1-160	μmol mol ⁻¹	25 (par.9)		c.f. III. B.1 (Sunda and Huntsman 1995)
	Chlo:C = constant	Chlo:C = Chlo content per Carbon	0.032-1.092	g mol ⁻¹	0.35 (par.10)		c.f. Fig. 1.2c; III. B.1 (Nielsen, 1995)
	PIC:POC = Constant	PIC:POC = Inorganic Carbon quota	0.04-2.3	mol mol ⁻¹	0.4 (par.11)	Evaluated in this study	c.f. Tab. 1.3; III. B.5

Table 1.7 (continued)

Processes	Equation	Symbol and meaning	Parametrisation Range	Units	Value for model	Remark	Source and reference
Photosynthese P (C mgChlo ⁻¹ h ⁻¹)	$P = K_{\max} \cdot [1 - e^{-\alpha} \cdot (PFD - I_C) / K_{\max}] \cdot [e^{-\beta} \cdot (PFD - I_C) / K_{\max}]$ Platt et al., 1980 Eq.1.3	K _{max} = Optimal specific photosynthesis rate	1.08-6	mgC mgChlo ⁻¹ h ⁻¹	4 (par.12)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3a; III. B.4 (Zondervan et al. 2002)
		alfa = Photosynthesis efficiency	0.26-104	m ² .s μmol ⁻¹ h ⁻¹	0.1 (par.13)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3a; III. B.4 (Zondervan et al. 2002)
		I _C = Minimum light of Compensation	-	μmol ⁻² s ⁻¹	3 (par.14)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3a; III. B.4 (Bleijswijk et al.1994)
		I _K =K _{max} / alfa = Light adaptation parameter	36.5-1000	μmol ⁻² s ⁻¹	40 (par.15)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3a; III. B.4 (Zondervan et al. 2002)
		Beta = Photoinhibition coefficient	-	m ² .s μmol ⁻¹ h ⁻¹	0.0008 (par.16)		c.f. Fig. 1.3a; III. B.4 (Nanninga and Tyrell 1996)
		PFD = Light Oceanic Range	0-2500	μmol ⁻² s ⁻¹	-		WOA data base
Calcification C (PgC cell ⁻¹ h ⁻¹)	$C = C_{\max} \cdot [1 - e^{-\alpha C} \cdot (PFD - I_{Cmin}) / C_{\max}]$ Eq.1.4	C _{max} = Maximum calcification rate	0.2-1.6	pgC cell ⁻¹ h ⁻¹	1.6 (par.17)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3b; III. B.4 (Zondervan et al. 2002)
		alfa _C = Calcification efficiency			0.1 (par.18)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3b; III. B.4 (Zondervan et al. 2002)
		I _{Cmin} = Minimum light for calcification	-	μmol ⁻² s ⁻¹	7 (par.19)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3b; III. B.4 (Bleijswijk et al. 1994)
		I _{KC} = Light adaptation parameter	-	μmol ⁻² s ⁻¹	20 (par.20)	Evaluated in this study	c.f. Fig. 1.3b; III. B.4 (Zondervan et al. 2002)
Losses Rates YR	YR = Constant Rate Y = Respiration, Sinking, Cell Autolysis, Grazing, Detachment	RR = Respiration	0.1-0.5	day ⁻¹	0.2 (par.21)	Evaluated in this study	c.f. Tab. 1.4; III. B.6a (Nielsen 1997 and Riegman et al. 1998)
		GR = Grazing	0-96000	cells copepods ⁻¹ h ⁻¹	-0 (par.22)		c.f. Tab. 1.5; III. B.6b (Nejstgaard et al., 1997)
		SR = Sinking	0.041-100	m day ⁻¹	0.35 (par.23)	Evaluated in this study	c.f. Tab. 1.6; III. B.6c
		AR = Cell Autolysis	-	day ⁻¹	-		-
		DR = Detachement	0.7-9.8	cocco cell ⁻¹ d ⁻¹	-	Evaluated in this study	III. B.6d

4. How to parameterise P and C as a function of light?

It appears from this synthesis that the data resulting from experiments with an incubation duration of one day (cf. III.A.2) allow to determine a single dependence. Thus, it is proposed to use the equations of P and C as a function of PFD (Fig. 1.4a and b, respectively) resulting from Zondervan *et al.* (2002) and Bleijswijk *et al.* (1994) experiments. These data are selected because they are the only ones obtained during a sufficient incubation duration (> 24 hours) to represent the processes during a complete cycle of growth with a proper day/night cycle (< 16 h d⁻¹). However, the chosen data remains out of the defined criteria of choice for the model (cf. III.A.2). First, they represent the net production (instead of photosynthesis) and thus already take into account carbon losses related to the maintenance metabolism of the cell (respiration, par.16, Tab. 1.4; cf. II.F). Secondly, they are obtained during an incubation duration of 38 hours (Zondervan *et al.*, 2002) and was given in a non-convertible unit (in term of carbon production per POC, Bleijswijk *et al.*, 1994).

The existing photosynthesis data can be represented by a Platt *et al.* equation (1980; equ.3, Tab. 1.7; similar to the diatoms ones used by SWAMCO). The parameters of this equation (par.12, 13 and 14 -Tab. 1.7-) can be evaluated also. However, *E. huxleyi* is known to be low photoinhibited (Nanninga and Tyrrell, 1996), with a parameter *beta* (par. 15) equal to zero.

Calcification is parametrised as a function of PFD to indicate that its response to light is different from the photosynthesis ones (Fig. 1.4b; Paasche, 1963; Nimer and Merret, 1993; Bleijswijk *et al.* 1994; Zondervan 2001). The results of Bleijswijk *et al.* (1994) are incorporated in the equation to take into account the low capacity of the algae to calcify at depth (Balch *et al.*, 1996), where PFD < 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bleijswijk *et al.*, 1994). The equation should be a modified Michaelis Menten function (equ.4, Tab. 1.7), with a minimum PFD (I_{Cmin} -par.18- of 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -below which the cells do not calcify-); a maximum calcification rate (C_{max} -par.17-) and a calcification constant (K_C -par.19, Tab. 1.7) remain to be calculated.

5. A big coccosphere for the model

If culture data from the literature show significant influences of T, nutrients and Fed, they are not sufficient to determine robust parameterisations of these impacts on the calcite content per cell. It is proposed to consider the maximal PIC/cell for a C-cell of type-A obtained in non-limiting light and nutrients conditions. This values is from the superior limit of coccoliths/cell and Ca/coccolith, in these conditions. Coccoliths/cell for a normally calcified **type-A** cell is up to 20 coccoliths cell⁻¹ (Paasche, 1962; Holligan *et al.* 1983; Linschooten *et al.* 1991) and their average calcite content is 0.25 pgC coccolith⁻¹ (cf. Chap. 3; Tab. 3.2). That is to mean a PIC/cell of 5 pgC cell⁻¹ and PIC:POC of 0.4 mol mol⁻¹ (par.6, Tab. 1.7) for a cell with an average POC/cell of 12 pgC cell⁻¹ (cf. §II.A). The production in terms of PIC (cf. II.D) exceeding the calcite content of the cell will be found in the free coccoliths pool, producing by the detachment process (cf. II.F).

This coccosphere is an overestimation of the average coccosphere (15 coccoliths of 0.12 pgC coccolith⁻¹) estimated by Paasche (2002). This coccosphere should be a best constant for model because it is implicitly taking into account the increasing of the coccosphere and the size of coccoliths in nutrients limiting conditions, in particular at the end of the blooms.

6. The losses rate

a. Respiration

To parameterise *respiration* in the model, a value calculated from the average of the reported values (Tab. 1.4) is proposed. The reason for this choice is that even if respiration can increase

(from 0.1 to 0.5 day⁻¹) with PFD (from 6 to 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -Riegman *et al.* 1998), it generally does not increase up to 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Nielsen, 1997). Considering that the proposed data to represent photosynthesis in the model (cf. II.D) are in terms of net production (ie. already taking into account respiration, Zondervan *et al.*, 2002), the respiration term in the suggested equations for the model is not necessary.

b. Grazing rate

It is proposed to consider a very low *grazing rate*, close to zero. For a model with several phytoplankton classes which allows to take into account the beneficial "cascade-effect" for *E. huxleyi*. During blooms or periods of *E. huxleyi* predominance, the grazing could be more active, but would not allow to control the growth and not cause the end of a bloom.

c. Sinking rates

For the models, it seems difficult to account for several *sinking rates* proper to each kind of particles produced by *E. huxleyi* (coccospheres, coccoliths, aggregates), as number and biomass of aggregates as well as coccoliths sinking rate and degradation process (dissolution) are unknown. To take into account the possibility of aggregation, we choose to calculate the sinking rate of a big coccosphere (superior limit of a coccosphere in non limiting condition of light and nutrients), using the following formula (Eppley *et al.*, 1967):

$$SR = 288.CV.g (rc-rsw)/n/D/\pi$$

with SR is sinking rate in meter/day, CV is the coccosphere volume in cm³, g is the gravity acceleration (=98cm s⁻²), rc is the cell density in g/cm³, rsw is the seawater density (= 1.0236 g cm⁻³), n is the seawater viscosity coefficient (= 0.0108 g cm⁻¹ s⁻¹ at 20°C), D is the cell diameter for a spherical shape (Fritz and Balch, 1996).

Volume would be a function of coccoliths thickness (0.4 μm , Balch *et al.*, 1993) and number present around the organic cell (Balch *et al.*, 1993; Fritz and Balch, 1996). In average, big cell diameter including coccoliths is 4.6 μm (Tab. 1.3), inducing a volume of 50 μm^3 for a coccosphere. The calcite content of a big cell is 5 pgC for 20 coccoliths (cf. II.E, ie. 40 pgCaCO₃ per cell). The density of a cell is deduced from the mass of calcite in the coccosphere and the amount of organic matter, deduced from density (close to the seawater one) and the internal radius of the coccosphere, estimated at 3.4 μm with a coccosphere thickness of 0.6 μm (one layer and a half of coccoliths), ie. an internal volume of 20 μm^3 . The resulting sinking rate (SR, par.20, Tab. 1.7) of an average coccosphere in non-limiting nutrients and light conditions is 0.35 m d⁻¹. In culture, this rate is in the range of recorded sinking rates and of the same order of magnitude than sinking of calcified cells at low light in senescent growth phase (Tab. 1.6, Lecourt *et al.* 1996). This sinking rate is an overestimation of the sinking rate (0.22-0.26 m d⁻¹) calculated by Paasche (2002) with the same formula. This is due to the consideration of a big coccosphere for the model, in order to represent the possibility of aggregation and the increasing of volume during the end of the blooms.

d. Detachment rate

For the model, it is proposed to take into account the quantity of *released calcite* in the euphotic zone (coccoliths detachment). The release calcite, which can be calculated from the difference between the calcification in terms of carbon (C Vs PFD parametrisation, cf. II.D) and the maximum calcite per coccosphere (20 coccoliths of 0.25 pgC each; cf. II.E).

C. Summarising of the growth and bloom strategy

(i) *Emiliana huxleyi* is: a coccolithophorid, of spherical shape (the coccosphere) with a small size ($4\pm 1\ \mu\text{m}$) and a maximum μ of $2.35\ \text{day}^{-1}$ at optimal T of 20°C , a very energetic algae (high lipid reserves), characterized by low Chlo ($1.1\pm 0.8\ \text{pg cell}^{-1}$) and low POC ($12\pm 10\ \text{pgC cell}^{-1}$) and PIC per cell (0 to $18\ \text{pgC cell}^{-1}$). The coccosphere is made of 1 to 5 layers of coccoliths, which vary in number (0 to $120\ \text{cell}^{-1}$) and in calcite ($0.3\pm 0.25\ \text{pgC coccolith}^{-1}$) contingent upon PFD, nutrients (NO_3 , PO_4) and Fe. Under non-limiting conditions (nutrients, light and Fe), a cell contains on average 20 coccoliths, $6\ \text{pgC cell}^{-1}$ and a PIC:POC of $0.5\ \text{mol mol}^{-1}$.

1. Distribution

(ii) It is a very ubiquitous, present in almost all the oceanic regions except the polar zones, areas with very low S (< 10) and fresh waters (eg: lakes). Abundant in rich upwelling areas like the Arabian Sea and South Benguela, present almost all year round in low and mid latitudes waters, and sometimes in relatively deep water (eg: 200m).

(iii) It produces blooms of great extent only in temperate and subpolar regions, in surface waters *a priori* rich in nutrients (the most dense being observed in the North East, South West Atlantic and the Black Sea), at the end of spring/beginning of the summer and generally after large diatoms blooms. Southern Hemisphere *in situ* data are really scarce to allow observations of the formation, peak, and end of *E. huxleyi* blooms ($> 1,000\times 10^3\ \text{cells L}^{-1}$) in relation to the environmental conditions.

2. Physical conditions (Temperature, Light and turbulence)

(iv) *E. huxleyi* needs light with a relatively low saturation DL for μ and photosynthesis (near $10\ \text{mol m}^{-2}\ \text{d}^{-2}$) and a low half saturation constant for μ ($3.85\ \text{mol m}^{-2}\ \text{d}^{-1}$) and is not photoinhibited (up to $110\ \text{mol m}^{-2}\ \text{d}^{-1}$ for photosynthesis). Its growth performances are similar to those of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* but under lower T ($8\text{--}15^\circ\text{C}$ -Ackelson *et al.*, 1989) instead of 25°C (Moore *et al.*, 1995). This could explain why surface *E. huxleyi* blooms are dominant in temperate and subpolar climatological zones. *Emiliana huxleyi* can, however, grow under low light (a high light affinity for μ of $0.43\ \text{m}^2\ \text{mol}^{-1}$, 2 to 20 fold more than diatoms - Langdon, 1987; Sakshaug *et al.*, 1991). This should allow *E. huxleyi* to develop near the thermocline, but at this depth, cells can either be calcifying or not because of a light-stress or/and nutrients abundance (cf. below).

3. Calcification and Photosynthesis

(v) It produces more CaCO_3 at the subsurface than the surface because calcification has a high affinity for light ($\sim 1\ \text{pgC cell}^{-1}\ \text{h}^{-1}$ ($\mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) $^{-1}$) and a saturation PFD ($< 100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) twice lower than photosynthesis ($I_K < 200\ \mu\text{mol m}^{-2}$). This allows to explain the highest C/P ratio observed between 20 and 50m. However, calcification needs a minimum of light to occur ($I_{Cmin} = 10\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) which is higher than the minimum required for photosynthesis. This can produce a decrease of C/P at depths $> 60\text{m}$ and an inhibition of calcification at the base of the euphotic layer. Contrary to photosynthesis also, calcification at the surface benefits from an instantaneous PFD reduction thanks to stored ATP. Thus, during sunny summer days at high latitudes, cloudy breaks would enhance its calcification and increase the bloom intensity with a high C/P ratio (> 1).

(vi) Calcification would decrease by 30% with a small decrease in pH (0.3), or a high decrease (2mM) in DIC. This would induce a decrease of the C/P ratio with a CO_2 increase due to the

main effect of pH in the present low range of oceanic DIC; this results in a lower photosynthesis stimulation by calcification.

(vii) The CA activity at low PFD and high nutrient would sustain photosynthesis in absence of calcification or stimulate calcification if low PFD does not inhibit calcification. This can allow a C/P increase at the subsurface where the nutricline is strong and shallow or a calcification inhibition when the nutricline is deeper (below 80m). This could be associated to low calcified cells at the subsurface.

4. Strategy with Nutrients

(viii) It is adapted to relatively low NO_3 (K_{SNO_3} of $0.2 \mu\text{M}$, up to 7 times weaker than coastal diatoms -Dortch *et al.*, 1991-) and this would explain its presence in oligotrophic regions. Its slow NO_3 uptake's kinetic ($V_{\text{NO}_3\text{max}}$ of 0.07 hour^{-1} , 7 to 4 times weaker than diatoms, with an average affinity of $0.37 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$, close to the diatoms one) and its important N requirements (POC:PON of 6 mol mol^{-1} and 0.5 mol mol^{-1} lower than the diatoms one) would both explain that *E. huxleyi* is a less competitive species than diatoms under high NO_3 , but can bloom only when NO_3 reach a threshold, as observed in mesocosms ($\text{NO}_3 > 0.4 \mu\text{M}$ and $\text{NO}_3/\text{PO}_4 > 16 \mu\text{M}$) and during the North Atlantic bloom ($\text{NO}_3 > 4 \mu\text{M}$). This suggests that this species cannot bloom in N-limited conditions.

(ix) *E. huxleyi* needs vitamins (eg: thiamin) to grow. Its blooms occur under conditions of regeneration (small f-ratio of 0.08), and *E. huxleyi* would have a preference for NH_4 (half inhibition constant of NO_3 uptake by NH_4 - K_i - of $0.24 \mu\text{M}$ very low and a high coefficient of I_{max} inhibition (100%). This suggests that a bloom could be sustained by NH_4 .

(x) These two last points raise a contradiction: whereas *E. huxleyi* needs NO_3 to bloom, the blooms themselves would be sustained by NH_4 . Thus, the relatively high NO_3 observed *in situ* during blooms would be a consequence of a NH_4 inhibition, as suggested by Varela and Harrison (1999b, Station PAPA), or rather reveal a need for NO_3 for a strong calcification which is indeed stimulated by NO_3 addition (see below).

(xi) Its phosphorus uptake ($V_{\text{PO}_4\text{max}} = 9 \text{ hour}^{-1}$) is a common feature among phytoplankton, but its low K_p for growth (1 nM) and high POC:POP (600 mol mol^{-1} under P-stress conditions) imply low phosphorus requirements and its remarkable high PO_4 affinity ($20 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$), the highest ever recorded for a phytoplankton (2 and 10 fold higher than coastal diatoms -Perry, 1976- and -Veldhuis *et al.*, 1991-; in Riegman *et al.*, 1998). Moreover, one unique feature of *E. huxleyi* is the possession of two different enzymatic Apase (Alkaline phosphatase) which enable this species, under P-limitation, to profit from the DOP production by the microbial web. This makes this algae a very efficient competitor in P-limited conditions.

5. Different role for iron in rich and poor oceanic waters

(xii) Its maximum Fe' uptake normalized to cell size ($1250 \text{ nmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) is of the same order of magnitude than dinoflagellates and coastal diatoms species; but its low $K_{\text{SFe}'}$ (2.1 pM with respect to Fe') and its relatively low minimum PFe:POC ($1.23 \mu\text{mol mol}^{-1}$ under Fe' -stress - 50% lower than that of dinoflagellates and coastal diatoms- mean low Fe requirement for *E. huxleyi*). This could allow *E. huxleyi* to live everywhere but not necessarily bloom. Moreover, its affinity to Fe' ($25 \times 10^3 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), 10 times higher than that of coastal species, makes *E. huxleyi* a competitive species for Fe' inputs and less limited with respect to Fe' , probably because of its small size. This allows *E. huxleyi* to form blooms during fresh Fe inputs episodes (rich in bioavailable Fe) in the areas having *a priori* a high Fed (North Atlantic) and in areas with desert contributions (eg: south of Patagonia and Sahara desert).

(xiii) Its important production of Fe ligand and the unchanged sinking rate after a fresh Fe enrichment in cultures -contrary to the diatoms (which have twice less ligands than *E. huxleyi* and one order of magnitude higher sinking rates)- would suggest an *E. huxleyi* strategy to maintain Fe bioavailable at the sea surface (Boyé and van den Berg, 2000). But, after an *in situ* Fe enrichment, *E. huxleyi* growth response is slower than that of diatoms (eg: at the north of the polar front). The low availability of siderophores (typical ligand of HNLC areas) for the eukaryotes suggests that *E. huxleyi* should not be very competitive when *in situ* Fe enrichments occur in depleted Fe_d areas and can therefore not form blooms (eg: Equatorial Pacific and Station PAPA).

6. PIC, nutrients, iron and DIC

(xiv) It produces a higher PIC:POC when PO₄ is limiting (< 0.55 μM, PIC:POC = 1.4 mol mol⁻¹) or when CO₂ increases from 11 to 27 μM (with constant pH, PIC:POC +44%). On the other hand, lower PIC:POC would be produced when Fe' is limiting (PIC:POC = 0.04 mol mol⁻¹) or when CO₂ increases from 12 to 30 μM (with constant DIC, PIC:POC -21%). Moreover, P_{orga} would stimulate nocturnal calcification. Calcification could also be stimulated by NO₃ addition (doubling after a 2 μM NO₃ addition; Balch *et al.*, 1992) or would not be affected by NO₃-stress (PIC:POC = 0.5 mol mol⁻¹) or would be inhibited by a strong μ (> 1 day⁻¹).

(xv) *E. huxleyi* produces more coccoliths (attached plus detached) per cell when S decreases (Coccoliths/cell +30% from 34 to 17 unit?), PFD increases (Coccoliths/cell +50% from 18 to 330 μmol m⁻² s⁻¹) and nutrients (NO₃ and PO₄) are low (Coccoliths/cell +300% pour quelle variation?). Nutrients effect on the coccoliths number (attached plus detached) is 10 times larger than the Salinity one, which can be neglected for 30 to 35 unit?. The calcite produced per coccolith decreases with a reduction in PFD (Ca/Coccolith -30% from 330 to 18 μmol m⁻² s⁻¹) and in S (Ca/coccolith -30% from 34 to 17); and μ decreases under NO₃-stress (Ca/Coccolith -20% from 1.4 to 0.46 day⁻¹). On the contrary, calcite production per coccolith increases when μ decreases under PO₄-stress (Ca/coccolith +15% from 1.4 to 0.46 day⁻¹).

7. Losses and competition

(xvi) *E. huxleyi* flourishes better after strong spring blooms associated with opportunistic algae such as diatoms. The most important the diatom bloom is, the biggest the *E. huxleyi* bloom will be (eg: North East and South East Atlantic).

(xvii) Its loss terms are weak on average: sinking rate (0.35 +/- 0.3 m d⁻¹), grazing (40x10³ +/- 30x10³ cells indiv⁻¹ h⁻¹), respiration (0.2 day⁻¹ on average) and autolysis unknown; but, at the end of the bloom, losses would exceed growth because of an important viral activity. *Emiliania huxleyi*, among others micro- and meso-zooplankton, is predated by *Calanus finmarchicus* and *Pseudocalanus elongatus*, but it seems to be less grazed than other phytoplankton and then not grazer-controlled. It would however benefit of a "cascade-effect" in the predatory food web. Sinking rate depends on the density of the cell which (i) decrease thanks to the accumulation of lipids produced under high light during the stationary phase occurring at the end of a bloom; (ii) increase with the accumulation of calcite under low PO₄ or (iii) be unchanged in the case of Fe enrichment. Faecal pellets are heavier during *E. huxleyi* bloom because of an increase in CaCO₃, free coccolith number and CaCO₃dissolution (coccospheres and coccoliths) increase at the end of the bloom. Mortality by autolysis due to VLP would be the main control of the bloom when PO₄ > 0.8 μM.

(xviii) There is a contradiction between *E. huxleyi* growth phase and its calcified feature which could be associated to various phases of the life cycle. Indeed, the growth can be linked, when it is either high (exponential phase related to the bloom formation and young cells) to cells strongly (Balch *et al.*, 1996) or slightly calcified (Lecourt *et al.*, 1996); or low (stationary

phase related to the end of bloom and old cells) with cells strongly (Paasche and Brubak, 1994) or slightly calcified (Linschooten *et al.*, 1991).

Conclusion

A. strategy of growth and bloom

This synthesis pointed out the fact that environmental conditions which allow to understand *E. huxleyi* ubiquity and blooms are different. *Emiliania huxleyi* would be a "thrifty" algae with a life strategy based on relatively low production coupled to low biomass losses (according to Egge and Heimdal, 1994). Its ubiquity and presence at relative great depths (200m) would be due to its capacity to grow well in all oceanic salinity (30-35), light (3.85 to 110 mol m⁻² d⁻¹), various turbulence and T conditions (2° to 30°C); it could supports low NO₃, PO₄ and Fe_d (its growth would be limited under a Fed lower than for diatoms; < 1.3 nM, without EDTA; Boyé, 2000), without forming bloom, but with an r-strategy can profit from nutrients enrichments. Moreover, thanks to its capacity to use regenerated N (NH₄) and organic forms of phosphorus, *E. huxleyi* can grow both in strong (eg: upwelling systems) and weak nutrients with organic material production (summer in the North East Atlantic).

Large *E. huxleyi* blooms (eg: the North East and South West Atlantic) would be more specifically characteristic of rich nutrients areas with strong atmospheric Fe contributions coming from the desert regions. To understand blooms, it is necessary to consider conditions for both strong μ and calcification. These optimal conditions are low salinities (μ and numbers coccoliths/cell decrease by +10% for a S decrease from 35 to 30), very stratified waters, sufficient light (> 10 mol m⁻² d⁻¹) and moderate T (15-18°C), like in subpolar, temperate and coastal regions where the biggest blooms occur. Its adaptation to low PO₄ and ability to use organic phosphorus, its poor competitiveness under N-depleted conditions, its need in NO₃ for high μ and calcification, the stimulation of calcification under low PO₄ and high Porga and the low development of Virus Like Particle in low PO₄ suggest that this species performs mainly in P-controlled environments. Consequently, *E. huxleyi* would be a NO₃-limited phytoplankton during bloom. Due to its small size, high affinity for Fe' and strategy (μ , sinking) adapted to deal with fresh Fe additions in areas with high Fe_d would enable *E. huxleyi* to be a dominant species and form bloom in North East and South West Atlantic Ocean where atmospheric Fe comes from the Sahararian and Patagonian deserts. In the areas with low Fed (very low Fe' -Fed < 0.8 nM, with EDTA- and low fresh Fe external inputs), low FeL assimilation, slow indirectly FeL uptake and low calcite deposition, contrary to a bloom, do not allow bloom formation.

B. model and paramétrisation

The parameters and equations proposed in this synthesis which meet the criteria of choice for a model type SWAMCO concern on one hand gain processes, μ variation as a function of T, PO₄ assimilation and inhibition of NO₃ uptake by NH₄. A parameterisation is proposed for the relationship between photosynthesis and light, but it must be refined with new incubations. Indeed, the photosynthesis values chosen here for the model result from organic carbon production measurements and not from a direct photosynthesis measurements (¹⁴C fixation or O₂ evolution). In addition, they were obtained with incubation duration of 24 hours and cover only 1/10 of the PFD spectrum (< 150 μ mol m⁻² s⁻¹) to which can be subjected *E. huxleyi* in the ocean. On the other hand, concerning the losses, the values proposed for the model for grazing, sinking and autolysis corresponds to cells normally calcified and out of blooms. These losses terms together with coccoliths detachment and viruses would play an important role on *E.*

huxleyi life strategy but remain very poorly known. All these terms of losses should be studied at the formation, during and at the end of a bloom.

All the parametrisations (Tab. 1.7) proposed in this synthesis and the roughly synthesis concerning the *E. huxleyi* spatial and temporal distribution (based on satellite -Fig. 4.1- and *in situ* data -Tab. 5.1-) could be used for different kind of mathematical models at the cell level aiming to reproduce *E. huxleyi* distribution and bloom formation at global or local scale. The calcareous phytoplankton role in the carbon cycle and indirectly better-understood oceanic biocalcification.

C. experimental perspectives

Even if all the parameters values needed for the SWAMCO have been proposed in this synthesis, some of the chosen experimental data which have been used are not in agreement with the criteria of choice needed defined for the model. Photosynthesis and calcification data are in term of production and their dependence on PFD is only known for low PFD ($< 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; ie. 1/10 of the whole spectrum). For these processes it is recommended to work at various high light (between 150 and $2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), with a day/light cycle, at optimal T and with several measurement of photosynthesis and calcification using short duration incubations (20 minutes, batch culture). Moreover, POC:POP and PFe:POC quotas, NO_3 and Fed assimilation have never been measured. To obtain physiological parameters (nutrient and iron assimilation, quotas), it is recommended to work at optimal T (20°C), under low PFD ($< 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to control the reserves accumulation, in a stable nutrients media without EDTA, while imposing a day/night cycle (cyclostat).

The experimental studies to privilege to be able to test the hypothesis resulting from this synthesis concern the potential NO_3 and Fe roles and better understand the blooms of this coccolithophorid. Such experiments would help to address the contradiction which exists: whether high (Balch *et al.*, 1992, Fagerbakke *et al.*, 1994) or low NO_3 concentrations (Paasche, 1998) stimulates this coccolithophorid's calcification. Experiments should be carried out - on type-A C-cells adapted to a day/night cycle $< 16 \text{ h d}^{-1}$ and low PFD ($< 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); - in semi-continuous culture with various Fed (from 0 to 10 nM, without EDTA) with a NO_3 colimitation; - with several measurements of calcification and photosynthesis per 24 hours with short duration incubations (20 minutes); - and a daily measurement of μ , organic quotas and inorganic biomass (in term of free coccoliths and Ca). Measurements to differentiate between attached and detached coccoliths can be carried out with two separate incubations: free coccoliths counting before (= detached) and after destruction of organic cell (= attached + detached) would allow to obtain attached coccoliths by difference.

All the proposed culture studies completed by *in situ* monitoring (environmental conditions from the formation to the end of a *E. huxleyi* bloom), and particularly in the southern hemisphere (Atlantic or Pacific Ocean), could help to define the *E. huxleyi* ecological niche and to understand how this small algae forms big blooms. The contribution to the carbon cycle and the role of other coccolithophorids remains to be evaluated by both laboratory and model simulations using *in situ* data (eg: sediment traps) and JGOFS time-series where they exist (eg: BATS). Finally coccolithophorids life cycle studies (by genetic approach particularly) will bring us information to better understand calcification and coccosphere variation during the blooms.

While for the future, oceanic coccolithophorids CaCO_3 would decrease from direct response of the $\text{CO}_{2\text{atm}}$ increase; the resulting assumptions from this synthesis suggest that this evolution could be controlled not only by CO_2 , but also by the PO_4 and metals variations. According to IPCC, the ocean becoming in the next decades more PO_4 -limited and its metals enrichment more significant; these PO_4 and metals changes (iron, zinc implied in the CA activity, but especially cobalt for which *E. huxleyi* would have a more significant requirement than the diatoms) would

be more favourable both for growth and calcification. Also, the effect of other parameters change, to which *E. huxleyi* is sensitive (such as the temperature, salinity -which would hide an AT effect- and stratification), remains to be determined on the CaCO_3 variations. Both experimental as well as modelisation works seem necessary to quantify how nutrients, metals or other modifications could in fact control the oceanic CaCO_3 evolution.

Chapitre 2 : Rôle des apports en fer sur les blooms d'*Emiliana huxleyi*

Introduction

A. Pourquoi étudier le rôle du fer dans la croissance et dans la formation des blooms d'*E. huxleyi* ?

Le fer, métal à l'état de trace dans l'océan, joue, à travers son impact de fertilisateur, un rôle fondamental sur l'intensité de la productivité (Martin *et al.* 1990) et par conséquent sur la pompe biologique de carbone (Watson *et al.* 2000). Ce rôle serait dû aux besoins en fer durant la photosynthèse et pour la fabrication de nombreuses enzymes essentielles à la fixation de CO₂ (cf. review van Leeuwe *et al.*, 1997). Ce rôle physiologique du fer a conduit la recherche biogéochimique à définir un «âge du fer» initialement basé sur l'hypothèse que les principales régions au régime HNLC (High Nutrients Low Chlorophyll) de l'océan (eg : Pacifique Nord Est et Equatorial, Océan Austral) seraient limitées ou co-limitées en fer (De Baar et Boyd, 1999). Malgré les nombreuses études entreprises depuis les dernières décennies (cf. synthèse De Baar et Boyd, 1999), les incertitudes sur le rôle véritable du fer dans la productivité marine sont encore nombreuses et dues principalement au manque de connaissances sur : (i) le rôle et la biodisponibilité des apports en fer associés aux poussières en provenance de zones désertiques (eg : Sahara ou Patagonie) dans la productivité phytoplanctonique ; (ii) la stratégie de prise et utilisation des différentes formes de fer (ou spéciation) autres que le fer III, notamment le fer organique (Boyé *et al.* 2003), par les différentes espèces de phytoplancton. Ces deux aspects seront analysés dans ce chapitre en se focalisant sur le rôle des différentes intensités d'ajouts de fer sur la spéciation de fer et sur le développement d'un bloom de population du coccolithophoridé *E. huxleyi*.

L'hypothèse du rôle des apports en fer sur les blooms de coccolithophoridés est suggérée tout d'abord par la corrélation entre les apports éoliens naturels riches en fer (ie. en provenance du Sahara, de Patagonie ou d'Australie ; cf. introduction générale) arrivant à la surface de l'océan (Fig. 0.7c) et la distribution globale (Fig. 0.7b) de certains grands blooms visibles (eg. Atlantique Nord et Sud et le Pacifique Sud Ouest). Cette hypothèse est en contradiction avec le faible besoin apparent en fer de la croissance d'*E. huxleyi*, d'une part à la vue de l'apparition des blooms visibles d'*E. huxleyi* (Fig. 0.7b) et de son ubiquité quelle que soit la concentration de fer total dissous (Fed ; Fig. 0.7a), d'autre part ses faibles besoins en fer pour sa croissance dans les expériences en laboratoire sous conditions contrôlées en fer (Sunda et Huntsman, 1995) et par l'absence de blooms dans le cas d'apports artificiels en fer dans une région HNLC (cf. introduction générale, Landry *et al.* 2000). En conséquence, le fer ne serait pas *a priori* un élément trace fondamental à considérer pour comprendre la formation des blooms d'*E. huxleyi*. Comment expliquer alors la relative corrélation entre apports naturels et blooms si aucune expérience n'a montré d'effet sur les blooms ? Pour résoudre ces contradictions du rôle potentiel du fer dans la formation de blooms, la connaissance du rôle, sur le réservoir organique et la croissance d'*E. huxleyi*, du fer et de ses différentes formes, pas toujours prises en compte dans les expériences contrôlées, est un des facteurs clés.

Les mécanismes de contrôle de la spéciation du fer par les organismes marins non producteurs de sidérophores, tel que les coccolithophoridés, sont encore inconnus (Hutchins *et al.* 1999). L'étude des espèces phytoplanctoniques de petite taille, comme les coccolithophoridés (<10 μm , Sunda et Huntsman 1995), est fondamentale du fait qu'ils auraient une stratégie vis-à-vis du fer contraire à celle des phytoplanctons de plus grande taille (eg : diatomées taille > 10 μm , Sarthou *et al.* 2005) et *Trichodesmium spp.* (100 μm ; Bermann-Franck *et al.*, 2001). Les études existantes à l'échelle de l'algue, conduites en conditions contrôlées, s'étant intéressées aux relations fer – coccolithophoridés sont relativement moins nombreuses (cf. Chap. I, §IIC2) que celles s'étant intéressées aux diatomées (cf. review Sarthou *et al.* 2005). A notre connaissance, uniquement 6 travaux ont abordé l'étude du rôle potentiel du fer sur la physiologie organique d'*E. huxleyi*. Bien que ces études s'accordent sur une limitation de sa croissance par le fer, la valeur de limitation varie en fonction des expériences : 1.2 nM (Brand *et al.* 1983), 4 nM (Sunda et Huntsman 1995), 1.2 nM (Boyé et Van den Berg, 2000) et 0.8 nM (Muggli et Harrison, 1996 et 1997). Ces concentrations en fer total dissous (Fed) restent cependant fortes parmi celles de l'océan global (Fig. 0.7a). La stratégie d'*E. huxleyi* vis-à-vis du fer, d'après ces expériences, consisterait à : **(i)** posséder des besoins en fer relativement faibles, caractérisés par un quota Fe/C de l'ordre de 10 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, et 10 fois inférieures à celui de diatomées côtières (*T. weissflogii*) ; **(ii)** réduire sa taille, de 3.5 à 2 μm , lorsque le stress en fer augmente. Cette stratégie d'adaptation aux faibles concentrations de fer impliquerait que le développement de blooms monospécifiques d'*E. huxleyi*, visualisés par satellite dans des milieux stressés en fer (<0.1 nM) comme l'Atlantique Sud-Ouest (Fig. 0.7a) soit possible. Comment concilier cette stratégie d'adaptation aux faibles valeurs de fer avec une croissance limitée à des valeurs de Fed relativement élevées ?

Les études en laboratoire conduisent également à une deuxième contradiction en ce qui concerne l'efficacité des apports de fer sur la croissance d'*E. huxleyi*. D'après les expériences en batch (voir ci-dessous), et malgré les différences entre leurs résultats, *E. huxleyi* apparaît comme étant moins limité en présence d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetra-acétique) vis-à-vis du fer inorganique (Fe') que d'autres phytoplanctons. En effet, la constante de demi-saturation de la croissance ($K_{1/2}$), de 2 pM (Sunda et Huntsman 1995) ou 0.7 pM (Schulz *et al.* 2004) vis à vis de Fe', est 10 fois plus faible que celle de la diatomée *T. oceanica* et du dinoflagellé *P. minimum* (Sunda et Huntsman, 1995). L'effet des différentes formes de fer dans des conditions naturelles (sans EDTA) sur la croissance d'*E. huxleyi* n'est donc pas encore connu. Pour connaître cet effet, il est nécessaire de quantifier l'impact des différentes formes de fer simultanément sur la croissance. Pour cela, l'absence d'EDTA est indispensable pour ne pas masquer le fer organique dont le rôle dans la biodisponibilité du fer n'est pas connu. Les deux travaux sur *E. huxleyi* en monoculture (Muggli et Harrison, 1997 ; Boyé et van den Berg, 2000) ayant réalisé des ajouts de fer sans EDTA, montrent que les ajouts de fer pourraient être respectivement inhibants ou stimulants pour la croissance. En effet, une croissance, de 0.73 jour⁻¹ en présence de 1 nM de Fed diminuerait de 60% lors d'un ajout de 5 nM (Muggli et Harrison, 1997). Au contraire, la croissance, de 0.1 jour⁻¹ et nulle en présence de 1.2 et 5.4 nM de Fed, augmenterait à 0.7 et 0.8 jour⁻¹ lors d'un ajout de 1 et 9 nM (Boyé et van den Berg, 2000). Ainsi, ces auteurs soulèvent le problème d'une inhibition de la croissance lors d'ajouts initialement forts de 5 nM. Cependant, aucune mesure de Fed et de sa spéciation de fer, n'a été effectuée au-delà de l'instant initial de l'expérience. Par conséquent, l'hypothèse d'une modification de la spéciation de fer, voire d'une diminution de la concentration en Fed au cours de l'expérience (12 jours) n'a pu être testée par ces auteurs. L'effet stimulant ou inhibant d'apports en fer de différentes intensités, sur la croissance d'une même population initiale, n'est donc pas encore connu. Afin de comprendre tous les effets du fer sur les blooms d'*E. huxleyi*, nous ferons dans la partie suivante l'état de l'art de l'effet des différentes espèces de fer sur la stratégie de vie d'*E. huxleyi* et de son réservoir inorganique.

B. Questions spécifiques posées sur le rôle de la spéciation de fer pour *E. huxleyi*

Afin d'améliorer nos connaissances sur les interactions entre coccolithophoridés et le fer, il est indispensable d'étudier la spéciation du fer dissous. La première raison est que la limitation de la croissance dépendrait de la proportion des espèces de fer (Boyé et van den Berg, 2000). Selon ces auteurs, la limitation de la croissance disparaîtrait après un ajout de fer inorganique (Fe') relativement fort, de 1 nM, et dans une eau de mer relativement riche en fer total dissous (1 nM). Parallèlement, Sunda et Huntsman (1995) concluent à une absence de limitation au-delà d'une concentration très faible en Fe' ($> 3 \text{ pM}$). Ainsi, la limitation de la croissance se ferait à des concentrations de fer total dissous (Fed) relativement fortes (1 nM) mais à des concentrations en Fe' très faibles (3 pM). Ces valeurs limitantes en fer total dissous et inorganique sont *a priori* en contradiction et ne permettent pas d'établir la niche écologique de la croissance d'*E. huxleyi* dans l'océan incluant le rôle potentiel du fer (cf. Chap. 4, §IIB1e). La deuxième raison pour laquelle les connaissances actuelles ne sont pas suffisantes pour conclure sur un rôle positif du fer sur les blooms d'*E. huxleyi*, est due au fait que les mécanismes physiologiques associés à l'algue à travers la fabrication de ligands complexant le fer n'ont pas encore été identifiés. Pourtant, ces mécanismes de complexation du fer modifieraient et dicteraient en grande partie la quantité de fer présent dans le milieu dissous. Par conséquent, pour avancer dans la compréhension du rôle du fer sur la croissance des coccolithophoridés, doivent être pris en compte, pas uniquement sa quantité totale dissoute, ni d'ailleurs la quantité de forme biodisponible, mais également les interactions entre les différentes formes organiques et inorganiques de fer.

Il a été montré d'une part que plus de 99% du fer est organique (FeL ; Rue and Bruland, 1995). En conséquence, il n'est pas suffisant de mesurer la forme de fer total ou inorganique (en présence d'EDTA) pour comprendre le rôle du fer biodisponible dans l'océan. D'autre part, le rôle des ligands pour *E. huxleyi* serait probablement de maintenir en solution le fer puisque leur production est stimulée lors d'ajouts en fer inorganique (Boyé et van den Berg, 2000). Ce comportement, contraire à celui de la production de ligands de type sidérophores par les procaryotes (comme par exemple les bactéries, Hutchins *et al.* 1999), correspondrait selon ces auteurs à une stratégie permettant à ce coccolithophoridé de maintenir en solution le fer fraîchement solubilisé. De plus, selon cette même étude, le fer inorganique serait la forme assimilable et le fer organique une forme non assimilable par *E. huxleyi*, puisque la croissance serait stimulée uniquement lorsque du fer inorganique est ajouté quelle que soit la concentration de Fe organique, et même si cet ajout ne modifie pas la teneur en fer total (1.2 nM). La production de ligand pourrait ainsi être une stratégie employée par *E. huxleyi* pour maintenir le fer ajouté en solution. Comment la production de ligands réagit-elle à différentes intensités d'ajouts ? C'est par conséquent une de premières questions à laquelle nous devons répondre pour mieux comprendre comment les ajouts de fer sont utilisés pour la croissance de cette algue.

En plus de ces effets du fer sur le réservoir organique d'*E. huxleyi*, il est également indispensable de comprendre le rôle de ce métal sur le réservoir inorganique (PIC, production de coccolithes et calcification), tel que suggéré sur la quantité de PIC par cellule (PIC/cell) et sur la calcification plus récemment. Un rôle potentiel mais contradictoire du fer sur le PIC/cell a été montré très récemment. Le PIC/cell serait inhibé (Muggli et Harrison, 1996b) ou non inhibé (Schulz *et al.* 2004) lorsque le Fe' devient limitant pour la croissance. L'effet potentiel d'inhibition du PIC/cell, de 7 pgC cell^{-1} , est réduit d'un facteur 10 lorsque le fer diminue en dessous de 0.8 nM et conduit à un PIC /cell qui semble irréaliste (Muggli and Harrison, 1996b). Ce PIC est en effet 10 fois plus faible que la concentration moyenne issue de la synthèse de données (*in situ*, laboratoire et mésocosme ; cf. Chap. 1, §IIE) et correspond à une cellule possédant uniquement deux coccolithes ! (En considérant une valeur typique de 0.2 pgC

coccolithe⁻¹; cf. Chap. 3, Tab. 3.2). Ce faible PIC pourrait donc indiquer un coccolithophoridé ne calcifiant pas normalement, mais l'expérience devrait être reproduite pour savoir si cet effet est dû au fer ou à une anomalie physiologique. Mais si le fer a un rôle sur le PIC/cell il devrait alors se traduire par une modification de la calcification en réponse à des variations de sa concentration. Cet effet de la variation de fer sur la calcification d'*E. huxleyi* en présence d'EDTA a été testé très récemment (Schulz *et al.* 2004). Cette expérience a montré que le PIC /cell reste constant, autour de 5 pgC cell⁻¹, quelle que soit la concentration de Fe' ; mais que la calcification obtenue, avec 13 pgC cell⁻¹ jour⁻¹ à 360 pM de Fe', est au contraire réduite d'un facteur 6 lorsque Fe' diminue à 0.06 pM. Ces études ne permettent pas d'envisager toute l'implication de leurs résultats pour la calcification d'*E. huxleyi*, puisque la concentration de Fe_o océanique correspondant à ces valeurs de Fe' n'est pas identifiable, en raison de la présence d'EDTA. La calcification réagirait-elle de manière différente, comme pour la croissance, sans la présence d'EDTA ? Par ailleurs, la diminution de la calcification lors de cette expérience se produit de manière proportionnelle à la croissance, permettant à Schulz *et al.* de suggérer un couplage entre les processus de croissance et de calcification, qui varierait de façon proportionnelle en réponse aux variations de la concentration en fer inorganique. Ce couplage reste-t-il identique quelles que soient les variations de spéciation en fer et de croissance au cours d'un apport en fer et d'un bloom ? Ces aspects seront justement analysés ici.

Ces effets potentiels du fer sur le réservoir inorganique et sur la calcification à l'échelle de la cellule, ainsi que l'existence d'une corrélation entre les poussières et les blooms visibles (atlantique Nord Est et Sud Ouest), suggèrent un rôle potentiel du fer sur la production de coccolithes libres et leur détachement. Un bloom est constitué de différentes phases : démarrage (croissance maximale des cellules), apogée (quantité maximale de cellules) et déclin (diminution de cellules dans la couche de surface, Fritz 1999). Ces différentes phases pourraient donc influencer la production de coccolithes libres, processus mystérieux et peu connu (cf. Chap. 1 §IIF4). Ces processus de production de coccolithes libres en terme de bloom visible à la surface et le rôle potentiel du fer sur ces processus de fabrication de coccolithes libres n'ont jamais à notre connaissance fait l'objet d'étude *in situ* ou en laboratoire. Pour comprendre le rôle de l'apport de fer sur les blooms d'*E. huxleyi*, il apparaît donc nécessaire de résoudre les contradictions entre l'effet du fer sur ces deux réservoirs organique et inorganique et le suivi d'apports en fer sur eux.

C. Objectifs et stratégie générale

L'objectif de ce chapitre est double : premièrement, étudier l'influence de différentes intensités d'ajouts de fer sur la totalité des processus impliqués dans un bloom d'*E. huxleyi* : croissance et taille des cellules, nombre de coccolithes attachés et détachés, PIC/POC. Deuxièmement, d'étudier les effets de rétroaction d'*E. huxleyi* sur la biodisponibilité du fer à travers le suivi de sa spéciation.

Pour atteindre cet objectif, sont réalisées quatre expériences conduites simultanément en batch de cultures axéniques avec une souche d'*E. huxleyi* soumise à des ajouts initiaux différents en fer : 1, 5 et 10 nM de Fe(III)' et sans ajout, pendant la durée complète d'un bloom : 40 jours. Ces expériences en laboratoire font apparaître 2 particularités : (i) contrôle de la spéciation de fer (total dissous et inorganique) associé au suivi simultané des réservoirs et des processus organiques (cellule, croissance et POC) et inorganique (coccolithes attachés et détachés, processus du détachement et PIC) ; (ii) reproduction en laboratoire des conditions les plus proches du milieu naturel: une cellule calcifiante et des concentrations de différentes formes de fer (Fer total, inorganique et organique, représenté par Fe_o, Fe' et L). Il est alors développé à la fois une stratégie expérimentale de modification des conditions chimiques avec des cultures en

batch (décrite en §IA1) et une nouvelle méthode analytique pour la mesure de la spéciation de métaux en trace dans l'eau de mer (décrite dans l'Annexe I).

I. Stratégie

Dans cette partie sont décrits de manière détaillée la stratégie et le protocole expérimental suivis pour les 2 expériences d'ajouts de fer (dont les résultats sont présentés dans ce chapitre) et aussi d'ajout de NO_3 (Chap. 3). Ces deux expériences ont commencé en même temps et leurs suivis de 40 jours étaient simultanés. Cette stratégie avait le souci d'imposer des conditions proches des conditions océaniques (faibles nutritifs et sans EDTA), qui sont inhabituelles dans le cas des expériences effectuées d'ordinaire sur *E. huxleyi* (milieu parfois artificiel enrichi en nutritifs au-delà des conditions océaniques). Pour cela, un apprentissage de la manière de tenir les coccolithophoridés en bonne santé et de les manipuler sous conditions axéniques a été effectué dans un laboratoire de biologie (Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie Marine, Université de Caen), durant un stage de 2 jours en collaboration avec Mme Billard. De plus cette contrainte a demandé la recherche du milieu le plus adapté pour effectuer ces expériences. Cette recherche, qui consistait à faire pousser *E. huxleyi* dans divers milieux de culture enrichis, a été menée durant une période de trois mois précédant les expériences d'enrichissements proprement dites dans le même laboratoire (Université de Liverpool).

La spéciation en conditions similaires à celles dans l'océan implique (i) l'utilisation d'une souche calcifiante permettant de tenir compte de la perturbation du réservoir organique par la construction du réservoir inorganique ; (ii) des conditions d'expérimentation axéniques afin de ne pas perturber la croissance d'*E. huxleyi* et les mesures de POC ; (iii) des conditions d'analyse «ultra propre», permettant la détection de faibles concentrations en fer $< 1 \text{ nM}$, sans EDTA pour permettre d'étudier les interactions entre *E. huxleyi* et la spéciation de fer ; (iv) un contrôle des conditions sans autre limitation (lumière, nutriments) que le fer à des conditions de T et de salinité adaptées, définies d'après synthèse (cf. Chap. 1 §IIB).

Cette stratégie, très contraignante car nécessitant de nombreux batchs, nous a amené à élaborer une nouvelle technique de mesure de la spéciation de fer. Cette technique est : (i) basée sur une faible quantité d'échantillonnage (20 mL), 7 fois plus faible que l'ancienne technique (Croot *et al.* 2001) ; (ii) automatisée ; (iii) dérivée de la méthode par Compétition Ligand Equilibration (Rue and Bruland, 1995) en utilisant pour la première fois le 2,3-dihydroxynaphtalène (DHN) comme Competing Ligand, lequel a montré une des meilleures sensibilités vis à vis du Fed (Obata et van den Berg, 2001 ; cf. Annexe I).

L'expérience consiste à cultiver en milieu contrôlé, une souche calcifiante d'*E. huxleyi*, provenant d'une même solution mère inoculée simultanément dans 15 petits batchs contenant 50 mL de milieu de culture (Fig. 2.1). Les batchs contiennent initialement une concentration moyenne de fer dissous total (Fed) de $0.6 \pm 0.3 \text{ nM}$ et reçoivent des ajouts initiaux ($t=0$) de NO_3 et de fer III. Ces ajouts permettent de simuler 3 différents états de stress en NO_3 pour sa croissance (pas stressant, stressant et très stressant, et 4 ajouts de fer (pas d'ajout, faibles, moyens et forts ajouts), en replicat variant en nombre pour chaque batch (Fig. 2.1). Toutes les conditions de NO_3 et de fer sont obtenues en triplicat sauf celles en condition de NO_3 stressante, effectuées en duplicat, et très stressante, sans replicat. Tous les batchs ont été maintenus dans un incubateur clos hormis durant une heure lors des jours de prélèvements (Fig. 2.2) en continu (§IA1c) et ponctuellement (§IA1d). La température était imposée à 16.5°C . La lumière (intensité non mesurée) était maintenue au rythme nycthéral de 14 h par jour. Le milieu approprié, choisi pour les cultures, a été déterminé durant les 3 mois précédant les expériences dites d'ajouts (§IB3, Fig. 2.2).

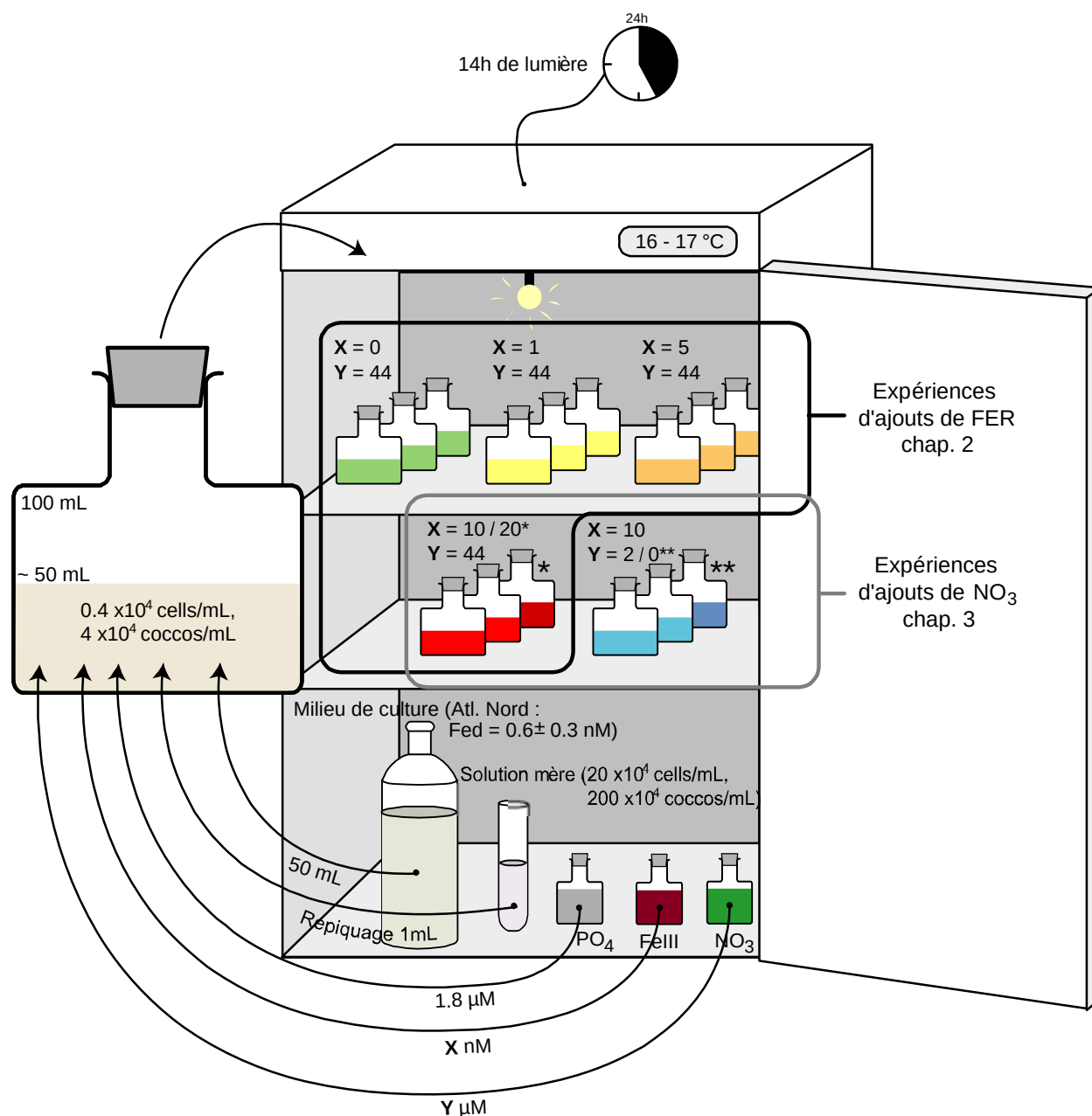


Figure 2.1 : Conditions d'incubations

Lancement des expériences d'ajouts de FER et de NO_3 au jour 0 avec la stratégie d'ajouts de Fe(III) et de NO_3 et d'inoculations des cellules de la solution mère dans le milieu de culture, ainsi que les conditions d'incubations maintenues les 3 mois avant et pendant les 40 jours des expériences.

À partir de l'inoculation de la souche ($t=0$), et pour chaque expérience d'ajout en NO_3 et en fer III différente, l'évolution de la population d'*E. huxleyi* a été suivie durant 40 jours. Sont documentés durant ces 40 jours, de façon régulière, à la fois des paramètres associés à la physiologie de l'algue, tant pour sa fabrication de carbone organique qu'inorganique, et des paramètres environnementaux de contrôle (eg. NO_3 et spéciation de fer ; Fig. 2.2). L'évolution de l'algue est suivie tous les 2 à 15 jours à travers la mesure du nombre de cellules et de leur taille et des coccolithes libres (population), simultanément pour les différents ajouts de NO_3 et de fer. Associées à ce suivi continu, des mesures ponctuelles, en général tous les 10 jours, ont été effectuées dans le particulaire (Carbone Particulaire Total et Inorganique – TPC et PIC –). Egalement ont été effectués, mais uniquement au jour 10, des clichés des cellules par Scanning Electron Microscopy (SEM). Ces clichés indiquent le nombre de coccolithes attachés et la taille précise des coccosphères et des coccolithes. Simultanément, tous les 10 jours, ont été effectuées

des mesures dans le dissous pour les paramètres suivants : nitrate (NO_3), fer dissous total (Fed), concentration des ligands organique (L), leur capacité de complexation du fer (pK_{FeL}) et la forme inorganique du fer (Fe').

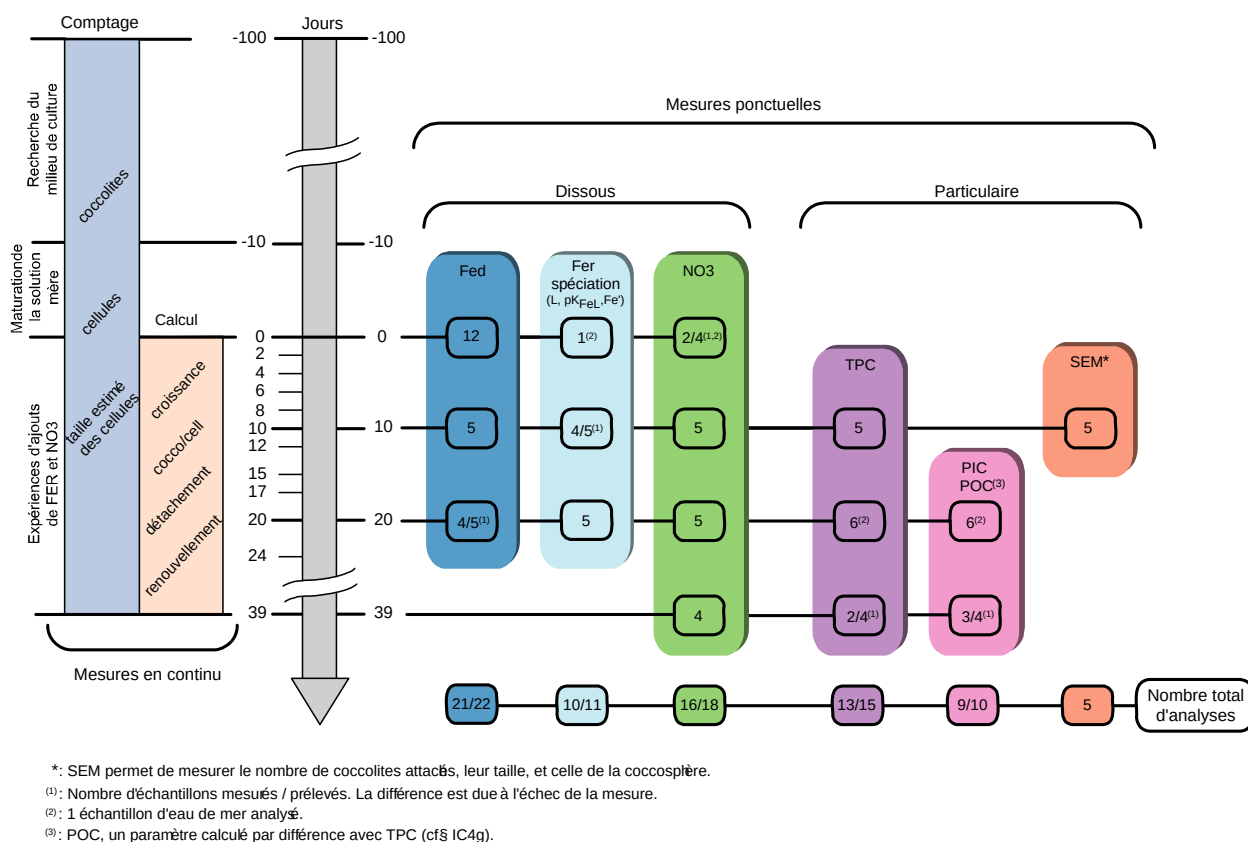


Figure 2.2: Stratégie de l'échantillonnage et des mesures ainsi que le nombre d'échantillons mesurés par paramètre.

A. Description de l'approche expérimentale et justification

1. Description générale des expériences d'ajouts de fer et de NO_3

a. Importance de l'origine des souches

Il est connu que les souches qui ne calcifient pas possèdent des caractéristiques physiologiques (μ , nutrition) différentes de celles qui calcifient, probablement en lien à des cycles de vie différents (Paasche 2002). Ainsi, les résultats concernant des souches présumées non calcifiantes sont à considérer avec précaution, principalement lorsqu'il s'agit de comprendre la stratégie d'un bloom d'*E. huxleyi* visible par satellite, de type forcément calcifiante car seule à produire des coccolithes libres. Les seules études en laboratoire ayant étudié les effets du fer et ayant utilisé une cellule normalement calcifiée ont été réalisées avec des souches du Pacifique Nord utilisées par Muggli et Harrison (1996 et 1997). Les souches utilisées tant par Brand *et al.* (1983), Sunda et Huntsman (1995) que par Boyé et van den Berg (2000) auraient été des souches non calcifiantes, bien que cette caractéristique n'ait pas été rapportée par les auteurs. Par exemple, pour l'étude de Sunda et Huntsman, l'utilisation des souches isolées du golfe du Mexique, de très petite taille ($3 \mu\text{m}$), il est donc très probable que ces souches n'aient pas été des souches calcifiantes. Les cellules non calcifiantes utilisées lors de l'expérience par Boyé et van den Berg (2000) en est un autre exemple (Boyé com. pers.). De ce

fait, pour la compréhension du rôle du fer sur le réservoir organique ou inorganique, il apparaît indispensable de travailler avec des souches calcifiantes en bonne santé. Enfin, l'utilisation de souches provenant de zones où se produisent de grands blooms visibles à la surface (cf. Chap. 1, Fig. 1.1b) comme l'Atlantique Nord ou Sud Ouest (Patagonie) sont à privilégier dans l'étude des blooms visibles d'*E. huxleyi*.

b. Conditions d'ajouts

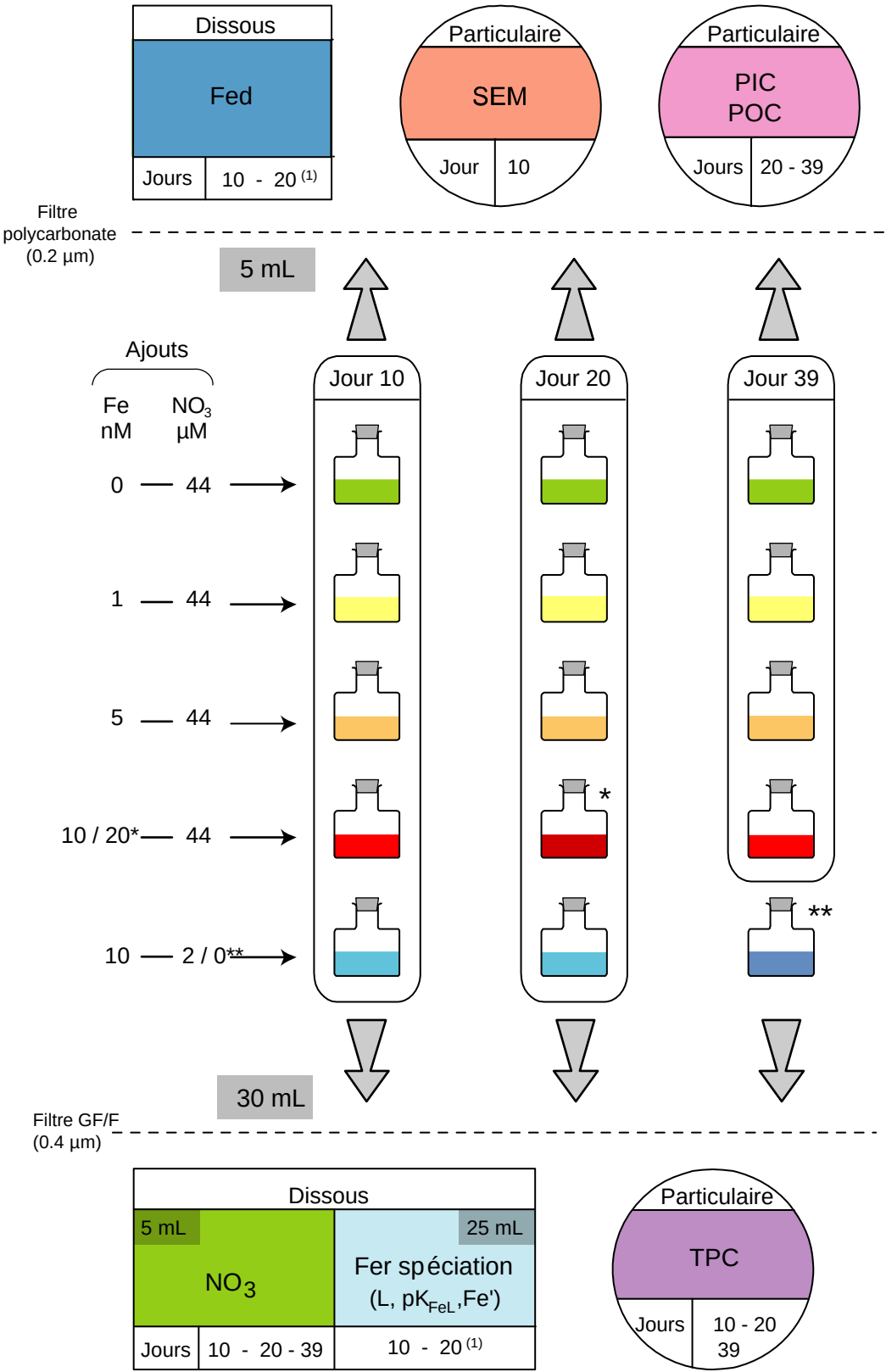
Afin de comparer l'effet du stress initial de NO_3 et des différents ajouts de fer III sur une même population d'*E. huxleyi* durant 40 jours, une solution mère contenant une souche d'*E. huxleyi* (provenant de l'A.N.) en phase de croissance a été initialement inoculée dans 15 différents batchs (Fig. 2.1). Cette durée couvre la durée totale du bloom, comprenant le démarrage, l'apogée, la stationnarité et le déclin d'un bloom d'*E. huxleyi*. En effet les blooms dureraient plus de 3 semaines d'après les observations en mésocosme (Heimdal *et al.* 1994). Chacun de ces batchs contenait 50 mL d'un milieu de culture identique, à l'exception de la concentration de NO_3 (§IB4). Le volume de chaque batch était faible à cause de la quantité de milieu de culture disponible. Initialement ($t=0$), 12 de ces batchs ont reçu un enrichissement fort ($44 \mu\text{M}$) de NO_3 , deux ont reçu un enrichissement faible ($2 \mu\text{M}$) de NO_3 et un dernier n'a pas reçu d'enrichissement en NO_3 . Initialement, parmi les 12 batchs ayant reçu un enrichissement de NO_3 fort, 3 n'ont pas reçu d'enrichissement de $\text{Fe(III)'}'$, les autres batchs ont reçu un enrichissement de $\text{Fe(III)'}'$: faible (1 nM) pour 3 d'entre eux, moyen (5 nM) pour 3 autres et fort (10 ou 20 nM) pour les 3 derniers (Fig. 2.1). De même, les 2 batchs enrichis par $2 \mu\text{M}$ de NO_3 et celui sans NO_3 , ont reçu, au temps $t=0$, un enrichissement fort (10 nM) de $\text{Fe(III)'}'$. Ces enrichissements de NO_3 permettent de simuler en laboratoire, la gamme des concentrations minimales et maximales qui sont observées dans l'océan. Tandis que ceux de $\text{Fe(III)'}'$ représentant l'ordre de grandeur d'ajouts naturels et artificiels et qui doivent permettre d'atteindre les valeurs maximales de Fed rencontré dans l'océan ($> 1 \text{ nM}$).

c. Conditions d'incubation

Tous les 15 batchs étaient conservés dans un incubateur dont les conditions de température et de lumière étaient maintenues constantes d'un jour sur l'autre. Ces conditions étaient maintenues constantes afin de ne considérer que l'effet sur *E. huxleyi* des ajouts du NO_3 . Les conditions de T, de 16.5°C , ont été choisies car elles sont à priori optimales pour la calcification et la santé d'*E. huxleyi* et se sont révélées à posteriori peu limitantes pour la croissance des cellules de la solution mère. De plus, les cellules se développaient à une vitesse proche de celle observée en conditions optimales (1 jour^{-1} ; cf. Chap. 1, §IIB).

d. Suivi continu

Dans tous les batchs et durant les 40 jours de l'expérience, des prélèvements ont été effectués tous les 2 à 15 jours pour permettre le suivi de l'algue en parallèle dans tous les batchs (Fig. 2.2) : concentration des populations de cellules et de coccolithes, estimation de la taille des coccosphères et leur capacité à calcifier, présence de corps (amas de cellules ou de coccolithes).



⁽¹⁾ jour 39 : échantillonné mais mesure non effectuée

Figure 2.3 : Echantillonnage, filtration et analyses effectués sur les réplicats.

e. Suivi ponctuel

Parallèlement à ces prélèvements, le contenu de chacun des batchs a été filtré en deux volumes distincts (30 et 15 mL), au même instant de temps, à travers un filtre différent pour chaque volume (Fig. 2.3). Les jours 10, 20 et 39 ont été choisis parce qu'ils correspondent respectivement à des étapes distinctes de phase de croissance exponentielle, stationnaire et sénescence. Les 2 filtrations distinctes étaient nécessaires pour ne pas contaminer les filtrats par des métaux ou de la matière organique et pour permettre les mesures particulières envisagées sur les filtres. Les filtres utilisés sont de type GF/F de 47 mm pour les mesures de TPC (Total Particulate Carbon) et en polycarbonate de 25 mm pour la mesure du PIC et pour la visualisation au SEM. A l'issue des filtrations, le filtrat (30 mL) récolté à travers le filtre GF/F, est utilisé pour la détermination de la concentration de NO_3 (5 mL), de L et de pK_{FeL} (25 mL). Par contre, le filtrat (15 mL) récolté à travers le filtre en polycarbonate, est utilisé pour la détermination de la concentration de Fed. Pour la mesure des éléments chimiques dans le dissous (NO_3 , Fed et spéciation de fer), du TPC et la prise de clichés SEM, un des batchs de chaque lot de triplicats ayant reçu les ajouts de 44 μM de NO_3 et l'un des répliqués de ceux ayant reçu des ajouts de 2 μM de NO_3 ont été filtrés à 90%, 10 jours après le début de l'expérience. Ce même protocole de filtration de 90% du volume d'un des répliqués pour chaque type d'ajout en NO_3 et en fer, a été répété 20 jours et 39 jours (dernier répliquat) après le démarrage de l'expérience, pour les mesures de TPC, PIC, NO_3 , Fed, L et pK_{FeL} (Fig. 2.3). L'absence de Fed et de spéciation de fer au jour 39 est due à un manque de temps pour les analyses.

f. Echantillonnage et répliqués

Pour les mesures de TPC et de PIC un seul des triplicats était échantillonné chaque jour d'échantillonnage (Fig. 2.3). Ainsi une seule valeur de PIC pour chaque type de conditions de NO_3 et de fer a pu être obtenue. La quantité de volume échantillonnée pour les mesures des paramètres dans le dissous (Spéciation de fer et NO_3) était juste suffisante pour effectuer une mesure avec la précision nécessaire. Ces précisions sont données dans la description des techniques de prélèvements et d'analyses correspondant à chaque paramètre (§IC2). C'est la raison pour laquelle, il n'a pas été possible d'estimer une erreur sur la reproductibilité sur la mesure de TPC et de PIC, par conséquent sur le POC (/mL, /cell et /coccolithes), ainsi que sur la mesure de Fe, L, pK_{FeL} et NO_3 . Les échantillonnages multiples concernent les paramètres mesurés dans le particulaire que sont les populations de cellules et de coccolithes libres, ainsi que les paramètres calculés à partir de ces populations. La reproductibilité a été effectuée sur un minimum de 2 échantillonnages donnant une reproductibilité de 10%. Les erreurs équivalentes pour les populations et les processus associés sont données dans la description des techniques de prélèvements et d'analyses correspondant à chaque paramètre (§IC2).

2. Justifications techniques des expériences d'ajouts en fer

a. Importance des ajouts initiaux de fer

Certaines différences dans les conditions expérimentales de Muggli et Harrison (1997), et de Boyé et van den Berg (2000), pourraient expliquer les contradictions concernant l'effet des différents ajouts de fer sur la croissance d'*E. huxleyi* (cf. introduction de ce chapitre) et retiendront toute notre attention. Ces conditions expérimentales concernent respectivement : **(i)** la concentration initiale de Fed de 1 nM et de 1.2 et 5.4 nM. **(ii)** La valeur de l'ajout (un seul ajout de 5nM et deux ajouts de 1 et 9 nM). **(iii)** L'instant de temps auquel l'ajout est effectué (au temps $t=0$ de l'expérience et les jours 14 et 17 après le premier jour de l'expérience). **(iv)** La période de temps considérée pour analyser l'effet de l'ajout sur la croissance (12 jours après

l'ajout effectué au temps 0, et 3 et 2 jours après l'ajout effectué le jour 14 et 17). Ainsi les contradictions entre ces résultats pourraient être résolues en mesurant au cours du temps la modification de la spéciation de fer après des ajouts initiaux différents sur une même population. Cette stratégie permettra de déceler les modifications de spéciation éventuellement responsables des variations de croissance. L'effet des différentes intensités d'ajout sur une même population grandissant dans une eau de mer possédant une même concentration initiale en fer serait la voie adaptée et nécessaire pour pouvoir simuler l'effet d'un apport externe d'aérosol de type désertique au démarrage d'un bloom de coccolithophoridés (cf. intro générale, Fig. 0.8).

b. Importance de l'absence d'EDTA

L'utilisation de l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetra-acétique) est employée afin de pouvoir contrôler la concentration de fer et la maintenir constante. Mais son emploi masque complètement le rôle éventuel des ligands organiques dans la spéciation du fer et la régulation éventuelle de la biodisponibilité des différentes formes de fer. L'EDTA a été employée dans les études antérieures à 1997, lorsque l'abondance et le rôle éventuel du fer organique dans la régulation de la biodisponibilité n'étaient pas encore connus (Rue and Bruland, 1995). Ainsi, certains auteurs travaillent avec de l'EDTA à différentes concentrations : de 10^{-6} à 10^{-8} M (Brand *et al.* 1983) ; à 10^{-7} M (Sunda et Huntsman, 1995) ; à 10^{-5} M (Muggli et Harrison, 1996). D'autres études, moins nombreuses mais plus récentes, n'utilisent pas d'EDTA (Muggli et Harrison, 1997, Boyé et van den Berg, 2000). Les études contrôlant la concentration de fer par l'utilisation de l'EDTA ont permis d'avancer dans la compréhension du rôle du fer inorganique (ie. seul disponible représenté ici principalement par le fer III) sur la physiologie et les besoins d'*E. huxleyi* vis à vis du fer. Ces études ne mesurent pas le fer inorganique (Fe'), hormis la plus récente (Sunda et Huntsman, 1995). Elles ne permettent pas de comprendre le rôle du fer dissous total (Fed), présent dans l'océan (car ne représentant pas tout le fer réellement présent dans l'eau de mer sans EDTA). Ainsi, dans ces études avec EDTA, la physiologie d'*E. huxleyi* est étudiée par comparaison des caractéristiques physiologiques d'*E. huxleyi* (μ , Fe/C, Chlo) avec d'autres espèces de phytoplancton comme des diatomées (Brand *et al.* 1983 ; Sunda et Huntsman, 1995 ; Muggli and Harrison, 1997) et des dinoflagellés (Sunda et Huntsman, 1995). Il a également été montré que l'utilisation d'EDTA en trop forte concentration produit un effet d'inhibition de la croissance à de très fortes concentrations (10^{-4} M ; Muggli et Harrison, 1996b). Ainsi, les expériences utilisant de l'EDTA ne permettent pas d'analyser la stratégie de la croissance vis à vis des différentes formes de fer. La stratégie employée afin de faire varier les concentrations de Fed sans EDTA serait d'effectuer différents ajouts initiaux sur une même population et de contrôler simultanément l'effet de différents ajouts sur cette population et sur la spéciation de fer.

B. Matériel et milieu de culture

1. Vaisselle utilisée

Les flacons utilisés en guise de batch sont des flacons de culture de 100 mL rebouchonnable (bouchon à vis) en polycarbonate. Les ustensiles utilisés (spatules, pinces et embouts de pipette) sont également en polycarbonate. Les flacons de préparation, des solutions de sels nutritifs, de vitamines et de métaux traces sont des tubes de polycarbonate stériles de 30 mL. Le polycarbonate a été utilisé en raison de sa capacité à être débarrassé de toutes traces de métaux grâce à un nettoyage à l'acide chlorhydrique. Ce nettoyage a été choisi car il permet d'éviter toute contamination des cultures par des métaux ou par les ustensiles utilisés lors des prélèvements. Egalement pour des raisons de contamination possible par de la matière

organique, toute manipulation des ustensiles et des flacons ouverts est réalisée sous hotte à flux laminaire à l'aide de gants en plastique à utilisation unique (type gants de chirurgie). La matière organique, outre la possibilité de contaminer les cultures sous forme de bactéries, pourrait complexer les métaux et par conséquent modifier leur biodisponibilité et leurs concentrations.

2. Préparation du matériel de culture

Tout le matériel utilisé décrit (§ précédent) a été soumis à la succession d'opérations suivantes : **(i)** une semaine dans un bain de savon sans phosphates (PO_4) suivi d'un rinçage minutieux à l'eau Milli-Q, afin d'être débarrassé de tous composés organiques ; **(ii)** une semaine dans un bain d'acide chlorhydrique fort (50%), afin d'être débarrassé des métaux adsorbés sur les parois ; **(iii)** la semaine suivante, dans un bain d'acide au contraire faible (10%), afin d'être rincé de l'acidité très corrosive du bain précédent ; **(iv)** l'étape finale de préparation consiste en un rinçage minutieux à l'eau Milli-Q, et à une stérilisation dans un four à micro-ondes durant deux minutes. Pour cette dernière étape de stérilisation, les flacons contenaient quelques mL d'eau Milli-Q et étaient introduits dans des sacs stériles quasi-hermétiques.

3. La solution mère d'*E. huxleyi*

Les cellules sont issues d'une souche isolée de l'Atlantique Nord de type calcifiante (CCAP 920/4 de 60°N – 40°W ; Green 1989) qui est donc adaptée à de relativement forts Fed ($> 0.1 \text{ nM}$). Pour la solution mère, le milieu de base est de l'eau de surface de l'Atlantique Nord, filtrée à $0.2 \mu\text{m}$ et conservée à l'abri de l'air et de la lumière pour limiter le développement d'organismes parasites. Les éléments nutritifs ajoutés à ce milieu de base, ont été déterminés après avoir suivi, durant 8 générations, l'évolution de la population de cellules dans 45 batchs enrichis à l'aide de 33 milieux f/2 modifiés (Guillard, 1975). La souche d'*E. huxleyi* a été adaptée à ce type de milieu par des repiquages successifs, de 0.7 mL d'un milieu, dans 30 mL d'un autre milieu tous les 10 jours durant l'apogée de la population de cellules. La détermination du milieu adéquat de la solution mère a été effectuée par une série de 6 expériences de 15 jours chacune sur les générations successives (data not show). Les expériences consistaient à tester des milieux basés sur le milieu f/2 modifié comme suit : **(i)** pas d'EDTA, son absence était nécessaire pour que les métaux ne soient pas plus disponibles que dans l'océan ouvert ; **(ii)** absence d'éléments chimiques (Métaux traces et vitamines) les uns après les autres au fur et à mesure des générations ; et cela afin de pouvoir évaluer leur rôle dans la croissance sur 8 générations de cellules. Ainsi le milieu adéquat était composé, de NO_3 , de PO_4 et de fer ; éléments sans lesquels la croissance est plus faible qu'en leur présence ; les autres éléments (vitamine B12, thiamine, cobalt, manganèse, cuivre, molybdène et zinc) normalement constituant un milieu f/2 n'ont été ajoutés ici qu'en très faible quantité dans la solution mère. L'absence de leur ajout dans le milieu f/2 modifié n'a pas montré d'effet sur la croissance (data not show). La huitième génération a constitué la solution mère et a reçu comme enrichissement initial du NO_3 , du PO_4 ainsi que de la vitamine B12, du CoCl_2 , du MnCl_2 et du FeCl_3 à des concentrations de f/20, f/20, f/40, f/40, f/40 et f/4000 pour des concentrations respectivement de 88.2, 3.62 μM , 18.5 nM, 25 nM, 450 nM et 5.85 nM. Ce procédé a permis d'obtenir au bout de 3 mois une solution mère de cellules adaptées au milieu et utilisée par la suite pour l'inoculation des batchs lors des expériences d'ajouts de NO_3 et de fer.

4. Le milieu de culture des expériences d'ajouts

Les batchs contenaient 50mL du milieu de culture. Celui-ci est composé de l'eau de surface d'Atlantique Nord ayant servi pour la solution mère, à laquelle a été ajoutée une concentration initiale non limitante pour la croissance de 1.8 μM de PO_4 sous forme de Na_2HPO_4 . La

concentration initiale de NO_3 de $0.5 \mu\text{M}$ dans les batchs sans ajout est déduite de la mesure de la concentration de NO_3 , par la méthode décrite §IC2a, dans les batchs avec un faible ajout au jour 0 ($2.55 \mu\text{M}$). Le milieu de culture contenait une concentration de L et un pK_{FeL} de $4.58 \pm 1.2 \text{ nM}$ et 16.64 ± 0.12 , au jour 0 (Tab. 2.1), mesuré par la méthode décrite §IC2c. En plus de l'ajout de PO_4 , 12 des batchs ont reçu initialement (Jour 0) un fort ajout en NO_3 ($+44 \mu\text{M}$), 2 un faible ajout ($+2 \mu\text{M}$) et le dernier n'a pas reçu d'ajout initial sous forme de NaNO_3 . Parmi les 12 batchs ayant reçu des forts ajouts de NO_3 (Fig. 2.1), 3 non pas reçu d'ajout de fer III, 3 ont reçu un ajout faible (1 nM), 3 autres un ajout moyen (5 nM) et les 3 derniers, ainsi que les batchs ayant reçu de faible et pas d'ajout de NO_3 , ont reçu un fort (10 ou 20 nM) d'ajout de fer III sous forme de FeCl_3 . Les batchs ont reçu au début de l'expérience 1 mL de solution mère à $20 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ et $200 \times 10^4 \text{ coccolithes mL}^{-1}$ dans la phase exponentielle de croissance diluée dans 50 mL de milieu de culture donnant une concentration initiale de $0.4 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ et $4 \times 10^4 \text{ coccolithes mL}^{-1}$.

5. Conditions d'incubation

Ces flacons ainsi que la solution mère étaient maintenus, durant toute la durée de l'expérience (40 jours), dans un incubateur d'approximativement $1.5 \times 1 \text{ m}$ qui permettait d'imposer un cycle programmé de 14 heures de lumière constante et une température de $16.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$. La température était régulée par un thermostat interne à l'incubateur et mesurée également à l'aide d'un thermomètre à «mémoire mécanique». Le cycle était maintenu à l'aide d'ampoules à lumière blanche et branchée sur un interrupteur programmable. La lumière était assurée par 6 ampoules de type F8W/35 (Fitzgerald ; GB), 2 ampoules F15/29 et 1 ampoule OSRAM (warm light 15W/30 ; Germany) d'intensité inconnue mais reproduisant une lumière naturelle (Boyé et van den Berg, 2000). La constance de l'intensité lumineuse a été contrôlée durant la semaine précédant le début des expériences d'ajouts à l'aide d'une fibre optique déterminant le flux lumineux. Les ampoules n'ont pas connu de dysfonctionnement et n'ont pas eu à être changées durant les 140 jours qu'ont duré les expériences. Chaque flacon était agité une fois par jour, tous les jours. L'agitation consistait à effectuer trois retournements du flacon et elle avait pour but de remettre en suspension les particules présentes dans les flacons.

C. Techniques de prélèvements et d'analyses

1. Filtration

Pour chaque batch, la filtration de la quasi-totalité du volume de la culture a toujours été effectuée, par mes propres soins, et avec un protocole identique au jour 10, 20 et 39. La filtration de chaque batch s'est effectuée de manière manuelle en 2 étapes : 15 mL ont été filtrés à l'aide d'une seringue stérile à travers un filtre en polycarbonate de 25 mm de diamètre, de porosité $0.2 \mu\text{m}$. Les filtres en polycarbonate sont conservés dans un bain d'acide chlorhydrique dilué à 10% et soigneusement rincé avant utilisation avec 10 mL d'eau Milli-Q puis 10 mL du milieu de culture. Simultanément, 30 mL de la solution restante étaient filtrés par mano-pompe à travers un filtre GF/F de porosité $0.4 \mu\text{m}$ pré-brulé à 200°C («four à moufle») pendant 24h. Le filtre en polycarbonate de la première filtration a servi à la mesure du nombre de coccolithes attachés autour de la cellule au jour 10, et à la mesure de PIC aux jours 20 et 39 ; son filtrat en revanche est utilisé pour la mesure de Fed. Le filtre GF/F de la seconde filtration, est utilisé pour la mesure du TPC, alors que son filtrat est utilisé pour les mesures de NO_3 et des ligands organiques (L). Les analyses de Fed et de L ont été effectuées à Liverpool à l'aide d'une méthode CLE-CSV, mise au point dans le cadre de cette thèse et décrite dans l'Annexe I.

2. Paramètres dans le dissous

La concentration de NO_3 des filtrats récoltés dans des tubes en verre, s'est effectuée par colorimétrie (à l'Université de Liverpool par Mme Murphy, technicienne au laboratoire de Liverpool) à travers une chaîne technicon, avec une reproductibilité de 15% soit 0.5 μM . Les échantillons avaient été au préalable conservés à -25°C pendant près 1 an.

La concentration de fer total dissous (Fed) des filtrats récoltés dans des tubes en polycarbonate, a été mesurée grâce à la méthode du Competing Ligand Equivalence utilisant le TAC (Croot *et al.* 2001) avec une précision de 0.02 à 0.2 nM (Tab. 2.1). Les résultats de ces mesures sont présentés dans l'annexe I sur la méthode de mesure de fer.

La concentration des ligands organiques (L) et leur capacité complexante (pK_{FeL}) vis-à-vis du fer des filtrats récoltés dans des tubes en polycarbonate, ont été mesurées selon la méthode développée dans cette thèse dans l'annexe I et les résultats seront présentés ci-dessous. La précision de cette mesure est 0.5 à 3.7 nM pour L et de 0 à 0.35 pour pK_{FeL} (Tab. 2.1)

3. Paramètres dans le particulaire

a. Microscopie

L'emploi de 2 microscopes était nécessaire pour une visualisation, d'une part des populations de cellules dans leur ensemble (microscope optique, bon marché et rapide à l'emploi), et d'autre part des détails d'une seule cellule (microscopie électronique, coûteux à mettre en œuvre et très long à l'emploi).

Microscopie optique. Le comptage des cellules simultanément avec celui des coccolithes libres et l'estimation du diamètre des cellules, ont été effectués en moyenne tous les 2 jours (jours 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 20, 24 et 39), dans la mesure du possible à peu près à la même heure (entre 9 et 10 heures du matin). Ce comptage s'effectue en utilisant une lame de comptage (Neubauer B.S. 748) de 100×10^{-6} m de profondeur et de côté de 1×10^{-3} m pour un volume de comptage de 10^{-7} mL. 20 μL d'échantillon était déposé sur cette lame à l'aide d'une pipette manuelle. L'échantillon est ensuite recouvert par une fine lame de Plexiglas. Les comptages et observations des cellules et des coccolithes sont effectués en utilisant un microscope optique. Les mesures de comptage sont répétées avec 2 à 5 échantillonnages jusqu'à obtenir une reproductibilité inférieure à 10%, calculée entre les différents échantillons, ce qui correspondait donc à l'erreur sur la mesure. Cette précision représente une erreur de 0.5 à 15×10^4 cells mL^{-1} et de 0.3 à 20×10^4 coccolithes mL^{-1} .

Scanning Electron Microscopy (SEM). Le comptage du nombre de coccolithes attachés autour de la cellule lors du jour 10, s'est effectué par approximation et extrapolation de la visualisation d'une face d'une ou plusieurs cellules «typiques». Les cellules «typiques» sont considérées comme étant représentatives de l'échantillon après visualisation par SEM (microscope de l'Université de Liverpool) de la totalité de l'échantillon. Ce microscope, d'un coût approximatif de 100 000 euros et nécessitant une expertise spécifique, a été manipulé par le docteur Kees, de l'Université de Liverpool. Cette visualisation (cf. Fig. 2.5 ; §IIC3) est obtenue grâce à l'utilisation des échantillons récoltés à la surface des filtres en polycarbonate du jour 10 selon un protocole identique à la méthode employée par Veltkamp *et al.* (1994).

b. PIC et TPC

La mesure de PIC est déduite, en utilisant un rapport molaire de 1:1, de la mesure du Ca^{2+} effectuée à l'aide d'un ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer). Ces mesures ont été faites dans le Laboratoire de Chimie Analytique et Marine de l'université de Lille (Elico)

par le docteur Billon, avec une précision de 10%. Cette mesure est effectuée sur les filtres en polycarbonate sans traitement supplémentaire, et conservée sous papier métallique. Ces analyses ont été effectuées après une période d'un an de conservation dans une boîte hermétique. Etant donnée la précision de la méthode, la précision de cette mesure est assez bonne, inférieure à $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tab. 2.2).

La mesure de TPC a été effectuée par CHN (Analyseur Élémentaire -AE- C,H,N,O,S à détection coulométrique, catharométrique et cellules infra-rouges) par le Service d'Analyse du CNRS de Lyon (France) avec une précision de 0.3%, soit une erreur de 0.01 à $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tab. 2.2). Ces mesures ont été effectuées 1 an et demi (Décembre 2004) après l'échantillonnage, et les échantillons ont été conservés, avant analyse dans du papier métallique, après un séchage à froid (effectué à L'Université de Liverpool).

4. Paramètres calculés dans le particulaire

a. Le nombre moyen de cellules et de coccolithes libres

Le nombre moyen de cellules (Cells) et de coccolithes libres (coccolithes) à chaque instant de temps pour une condition d'ajout donné est la moyenne entre la population de cellules et de coccolithes libres de chacun des trois batchs ayant reçu le même ajout de fer. Ces populations sont mesurées comme indiqué dans le protocole de mesure (§IC3a). La précision de ces calculs, basée sur 3 populations de cellules et de coccolithes de batch différents (§IC3a), est assez faible et de l'ordre de 0.5 à $20 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ dans le cas du nombre moyen de cellules (Fig. 2.6a). Par contre la précision, basée sur des populations assez importantes (>10 fois plus que le nombre de cellules), est assez forte et de 0.5 à $40 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ (Fig. 2.7a).

Le nombre moyen de coccolithes libres par cellule (coccolithes libres/cell) à chaque instant est le rapport entre les deux grandeurs précédentes. La précision est de 0.5 à $8 \text{ coccolithes mL}^{-1}$ (Fig. 2.7b).

b. Evolution du nombre de cellules

Le taux de croissance journalière (μ_t) des cellules, représentant la vitesse d'augmentation exponentielle de la quantité de cellules entre le jour t et $t+1$ par quantité de cellules présentes au jour t . Ce taux de croissance est calculé selon la relation suivante :

$$\mu_t = \ln(N_{t+1}/N_t) / (t+1 - t) \quad (\text{Eq. 2.1})$$

avec N_t représentant la concentration de cellules (obtenue comme indiqué §Cc) au jour t et N_{t+1} la concentration de cellules au jour du comptage suivant. Le calcul de l'erreur sur ce paramètre étant donnée la précision sur la population de cellules (§IC4a) est de 1% à 100%, soit de 0.01 à 0.4 jour^{-1} (Fig. 2.6b).

c. Evolution du nombre de coccolithes libres

Le taux de renouvellement du stock de coccolithes libres (R_t), représentant la vitesse de d'augmentation de la quantité de coccolithes libres entre le jour t et $t+1$ par quantité de coccolithes libres présentes au jour t . Ce paramètre est calculé selon la relation suivante :

$$R_t = \ln(C_{t+1}/C_t) / (t+1 - t) \quad (\text{Eq. 2.2})$$

avec C_t et C_{t+1} représentant la concentration de coccolithes libres (obtenue comme indiqué §IC3a) au jour t et au jour du comptage suivant. Le calcul de l'erreur sur ce paramètres étant donnée la précision sur la population de coccolithes libres (§IC4a) est assez bonne et de 0.01 à 0.04 jour^{-1} (Fig. 2.7c).

Le taux de détachement des coccolithes libres (D_t), représentant la vitesse d'augmentation de la quantité de coccolithes libres entre le jour t et $t+1$ par quantité de cellules au jour t . ce paramètre est calculé selon la relation suivante :

$$D_t = (C_{t+1} - C_t) / N_t(t+1 - t) \text{ (Eq. 2.3)}$$

avec C_t et N_t représentant les concentrations de coccolithes libres et de cellules au jour t (obtenues comme indiqué §IC4a). Le calcul de l'erreur sur ce paramètres étant donnée la précision sur la population de cellules et de coccolithes libres (§IC4a) est assez faible et de 0.2 à 4 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ (Fig. 2.7d).

d. Moyennes des différents paramètres (cellule, coccolithes libres, croissance, renouvellement et détachement)

Les moyennes ($\langle G \rangle_i$) des grandeurs mesurées (cellules et coccolithes libres) et calculées (croissance, détachement, renouvellement) durant les différentes périodes (0-10, 10-20, 20-24), représentant les grandeurs moyennes pouvant être associées aux quantités de NO₃ ou de fer ajouté dans les batchs au jour 0 (période 0-10) ou bien les quantités mesurées dans le particulaire et le dissous aux jours 10 (période 10-20) et 20 (période 20-24). Ces grandeurs moyennes sont calculées selon la relation suivante :

$$\langle G \rangle_i = \langle G_t \rangle_{\Delta t} \text{ (Eq. 2.4)}$$

Avec i allant de 1 à 3, représentant les périodes Δt entre les jours 0 et 8 ($i=1$), 10 et 17 ($i=2$) et 20 et 24 ($i=3$) pour lesquelles sont calculées les moyennes ; G_t les valeurs au jour t : **(i)** du nombre de cellules par volume (N_t), **(ii)** du nombre de coccolithes libres par volume (C_t), **(iii)** par cellule (C_t/N_t), **(iv)** du taux de croissance des cellules (μ_t), **(v)** du taux de renouvellement des coccolithes libres (R_t), **(vi)** du taux de détachement des coccolithes (D_t).

Le taux de croissance moyen ($\langle \mu \rangle$) des cellules au début de la phase exponentielle, représentant le taux de division moyen lorsque l'augmentation du nombre de cellules se fait de façon logarithmique (entre les jours 2 et 4 de l'expérience) durant la phase exponentielle. Ce taux de croissance, correspondant à l'augmentation maximale de la population de cellules, est calculé selon la relation 2.4 ci-dessus, avec t allant de 2 à 4 jours. Le calcul de l'erreur sur ce paramètre étant donnée la précision de μ (§IC4b), assez faible et de 0.1 à 0.2 jour⁻¹ (Fig. 2.6c).

e. Carbone calculé

Calcul du POC (Particulate Organic Carbon) a été calculé aux jours 20 et 39 par différence entre le TPC et le PIC qui ont été obtenus comme indiqué dans le §IC3b. Au jour 10, le POC /mL provient d'une estimation du PIC /mL issue du calcul effectué avec le nombre de coccolithes totaux mesuré et du PIC /coccolithe supposé égal au PIC /coccolithe moyen du jour 20 de 0.14 pg coccolithe⁻¹ (cf. Tab. 2, §IIIC2). Au jour 39, en absence d'ajout, le POC provient d'une estimation du PIC /mL issue du calcul effectué avec le nombre de coccolithes attachés supposé égal au nombre moyen du jour 10 de 15 coccolithes (cf. Tab. 2.2, §IIIC1).

Calcul du PIC /mL au jour 10 lors de tous les ajouts à partir d'une estimation issue du calcul effectué avec le nombre de coccolithes attachés (§IIIC1) et du PIC /coccolithe au jour 10 supposé égal au PIC /coccolithe moyen du jour 20 de 0.14 pg coccolithe⁻¹ (Tab. 2.2, §IIIC2). Au jour 39, le PIC /mL en absence d'ajout provient d'une estimation issue du calcul effectué avec le nombre de coccolithes attachés supposé égal à 15 (cf. Tab. 2.2 et explication ci-dessous) et du PIC /coccolithe supposé égal au PIC /coccolithe moyen mesuré lors des autres ajouts au jour 39 de 0.08 pg coccolithe⁻¹ (Tab. 2.2).

Calcul du PIC /coccolithe à partir d'une estimation issue : pour le jour 10, de la moyenne des quantités de PIC /coccolithe estimées lors des jours 20 de 0.14 pg coccolithe⁻¹ ; pour les jours 20

et 39, d'une part, de l'estimation du nombre de coccolithes attachés comme la moyenne mesurée au jour 10 de 15 coccolithes, et d'autre part, de la quantité de PIC /mL mesurée. La moyenne du nombre de coccolithes /coccosphères semble être une approximation raisonnable pour les jours 20 et 39 au vue de la faible variation du diamètre des cellules estimé par microscope optique (data not show)

II. Résultats

Le suivi de l'impact des ajouts initiaux de fer III sur une même population d'*E. huxleyi* est décrit, à la fois en fonction de l'intensité des ajouts et de la phase de croissance des cellules durant 40 jours. Afin d'identifier l'effet de ces ajouts de fer III sur la spéciation de fer, sont décrites les réponses aux ajouts : (i) de la spéciation du fer dans les batchs (§A) ; par la suite, (ii) de la population (cellules et coccolithes libres) et des processus de croissance organique et inorganique (détachement) (§B) ; enfin, (iii) des concentrations de carbone organique et inorganique, et de la taille de la coccosphère (§C).

A. Effet des ajouts sur la spéciation de fer et la production de ligands

L'étude de la concentration de Fed ainsi que de sa spéciation (Fe' , L, pK_{FeL}), durant le bloom et les 40 jours de l'expérience et suivant l'intensité des différents ajouts permet d'analyser la stratégie de production de ligand par *E. huxleyi* en fonction du stress initial reçu en fer. Les données obtenues concernant la spéciation de fer sont présentées dans le tableau 2.1 et la figure 2.4. Elles seront présentées selon 2 parties : 1. les variations des concentrations des différentes formes de fer (Fed et Fe'), des Ligands organiques (L) et de la constante de dissociation du fer III avec ces Ligands (pK_{FeL}) suivant l'ajout initial de fer III aux instants des échantillonnages (jour 0, 10 et 20). 2. les variations des concentrations des différentes formes de fer avec le temps pour les différents ajouts de fer III. *Les différents ajouts de fer seront qualifiés dans le reste du document par les termes sans ajout pour 0 nM, faible pour 1 nM, moyen pour 5 nM et forts ajouts pour 10 et 20 nM.*

Tableau 2.1 : Spéciation du fer

Spéciation du fer (Fed et Fe') et ligands organiques (L et pK_{FeL}), associés aux concentrations de cellules des batchs sélectionnés et analysés selon la méthode décrite §IC2, lors de différents ajouts initiaux de fer pour les 3 jours d'échantillonnage de l'expérience (0, 10 et 20).

Jour Expérience	Fe Ajout nM	Cellules		[Fed]		Fe'		L		pKFeL	
		x10 ⁴ /ml	SD	nM	SD	pM	SD	nM	SD	-	SD
0	0	0.4	-	0.41	0.08	100	-	4.58	1.20	16.64	0.12
	1	0.4	-	0.34	0.08	100	-	4.58	1.20	16.64	0.12
	5	0.4	-	0.70	0.18	100	-	4.58	1.20	16.64	0.12
	10	0.4	-	0.52	0.12	100	-	4.58	1.20	16.64	0.12
10	0	15.7	2.6	1.24	0.02	0.57	0.04	10.94	1.40	21.35	0.15
	1	28.3	4.0	0.94	0.06	1.75	0.44	19.98	2.70	20.73	0.12
	5	20.0	3.0	0.83	0.07	2.31	0.83	13.59	1.90	20.55	0.06
	10	19.5	0.5	0.58	0.02	0.52	0.90	8.23	0.50	21.03	0.08
20	0	56	17.1	0.96	-	0.58	0.22	10.21	3.70	21.22	0.65
	1	31	8.6	0.94	-	0.98	0.19	21.86	1.70	20.98	0.35
	5	29	9.4	0.69	-	0.18	0.03	11.58	1.80	21.57	0.06
	20	22	5.0	0.94	-	0.08	0.00	6.01	3.70	22.10	0.00

En italique : valeur estimée

1. Variation de la spéciation du fer et du pouvoir complexant des ligands en fonction des différents ajouts

Les variations de la spéciation (Fig. 2.4) seront présentées en décrivant les effets observés des différents ajouts sur le fer dissous total (2.4a), le fer inorganique (2.4b), la concentration de Ligands organiques (2.4c), et la constante de dissociation du fer III (Fig. 2.4d), aux différents instants où les mesures ont été effectuées (jour 0, 10 et 20).

Le fer total dissous (Fed ; Fig. 2.4a), au jour 10, est d'autant plus fort que l'ajout est faible mais, au jour 20, sa variabilité est très faible et non significative, quelle que soit l'intensité de l'ajout. Le jour initial (t=0, avant les ajouts), le Fed est de 0.41 et 0.34 nM dans les batchs sans ajout ou recevant des ajouts faibles de 1 nM, soit entre 20% et 50% plus faible par rapport aux batchs recevant des ajouts de 5 et 10 nM. Au jour 10, la situation est inverse puisque plus l'ajout est important, plus le Fed est faible. Le Fed de 1.24 nM sans ajout, est d'un facteur 2.5 plus intense que lors d'ajout de 10 nM. Le jour 20, Le Fed montre moins de différence entre les ajouts. Sa valeur moyenne est de 0,95 nM et similaire (à 1% près) quel que soit l'ajout en Fe(III)'. La seule exception est observée pour les batchs avec l'ajout de 5nM de Fe(III)', dans lesquels Fed est 30% inférieur.

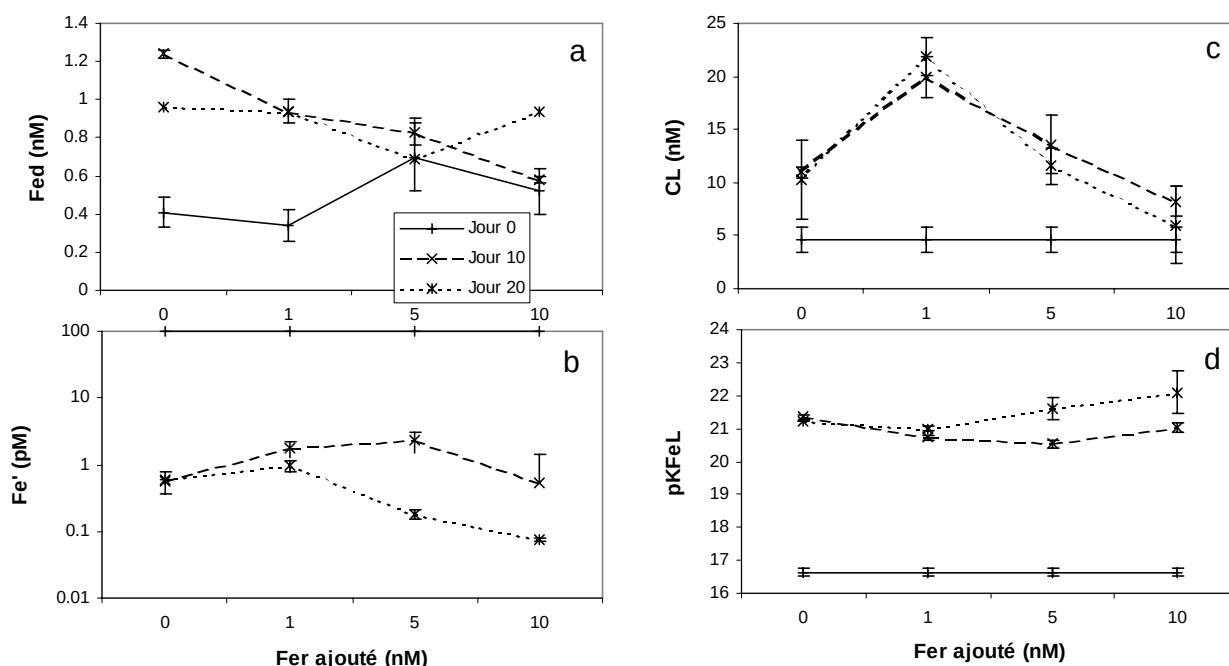


Figure 2.4 : Spéciation de fer pour les différentes conditions d'ajout de fer

Concentrations de fer dissous total (Fed) mesuré (a), de fer inorganique (Fe') calculé (b), de ligands organiques (CL) mesuré (c) et logarithme de la constante de dissociation (pK_{FeL}) calculé (d) dans les batchs, aux différents jours, en fonction du fer III ajouté initialement. La totalité des valeurs reportées dans les figures sont reportées dans leur intégralité dans le tableau 2.1. Le Fed est mesuré par « Cathodic Stripping Voltamétrie » (CSV) avec du 2-(2-thiazolyl)-4-méthylphénol (TAC) selon la méthode de Croot *et al.* (2001) avec une ou deux additions de Fe(III) de 1 nM. (cf. Annexe I). Le L, pK_{FeL} et p_{al} sont mesurés suivant un protocole similaire à celui ayant servi pour la mesure d'échantillons du Pacifique, présenté dans la partie dans l'annexe II. Le Fe' est issu du calcul utilisant les concentrations de Fed et L et leur pK_{FeL} selon la méthode de van den Berg (1984).

Le fer inorganique (Fe' ; Fig. 2.4b), au jour 10, augmente avec l'ajout et est à l'inverse de Fed (Fig. 2.4a). Au contraire au jour 20, Fe' est généralement d'autant plus fort que l'ajout est faible. Au jour 10, le Fe' calculé dans les batchs est maximal, avec une valeur de 2.31 pM, lors d'ajout de 5 nM. Le Fe' diminue lorsque l'ajout augmente ou diminue par rapport à 5 nM. La diminution de Fe' est d'un facteur 4.5 lorsque l'ajout augmente de 5 à 10 nM et est d'un facteur 4 lorsque l'ajout diminue de 5 à 0 nM. Le jour 20, le Fe' est maximal, avec une valeur de 0.98 pM, lors d'ajout de 1 nM et non de 5 nM tel qu'au jour 10. Le Fe' diminue lorsque l'ajout augmente ou diminue par rapport à 1 nM. La diminution de Fe' est d'un facteur 13 lorsque

l'ajout augmente de 1 à 20 nM et d'un facteur 2 lorsque l'ajout diminue de 1 à 0 nM. Le Fe' montre donc un maximum lors d'ajout de 5 nM au jour 10 et de 1 nM au jour 20.

La concentration de ligands (L ; Fig. 2.4c), est d'autant plus forte que l'ajout est faible avec un maximum lors d'ajout de 1 nM et est identique au jour 10 et 20. Le jour 10, le L est maximal, avec une valeur de 19.98, pour un ajout faible de 1 nM. Cette situation est similaire à celle due aux effets des différents ajouts sur le Fe' au jour 20, qui montre un maximum du Fe' lors d'ajout de 1 nM (Fig. 2.4b). L diminue lorsque l'ajout augmente ou diminue par rapport à l'ajout de 1 nM. La diminution de L est d'un facteur 2.5 lorsque l'ajout augmente de 1 à 10 nM et est d'un facteur 2 lorsque l'ajout diminue de 1 à 0 nM. Le jour 20, la situation est similaire au jour 10, avec des concentrations de L qui n'ont pas varié (à 20 % près) quel que soit l'ajout.

L'effet des ajouts sur **la constante de dissociation** (pK_{FeL} ; Fig. 2.4d) est à l'opposé de l'effet sur le Fe' (Fig. 2.4b). En effet, le pK_{FeL} au jour 10, est minimal, avec une valeur de 20.55, lors d'ajout de 5 nM. Puis le pK_{FeL} augmente lorsque l'ajout augmente ou diminue par rapport à l'ajout de 5 nM. Une augmentation de pK_{FeL} de 0.48 unité de pK est observée lorsque l'ajout augmente de 5 à 10 nM et de 0.8 unité lorsque l'ajout diminue de 5 à 0 nM. Au jour 20, le pK_{FeL} est minimal, avec une valeur de 20.98, lors d'ajout de 1 nM. Le pK_{FeL} augmente lorsque l'ajout augmente ou diminue par rapport à l'ajout de 1 nM. Une augmentation de 1.12 unités de pK est observée lorsque l'ajout augmente de 1 à 20 nM et de 0.24 unité lorsque l'ajout diminue de 1 à 0 nM. Le pK_{FeL} montre donc un minimum lors d'ajout de 5 nM au jour 10 et de 1 nM au jour 20.

Au jour 10, Fed, L et pK_{FeL} sont stimulés lors d'ajouts faibles avec des maxima respectivement de 1.24 nM et 21.35, pour Fed et pK_{FeL} , en absence d'ajout, et de 20 nM, pour L, lors d'ajouts de 1 nM. Ces maxima sont plus intenses d'un facteur 2.1 (pour Fed) et 2.4 (pour L) par rapport à des ajouts de 10 nM, et de 39‰ (pour pK_{FeL}) par rapport à des ajouts de 5 nM. A l'inverse, Fe' est inhibé avec un minimum de 0.57 pM en absence d'ajout et qui est 4.5 fois moins intense par rapport à des ajouts de 5 nM. La particularité de ces tendances se trouve dans le fait que Fe' et L sont à 10% et 25% et pK_{FeL} à 15‰ similaires en absence d'ajout que lors d'ajouts de 10 nM.

Au jour 20, Fed se stabilise autour d'une valeur de 0.95 nM (à 1% près) et L évolue peu (de 6% à 25%) par rapport au jour 10, indépendamment de l'ajout. Par contre, Fe' et pK_{FeL} continuent de diminuer, respectivement de 90% et d'augmenter de 50‰ mais, contrairement à celle du jour 10, de manière plus importante lors d'ajout respectivement de 5 (pour Fe') et 20 nM (pour pK_{FeL}) qu'en absence d'ajout, durant lequel Fe' et pK_{FeL} évolue peu (de 2% et 6‰).

Les faibles ajouts en fer (stress initial fort) produisent une stimulation de la spéciation de Fed et le FeL (représenté par L) alors qu'en même temps une inhibition de Fe' se produirait dans les mêmes conditions. Mais ces formes de fer sembleraient également suivre des variations différentes dans le temps.

2. Variation de la spéciation du fer et du pouvoir complexant au cours du bloom (40 jours)

La spéciation du fer dans ces expériences (Fed, Fe' , L et pK_{FeL}) ne varie pas seulement suivant les différents ajouts initiaux de fer III, mais également au cours du temps durant les 40 jours de l'expérience.

Le fer total dissous (Fed ; Fig. 2.4a) augmente entre le jour 0 et 10 d'autant plus intensément que l'ajout est faible, puis entre les jours 10 et 20 varie dans le sens de l'intensité de l'ajout (diminution en absence d'ajout et augmentation lors d'ajout de 10 nM). Fed, avec une concentration au jour 0, lors d'ajout respectivement de 0, 1, 5 et 10 nM, augmente le jour 10 d'un facteur 3, 2.8, 1.2, 1.1. Puis, le Fed entre les jours 10 et 20, varie différemment suivant l'importance de l'ajout : Fed diminue de 20% (ajout de 0 et 5 nM), reste similaire (ajout de 1 nM)

et augmente de 60% (ajout de 10 nM). L'augmentation de Fed entre le jour 0 et 10 en absence d'ajout, d'une intensité de 0.83 nM, est 14 fois plus intense que lors d'ajout de fer de 20 nM.

Le fer inorganique (Fe' ; Fig. 2.4b) diminue durant les 20 premiers jours de l'expérience quelle que soit l'importance de l'ajout. Le Fe' varie entre les jours 10 et 20 différemment suivant l'importance de l'ajout : Fe' reste similaire (en absence d'ajout) et diminue de 44%, 92% et 86% (ajout de 1, 5 et 20 nM). À l'exception de l'expérience sans ajout durant laquelle Fe' reste constant, la différence de Fe' entre les jours 10 et 20 augmente avec l'intensité de l'ajout : elle est minimale lors d'ajout de 1 nM et plus intense d'un facteur 2 lors d'ajouts de 5 et 20 nM que lors d'ajout de 1 nM.

La concentration de ligands (L ; Fig. 2.4c) augmente entre le jour 0 et 10 quel que soit l'ajout puis reste constant entre le jour 10 et 20. L, d'une valeur de 4.58 nM au jour 0 quel que soit l'ajout, augmente au jour 10, d'un facteur 2.2, 4.3, 3 et 1.8 (respectivement lors d'une absence d'ajout et des ajouts de 1, 5 et 10 nM). Cette augmentation de L entre le jour 0 et 10 est d'autant plus forte que l'ajout est faible, sauf en absence d'ajouts dont l'augmentation est 58% plus faible que lors d'ajouts de 1 nM. L'augmentation de L entre les jours 0 et 10 est plus intense d'un facteur 2.5 lors d'ajouts de 5 nM, d'un facteur 4.1 lors d'ajouts de 1 nM, mais seulement d'un facteur 1.7 en absence d'ajout par rapport à l'augmentation de 3.65 nM lors d'ajouts de 10 nM. À l'exception d'ajout de 1 nM, L diminue entre les jours 10 et 20 : L de 19.98 nM au jour 10 lors d'ajout de 1 nM, augmente de 9% ; par contre L de 10.94, 13.59 et 8.23 nM lors de respectivement une absence d'ajout, des ajouts de 5 et 10 (et 20) nM, diminue de 7%, 15% et 27%. Cette diminution de L entre les jours 10 et 20 est maximum lors d'ajout de 10 (et 20) nM et plus intense d'un facteur 2 et 4 que lors respectivement d'ajout de 5 nM et en absence d'ajout.

La variation de **la constante de dissociation** (pK_{FeL} ; Fig. 2.4d) est à l'opposé de celle du Fe' (Fig. 2.4b). pK_{FeL} augmente durant les 20 premiers jours de l'expérience quelle que soit l'importance de l'ajout, sauf en absence d'ajout où pK_{FeL} diminue entre le jour 10 et 20. pK_{FeL} , d'une valeur de 16.64 au jour 0 quel que soit l'ajout, augmente d'un facteur 1.2 au jour 10. À l'exception d'en absence d'ajout, pK_{FeL} augmente entre les jours 10 et 20 : pK_{FeL} de 21.35 au jour 10 en absence d'ajout, diminue de 0.13 unité de pK ; par contre, pK_{FeL} de 20.73, 20.55 et 21.03 lors de respectivement des ajouts de 1, 5 et 10 (et 20) nM, augmente de 12‰, 49‰ et 51‰. La différence de pK_{FeL} entre les jours 10 et 20, correspond à une diminution en absence d'ajout, et à une augmentation lors d'ajouts non nul. Cette augmentation de pK_{FeL} est maximum lors d'ajout de 5 et 10 (et 20) nM et diminue d'un facteur 4 lors d'ajouts faibles.

Le jour 0, la concentration de Ligand (L) et le log négatif de la constante de dissociation du fer organique (pK_{FeL}) sont similaires, avec des valeurs respectives de 4.58 nM et 16.64 (Tab. 2.1), quel que soit l'ajout de fer III. Cette similarité serait due au fait que la mesure et le calcul de ces paramètres ont été effectués sur un milieu de culture commun à tous les batchs avant l'inoculation de cellules (jour 0).

Quel que soit l'intensité de l'ajout : durant 20 jours, la constante pK_{FeL} , à l'opposé de Fe' , augmente au cours du temps. Par contre, la concentration de Fed et de L augmente durant les 10 premiers jours, mais n'évolue presque plus ensuite et reste pratiquement constante.

3. Apparition et disparition du Fed en tenant compte de l'ajout et comparaison des différentes formes de fer (Fig. 2.5).

Le paradoxe que soulèvent ces résultats se trouve au niveau de l'évolution de la concentration en Fed qui varie entre les jours 10 et 20 dans le sens opposé à l'importance des ajouts effectués initialement (Tab. 2.1) : plus l'ajout initial de $Fe(III)'$ est fort (de 0 à 10 nM) et moins il y a de Fed. L'augmentation de Fed de 0.83 nM en absence d'ajout est 2.5 fois plus intense que lors d'ajouts forts et correspond à une « apparition » de Fed (Fig. 2.5). Par contre cette augmentation correspondrait à une « disparition » de Fed si on tient compte de l'ajout initial de $Fe(III)'$. Cette perte du fer initialement ajouté, de 0.40 nM (ie. 40%) dans le cas d'ajout

de 1 nM, augmente d'un facteur 2.5 lors d'ajout de 10 nM. Ainsi, plus l'ajout initial de Fe(III) est important plus celui ci aurait tendance à disparaître. Les raisons de cette apparition et de ces disparitions de Fed seront discutées (cf. §IIIA).

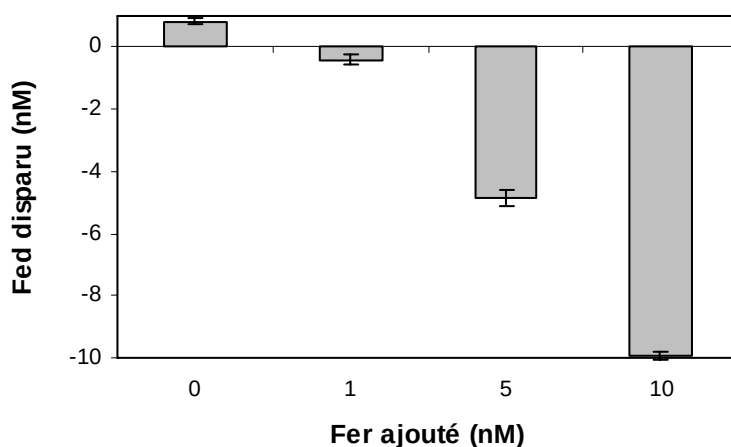


Figure 2.5 : Apparition et disparition de fer

Evolution de la quantité de fer présente en fonction de la quantité de Fe III ajouté initialement, calculé par différence entre la concentration de Fed mesurée au jour 10 et la concentration supposée de fer dissous total initial (Fed mesuré au jour 0 + Fe III ajouté). Des valeurs négatives signifient une disparition et des valeurs positives signifient une apparition de fer par rapport à la quantité de Fed supposée après les ajouts de Fe III initiaux.

La concentration de Fed, de L ainsi que la constante pK_{FeL} , à l'inverse de Fe' , sont stimulées les 10 premiers jours après l'inoculation de fer, de façon plus importante lorsque la concentration de l'ajout initial diminue. Au jour 20, la tendance de pK_{FeL} et de Fe' s'inverse vis à vis des ajouts. Par contre, la concentration de L évolue peu, par rapport au jour 10, et le Fed se stabilise autour d'une concentration constante de 1 nM. Ainsi la spéciation du fer au jour 10 peut être considérée comme la plus représentative de la perturbation introduite initialement ($t=0$) par les ajouts de différentes intensités. Alors que la spéciation du fer au jour 20, refléterait qu'une l'évolution indirecte des différents ajouts initiaux.

En parallèle de cette variation de spéciation du fer et notamment de ligands organique, existe t-il un effet des ajouts sur le contenu des batchs en terme de populations durant un bloom (cellules et coccolithes libres) ? Ces effets peuvent-ils être mis en relation avec les processus de production de ces populations (croissance et détachement) ?

B. Effets des ajouts sur la production de cellules et de coccolithes

Pour analyser la stratégie de bloom en fonction des différents ajouts de fer, il a été réalisé durant 40 jours un suivi de la population de cellules par mL (Fig. 2.6a) et de coccolithes libres par mL (Fig. 2.7a) et par cellule (Fig. 2.7b). Ces paramètres ainsi que les processus qui les produisent : croissance des cellules (Fig. 2.6b et 2.6c), processus de détachement des coccolithes (Fig. 2.7c) et renouvellement du stock de coccolithes libres (Fig. 2.7d), seront décrites ci-dessous: 1. en fonction des différents ajouts et 2. au cours du temps.

Il est important de remarquer que chaque valeur des processus décrits ci-dessous (croissance, détachement des coccolithes et renouvellement des coccolithes libres) est associée au premier jour de la période durant laquelle a été effectuée son estimation (cf. §IC4). Par exemple le taux de détachement calculé pour la période entre le jour 24 et 39 est associé au jour 24 ; un taux de détachement associé au jour 39 ne peut donc pas être estimé.

1. Evolution de la population de cellules et leur processus de croissance en fonction des différents ajouts (Fig. 2.6)

a. La population de cellules (Fig. 2.6a)

De manière générale et pour tous les ajouts, la population de cellules croît à partir du jour 0 jusqu'à un maximum atteint entre les jours 12 et 24, puis décroît jusqu'au jour 39. Premièrement, l'effet des différents ajouts sur l'évolution de la concentration de cellules est détaillé en distinguant trois périodes : du jour 0 à 12 ; du jour 12 à 20, du jour 20 à 24 et du jour 24 à la fin des expériences (jour 39). Cette distinction est effectuée à défaut de pouvoir identifier des phases de croissance exponentielle, stationnaire et sénescence, similaires pour tous les ajouts. Deuxièmement, les différentes phases de croissance propres à chaque ajout seront comparées.

La population de cellules doit être analysée pour chaque période

Le maximum de population est d'autant plus fort qu'il est atteint tardivement et que l'ajout est faible. Par contre, entre les jours 12 et 24, la population de cellules augmente, stagne ou diminue de façon irrégulière suivant l'ajout.

Entre les jours 0 et 12, la population évolue de manière similaire quel que soit l'ajout initial de $\text{Fe(III)}'$. La population augmente à partir de 0.4×10^4 cells $\text{mL}^{-1(4)}$ au jour 0 jusqu'à une concentration autour de $35 \pm 5 \times 10^4$ cells mL^{-1} au jour 12, soit une augmentation pour la population de deux ordres de grandeur en 12 jours. **Cette période correspondrait alors à la phase exponentielle de croissance commune à tous les ajouts.**

Entre les jours 12 et 20, l'évolution de la population de cellules dépend de l'ajout initialement introduit dans les batchs. **(i)** En absence d'ajout, la population au jour 12, de 35.7×10^4 cells mL^{-1} , augmente continuellement de 57% durant 8 jours. **(ii)** Lors d'ajout faible, la population au jour 12, de 30.7×10^4 cells mL^{-1} , augmente intensément de 40% durant 3 jours ; par la suite, la population entre les jours 15 et 17 diminue de 57% ; puis la population entre les jours 17 et 20, augmente de nouveau de 66%. **(iii)** Lors d'ajout moyen, la population entre les jours 12 et 15, de $33.3 \pm 9 \times 10^4$ cells mL^{-1} reste constante ; puis la population entre les jours 15 et 17, diminue de 22% et, entre les jours 17 et 20, est de nouveau constante autour d'une valeur de $28.5 \pm 9 \times 10^4$ cells mL^{-1} . **(iv)** Lors d'ajout fort, la population entre les jours 12 et 15, de $38.5 \pm 2 \times 10^4$ cells mL^{-1} , reste constante ; puis la population entre les jours 15 et 20, diminue continuellement de 40%. Ainsi, le taux d'accroissement moyen de la population de cellules entre le jour 12 et 20, serait d'autant plus important que l'ajout initial de $\text{Fe(III)}'$ est faible. Ce taux d'accroissement moyen est de 2.5 ± 2.5 et seul positif en absence d'ajout, de 0 ± 1.7 lors d'ajout de 1 nM, de -0.5 ± 2.4 lors d'ajout de 5 nM et de -2.1 ± 0.9 cells $\text{mL}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ et le plus faible lors d'ajout de 10 nM.

Entre les jours 20 et 24, la population n'évolue pas significativement en absence d'ajout, ou lors d'ajout faible de 1 nM et moyen de 5 nM, alors qu'elle augmente lors d'ajout fort de 10 nM. En absence d'ajout et lors d'ajout de 1 et 5 nM, la population reste constante entre les jours 20 et 24 autour d'une valeur moyenne de 59.2 ± 13 , 34 ± 6 et $27.2 \pm 7 \times 10^4$ cells mL^{-1} . A l'opposé, lors d'ajout de 10 nM, la population au jour 20, de 22×10^4 cells mL^{-1} , augmente fortement de 61% durant les 4 jours suivants.

Entre les jours 24 et 39, la population diminue quel que soit l'ajout avec une valeur finale au jour 39 d'autant plus forte que l'ajout initial est faible. La population en absence d'ajout, et lors d'ajouts de 1, 5 et 10 nM, de respectivement 62.3, 37.3, 25.3 et 35.5×10^4 cells mL^{-1} au jour 24,

⁴ : La concentration de cellules au jour 0 est estimée à partir de la concentration de la solution mère (cf. §IB3).

diminue de, 49%, 20%, 41% et 61% durant 15 jours. La diminution de la population lors d'ajouts de 5 et 10 nM est plus intense d'un facteur 2 et 3 par rapport à l'ajout de 1 nM. De même, la diminution de la population en absence d'ajout est plus intense d'un facteur 2.5 par rapport à l'ajout de 1 nM. Ainsi, la diminution de la population est minimale lors d'ajout faible et s'intensifie lorsque l'ajout augmente ou diminue. La concentration finale de cellules au jour 39, d'une valeur de 14×10^4 cells mL^{-1} lors d'ajout de 10 nM, est du même ordre de grandeur que lors d'ajout de 5 nM mais deux fois plus faible que lors d'ajout de 1 nM et en absence d'ajout. Cette période correspondrait à la phase sénescence commune à tous les ajouts.

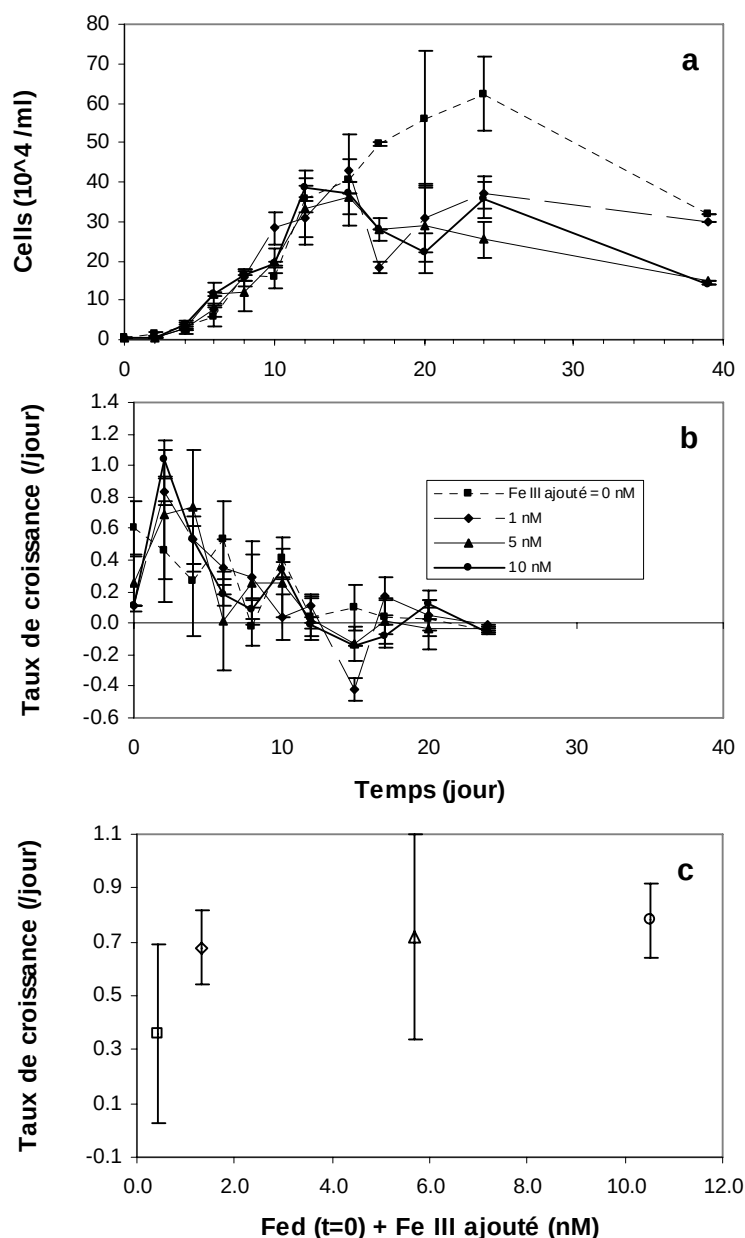


Figure 2.6 : Population et croissance des cellules dans les différentes conditions d'ajout de fer. Evolution au cours du temps entre le jour initial (jour 0) et le dernier jour de l'expérience (jour 39), pour chacune des conditions de fer III ajouté initialement dans les différents batchs (sans ajouts -0 nM ; faibles -1 nM ; moyens -5 nM et forts -10 ou 20 nM) : du nombre de cellules par unité de volume de culture (cells/mL -a) et de la croissance instantanée des cellules (μ -b). Relation entre la moyenne de la croissance des cellules de la période initiale (entre le jour 2 et 4) en fonction de la concentration supposée de fer dissous total initial (c), tenant compte de l'ajout de Fer III (Fed supposé = Fed mesuré au jour 0 + Fe III ajouté). L'effet des ajouts de fer sur la croissance est présenté par extrapolation des intensités des ajouts de fer III et non pas de la spéciation mesurée au jour 0. En effet, lors de la mise en relation de la population de cellules et de la croissance avec les différentes formes de fer, la spéciation de fer initialement mesurée (jour 0) n'est pas la spéciation réellement présente puisque ne tient pas compte des ajouts fer III qui ont eu lieu après la mesure de spéciation. Le nombre de cellules par unité de volume est mesuré par comptage à l'aide d'un microscope optique (cf. stratégie). La croissance instantanée des cellules est issue du calcul utilisant les concentrations de cellules (Fig. 2.6a) par unité de volume (cf. stratégie). Les moyennes de la croissance sont issues du calcul utilisant le taux de croissance instantanée des cellules (Fig. 2.6b ; cf. stratégie).

Impact des ajouts sur les phases de croissance

Les durées et les intensités des phases de croissance, stationnaire et de mortalité, diffèrent selon l'intensité de l'ajout initial de Fe(III)'. La phase de croissance est d'autant plus longue que l'ajout en Fe(III)' est faible. La durée de cette phase, de 12 jours lors d'ajout de 5 et 10 nM, augmente de 25% lors d'ajout de 1 nM et de 100% en absence d'ajout. La phase stationnaire de croissance apparaît uniquement dans le cas d'ajouts de 5 et 10 nM, et correspond à la période entre le jour 12 et 15. Par contre, en absence d'ajout et lors d'ajout de 1 nM, une telle phase ne peut être distinguée. La phase de mortalité diffère en durée et en intensité suivant l'ajout. En absence d'ajout elle est tardive (jour 24), longue (jusqu'au jour 39) et intense, avec une diminution de 50% de la population en 15 jours. Lors d'ajout de 5 nM, au contraire de l'expérience sans ajout, la phase de mortalité est précoce (jour 15), extrêmement longue (jusqu'au jour 39) et progressive, avec une diminution de 61% de la population en 24 jours. Lors d'ajouts de 1 et 10 nM, la phase de mortalité se fait en deux phases entrecoupées d'une phase secondaire de croissance de la manière suivante :

(i) La première phase de mortalité est précoce (jour 15), que l'ajout soit faible ou fort. Cette phase de mortalité, lors d'ajout de 1 nM, est courte (entre les jours 15 et 17) et intense, avec une diminution de 57% de la population en 2 jours. Par contre, cette phase de mortalité, lors d'ajout de 10 nM, est 2 fois plus longue (entre les jours 15 et 20) et 3.5 fois moins intense, avec une diminution de 41% de la population en 5 jours, que lors d'ajout de 1 nM.

(ii) La phase secondaire de croissance, lors d'ajout de 1 nM, est longue (entre le jour 17 et 24) et assez marquée, avec un doublement de la population en 7 jours. Par contre, cette phase de croissance, lors d'ajouts de 10 nM, est 2 fois plus courte (entre le jour 20 et 24) mais aussi marquée que lors d'ajouts de 1 nM, avec une augmentation de 61% en 4 jours.

(iii) La seconde phase de mortalité, lors d'ajout de 1 nM, serait peu marquée, avec une diminution de la population de 20% en 15 jours. Par contre, cette phase de mortalité, lors d'ajouts de 10 nM, serait 3 fois plus marquée, avec une diminution de 61% de la population en 15 jours.

La phase de croissance est d'autant plus longue que l'ajout est faible, jusqu'à un maximum de 60×10^4 cells mL⁻¹ au jour 24 en absence d'ajout. La phase sénescence serait d'autant plus tardive et intense que l'ajout est fort, jusqu'à 61% de perte de cellules entre le jour 24 et 39 lors d'ajouts de 10 nM. Une reprise de la croissance (jour 17 et 20) peut avoir lieu lorsque des ajouts en fer ont eu lieu, lors de cette phase de déclin. Comment cette stimulation de la population en absence d'ajout se traduit-elle sur le processus de croissance ?

b. Le taux de croissance des cellules (μ)

Dans un premier temps, seront analysées les tendances du taux de croissance instantané (μ) communes à tous les ajouts. Ces tendances permettent de définir des phases dans l'évolution de μ . Puis seront décrits les effets des ajouts sur le taux de croissance durant chacune des phases.

Les tendances du taux de croissance instantané sont communes à tous les ajouts. L'évolution dans le temps de μ est très irrégulière mais montre toutefois une diminution générale quels que soient les ajouts. Tous les ajouts confondus, la croissance montre trois phases (Fig. 2.6b). (i) Une première phase durant les 4 premiers jours⁽⁵⁾, correspondant au début de la phase de croissance, où celle-ci est maximale avec des valeurs entre 0.6 et 1 jour⁻¹. (ii) Une deuxième phase entre les

⁵ : Le taux de croissance initial (au jour 0) ne sera pas décrit car il est basé sur une estimation de la population des cellules inoculées lors de la dilution de la solution mère dans les batches (1mL d'une concentration de 50×10^4 cells mL⁻¹ dans 30 mL, soit une concentration de 0.4×10^4 cells mL⁻¹ ; cf. §IB3).

jours 4 et 12, correspondant à la fin de la phase de croissance, où μ diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur proche de 0 au jour 12. (iii) Une troisième phase entre les jours 12 et 24, où μ oscille autour de 0. Afin de pouvoir comparer l'effet des différents ajouts sur l'évolution très irrégulière du taux de croissance instantanée, l'évolution de μ est séparée selon ces trois phases : du jour 2 à 4, 4 à 12 et 12 à 24.

Effets des ajouts sur le taux de croissance à chaque phase de croissance

Entre les jours 2 et 4, le taux de croissance augmente avec l'intensité de l'ajout. Un taux de croissance moyen au début de la phase de croissance est évalué à partir du calcul de la moyenne de μ associé aux jours 2 et 4. Ce taux de croissance moyen, d'une valeur minimale de 0.36 jour⁻¹ en absence d'ajout, augmente d'un facteur entre 1.9 et 2.2 lorsqu'un ajout est effectué (Fig. 2.6c). De plus, le taux de croissance moyen, de 0.68 jour⁻¹ lors d'ajout de 1 nM, augmente de 6% et 15% lorsque l'ajout est respectivement de 5 et 10 nM.

Entre les jours 4 et 12, μ à partir du jour 4 et durant le reste de la phase de croissance diminue et atteint des valeurs proches de 0 jour⁻¹ au jour 12, et cela quel que soit l'ajout. La diminution de μ , d'une valeur minimale de 0.32 /jour en absence d'ajout, double lorsque un ajout est effectué. De plus la diminution de μ serait d'autant plus forte que l'ajout est fort. Ainsi, la diminution de μ , de 0.57 jour⁻¹ lors d'ajout de 1 nM, est 14% et 39% plus intense lors d'ajout respectivement de 5 et 10 nM. Durant cette phase de diminution d'une durée de 8 jours, la vitesse de diminution a donc été maximale lors d'ajout de 10 nM, avec une valeur de 0.09 jour⁻². Cette vitesse diminue de 11%, 22% et 56% lors respectivement d'ajout de 5, 1 nM et en absence d'ajout.

Entre les jours 12 et 24, le taux de croissance entre les jours 12 et 24, à l'opposé du taux de croissance moyen du début de la phase de croissance (du jour 2 à 4), est maximal en absence d'ajout. Le taux de croissance moyen de cette période est évalué de la même façon que durant le début de la phase de croissance, mais ici seront uniquement considérés pour le calcul, les taux de croissance instantanés des jours 12 à 24. Le taux de croissance moyen, de 0.15 jour⁻¹ en absence d'ajout, est seul positif comparé aux autres ajouts. Malgré les différences d'évolution de la population de cellules entre les jours 12 et 39 avec des ajouts (Fig. 2.6a, §IIB1a), le taux de croissance moyen entre les jours 12 et 24 varie relativement peu (entre -0.02 et -0.04 jour⁻¹) avec l'intensité des ajouts.

La population maximale de cellules est d'autant plus forte et intervient d'autant plus tardivement que l'ajout est faible. Malgré cette stimulation aux faibles ajouts, la population de cellules durant la phase de croissance exponentielle (jour 0 à 12) augmente d'autant plus fortement que l'ajout est fort. Cette augmentation est associée à un taux de croissance entre les jours 2 et 4 stimulé de 50% par l'ajout initial de fer, jusqu'à une valeur de 0.7 jour⁻¹ pour des ajouts de 10 nM. Au-delà de cette période initiale, le taux de croissance diminue rapidement jusqu'à être proche de zéro le jour 12.

2. Evolution de la population de coccolithes libres et du processus de détachement en fonction des différents ajouts

a. La population de coccolithes libres (Fig. 2.7a)

De manière générale la quantité de coccolithes /mL croît au cours du temps de façon continue et concomitante quel que soit l'ajout, du début jusqu'à la fin de l'expérience. Toutefois, entre les jours 12 et 24, il existe une différence significative entre les ajouts. L'effet des différents

ajouts sur l'évolution de la concentration de coccolithes libres sera donc décrit en distinguant trois périodes : du jour 4 à 12⁽⁶⁾, du jour 12 à 24 et du jour 24 à la fin (jour 39).

La population de coccolithes libres /mL augmente mais différemment selon les périodes.

Entre les jours 4 et 12, l'évolution du nombre de coccolithes libres /mL, comme le nombre de cellules /mL (Fig. 2.6a), est similaire quel que soit l'ajout initial de Fe(III)⁷. Leur nombre, de $10 \pm 3 \times 10^4$ coccolithes libres mL⁻¹ au jour 4, augmente d'un facteur 45 au jour 12. Ceci correspond à une augmentation de 54 coccolithes libres mL⁻¹jour⁻¹. Cependant, durant cette période, la moyenne du nombre de coccolithes libres /mL est d'autant plus forte que l'ajout est faible. Par exemple, d'un maximum de 219×10^4 coccolithes libres mL⁻¹ en absence et lors d'ajout de 1 nM, la moyenne est 44% plus importante que lors d'ajouts de 10 nM.

Entre les jours 12 et 24, l'augmentation du nombre de coccolithes libres /mL se poursuit, quel que soit l'ajout. Cette augmentation, de 65 coccolithes libres mL⁻¹ jour⁻¹, correspond à un triplement du nombre de coccolithes libres /mL en 12 jours, qui atteint une concentration moyenne de $1230 \pm 80 \times 10^4$ au jour 24. Cette augmentation est 20% supérieure à celle observée lors de la première période. Durant cette deuxième période, la moyenne du nombre de coccolithes libres /mL est différente suivant les ajouts. La moyenne, de $618 \pm 15 \times 10^4$ coccolithes libres mL⁻¹, est minimale lors d'ajouts de 5 et 10 nM. Par contre, la moyenne du nombre de coccolithes libres /mL est 50% plus forte en absence et lors d'ajout faible. Cependant une stagnation du nombre de coccolithes libres /mL entre le jour 15 et 17 pour tous les ajouts confondus, est observée entre 830 et 485×10^4 coccolithes libres mL⁻¹ lorsque les ajouts augmentent de 0 à 10 nM.

Entre les jours 24 à 39, le nombre moyen de coccolithes libres /mL est de $1150 \pm 200 \times 10^4$ au jour 24, et augmente jusqu'au jour 39 quel que soit l'ajout. La concentration moyenne au jour 39, tous ajouts confondus, est de $1830 \pm 700 \times 10^4$ coccolithes libres mL⁻¹. Cette augmentation moyenne de 55% de la population de coccolithes en 15 jours, correspond à 43×10^4 coccolithes libres mL⁻¹ jour⁻¹ et est 20% inférieure à celle observée durant la première période. L'augmentation, entre les jours 24 et 39, est d'autant plus intense que l'ajout est faible. L'augmentation du nombre de coccolithes libres /mL est en effet d'un facteur 2.5 et 1.5 plus intense lors d'ajout de 1 nM et en absence d'ajout que lors d'ajout de 10 nM. Par contre, lors d'ajout de 5 nM, l'augmentation n'est que de 150×10^4 coccolithes mL⁻¹, soit 3 fois plus faible que lors d'ajout de 10 nM.

L'évolution de la concentration de coccolithes /mL augmente tout le long de l'expérience contrairement à la population de cellules. De la même façon que la population de cellules, le maximum serait atteint en absence d'ajout, avec une valeur de 2500×10^4 coccolithes mL⁻¹ au jour 39, de 20% à 100% plus intense que lors d'ajout de fer initial. Les deux grandeurs, la population de cellules et celle de coccolithes libres, étant stimulées par l'absence d'ajout, comment se comporte le rapport des deux, définissant le nombre de coccolithes/cell ?

b. Le rapport coccolithes/cell (Fig. 2.7b)

Cette évolution correspond à une augmentation progressive du début (jour 0) jusqu'à la fin de l'expérience (jour 39) pour tous les ajouts. Cette augmentation est d'autant plus intense que l'ajout initial de fer est fort. Ainsi, en considérant une augmentation linéaire du jour 4⁽⁷⁾ au jour

⁶ : La quantité de coccolithes/mL au jour 0, de même que la quantité de cellules /mL, ne sera pas prise en compte dans la description car elle est basée sur une estimation de la population des coccolithes libres inoculées lors de la dilution de la solution mère dans les batchs (1 mL d'une concentration de 200×10^4 coccolithes libres mL⁻¹ dans 50 mL, soit une concentration de 0.4×10^4 cells mL⁻¹ ; cf. §IB3).

⁷ : Voir note de bas de page précédente.

39, le taux d'augmentation de la quantité de coccolithes libres /cell est maximal et de 3.11 coccolithes libres mL⁻¹ jour⁻¹, lors d'ajout de 10 nM. Ce taux d'augmentation est respectivement 46%, 77% et 70% supérieur à ceux obtenus lors d'ajouts de 5, de 1 nM et sans ajout.

Les effets des ajouts sur la quantité de coccolithes libres /cell sont différents selon la période (définie au §IIB2a)

Entre les jours 4 et 12, le nombre de coccolithes libres /cell, de même que le nombre de coccolithes libres /mL (Fig. 2.7a ; §IIB2a), est d'autant plus élevé que l'ajout est faible. La moyenne du nombre de coccolithes libres /cell, maximale et de 11.76 en absence d'ajout, est 87% supérieure que lors d'ajout de 10 nM. Mais, cette augmentation observée avec la diminution de l'ajout, est 3 fois plus importante que celle de la moyenne du nombre de coccolithes libres /mL (§IIB2a).

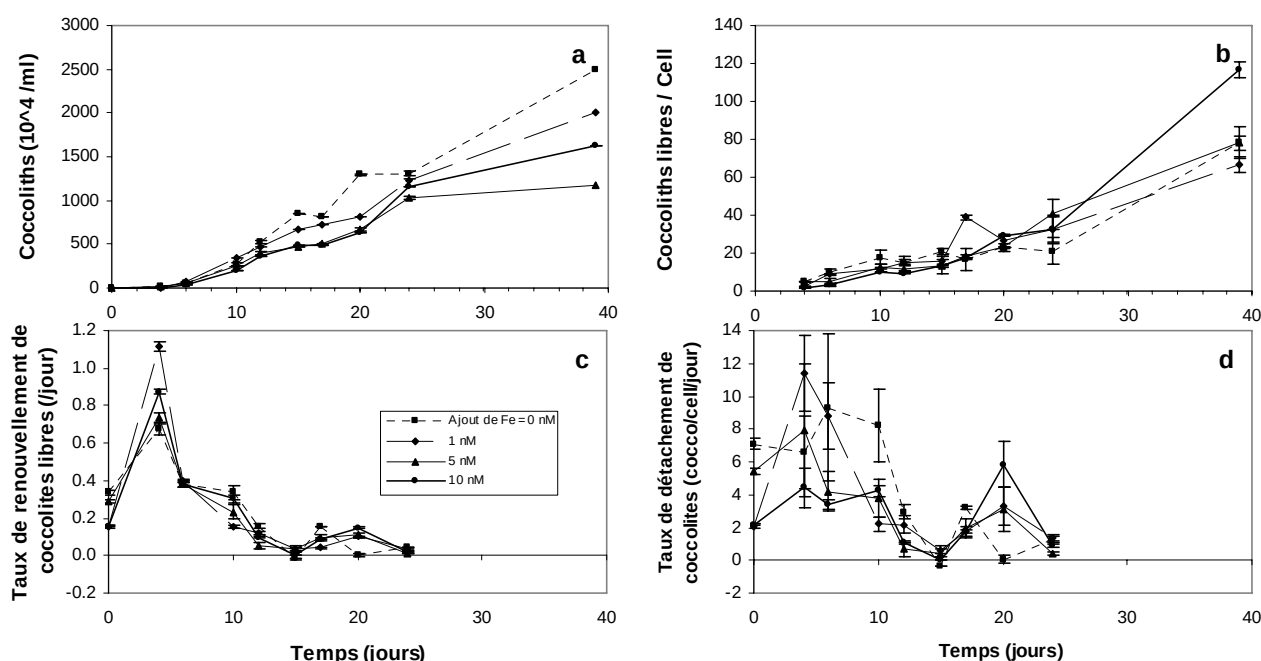


Figure 2.7 : Population et processus de détachement des coccolithes dans les différentes conditions de fer.

Evolution au cours du temps entre le jour initial (jour 0) et le dernier jour de l'expérience (jour 39), pour chacune des conditions de fer III ajouté initialement dans les différents batchs (0, 1, 5 et 10 ou 20 nM) : du nombre de coccolithes libres par unité de volume de culture (coccolithes libres/mL -a), du rapport de coccolithes libres par cellule (coccolithes libres/cell -b), du taux de détachement des coccolithes (D -c) et du taux de renouvellement des coccolithes libres (R -d). Le nombre de coccolithes par unité de volume est mesuré par comptage à l'aide d'un microscope optique (cf. stratégie). Le nombre de coccolithes par cellule est issu du rapport entre le nombre de coccolithes (Fig. 2.7a) et le nombre de cellules (Fig. 2.6a) par unité de volume (cf. stratégie). Le taux de détachement des coccolithes est issu du calcul utilisant les concentrations de coccolithes (Fig. 2.7a) et de cellules (Fig. 2.6a) par unité de volume (cf. stratégie). Le taux de renouvellement des coccolithes libres est issu du calcul utilisant les concentrations de coccolithes (Fig. 2.7a) par unité de volume (cf. stratégie).

Entre les jours 12 et 24, l'augmentation du nombre de coccolithes libres /cell, au contraire de la première phase, est similaire lors des différents ajouts. Leur moyenne entre le jour 12 et 24, maximale et de 28.45 coccolithes libres cell⁻¹, lors d'ajout de 1 nM, est entre 20% et 38% supérieure à celle observée dans les autres intensités d'ajouts. Cette différence significative pourrait être due au nombre important de 39 coccolithes libres cell⁻¹ au jour 17 lors d'ajout de 1 nM. En excluant ce fort nombre de coccolithes libres /cell, leur moyenne lors d'ajouts faibles diminue de 12% et est similaire, à 10% près, pour tous les ajouts (21.6 ± 5 coccolithes libres cell⁻¹). Cette moyenne est un facteur 2.4 supérieur à celle lors de la première période (entre les jours 4 et 12).

Au dernier jour de l'expérience (jour 39), le nombre de coccolithes libres /cell est, contrairement à la première période, maximum et de 116.43 coccolithes libres cell⁻¹ lors d'ajout fort (10 nM), et 2 fois supérieur par rapport au faible ajout. Le dernier jour, le nombre de

coccolithes libres /cell moyen tous ajouts confondus, est le plus élevé de toute l'expérience et un facteur 10 supérieur à celui de la première période.

A la différence du nombre de coccolithes libres /mL, l'augmentation tout le long de l'expérience du nombre de coccolithes libres /cell et son maximum atteint au jour 39, de 120 coccolithes cell⁻¹, sont 50% plus intenses lors d'ajout fort. Comment cette stimulation se traduit-elle pour son processus de production, le détachement ? Est-il inhibé aux faibles ajouts au début de l'expérience, comme le taux de croissance ?

c. Le taux de détachement des coccolithes (D ; Fig. 2.7c)

Quelle que soit l'intensité de l'ajout, le taux de détachement présente deux maxima : le plus intense entre les jours 4 et 10, d'une intensité entre 4.4 et 11.4 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹, et le maximum secondaire entre les jours 17 et 20, d'une intensité de 70% plus faible à 30% plus fort que le maximum principal. L'intensité du maximum primaire est d'autant plus forte que l'ajout est faible, alors que celle du maximum secondaire est à l'inverse d'autant plus forte que l'ajout est fort.

Les phases du taux de détachement de coccolithes sont communes à tous les ajouts.

Les maxima permettent de définir deux phases de détachement des coccolithes, entre les jours 0 et 10 puis entre les jours 17 et 20. Ces deux phases sont séparées par le jour 15, durant lequel le détachement présente une valeur nulle. **(i)** Durant la première période, allant du jour 0 à 10, D est maximal, avec des valeurs allant de 2.1 à 11.4 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ ; et il diminue à partir du jour 10 et devient nul au jour 15. **(ii)** Un détachement nul au jour 15, s'accorde avec la stagnation du nombre de coccolithes libres /mL et / cell, observée au jour 15, quel que soit l'ajout (Fig. 2.7a et 7b, §IIB2a et b). **(iii)** Durant la deuxième phase, D est de nouveau positif, et présente des valeurs entre 0 et 5.9 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹. **(iv)** Le jour 24, D est de nouveau, comme au jour 15, proche d'une valeur nulle.

La valeur moyenne de D, de 4.9 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ lors de la première phase est 86% plus forte que lors de la deuxième phase.

L'effet des ajouts sur le taux de détachement n'est pas le même suivant la phase

Afin de pouvoir comparer l'effet des différents ajouts sur l'évolution du taux de détachement, l'évolution de D est séparée selon ces 2 phases : du jour 0 à 10 et 17 à 20⁽⁸⁾. Entre les jours 0 et 10, le taux de détachement est d'autant plus faible que l'ajout est fort. Sa valeur moyenne durant cette période, de 7.8 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ en absence d'ajout, diminue respectivement, de 22%, 32% et 55% lorsque l'ajout augmente (de 1, 5 et 10 nM). Entre les jours 17 et 20, le taux de détachement augmente avec l'ajout initial. Cette situation est contraire à celle obtenue lors de la première phase. La moyenne de D, de 3.82 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ lors d'ajout de 10 nM, est d'un facteur 2.3 supérieure comparée à celle en absence d'ajout.

Le taux de détachement présente la même tendance au cours du temps que le taux de croissance, avec un maximum dans la phase exponentielle de croissance (entre 0 et 10-12 jours), de 7.8 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ en l'absence d'ajout. Mais contrairement au taux de croissance, le taux de détachement lors de cette phase est jusqu'à 50% plus important lors d'ajout faible. Le taux de détachement présente un deuxième maximum secondaire au jour 17 qui est cette fois maximum lors d'ajout fort. Le renouvellement de coccolithes libres est un processus équivalent au taux de croissance, mais pour les coccolithes, il est un paramètre de

⁸ : Le taux de détachement initial de coccolithes (au jour 0) est utilisé dans la description (§IIB2c). Mais il doit être considéré avec précaution car ce taux au jour 0 est basé sur une estimation de la population des cellules et des coccolithes libres inoculés lors de la dilution de la solution mère dans les batchs (cf. §IC3).

la variation du nombre de coccolithes libres plus facile à mettre en relation avec le taux de croissance.

d. Le taux de renouvellement des coccolithes libres (R ; Fig. 2.7d)

Le taux de renouvellement de coccolithes libres, de même que le taux détachement (Fig. 2.7c ; §IIB2c), présente deux maxima quelle que soit l'intensité de l'ajout : un principal au jour 4, d'une intensité entre 0.67 et 1.11 jour⁻¹, et un secondaire entre les jours 17 et 20, d'une intensité 85% plus faible que le premier maximum. Par contre, l'intensité des maxima ne présente pas de tendance avec l'intensité de l'ajout. Ces deux maxima présentent deux phases (entre les jours 4⁽⁹⁾ et 15 et entre les jours 15 et 24), également entrecoupées au jour 15 par un épisode où R atteint une valeur nulle, de façon similaire au taux de détachement. Entre les jours 4 et 15, le taux de renouvellement diminue de façon similaire quel que soit l'ajout. La moyenne du taux de renouvellement, diminue à partir de 0.85 ± 0.2 jour⁻¹ au jour 4, et devient nulle au jour 15. Toutefois, au jour 4, R est maximal et de 1.11 jour⁻¹ lors d'ajout faible de 1 nM. Ce maximum est 66% supérieur significativement par rapport à l'expérience en absence d'ajout. Entre les jours 15 et 24, la moyenne du taux de renouvellement de coccolithes libres devient à nouveau positive, mais reste à des valeurs faibles de 0.075 ± 0.015 jour⁻¹ quelle que soit l'intensité de l'ajout et 5.5 inférieure à celle de la première période (tous ajouts confondus).

Le taux de renouvellement, de même que le taux de détachement et le taux de croissance, diminue au cours du temps et présente un deuxième maximum au jour 17. Par contre, le taux de renouvellement montre peu de variation avec l'intensité des ajouts.

Le nombre de coccolithes libres /mL et /cell augmente au cours du temps en deux phases entrecoupées d'une phase de stagnation au jour 15 quel que soit l'ajout. Les 10 premiers jours, l'augmentation de la quantité de coccolithes libres /mL et /cell, de même que le taux de détachement sont plus intenses en absence d'ajout. A partir du jour 15, l'effet des ajouts s'inverse, avec une augmentation de la quantité de coccolithes libres /cell et un taux de détachement plus intenses lors d'ajouts forts.

Les ajouts initiaux de fer ont un effet sur le développement de la population de cellules et également sur la stratégie de blooms visibles (coccolithes libres) d'*E. huxleyi*.

Les phases d'évolution de la population de cellules et de coccolithes sont différentes. La population de cellules montre trois phases de croissance : un démarrage (4 premiers jours), une apogée (jour 10 à 12) et un déclin (à partir du jour 12). Cette tendance est associée à un taux de croissance qui diminue progressivement jusqu'au jour 12. Par contre, la population de coccolithes /mL et /cell présente une augmentation tout au long de l'expérience, et quel que soit l'ajout. Cette augmentation est entrecoupée d'une phase de stagnation au jour 15 et par la présence de deux pics pour le taux de détachement et de renouvellement.

Les effets des différentes intensités d'ajout sur les processus de blooms visibles sont différents. En effet, ce sont les ajouts faibles qui stimuleraient la production de cellules et de coccolithes libres. La population maximale de cellules, de coccolithes libres /mL et /cell (seulement les 20 premiers jours), ainsi que la durée de la phase de croissance et le taux de détachement (les 10 premiers jours) sont 50% à un facteur 2 plus intenses aux faibles qu'aux forts ajouts. Par contre, les forts ajouts stimulent le taux de croissance du début (jour 2 à 4) d'un facteur 2, mais provoqueraient également une mortalité au milieu du bloom (jour 15) et

⁹ : Le taux de renouvellement initial de coccolithes (au jour 0) n'est pas utilisé dans la description car il est basé sur une estimation de la population des coccolithes libres inoculés lors de la dilution de la solution mère dans les batchs alors que les autres valeurs ont été mesurées (cf. §IC3).

éventuellement une reprise de la croissance de la population au jour 20. Les ajouts forts stimulent de moitié la quantité de coccolithes libres /cell (mais uniquement à partir du jour 20) et également le taux de détachement entre les jours 17 et 20.

L'inhibition par l'intensité des ajouts du bloom visible (quantité de cellules et de coccolithes libres) est-elle accompagnée ou non d'un effet sur les réservoirs de carbone organique et inorganique ?

C. Effets des ajouts sur l'évolution dans le temps des quantités de Carbone et de la taille

D'autres grandeurs qui peuvent caractériser un bloom (cf. Chap. 4 ; §II) sont la quantité de PIC par cellule, la taille et la quantité de coccolithes attachés par cellule, la quantité de PIC et la taille par coccolithe. Parmi ces paramètres, seules la taille et la quantité de PIC des cellules avaient été étudiées précédemment en fonction de différentes concentrations en fer. Les résultats montrent une contradiction (Tab. 1.2, Chap. 1, §IIE). Le PIC /cell serait soit inhibé lorsque le Fe' est faible ($Fe_{ed} < 0.8 nM$ avec EDTA ; Muggli et Harrison, 1996a), soit constant (Schulz *et al.* 2004). Nos résultats permettront de discuter de l'effet de toutes les formes de fer sur le réservoir inorganique d'*E. huxleyi* dans des conditions sans EDTA et d'essayer de comprendre cette contradiction. Les résultats de nos expériences dans le particulier en terme de carbone par mL et par cellule (1. organique et 2. inorganique), de taille des coccosphères (3a. en diamètre et en nombre de coccolithes attachés) et de degré de calcification des coccolithes (3b. en taille et en PIC), seront décrits en fonction de l'intensité des différents ajouts.

1. Evolution du POC (Tab. 2.2)

Chaque jour d'échantillonnage (Jour 10, 20 et 39) représente une phase de croissance particulière : phase exponentielle, stationnaire ou sénescence et enfin sénescence ; les effets des différents ajouts seront décrits en considérant chaque jour indépendamment. L'évolution de la quantité de POC pour chaque batch est ensuite détaillée.

Effets de l'intensité des ajouts sur le POC pour chaque jour d'échantillonnage

Au jour 10 et 39, les POC /cell et /mL, diminuent lorsque l'ajout augmente ; alors qu'au contraire ils augmentent avec l'ajout au jour 20.

Au jour 10, les POC /cell et /mL, de $28.5 \text{ pg cell}^{-1}$ et $4.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en absence d'ajout, sont les plus intenses. Le POC /cell diminue de 30% et 43% lors d'ajouts de 5 et 10 nM. Ces diminutions sont 3 et 1.4 fois moins intenses pour le POC /mL. Par contre, les deux types de POC (/cell et /mL) sont 73% et 50% plus faibles lors d'ajouts de 1 nM par rapport à des conditions en absence d'ajout.

Au jour 20, les POC /cell et /mL, de $12.55 \text{ pg cell}^{-1}$ et $2.76 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, sont au contraire les plus forts lors de l'ajout de 20 nM. Le POC /cell diminue de 35% lors d'ajouts de 5 nM, mais d'un facteur 8.5 et 26 lors d'ajouts faibles et sans ajout. Ces diminutions sont respectivement d'un facteur 2.3, 1.4 et 2.6 moins intenses pour le POC /mL. Ainsi, les valeurs de POC /cell et /mL au jour 20 peuvent se séparer en 2 groupes : (i) les forts ajouts (5 et 20 nM), pour lesquels les POC /cell et /mL sont en moyenne de $10.4 \pm 3 \text{ pg cell}^{-1}$ et $2.5 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ et (ii) les faibles ajouts (0 et 1 nM), pour lesquels ils sont 10 et 7 fois inférieurs.

Au jour 39, des valeurs de POC /cell et /mL existent uniquement lors de faibles ajouts et sans ajouts (Fig. 2.1 ; §ICg). Les POC /cell et /mL de $19.52 \text{ pg cell}^{-1}$ et $6.25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en absence d'ajout, diminuent de 54% et 57% lors d'ajouts de 1 nM.

Tableau 2.2 : Quantité de Carbone organique et inorganique dans les différentes conditions d'ajout de fer.

Concentration en carbone total (mesuré par CHN, cf. §IC3), inorganique (à partir du Calcium par ICP-MS, cf. §IC3) et organique (calculé par différence des deux autres carbone, cf. §IC4), associé à la concentration de cellules (issue de la figure 2.6a) et de coccolithes attachés (calculé à partir des images SEM, Fig. 2.8).

Jour Expérience	Fe Ajout nM	Cellules x10 ⁴ /ml	SD	PIC Total µg /ml	SD	PIC Cellule pg /cell	SD	PIC Cocco pg /cocco	SD	TPC Total µg /ml	SD	POC Total µg /ml	SD	POC Cellule pg/cell	SD	PIC/POC Total mol /mol	SD
10	0	15.7	2.6	<i>0.71</i>	-	<i>4.51</i>	-	<i>0.14</i>	-	5.17	<i>0.02</i>	<i>4.46</i>	-	<i>28.48</i>	-	<i>0.16</i>	-
	1	28.3	4.0	<i>1.11</i>	-	<i>3.91</i>	-	<i>0.14</i>	-	3.27	<i>0.01</i>	<i>2.16</i>	-	<i>7.63</i>	-	<i>0.51</i>	-
	5	20.0	3.0	<i>0.80</i>	-	<i>4.00</i>	-	<i>0.14</i>	-	4.77	<i>0.01</i>	<i>3.97</i>	-	<i>19.85</i>	-	<i>0.20</i>	-
	10	19.5	0.5	<i>0.63</i>	-	<i>3.24</i>	-	<i>0.14</i>	-	3.80	<i>0.01</i>	<i>3.17</i>	-	<i>16.25</i>	-	<i>0.20</i>	-
20	0	56	17.1	2.50	<i>0.1</i>	4.46	<i>1.6</i>	<i>0.12</i>	-	2.77	<i>0.01</i>	0.27	<i>0.1</i>	0.48	<i>0.4</i>	9.26	<i>3.80</i>
	1	31	8.6	1.92	<i>0.1</i>	6.26	<i>2.1</i>	<i>0.15</i>	-	2.37	<i>0.01</i>	0.45	<i>0.1</i>	1.47	<i>0.8</i>	4.27	<i>1.20</i>
	5	29	9.4	1.46	<i>0.1</i>	5.03	<i>2.0</i>	<i>0.13</i>	-	3.83	<i>0.01</i>	2.37	<i>0.1</i>	8.17	<i>3.0</i>	0.62	<i>0.07</i>
	20	22	5.0	1.61	<i>0.1</i>	7.32	<i>2.2</i>	<i>0.17</i>	-	4.37	<i>0.01</i>	2.76	<i>0.1</i>	12.55	<i>3.4</i>	0.58	<i>0.06</i>
39	0	32	-	<i>2.38</i>	-	<i>7.45</i>	-	<i>0.08</i>	-	8.63	<i>0.03</i>	<i>6.25</i>	<i>0.1</i>	<i>19.52</i>	-	<i>0.38</i>	-
	1	30	-	<i>1.73</i>	<i>0.1</i>	5.77	-	<i>0.07</i>	-	4.43	<i>0.01</i>	2.70	<i>0.1</i>	9.00	-	0.64	<i>0.06</i>
	5	15	-	<i>0.94</i>	<i>0.1</i>	6.27	-	<i>0.07</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	14	-	<i>1.59</i>	<i>0.1</i>	11.36	-	<i>0.09</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En gras : valeur de mesure

En italique : valeur estimée

Evolution du POC au cours du temps

Quel que soit l'ajout, le POC /cell, ainsi que le POC /mL mais de manière plus intense, diminuent entre le jour 10 et 20 et au contraire augmentent entre les jours 20 et 39.

Entre les jours 10 et 20, le POC /cell diminue de 23% et 59% lors d'ajouts forts et moyens et d'un facteur 5.2 et 59 lors, respectivement, d'ajouts faibles et sans ajout. Ces diminutions sont respectivement 44%, 32%, 8% et 72% moins intenses pour le POC /mL. Ainsi, cette diminution de POC /cell et /mL est d'autant plus intense que l'ajout est faible. En effet, les diminutions de POC /cell et /mL, de 23% et 13% et les moins intenses lors d'ajout fort, sont 4.3 fois et 7.2 plus intenses en absence d'ajout.

Entre les jours 20 et 39, le POC /cell augmente d'un facteur 40.7 et 6.1 en absence et lors d'ajout de 1 nM. Ces augmentations sont respectivement 43% et 2% moins intenses pour le POC /mL. Par conséquent, sur la durée totale de l'expérience, entre les jours 10 et 39, le POC /cell diminue au total de 32% en absence d'ajout et augmente au total de 18% lors d'ajout de 1 nM. Par contre, le POC /mL augmente, dans les mêmes conditions d'ajout, respectivement de 40% et 25%.

Les très faibles valeurs de POC enregistrées (<1 pg cell⁻¹) au jour 20, en absence et lors d'ajout faible de 1 nM, pourraient être dues au fait que ces échantillons en particulier n'ont pas été séchés lors du conditionnement. Cela a pu entraîner une dégradation de la matière organique lors du stockage d'environ 8 mois avant analyse (transport d'Angleterre en France pour analyse). Pour cette raison, ces valeurs seront à considérer avec précaution dans la suite de la discussion.

Le POC serait produit durant la phase exponentielle de croissance (10 premiers jours). Entre les phases exponentielle et sénescence, la quantité de POC /cell et de POC /mL diminuent, mais moins significativement, de plus de 20%. Le POC /cell est de 50% plus faible à faible ajout à l'issue de la phase de croissance exponentielle, alors qu'elle est maximum et de 29 pg/cell en absence d'ajout. De quelle variation du PIC durant les phases de croissance et en fonction des ajouts, l'inhibition de POC à faible ajout, est-elle accompagnée ?

2. Evolution du PIC (Tab. 2.2)

De même que pour le POC, l'effet des ajouts en fer sur le PIC est décrit selon les différents jours d'échantillonnage, puis l'évolution au cours du temps pour chaque ajout est détaillée.

Effets de l'intensité des ajouts sur le PIC pour chaque jour d'échantillonnage

Le PIC /mL diminue lorsque l'ajout augmente quel que soit le jour. De la même façon, le PIC /cell diminue lorsque l'ajout augmente, mais seulement au jour 10 ; les autres jours, ce PIC suit une tendance inverse à celle du PIC /mL en augmentant avec l'ajout. Par contre, le PIC /POC au jour 10 ne dépend pas de l'ajout et le jour 20, il diminue avec l'ajout qui s'intensifie ; ce qui est contraire à la réponse du PIC /cell au même jour.

Au jour 10, le PIC /cell et /mL, de même que le POC /cell et /mL (§IIC1a), diminue lorsque l'ajout augmente. Le PIC /cell est maximal, de $4.51 \text{ pg cell}^{-1}$, en absence d'ajout ; alors que le PIC /mL, de $1.11 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, est maximal lors d'ajout de 1 nM. Par rapport à ce maximum, le PIC /cell diminue de 13%, 11% et 28% lors d'ajouts de 1, 5 et 10 nM ; alors que le PIC /mL diminue de respectivement 36%, 28% et 43% en absence et lors d'ajouts de 5 et 10 nM. Alors que le PIC /cell varierait de manière significative avec les ajouts autour d'une valeur moyenne de $3.9 \pm 0.6 \text{ pg cell}^{-1}$, le PIC /POC reste constant quel que soit l'ajout (hormis lors d'ajout faible), avec une valeur moyenne de $0.18 \pm 0.02 \text{ mol/mol}$. Cette homogénéité du PIC/POC pourrait être associée au POC (Tab. 2.2, §IIC1a) et PIC /mL qui suivent tous les deux une diminution similaire avec l'augmentation de l'ajout. Le fort rapport PIC/POC lors d'ajout faible (2.5 fois supérieure à celle observée lors des autres ajouts ; Tab. 2), pourrait être associé à un POC /mL minimal (45% inférieur qu'aux ajouts supérieurs à 1 nM ; Tab. 2.2, §IIC1a), simultanément à un PIC /mL maximal (55% supérieur lors d'autres ajouts ; Tab. 2.2).

Au jour 20, le PIC /cell, au contraire du PIC /mL, mais de la même façon que le POC /cell et /mL (§IIC1a), augmente avec l'ajout. Ainsi, le PIC /cell, de $7.32 \text{ pg cell}^{-1}$, est maximal lors d'ajout de 20 nM ; alors que le PIC /mL, de $2.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, l'est en absence d'ajout. Par rapport à ce maximum, le PIC /cell diminue de 31%, 14% et 39% lors d'ajouts de 5, 20 nM et sans ajout ; alors que le PIC /mL diminue de respectivement 23%, 42% et 36% lors d'ajouts de 1, 5 et 20 nM. Le PIC /POC, au contraire du PIC /cell, diminue lorsque l'ajout augmente. Le PIC /POC, de $9.26 \text{ mol mol}^{-1}$ et le plus fort en absence d'ajout, diminue d'un facteur 2.2, 15 et 16 lors d'ajouts de 1, 5 et 20 nM. Cette différence de PIC/POC importante (facteur 15) entre les différents ajouts serait due à une quantité anormalement faible de POC /cell en absence et lors d'ajout de 1 nM (10 fois inférieure par rapport aux ajouts de 5 et 20 nM ; §IIC1a).

Au jour 39, le PIC /cell, au contraire du PIC /mL, augmente avec l'ajout. Ainsi, le PIC /cell, de $11.36 \text{ pg cell}^{-1}$ est maximal lors d'ajouts de 10 nM ; alors que le PIC /mL, de $2.38 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ est maximal en absence d'ajout. Par rapport à ce maximum, le PIC /cell diminue de 45%, 61% et 34% lors d'ajouts de 5, 1 nM et en absence d'ajout ; alors que le PIC /mL, diminue de 27%, 61% et 33% lors d'ajouts de 1, 5 et 10 nM. Le PIC /POC, au contraire du PIC /cell, de $0.64 \text{ mol mol}^{-1}$ et maximal lors d'ajouts de 1 nM, diminue d'un facteur 1.7 en absence d'ajout.

Evolution du PIC au cours du temps

Hormis en absence d'ajout, où le PIC /cell reste constant, entre les jours 10 et 20, le PIC /cell, /mL et /POC augmentent, pour tous les ajouts. Entre les jours 20 et 39, le PIC /cell augmente pour tous les ajouts, sauf lors d'ajout faible où il reste constant. Mais au contraire, entre les jours 20 et 39, le PIC /mL et /POC diminuent, sauf le PIC /mL qui reste constant lors d'ajouts forts.

Entre les jours 10 et 20, l'augmentation du PIC /mL, d'un facteur 3.5 est maximale en absence d'ajout et son intensité diminue lorsque l'ajout augmente : de 50% lors d'ajouts de 1 et 5 nM et de 30% lors d'ajouts forts (10 et 20 nM). L'augmentation en terme de PIC /cell est moins intense de 10% à 30% par rapport au PIC /mL et maximale lors d'ajouts forts, avec un facteur 2.3, et moins intense de 44% et 29% lors d'ajouts de 5 et 1 nM.

Entre les jours 20 et 39, la diminution de PIC/mL, de 36% est maximale lors d'ajouts de 5 nM et son intensité diminue lorsque l'ajout diminue : d'un facteur 3.6 lors d'ajouts de 1 nM et 7.2 en absence d'ajout. Hormis lors d'une absence d'ajout, la variation de PIC/cell, augmente de 67%, et est maximale en absence d'ajout, et moins intense de 25% et 7% lors d'ajouts moyens et forts. *La diminution du PIC /mL entre les jours 20 et 39 pourrait représenter une dissolution du stock de PIC dans les batchs. En conséquence, les valeurs de PIC /mL sont à considérer avec précaution lors des interprétations (§IIIB2c).*

Le PIC/POC, augmente entre le jour 10 et 20, quel que soit l'ajout. Cette augmentation avec une différence de $9.26 \text{ mol mol}^{-1}$ et maximale en absence d'ajout, est plus faible d'un facteur 24 (ajout fort) lorsque l'ajout augmente. Lors d'ajouts faibles et en absence d'ajout, PIC/POC diminue entre les jours 20 et 39, d'un facteur 7 et 24, soit au total entre les jours 10 et 39, le PIC/POC augmente respectivement d'un facteur 1.25 et 2.4.

A la différence de la quantité de POC, la quantité de PIC /cell et /mL serait produite par les cellules durant les 20 premiers jours, marquant une accumulation de PIC /mL dans les batchs et également par cellule. La diminution de PIC /mL au jour 39 peut signifier une dissolution du PIC par rapport au jour 20. A l'issue de la phase de croissance, au contraire de la quantité de POC /cell, la quantité de PIC /cell est maximale à faible ajout et minimale en absence d'ajout. Cet antagonisme du PIC et du POC se traduit par un PIC/POC à l'issue de la phase de croissance de 0.6 et maximal lors d'ajout faible, et d'un facteur 5 plus intense qu'en absence d'ajout. Comment cette disparité entre PIC et POC /cell se traduit-elle sur l'aspect de la coccosphère ?

3. Evolution de la coccosphère et des coccolithes (Fig. 2.8 et Tab. 2.2)

a. Effets des ajouts sur la coccosphère

La taille de la coccosphère au jour 10, mesurée au SEM, varie relativement peu en diamètre avec les ajouts (Fig. 2.8). La moyenne du diamètre est de $6.3 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$; mais, elle varie de façon importante, de plus de 50%, au sein d'un même batch (même condition d'ajout). Par contre, le diamètre moyen des coccosphères ayant reçu différents ajouts de fer (0 à 10 nM) et des ajouts de NO_3 de $44 \text{ }\mu\text{M}$ est 20 % plus faible que celui des coccosphères ayant reçu des ajouts en NO_3 de seulement $2 \text{ }\mu\text{M}$ (cf. Chap. 3, §IIIB2a , Fig. 3.8e). Cette faible influence de l'ajout de fer sur la taille de la coccosphère est également notée lors de l'estimation de la taille des cellules au microscope optique tout au long de l'expérience ; données non montrées)

Le nombre de coccolithes attachés est indépendant de l'ajout en fer. Au jour 10, le nombre de coccolithes attachés par cellule est en moyenne de 15 ± 2 quel que soit l'ajout (Fig. 2.8). Lors de forts ajouts de fer, leur nombre de coccolithes attachés est 15% plus faible que la moyenne de coccolithes attachés par cellule. Le nombre de coccolithes attachés /cell varie beaucoup plus avec les NO_3 qu'avec le fer. Lors de concentrations initiales de NO_3 de seulement $2 \text{ }\mu\text{M}$, le nombre de coccolithes attachés /cell est de 50% à 100% supérieur à la moyenne lors des expériences d'ajout de fer (cf. Chap. 3, §IIIB2b, Fig. 3.8).

Les ajouts en fer montrent peu d'effets notables sur la taille des coccosphères, ainsi que sur le nombre de coccolithes attachés.

b. Effets des ajouts sur les coccolithes

Le degré de calcification des coccolithes peut être représenté par la quantité de PIC /coccolithe (Tab. 2.2) et leur aspect (Fig. 2.8) donne une indication non quantitative indirecte de la calcification.

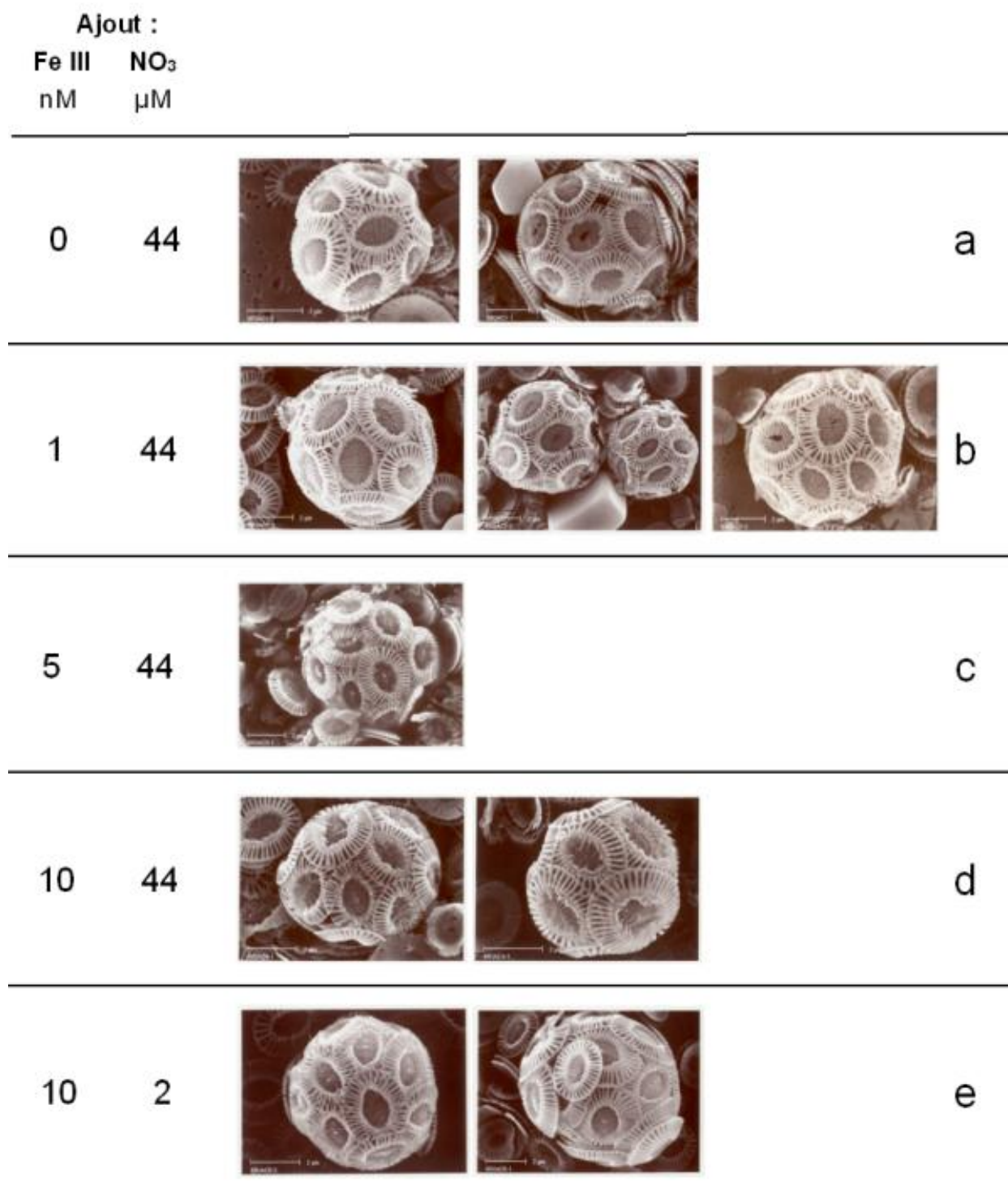


Figure 2.8 : Photos de coccophères au microscope électronique.

Photos des coccosphères prises au microscope électronique (SEM) au jour 10 dans un des batchs de chacune des différentes conditions d'ajouts de fer III : sans ajout (0 nM -a), faibles (1 nM -b), moyens (5 nM -c) et forts (10 nM -d et e) et les différentes conditions de NO₃ (44 μM pour -a, -b, -c et -d et 2 μM pour -e). Il n'est pas aisé de quantifier le nombre de coccolithes attachés, leur taille ainsi que leur degré de calcification en se basant sur quelques clichés de cellules prises au microscope. Il a fallu observer avec un soin minutieux pour choisir des cellules modèles représentatives de la population.

Le PIC /coccolithe n'est pas similaire suivant le jour d'échantillonnage. D'un côté, au jour 20, comme au jour 39, le PIC /coccolithe augmente avec l'ajout. D'un autre côté, au jour 20, il est minimal, de 0.12 pg cocco⁻¹ en absence d'ajout, et augmente de 25%, 8% et 42% lors d'ajouts de 1, 5 et 20 nM. Au jour 39, il est minimal, de 0.07 pg coccolithes⁻¹ lors d'ajouts de 1 et 5 nM, et

augmente de 29% lors d'ajout de 10 nM. Entre les jours 20 et 39, la diminution du PIC /coccolithe est de l'ordre de 50% quel que soit l'ajout initial de fer.

La taille et le degré de calcification des coccolithes, observés au jour 10, déduite de la quantité d'inner-éléments et du remplissage de la partie centrale du coccolithe (Vrind-de Jong *et al.*, 1994), est du même ordre de grandeur quel que soit l'ajout en fer (Fig. 2.8). Par contre, la taille des coccolithes est 20% plus faible, avec une partie centrale moins calcifiée, lors d'ajouts initiaux de NO_3 de $2\mu\text{M}$ (Fig. 2.8e). Cette observation suggère que de faibles NO_3 pourraient avoir un effet inhibant sur le degré de calcification des coccolithes (cf. Chap. 3, §IIC2) alors que ce n'est pas le cas pour le fer.

Les ajouts en fer auraient peu d'effet observable au microscope électronique sur la taille et le degré de calcification des coccolithes, au jour 10. Par contre, la quantité de PIC par coccolithe peut être stimulée de moitié lorsque l'ajout initial de fer augmente. Le PIC/coccolithe diminuerait de moitié durant la phase sénescence marquant une dissolution des coccolithes

Ces expériences suggèrent qu'il existe un effet notable des ajouts en fer sur les concentrations de POC et de PIC /cell et également sur leur évolution dans les différentes phases de croissance. Par contre, il y aurait peu d'effet sur la quantité de PIC attaché aux cellules et sur les coccolithes. A l'issue de la phase de croissance, le PIC est stimulé et le POC inhibé quand de faibles ajouts ont lieu par rapport à une absence d'ajout. Cette différence se traduit par un PIC/POC maximal à la fin de la phase de croissance et 3 fois plus élevé par rapport aux autres conditions de fer. Le POC /cell diminue au cours du temps, notamment entre les jours 10 et 20 (baisse de 33% à 59%) pour des ajouts de 5 et 10 nM. Au contraire, le PIC /cell augmente durant toute la durée de l'expérience d'un maximum de 4 pg cell^{-1} tous les 10 jours.

Les effets des ajouts sur le PIC /mL, suivent une tendance similaire à celles des coccolithes libres /mL, et sont d'autant plus intenses que l'ajout est faible, cela à tout instant. Même si la quantité de coccolithes libres augmente du début jusqu'à la fin de l'expérience, la concentration de PIC /mL, au contraire, diminue entre le jour 20 et 39. Cette diminution de PIC /mL, de 2% à 36%, se traduit par une baisse d'un facteur 2 de la quantité de PIC /coccolithe.

III. Discussion

Les résultats montrent un effet des 4 intensités des apports initiaux de fer (de 0 à 10 nM) sur les différents paramètres mesurés dans le dissous (spéciation de fer, §IIA) et le particulaire (quantité de cellules et de coccolithes libres - §IIB et quantité de POC et de PIC - §IIC). Les forts ajouts en fer III inhibent les blooms de cellules et de coccolithes d'*E. huxleyi*. Cette inhibition se produit, non seulement en terme de population de cellules (§IIB1a, Fig. 2.6a) et de coccolithes libres (§IIB2a et b, Fig. 2.7a et 2.7b), dont les concentrations sont respectivement réduites de 40% et de 30 % ; mais également en terme de processus de croissance (§IIB1b, Fig. 2.6b) et de détachement de coccolithes libres (§IIB2c, Fig. 2.7c), dont les intensités peuvent être réduites respectivement de 50% et 55%. Au contraire, l'augmentation des intensités des ajouts de fer stimulerait la quantité de PIC /cell (§IIC2, Tab. 2.2) et de coccolithes attachés (§IIC3, Tab. 2.2). L'augmentation de la concentration en Fed, entre le jour 0 et 10, est également d'autant plus intense que l'ajout est faible. Fed augmente de 0.07 nM lors d'ajouts de 10 nM et 10 fois moins en absence d'ajout (§IIA1a, Fig. 2.4a).

Comment ces inhibitions des blooms sont-elles expliquées par la spéciation et quelle est la stratégie employée par les cellules vis-à-vis des apports pour modifier cette spéciation. Les

effets de ces ajouts sur la population et les blooms visibles peuvent-ils être expliqués par l'une ou l'autre des formes de fer ou ces processus sont-ils liés entre eux par un simple couplage ?

Pour répondre à ces questions, la discussion sera abordée en trois parties :

A. Etude de l'effet de rétroaction des cellules sur la spéciation pour permettre de comprendre l'effet de ces ajouts sur la spéciation de fer. Cette étude se fait à la fois en terme de production de ligands (concentration et capacité de complexation), et aussi de contrôle de la spéciation par ces ligands.

B. Etude de l'effet des différentes formes de fer sur les différents réservoirs organiques et inorganiques, afin de comprendre par quel mécanisme de spéciation les apports en fer influencent les blooms d'*E. huxleyi*. La relation entre les grandeurs caractéristiques des blooms (population de cellules et de coccolithes libres et leur processus associé) et la spéciation du fer sera prise en compte.

C. Les grandeurs et les processus organiques et inorganiques seront mis en relation, afin de comprendre les modifications physiologiques engendrées lors de ces apports en fer.

A. Stratégie de production de ligands par *E. huxleyi* et effet de rétroaction des cellules sur la spéciation du fer (Fig. 2.9)

Pour l'étude de la spéciation de fer (Fed et Fe'), nous montrerons l'implication des ligands dans l'évolution du stress des cellules (croissance) en réponse à l'intensité des apports initiaux en fer. Puis seront discutées les relations entre les caractéristiques des ligands (concentration -L- et capacité de complexation du fer - pK_{FeL} -), le stress des cellules et la spéciation du fer.

1. Stress et variation du Fed

L'intensité des apports de fer est associée à un stress produit sur la croissance des cellules, tel que marqué par une croissance initiale qui diminue avec l'intensité des ajouts (§IIB1b, Fig. 2.6c). Le Fed présent dans les batchs au jour 10 apparaît ou disparaît suivant l'intensité des ajouts (§IIA3, Fig. 2.5), et est associé à une inversion du stress sur la croissance des cellules. Ainsi la croissance moyenne entre les jours 12 et 24 est uniquement positive en absence d'ajout (cf. résultats §IIA2). L'inversion de la concentration de Fed pourrait être produite par un effet de rétroaction des cellules en réponse au stress. Cet effet de rétroaction ne pourrait avoir lieu que par l'intermédiaire de la production de ligands qui régulent la spéciation de fer. Des apparitions et disparitions de Fed avaient également été observées dans l'étude de Boyé et van den Berg (2000). Dans leur culture en batch d'*E. huxleyi*, contenant initialement 1.2 nM de Fed, 0.3 nM de Fed était apparu après 16 jours d'expérience. De plus, le seul ajout de 1 nM de Fe(III) utilisé par ces auteurs avait produit une disparition de Fed à 120% entre l'instant de l'ajout (jour 17) et la mesure suivante de la spéciation de fer (jour 21). Des explications de ces variations de fer entre le jour 0 et 10 seront proposées pour la disparition de Fed en cas d'ajouts forts et pour l'apparition de Fed en l'absence d'ajout.

La disparition de Fed pourrait être due à une adsorption ou absorption par les cellules au vu du bénéfice initial pour leur croissance (§IIB1b, Fig. 2.6c). Cette hypothèse formulée par Boyé et van den Berg (2000) supposait que le fer ajouté disparu ait pu être adsorbé (sur les parois de la cellule) ou absorbé (par la cellule) et utilisé pour leur croissance pendant de nombreux jours (14 jours après l'addition). Selon ces auteurs, une autre explication possible réside dans le fait que des précipitations sous formes colloïdales ou particulaires pourraient avoir lieu. Cependant la proportion de fer adsorbé (ou absorbé) et de fer précipité devrait dépendre du temps de réaction avec la matière organique dissoute (ligand). Malheureusement ce temps de réaction n'a, à notre connaissance, jamais été étudié. Sa mise en évidence nécessiterait des mesures à

haute fréquence (de l'ordre de l'heure), du fer dans les différentes phases : particulaire colloïdal et dissoute (organique et inorganique).

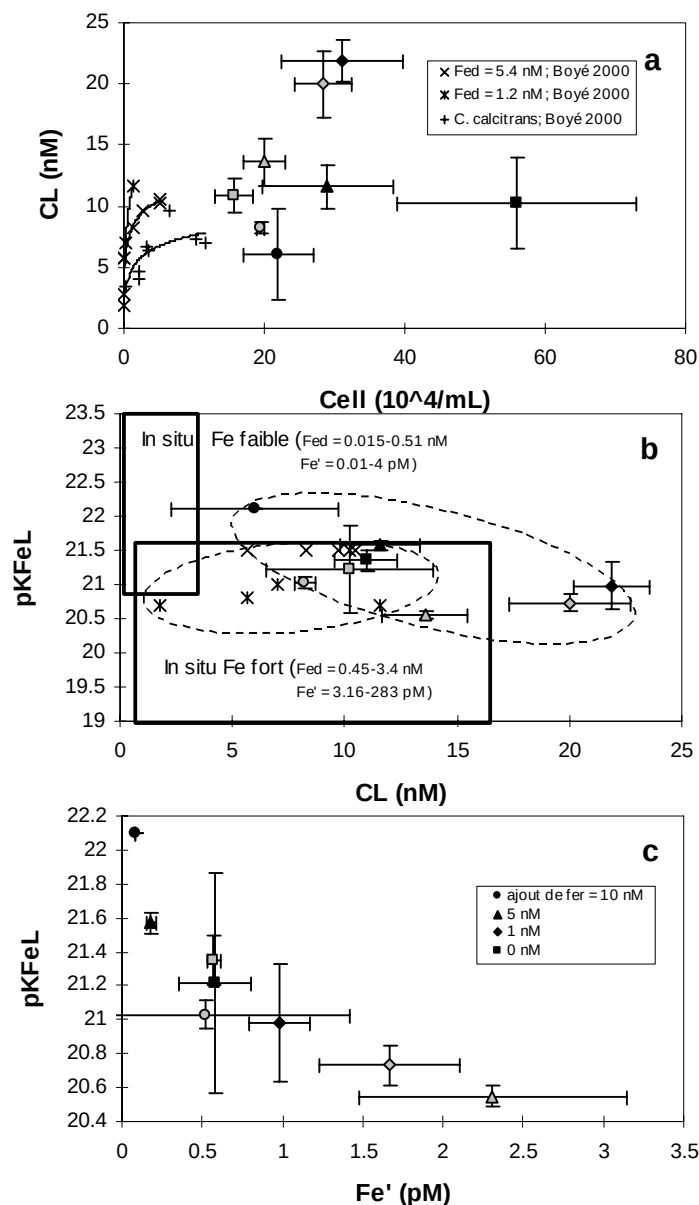


Figure 2.9 : Relations entre spéciation de fer et ligands organiques

Relation entre concentration des ligands (CL=L) et : (a) la moyenne de la concentration de cellules par unité de volume pour les différentes périodes (entre jours 0 et 8, 10 et 17, 20 et 24 ; cf. stratégie) et (b) leur capacité de complexation obtenue pour les différents jours d'échantillonnage (jour 0, 10, 20) et les différents ajouts initiaux de Fe III (0, 1, 5 et 10 ou 20 nM). (c) Relation de la capacité de complexation du fer des ligands avec le fer inorganique (Fe'), mesuré aux différents jours d'échantillonnage (jours 0, 10 et 20) pour les différents ajouts initiaux de Fe III (0, 1, 5 et 10 ou 20 nM). Les données sont superposées avec les données de Boyé (2000) obtenues en laboratoire sur *E. huxleyi* et sur une diatomée (Fig. 2.9a) et issues d'une synthèse des données *in situ* (Fig. 2.9b). Les moyennes de la population de cellules sont issues du calcul utilisant les concentrations de cellules (Fig. 2.6a) par unité de volume (cf. stratégie). Les valeurs de Fe', L et de pK_{FeL} sont issues du tableau 2.1.

Dans le cas d'apparition de Fed, il se pourrait que la concentration du fer «apparu» et n'ayant pu être retenu dans les filtres de préparation du milieu (0.2 μm , SIC1) soit celle du fer non détectable lors de la mesure de Fed, c'est-à-dire du fer colloïdal. Ce fer colloïdal, aurait pu au cours du temps (entre le jour 0 et 10) être dissous et ainsi augmenter la concentration de Fed lors de la mesure au jour 10 (cas sans ajouts). Cette augmentation en Fed (0.83 nM) pourrait être possible grâce à un excès de la production de la concentration de ligands par rapport au Fed (Boyé et van den Berg, 2000). En absence d'ajouts, ces ligands, de par leur forte concentration au

jour 10 (10.94 nM ; Tab. 2.1), pourraient transformer du fer non mesuré (fer colloïdal) au jour 0 en Fer labile (Fed). De plus, malgré des ligands moins concentrés en absence d'ajout d'un facteur 2 au jour 10, par rapport au cas d'ajout de 1 nM (Tab. 2.1), ces ligands en absence d'ajouts, montrent une plus grande capacité à maintenir le fer en solution. Cette capacité serait soutenue par un pouvoir complexant élevé et caractérisé par une valeur de pK_{FeL} de 0.63 unité supérieure à celle en cas d'ajout de 1 nM (Tab. 2.1). Cette réserve de fer sous forme labile apparemment associée à une augmentation de ligands pourrait être due (Tab. 2.1) : d'une part à leur faible concentration de L (4.58 nM) dans le milieu de culture avant l'inoculation de cellules ; d'autre part à leur faible pouvoir complexant ($pK_{FeL}=16.64$), comparé aux cultures comportant des cellules (L supérieur d'un facteur 2 et pK_{FeL} supérieur de 4 unités de pK, Tab. 2.1).

Cette augmentation de Fed entre le jour 0 et 10 ne serait pas aussi importante dans le cas des ajouts de fer. Le fer ici disparu correspond exactement au fer ajouté, sauf dans le cas d'ajout faible (1 nM) où le fer disparu n'est que de 40% du fer ajouté (§IIA3, Fig. 2.5). Il peut être supposé que dans le cas d'ajout moyen et fort, le fer III présent au début de l'expérience, correspondrait à une concentration non stressante pour les cellules, et serait la cause d'une faible production de ligands jusqu'au jour 10. Ainsi, même si ces ligands produits sont très complexants, le Fed labile n'aurait pas ou peu été mobilisé. Dans le batch où le fer est initialement le plus fort, la concentration et le pouvoir complexant sont les plus faibles. En effet, en accord avec la concentration et le pouvoir complexant observés sur le tableau 2.1, la concentration de ligands au jour 10 est la plus faible (8.2 nM lors d'ajout de 10 nM et inférieur à 20 nM lors d'ajout de 1 nM), et le pouvoir complexant est le plus faible (20.55 unités de pK lors d'ajout de 5 nM et inférieur à 21.35 en absence d'ajout).

L'augmentation de Fed entre les jours 0 et 10, d'autant plus forte que l'ajout est faible, serait due à un pouvoir de complexation des ligands produits par les cellules augmentant avec le stress. Ce pouvoir serait révélé par un stock de fer labile dans les 3 batchs sans ajout. Comment quantifier cet effet de rétroaction des cellules sur la spéciation ?

2. Stratégie de production de ligands et effet de rétroaction

La concentration de fer dissous présente à l'issue de la phase de croissance (jour 10) serait dirigée par la production de ligands en concentration -L- et aussi en capacité de complexation par les cellules. Pour la première fois en conditions entièrement contrôlées, il a été possible de suivre, sur une même population, l'effet de différents ajouts sur L. La concentration L à l'issue de la phase de croissance (jour 10), lorsqu'elle est mise en relation avec la population de cellules (Fig. 2.9a) ne semble pas être influencée par le stress et les ajouts en fer : L serait de $70 \pm 2 \times 10^{-18} \text{ mol cell}^{-1}$ quel que soit l'ajout initial ; sauf lors d'ajout très fort de 10 nM, où L est 40% inférieure. La production de ligands ne dépend alors que de la concentration de cellules à l'issue de la phase de croissance : L au jour 20 est similaire à 25% près, à la concentration au jour 10 (Fig. 9a). L est 2 fois plus importante pour des cellules peu stressées (deux fois plus de cellules) par rapport à des cellules stressées (L = 10 nM pour une concentration de cellules de $15 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$), mais avec une quantité de ligands par cellule identique ($70 \text{ amol cell}^{-1}$; Fig. 2.9a). Ainsi, L durant un bloom pourrait être uniquement dirigé par l'intensité de leur croissance, et donc par le stress des cellules qui dirige la croissance durant cette phase de développement du bloom.

Un comportement de production de ligands différent de celui observé ici (pas d'influence des ajouts et une dépendance au stress des cellules), avait été noté lors de l'étude précédente de Boyé (2000). Cette expérience en laboratoire de culture d'*E. huxleyi* (sans EDTA) avait montré que la production de ligands pouvait être stimulée par un ajout de fer lorsque le stress de la croissance est intense. Cette différence peut être due au fait que lors de nos expériences, l'ajout du fer ait été effectué au début de l'expérience. Ces ajouts initiaux, à $t = 0$, n'auraient pas

conduit à des changements de production de ligands, provoqués par un ajout après 14 jours de stress comme dans le cas de l'étude de Boyé (2000).

Par contre, les différents ajouts effectués conduisent à des différences dans la capacité de complexation des ligands produits. L'étude de Boyé (2000) avait montré que les concentrations de fer influent sur la capacité de complexation des ligands produits. Des Fe^{2+} forts de 5.4 nM produisaient des ligands avec une capacité de complexation forte ($\text{pK}_{\text{FeL}} = 21.5$). Par contre, des concentrations en fer 4 fois plus faibles produisent des ligands d'un pK_{FeL} plus faible, de 23% à 37% (Fig. 2.9b). Une tendance inverse est observée dans nos expériences lorsque le stress est modifié par des ajouts initiaux de fer. Au jour 10, pK_{FeL} qui est maximum en absence d'ajout, avec une valeur de 21.35, diminue jusqu'à 37% lorsque l'ajout augmente à 5 nM (Fig. 2.9b). Par contre, pK_{FeL} augmente de 24% lorsque les ajouts augmentent d'un facteur 2 par rapport à des ajouts de 5 nM. Cette tendance, d'un pK_{FeL} plus fort lors d'un stress initial 2 fois plus faible, pourrait être due à un Fe^{2+} au jour 10, de 0.58 nM lors d'ajout fort, 30% plus faible que lors d'ajout moyen (Tab. 2.1). Au jour 20, cette tendance est accentuée, avec un pK_{FeL} d'une valeur de 22.10, maximale lors d'ajout de 20 nM, et qui diminue de 23% à 50% lors des ajouts plus faibles ou en absence d'ajout; soit une diminution 50% plus forte avec la diminution de l'ajout par rapport au jour 10.

Ces résultats permettent d'améliorer la compréhension de la stratégie de rétroaction de production de ligands face au stress en fer dans l'océan global grâce en particulier à l'analyse possible de l'effet des différentes intensités d'ajouts introduits initialement. Il apparaît que les caractéristiques des ligands d'*E. huxleyi* en laboratoire se distribuent de façon similaire à celles dans l'océan global (Fig. 2.9b) : un pK_{FeL} fort (>21.5) est associé à des faibles concentrations de ligands (<5 nM). Il est à noter que la capacité de complexation des ligands produit lors d'un stress initial important (ie. pas d'ajout) est supérieure (avec une différence de 0.5 pour pK_{FeL}) par rapport à des ajouts de 1 nM. Cette différence, qui va dans le sens d'une distribution généralement admise dans l'océan (Boyé 2000), correspond à un fort pK_{FeL} dans les régions stressées en fer et à un faible pK_{FeL} dans les régions abondantes en fer (Fig. 2.9b). Par contre les conditions de stress en fer engendrées par les différents ajouts lors de nos expériences, sont à l'inverse des conditions observées *in situ*. Dans le cas d'un faible stress (ie. fort ajout de fer initial de 10 nM), les ligands sont peu concentrés (8 nM) mais posséderaient un fort pouvoir complexant (pK_{FeL} entre 21 et 22). Alors que, dans le cas d'un relativement fort stress (1 nM de fer ajouté initialement), les ligands seraient 3 fois plus concentrés mais en possession d'un pouvoir complexant plus faible de 1 à 0.5 unité de pK par rapport à 10 nM de fer ajouté. Il semble donc que la stratégie de production des ligands d'*E. huxleyi* en réponse aux ajouts est contraire à celle des ligands dans l'océan. La capacité de complexation croît et à l'inverse une concentration de ligands décroît lorsque le stress diminue (ie. lorsque l'ajout augmente).

Cette «originalité» pourrait être due à un effet de rétroaction du stress sur la quantité de fer dissous et induirait une diminution de la disponibilité du fer lorsque l'ajout augmente. Cette hypothèse est basée sur le fait que les caractéristiques des ligands et la concentration de Fe^{2+} dans cette étude sont cohérentes avec leur concentration dans l'océan. La capacité de complexation des ligands représentée par pK_{FeL} est, de façon similaire à celle de l'océan global (Fig. 2.9b), inversement proportionnelle à la concentration de fer inorganique (Fe^{2+} présumé fer biodisponible ; §IIIB1b). Cette relation entre pK_{FeL} et Fe^{2+} correspond à une droite décroissante quel que soit l'ajout et le jour de la mesure (Fig. 2.9c). Le Fe^{2+} qui est de 0.2 pM pour un pK_{FeL} de 21.6 augmente d'un facteur 10 lorsque le pK_{FeL} diminue d'une unité de pK. La concentration de ligands serait donc, comme dans l'océan global, proportionnelle à la concentration de fer inorganique puisque la concentration de ligands est inversement proportionnelle au pK_{FeL} (Fig. 2.9b). Par contre des conditions stressantes, initialement en cas de faible ajout, produiraient une stimulation de la production de ligands par les cellules, ce qui induirait des conditions non stressantes du milieu avec des Fe^{2+} forts. Cet effet pour la première fois détecté en conditions

contrôlées, suggère que les ajouts faibles seraient plus stimulants que les ajouts forts ou en absence d'ajout pour la production de ligands à une même concentration de fer inorganique (Fig. 7d). L'étude de l'effet de ces ajouts au début de la phase exponentielle ne peut pas être évaluée à partir de mesures de spéciation effectuées à un intervalle de 10 jours, un intervalle journalier durant la phase de croissance serait nécessaire (ie. les 12 premiers jours).

Dans les études antérieures en laboratoire sans EDTA, la production de ligands était stimulée en cas d'ajout faible, de 1 nM, en revanche la capacité de complexation était stimulée dans des conditions de fer non stressantes (forts ajouts). Lors des expériences conduites ici, grâce à l'application de différentes intensités d'ajouts sur une même population, la stratégie de production de ligands est améliorée mais apparaît plus complexe. Celle-ci fait apparaître l'importance de la production de ligands mais également leur pouvoir de complexation, avec une relation les liant qui dépend de l'intensité de l'ajout. De plus, cette stratégie de production dépendrait à la fois de l'intensité des ajouts en fer et également du stress en Fed. Un stress en fer important, avec un Fed de 0.4 à 0.6 nM (en absence d'ajout ou après 10 jours lors d'ajouts forts de 10 nM) stimulerait la capacité de complexation des ligands, avec des valeurs de pK_{FeL} atteignant 22, par rapport à des Fed de l'ordre de 1 nM pour lesquelles le pK_{FeL} est de 68‰ plus faible. De fortes capacités de complexation engendrées par un stress de fer initial (pas d'ajout) et caractérisées par des valeurs de pK_{FeL} supérieures à 21 au jour 10, permettraient aux cellules de solubiliser du fer sans doute colloïdal. Par contre, des cellules ayant beaucoup de fer disponible (moyen et fort ajout initial de 5 ou 10 nM), de par la production de ligands à faible pouvoir complexant caractérisé par un pK_{FeL} inférieur à 21 au jour 10, pourraient se retrouver avec relativement peu de fer pour leur croissance. Les conséquences de cet effet de rétroaction seraient de permettre aux cellules plus stressées en fer, comme dans les régions HNLC (Océan Sud, Pacifique Nord et Equatorial), une meilleure utilisation des apports en fer pour leur croissance, même si les apports sont *a priori* peu solubles comme c'est le cas des poussières désertiques du Sahara ou de la Patagonie.

La spéciation de fer, induite par l'effet de rétroaction des cellules au stress imposé par l'intensité des ajouts, a-t-elle un effet sur les grandeurs du bloom de cellules et de coccolithes libres ?

B. Stratégie du bloom et effet de la spéciation de fer sur les parties organiques et inorganiques d'*E. huxleyi*

A travers les effets des différents ajouts sur les grandeurs caractéristiques des blooms (organiques et inorganiques), décrits dans le §IIB (population de cellule, §IIB1, Fig. 2.6a; population de coccolithes, §IIB2, Fig. 2.7a) et IIC (POC et PIC /cell, §IIC1 et 2, Tab. 2.2 ; taille des cellules et des coccolithes, §IIC3, Fig. 2.8), il apparaît que le fer pourrait jouer un rôle important sur l'intensité des blooms. La question qui se pose est de savoir quel rôle jouent les différentes formes de fer ou spéciation, qui de plus évoluent au cours du temps (§IIA2, Fig. 2.4) sur les paramètres caractéristiques d'un bloom ? La mise en évidence du contrôle du bloom par le fer peut être effectuée à partir de la mise en relation des grandeurs caractéristiques du réservoir organique (POC, population, et croissance des cellules, A.) et inorganique (PIC, population et détachement des coccolithes, B.) en fonction des différentes formes de fer (Fed et Fe').

1. Physiologie organique et spéciation (Fig. 2.10)

a. Population maximale stimulée par Fed

Les résultats montrent que la population de cellules entre les jours 10 et 20 s'accroît d'autant plus fortement que l'ajout initial de Fe(III) est faible (§IIB1a, Fig. 2.6a). De même que le Fed est d'autant plus intense à l'issue de la phase de croissance (jour 10) que l'ajout de Fe(III) initial est faible (§IIA1, Fig. 2.4a). Il ressort donc de ces observations que l'accroissement de la population entre les jours 10 et 20 augmente avec l'intensité du Fed présent au jour 10. Les relations entre Fed et la population sont visibles sur la figure 10a : le triplement observé de la population entre le jour 10 et 20 est associé à un Fed au jour 10 de 1.24 nM. Par contre, lorsque le Fed au jour 10 est plus faible de 50%, l'augmentation de la population de cellules est plus faible d'un facteur 10. Les moyennes de la population de cellules des périodes entre les jours 0 et 10, 10 et 20 et 20 et 24, augmentent avec le Fed : elles sont d'environ $10 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ pour un Fed de $0.5 \pm 0.2 \text{ nM}$ et triple lorsque Fed augmente de 80%. Lors de chaque journée, la population de cellules est d'autant plus forte que le Fed du jour 10 est fort : la population de cellules de $29 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ au jour 10 et 20, est associée à un Fed au jour 10 faible de 0.58 nM, et augmente de 30% et 100% lorsque le Fed double.

Le Fe' ne semble pas être une espèce de fer dirigeant le stock de cellules telle que le montre la figure 10c où aucune relation est évidente. Cette remarque est néanmoins en contradiction avec le fait qu'un ajout de FeIII favoriserait la croissance sans modifier le Fed (Boyé et van den Berg, 2000) et suggérerait ainsi une faible biodisponibilité du fer organique. Il serait donc possible que le fer inorganique ne soit pas l'unique espèce biodisponible et que l'espèce principale de fer (fer organique) participe en grande partie à l'intensité du stock de cellules.

b. Croissance stimulée par le Fed mais le fer biodisponible serait le fer inorganique (Fe').

Fed sur la croissance : Des ajouts initiaux forts en fer III stimulent le processus de croissance les premiers jours (jour 2 à 4 ; Fig. 2.6c), de manière similaire à la réponse de la population maximale de cellules (Fig. 10a). Mais au contraire, au-delà du jour 12, les ajouts initiaux inhibent la croissance (Fig. 2.6b). La croissance, au-delà du jour 12, est cependant positive uniquement en absence d'ajout (Fig. 2.6b). Ce renversement de l'effet des ajouts de fer sur la croissance au-delà du jour 12, comparé aux 4 premiers jours, est accompagné d'un changement des concentrations de Fed au jour 10 inversement proportionnel aux ajouts initiaux : les concentrations de Fed au jour 10 sont d'autant plus faibles que les ajouts initiaux sont forts (Tab. 2.1). Ainsi, de même que les moyennes de la population de cellules (Fig. 2.10a), la moyenne de la croissance des cellules pour chaque période (jours 0-10, 10-20 et 20-24), est stimulée par le Fed associé (Fig. 2.10b) : au jour 10, pour un Fed de 0.58 nM, la croissance est de 0.03 jour^{-1} et augmente d'un facteur 5, lorsque la concentration de Fed augmente seulement d'un facteur 2. Par contre, à l'inverse de la population de cellules avec Fed, il n'existe pas de relation unique entre la croissance et le Fed lorsque toutes les périodes du bloom sont considérées ensemble. A chaque valeur de Fed peuvent être associées plusieurs concentrations de cellules (celle du jour 10 et celle du jour 20).

L'intensité de l'augmentation du Fed, entre les jours 0 et 10, à l'inverse de l'intensité de l'ajout initial (§IIA1a, Tab. 2.1), permet d'expliquer l'apparente contradiction de l'inhibition de la croissance au-delà du jour 12 (§IIB1b, Fig. 2.6b). Un faible Fed serait à l'origine de la diminution du taux de croissance calculé sur 12 jours (de 0.7 à 0.4 jour^{-1}), lorsque des ajouts initiaux augmentent de 0 à 5 nM (Muggli et Harrison, 1997). Malheureusement le Fed n'a pas été mesuré au-delà de l'instant initial dans l'expérience de Muggli et Harrison. Il est à noter toutefois que l'inhibition de la croissance lors de l'augmentation de l'ajout n'est pas observée lors d'expériences similaires sur des diatomées (Muggli et Harrison, 1997).

Fe' sur croissance : Il n'existe pas de relation unique entre croissance moyenne de toutes les périodes mises ensemble et le Fed (un même Fed peut correspondre à plusieurs taux de croissance, Fig. 2.10c). Par contre, la croissance moyenne montre une relation unique avec le Fe' (Fig. 2.10b). La croissance peut être nulle pour un Fe' de l'ordre de 0.1 pM et augmenter jusqu'à une valeur de 0.1 jour⁻¹ lorsque le Fe' est multiplié par un facteur 10. La relation reliant croissance moyenne et Fe' pourrait être représentée par une courbe de Michaelis Menten caractérisée par une croissance maximale de 0.6 jour⁻¹ et une constante de demi-saturation de l'ordre de 10 pM (Fig. 8c). Cette concentration de Fe' à laquelle la croissance est inhibée à 50% ($K_{1/2Fe'}$), est une concentration relativement forte dans les régions à faible Fe' (0.01-4 pM, Fig. 2.9b). La croissance d'*E. huxleyi* pourrait donc être susceptible d'y être limitée. Cet ordre de grandeur pour la constante de demi saturation de fer est supérieur à celui obtenu lors d'études précédentes ayant permis de calculer, mais à travers l'utilisation d'EDTA, la relation entre fer inorganique et croissance (Sunda et Hunstman, 1995 ; Schulz *et al.* 2004). Ces auteurs obtiennent une constante de demi saturation de respectivement 2 et 0.7 pM (Schulz *et al.* 2004). La différence de $K_{1/2Fe'}$ d'un facteur 5 à 15 entre nos résultats et ceux des deux études antérieures pourrait être due à leurs conditions contrôlées utilisant l'EDTA. L'EDTA permettrait par exemple au Fe' d'être plus disponible qu'il ne l'est dans un milieu plus naturel, tel que simulé dans nos expériences sans EDTA. Sunda et Hunstman, 1995 ; Schulz *et al.* 2004 avaient par ailleurs montré que les besoins en fer sont proportionnels au volume de la cellule. Puisque le volume était 8 fois plus petit que lors de nos expériences ; cette différence de taille pourrait également expliquer que dans notre étude la constante de demi saturation de Fe' soit 5 à 15 fois plus élevée.

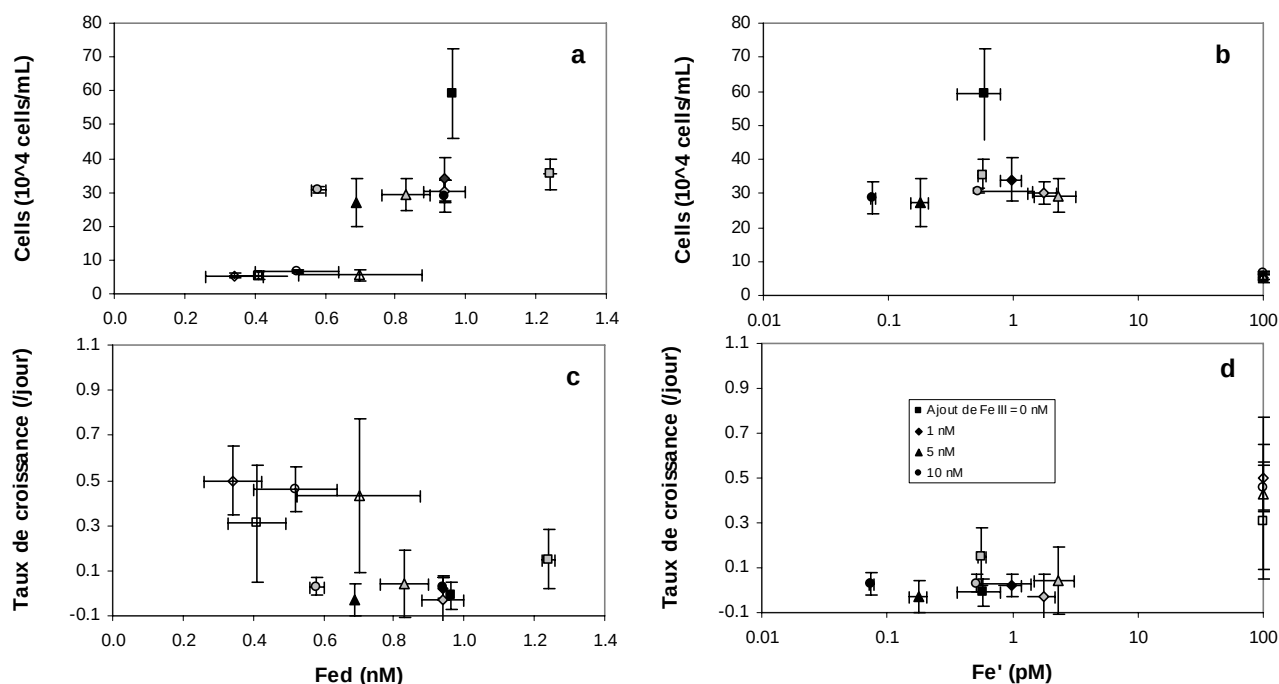


Figure 2.10 : Effets de la spéciation de fer sur la population et la croissance des cellules

Moyennes de : la population de cellules de chaque période (entre jours 0 et 8, 10 et 17, 20 et 24 ; cf. stratégie) en fonction du fer dissous total (a) associé à ces mêmes périodes (jour 0, 10, 20) ; la croissance des cellules de chaque période (entre jours 2 et 8, 10 et 17, 20 et 24 ; cf. stratégie) en fonction du fer dissous total (b) et du fer inorganique (c) associé à ces mêmes périodes (jour 0, 10, 20). Les moyennes de la population de cellules sont issues du calcul utilisant les concentrations de cellules (Fig. 3a) par unité de volume (cf. stratégie). Les moyennes de la croissance sont issues du calcul utilisant le taux de croissance instantané des cellules (Fig. 2.6b ; cf. stratégie). Les valeurs de Fed et Fe' sont issues du tableau 2.1.

Fer biodisponible : Les différences d'effet des différentes formes de fer (Fed et Fe') sur la croissance et la population de cellules d'*E. huxleyi* n'étaient pas été connues. A une valeur de Fe' correspond une seule valeur de croissance et le taux de croissance augmente avec le Fe' (Fig. 2.10b). Par contre, à une période donnée (entre les jours 0 et 10 ou entre 10 et 20), la croissance

augmente avec le Fed' , mais plusieurs valeurs de la croissance peuvent être associées à une même valeur de Fed (Fig. 2.10b). La conséquence est que le Fe' semble contrôler la croissance sur toute la période du bloom entre le jour 0 et 24, mais, la quantité de Fed contrôlerait en revanche la croissance mais à un instant donné. De plus le stock de Fed contrôlerait le stock de cellules présentes (Fig. 2.8a). Les relations entre fer et population (Fig. 2.10a) et croissance (Fig. 2.10b et 10c) de cellules pourraient signifier que le Fe' soit le fer biodisponible utilisé pour la croissance des cellules. Mais en dehors de la concentration de Fe' , le stock de Fed pourrait également réguler celui des cellules et le taux de croissance sur une période uniquement de 10 jours (entre les jours 10 et 20). Cette régulation de l'évolution de la population de cellules, par à la fois le Fe' et le Fed , pourrait être due à la cinétique d'échange particulier existant entre les deux formes de fer. Une étude future de cette cinétique d'échange entre les deux formes et le réservoir organique devrait permettre de préciser un rôle sur la cellule organique. Ces études devraient être effectuées en absence d'EDTA, afin de tenir compte du rôle de toutes les formes de fer et en utilisant des incubations courtes (de l'ordre de la journée) pour la mesure de la prise de fer. Ceci pourrait être possible à l'aide par exemple de marquages isotopiques de fer (Fe^{55} et Fe^{59} ; Sunda et Huntsman, 1995) et sa détection à la fois dans le dissous et le particulaire.

c. Limitation de la croissance par le Fed plus bas que celui connu auparavant

La moyenne des taux de croissance des jours 2 et 4 est de 0.36 jour^{-1} sans ajout et double lorsqu'un ajout est effectué (§IIA2, Fig. 2.6c ;). Il apparaît alors que la croissance n'est pas nulle pour des concentrations de Fed supérieures à 0.41 nM . Cette concentration de Fed reste plus de 3 fois plus faible que la limite proposée précédemment dans des conditions expérimentales similaires (1.2 nM sans EDTA ; Boyé et van den Berg, 2000). Cette différence pourrait être due à l'utilisation d'une souche d'*E. huxleyi* qui ne calcifiait pas (Boyé c.p.). Une souche calcifiante aurait donc des besoins en fer au moins 3 fois plus faibles, ceci étant dû probablement à une physiologie moins exigeante en fer. Le fait que la stimulation de la croissance soit similaire lorsque les ajouts sont supérieurs à 1 nM (Fig. 6c) est en désaccord avec une augmentation du taux de croissance (de 0.5 à 0.8 jour^{-1}) lorsque l'ajout augmente de 1 à 9 nM (Boyé et van den Berg, 2000). Le fait qu'*E. huxleyi* apparaisse moins limité pourrait être dû aux ajouts qui ont été ici effectués au même instant, et sur un même type de population. La différence de réponse de la croissance à différents ajouts (2 ajouts de 1 et 9 nM) observée par Boyé et van den Berg (2000) pourrait donc être expliquée par le fait que ces auteurs comparent l'effet de ces ajouts sur des populations différentes (population 1.16 et $51.9 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) et à des instants de temps différents (14 et 17 jours).

2. Réservoir inorganique et spéciation (Fig. 2.11 et 2.12)

a. Coccolithes libres/cell stimulé par Fed et inhibé par Fe'

Les résultats ont montré que la population de coccolithes libres par cellule (Fig. 2.7b), s'accroît en parallèle avec l'augmentation de Fed du jour 10 (Fig. 2.4a). Afin de déterminer l'effet de la spéciation du fer sur le réservoir de coccolithes libres, sont associées les moyennes du nombre de coccolithes libres par cellule pour les différentes phases et les concentrations d'espèces de fer (Fed et Fe' ; Fig. 2.11a et 2.11b). La stimulation par le Fed (Fig. 2.11a) du nombre de coccolithes libres par cellule se produit de façon similaire que pour le réservoir de cellules (Fig. 2.10a). Les moyennes du nombre de coccolithes par cellule sont d'environ 4.5 coccolithes libres cell^{-1} pour un Fed de l'ordre de $0.5 \pm 0.2 \text{ nM}$ et augmentent d'un facteur 10 lorsque le Fed augmente de 80% . Contrairement à l'absence d'effet du Fe' sur le réservoir de cellules (Fig. 2.10b), le nombre de coccolithes par cellule serait inhibé par l'augmentation de Fe' (Fig. 2.11b). Les moyennes du nombre de coccolithes libres par cellule

sont de l'ordre de 30 coccolithes cell^{-1} pour un Fe' de 0.1 pM et diminuent d'un facteur 3 lorsque le Fe' augmente d'un facteur 100. La stimulation du nombre de coccolithes libres/cell par Fed peut s'interpréter comme une conséquence de l'augmentation de la population de cellules, qui imposerait le nombre de coccolithes durant la phase active de la croissance. Au contraire, mais avec des conséquences similaires, la désagrégation des cellules durant la phase de mortalité (croissance nulle à $\text{Fe}' < 1$ pM, Fig. 2.10d) permettrait au nombre de coccolithes libres d'augmenter pour des faibles Fe' .

b. Processus de détachement inhibé par Fed et stimulé par Fe'

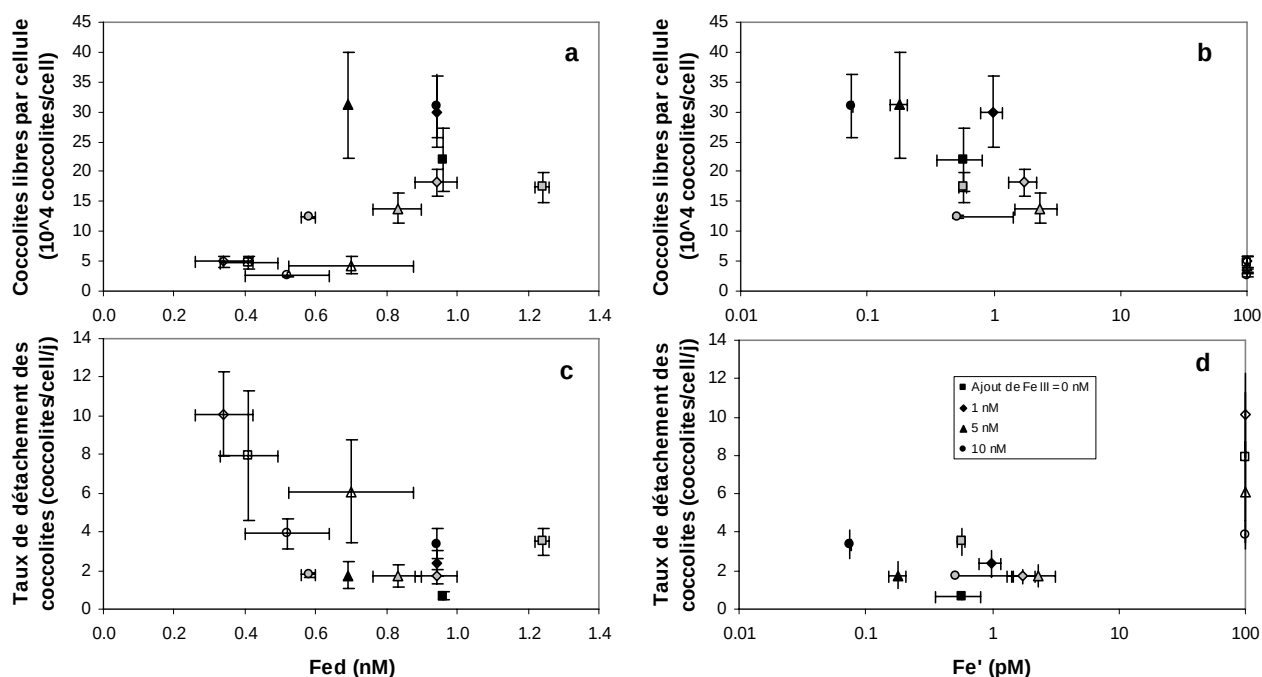


Figure 2.11 : Effets de la spéciation de fer sur la population et le détachement des coccolithes.

Moyennes de la quantité de coccolithes libres par cellule de chaque période (entre jours 4 et 8, 10 et 17, 20 et 24 ; cf. stratégie) en fonction (a) du fer dissous total (Fed) et (b) du fer inorganique (Fe') associés à ces mêmes périodes (jours 0, 10, 20 ; cf. tableau 2.1). Les moyennes de la quantité de coccolithes libres par cellule ont été calculées d'après les mesures Fig. 2.7b (cf. stratégie)..

Des ajouts en fer inhiberaient le détachement lors des 10 premiers jours tel que nous l'avons vu au §IIB2c (Fig. 2.7c). De façon similaire, le détachement moyen calculé entre les jours 10-20 est inhibé de 60% lorsque qu'un ajout initial a lieu en comparaison à une situation sans ajout. Etant donné que le Fed mesuré le jour 10 est inversement proportionnel à l'importance de l'ajout (Fig. 2.5a), le détachement devrait être stimulé par le Fed. Pourtant lorsque le taux de détachement moyen pour les différentes périodes est mis en relation avec le Fed, il apparaît inhibé par une augmentation du Fed (Fig. 2.11c). Le taux de détachement moyen est de l'ordre de 10 coccolithes cell^{-1} jour $^{-1}$ pour un Fed de 0.34 nM et diminue d'un facteur 5 lorsque le Fed augmente d'un facteur 2.7. Cette inhibition est différente en l'absence de relation entre le taux de croissance et le Fed (§IIIB1b, Fig. 2.10c). Par contre, la stimulation du taux de détachement par le Fe' (Fig. 2.11d) est similaire à celle obtenue pour le taux de croissance (Fig. 2.10c). Le taux de détachement moyen est de l'ordre de 2 pour un Fe' de 0.1 pM et augmente d'un facteur 2 lorsque le Fe' augmente d'un facteur 100. Ces relations du taux de détachement suggèrent que le fer influence la partie inorganique également à travers le processus de détachement des coccolithes. Mais cette influence peut être indirectement liée à la phase de croissance. Le taux de détachement diminue par exemple de 50% entre les phases de déclenchement et de mortalité (§IIB2c). Ce lien entre croissance et détachement sera abordé dans le §IIIC1c.

c. Production de PIC inhibé par Fe' (Fig. 2.12a, 2.12b)

La concentration de PIC par cellule est différente suivant les ajouts initiaux de fer mais sans tendances décelables (§IIC2, Tab. 2.2). Par contre, le PIC/cell est inversement corrélé avec Fe', et ceci quel que soit l'ajout (Fig. 2.12a). Le PIC/cell est de 7 pg cell⁻¹ pour un Fe' de l'ordre de 1 pM et diminue de 50% lorsque le Fe' augmente d'un facteur 10. Cette observation est en contradiction avec celle obtenue utilisant par Muggli et Harrison (1997) et par Schulz *et al.* (2004) l'EDTA. Selon les premiers auteurs, un stress important de fer inorganique (Fed << 0.8 nM), engendre un PIC /cell de 0.5 pg cell⁻¹, soit d'un facteur 10 plus faible que celui lors de Fed plus fort de 0.8 nM. Alors que selon Schulz et coauteurs, un stress important de Fe' (<0.1 pM), n'engendrerait pas de variations significatives du PIC /cell (5 pg cell⁻¹) par rapport à des concentrations de Fe' 10³ supérieures (>100 pM). Dans nos expériences, au contraire de ces résultats publiés précédemment, le PIC /cell, de 4 pg cell⁻¹ lors de Fe' de 2.3 pM, augmente d'un facteur 2 lorsque le Fe' diminue d'un facteur 30. Cet effet d'augmentation peut être la conséquence du changement de phase de croissance, absent dans les 2 expériences précédentes (§IIC1a, Fig. 2.12b). Le changement de phase est marqué par une accumulation du PIC/cell au-delà de la phase exponentielle (Jour 20). La raison pour laquelle aucune inhibition de la quantité de PIC /cell dans nos expériences est observée, serait liée aux valeurs de fer total utilisées ici (>0.5 nM sans EDTA), supérieures à celles utilisées par Muggli et Harrison (<< 0.8 nM avec EDTA). Ainsi la question de savoir si de faibles concentrations de fer (Fed < 0.5 nM et Fe' < 0.08 pM) inhibent le PIC reste ouverte puisque ces valeurs ne sont pas atteintes ici.

d. Stimulation du degré de calcification des cellules par Fe' (Fig. 2.12c)

Contrairement à l'absence de relation directe entre nombre de coccolithes attachés /cell et ajout (§IIC3a), une relation entre nombre de coccolithes attachés/cell (au jour 10) et fer inorganique a été décelée (Fig. 2.12c). Le nombre de coccolithes attachés par cellule dénombrée au jour 10 est de 13 coccolithes cell⁻¹ pour un Fed de 0.5 pM et augmente de 20% lorsque le Fe' augmente d'un facteur 3. Cette relation serait cohérente avec l'inhibition du processus de détachement lorsque le Fed augmente (Fig. 2.11c). Ainsi une hausse du taux de détachement irait dans le sens d'une plus faible accumulation de coccolithes attachés lorsque les cellules sont stressées en fer. Il est également logique que le processus de croissance ait un impact sur le nombre de coccolithes attachés via la division cellulaire, tel que nous l'analyserons dans le §IIC2a (Fig. 2.12d).

Les relations reliant les quantités et processus organiques et inorganiques avec le Fed seraient en général à l'inverse des relations avec le Fe'. Mais le stock de fer en terme à la fois de Fed et de Fe', présent dans la solution à tout instant, est à considérer pour pouvoir déterminer le rôle de la spéciation du fer sur la stratégie de vie (l'intensité de la fabrication simultanée de réserves organiques et inorganiques) d'*E. huxleyi*.

La forme inorganique du fer (Fe') pourrait être considérée comme le fer qui limiterait la croissance et donc le fer biodisponible. La croissance, sans EDTA, montrerait un besoin 10 fois plus important en terme de Fe', avec une constante de demi saturation vis-à-vis du Fe' de 10 pM et d'un ordre de grandeur plus fort qu'en présence d'EDTA. Mais cette différence dans la dépendance de la croissance vis-à-vis du fer inorganique avec ou sans EDTA va dans le sens d'une biodisponibilité régulée par le Fed représenté majoritairement par le fer organique.

De plus *E. huxleyi* en terme de croissance serait au moins deux fois moins limité que la valeur de limitation proposée dans les études antérieures, d'environ 1 nM. Ceci est suggéré parce que sa croissance de 0.3 jour⁻¹ (les 6 premiers jours) pour un Fed initial de seulement 0.41 nM, double lors d'ajouts de fer III.

La quantité de cellules ne montre pas de relation avec le Fe' mais avec le Fed. Le Fed déterminerait l'abondance de la population à l'apogée du bloom, qui triple lorsque le Fed à l'issue de la phase de croissance double. Le Fed stimulerait également le bloom au vue de l'augmentation du nombre de coccolithes libres /mL et /cell d'un facteur 50 et 3 lorsque le Fed augmente de 0.5 à 0.9 nM. Au contraire cette même augmentation de Fed produit une inhibition d'un facteur 3.5.

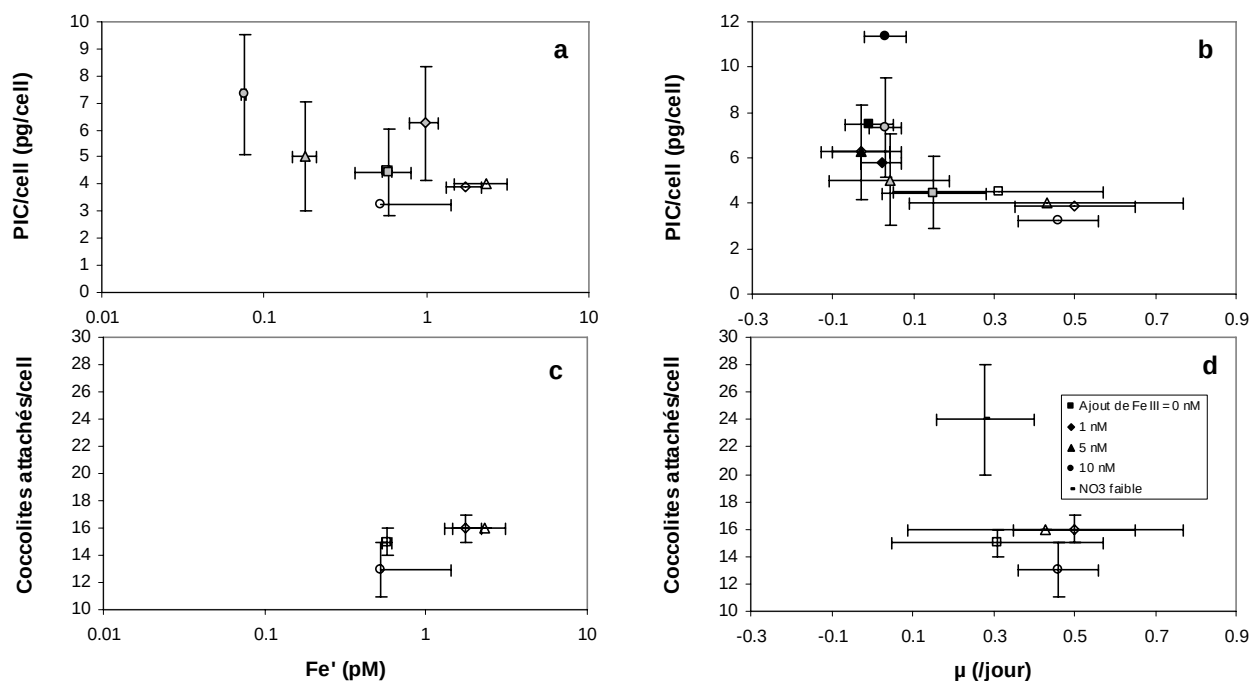


Figure 2.12 : Relation du réservoir inorganique avec le fer inorganique et couplage avec la croissance.

Quantité de PIC /cell mesurée aux différents jours d'échantillonnage (jours 10 et 20 ; cf. tableau 2.2) en fonction : (a) de la concentration de fer inorganique (Fe') mesurée durant ces mêmes jours (10 et 20 ; cf. tableau 2.1) et de (b) de la croissance moyenne des cellules de chaque période associées (entre jours 2 et 8, 10 et 17). Les moyennes de la croissance sont issues du calcul utilisant le taux de croissance instantanée des cellules (Fig. 2.6b ; cf. stratégie). Quantité de coccolithes attachés mesurée au jour 10 (tableau 2.2) en fonction : (c) de la concentration de fer inorganique (Fe') mesurée durant ce même jour (tableau 2.1) et de (d) la croissance moyenne des cellules de la période associée (entre jours 2 et 8). Les moyennes de la croissance sont issues du calcul utilisant le taux de croissance instantanée des cellules (Fig. 2.6b ; cf. stratégie).

Fe' aurait un effet stimulant sur la croissance des cellules et la quantité de coccolithes attachés par cellule, qui augmentent de 30% lorsque le Fe' augmente de 0.5 à 1.5 pM, mais serait inhibant sur la quantité de coccolithes libres et de PIC/cell qui diminuent de 50% lorsque le Fe' augmente de 0.1 à 1 pM. Cette opposition entre croissance et PIC et coccolithes libres /cell pourrait cacher un effet physiologique indirect potentiel du réservoir organique sur le réservoir inorganique.

Il apparaît nécessaire de déterminer si de telles relations (couplage ou découplage) existent entre les réservoirs organiques et inorganiques et entre leur processus.

C. Couplage entre réservoir inorganique et organique

Dans le paragraphe précédent (B), nous avons vu d'un côté que les réservoirs organiques et inorganiques suivent des tendances similaires avec les différentes formes de fer. D'un autre côté que les processus associés suivent des tendances opposées aux réservoirs. Dans quelle mesure, les variations du réservoir inorganique (coccolithes et PIC) sont-elles dues aux variations du réservoir organique (cellules et croissance) ? Dans cette partie seront discutées les interactions possibles entre les réservoirs et processus organiques et les réservoirs et processus inorganiques, par leur mise en relation qu'ils soient corrélés (1.) ou anticorrélés (2.).

1. Evolution parallèle des réservoirs organiques et inorganiques (Fig. 2.13)

a. Coccolithes libres/mL et cellules/mL (Fig. 2.13a)

Il a été montré que l'augmentation des ajouts en fer a un effet inhibant à la fois sur la population de cellules (§IIB1a, Fig. 2.6a,) et sur celle de coccolithes libres (§IIB2a, Fig. 2.7a). De plus, l'augmentation de Fed contrôlerait à la fois les maxima de cellules (Fig. 2.10a) et de coccolithes libres (Fig. 2.11a) à l'apogée du bloom. Dans quelle mesure, ces deux réservoirs cellules et coccolithes libres, varient-ils ensemble ? Et dans quelle mesure, les ajouts en fer et la spéciation de fer influencent-ils les relations entre ces deux populations ?

Lors de la phase de croissance du nombre de cellules, le nombre de coccolithes libres suit l'augmentation du nombre de cellules et cela indépendamment de l'ajout (Fig. 2.13a). En effet durant cette phase de croissance, tous les points sont sur une même droite quel que soit l'ajout. Lors de l'augmentation du nombre de cellules jusqu'à $40 \pm 5 \times 10^4$ cells mL⁻¹, marquant l'apogée du bloom (jour 12), le nombre de coccolithes libres reste égal à 14 ± 1 coccolithes libres cell⁻¹, et ce, quelle que soit la quantité de fer ajoutée. Par conséquent le nombre de coccolithes serait indépendant de la spéciation de fer (Fig. 2.13a). Au-delà, durant la phase stationnaire et de mortalité des cellules, le nombre de coccolithes montre une relation avec le nombre de cellules, différente de celle observée durant la phase de croissance. Le nombre de coccolithes libres augmente fortement avec un triplement du nombre de coccolithes /mL par rapport à l'apogée du bloom de cellules (jour 12), et cela quel que soit l'ajout (Fig. 2.13a). Cette augmentation du nombre de coccolithes/mL est marquée par contre par un nombre de cellules stationnaire ou décroissant de 50% à 60% par rapport à l'apogée. La relation inverse entre augmentation du nombre de coccolithes et décroissance du nombre de cellules, semble indépendant de l'ajout et serait de l'ordre de 1000×10^4 coccolithes mL⁻¹ par 10×10^4 cells mL⁻¹ perdues.

b. Relation entre taux de détachement et de renouvellement avec la croissance (Fig. 2.13b, 2.13.d)

De même que les quantités de coccolithes libres et de cellules, les taux de renouvellement et de détachement suivent le taux de croissance des cellules lorsque celui-ci est positif. Ils restent positifs lorsque le taux de croissance est au contraire négatif.

Le taux de détachement des coccolithes augmente avec le taux de croissance des cellules (Fig. 2.13d). Cette relation est linéaire quel que soit l'ajout et correspondrait à une augmentation du taux de détachement de 6 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ pour une augmentation du taux de croissance de 0.5 jour⁻¹ durant la phase de croissance positive (uniquement les 12 premiers jours). Le taux de détachement n'est jamais, hormis lors des phénomènes de dissolution des coccolithes, inférieur à zéro ; y compris lorsque le taux de croissance est nul, voire négatif (lors de la mort des cellules, cf. §IIB1b).

Le taux de renouvellement de coccolithes libres en fonction du taux de croissance des cellules suit une loi similaire à celle proposée par Fritz (1999), lorsque la croissance est importante (>0.2 jour⁻¹). Les taux moyens de renouvellement et de croissance sont tous deux de 0.4 jour⁻¹ pour des ajouts nuls et de 0.3 jour⁻¹ pour les 4 ajouts non nuls. Cette loi propose que le taux de renouvellement des coccolithes libres soit similaire au taux de croissance des cellules (figure 2.13b). Au contraire, pour des taux de croissance moins importants (<0.2 jour⁻¹), la corrélation entre taux de croissance et taux de renouvellement, n'est plus vérifiée. On peut noter que le taux de renouvellement est généralement supérieur de 0.1 jour⁻¹ et également toujours supérieur à zéro, lorsque le taux de croissance est inférieur à 0.2 jour⁻¹ (Fig. 13b). Cette anticorrélation serait due à une mortalité des cellules, accompagnée d'une libération de coccolithes, due ici à la désagrégation des cellules et non pas au détachement proprement dit

(cf. §IIB3c et chapitre 3 sur le processus de désagrégation, §IIB4). Cette désagrégation n'avait pas pu être mise en évidence dans les expériences de Fritz effectuées en chemostat qui ne permettaient pas d'observer les phases de mortalité où la croissance est négative.

c. Liens entre processus de renouvellement et processus de détachement (Fig. 2.13c)

Une autre relation entre les différents processus associés à la durée d'un bloom, utile de plus pour les modèles d'écosystème est celle reliant le renouvellement et le détachement de coccolithes, et pour laquelle (Fig. 2.13c) une très bonne corrélation est obtenue. Cette relation passe par zéro et le taux de renouvellement augmente de 0.6 jour^{-1} lorsque le taux de détachement augmente de $10 \text{ coccolithes cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$; soit une équation : $\text{renouvellement} = 0.06 \times \text{détachement}$. Cette corrélation montre simplement que ces deux processus suivent une tendance similaire (une diminution) lorsque le bloom avance dans le temps. Cette corrélation serait due au fait que les concentrations de coccolithes libres et de cellules, issues de ces processus de détachement et de renouvellement, sont également corrélées (Fig. 2.13a).

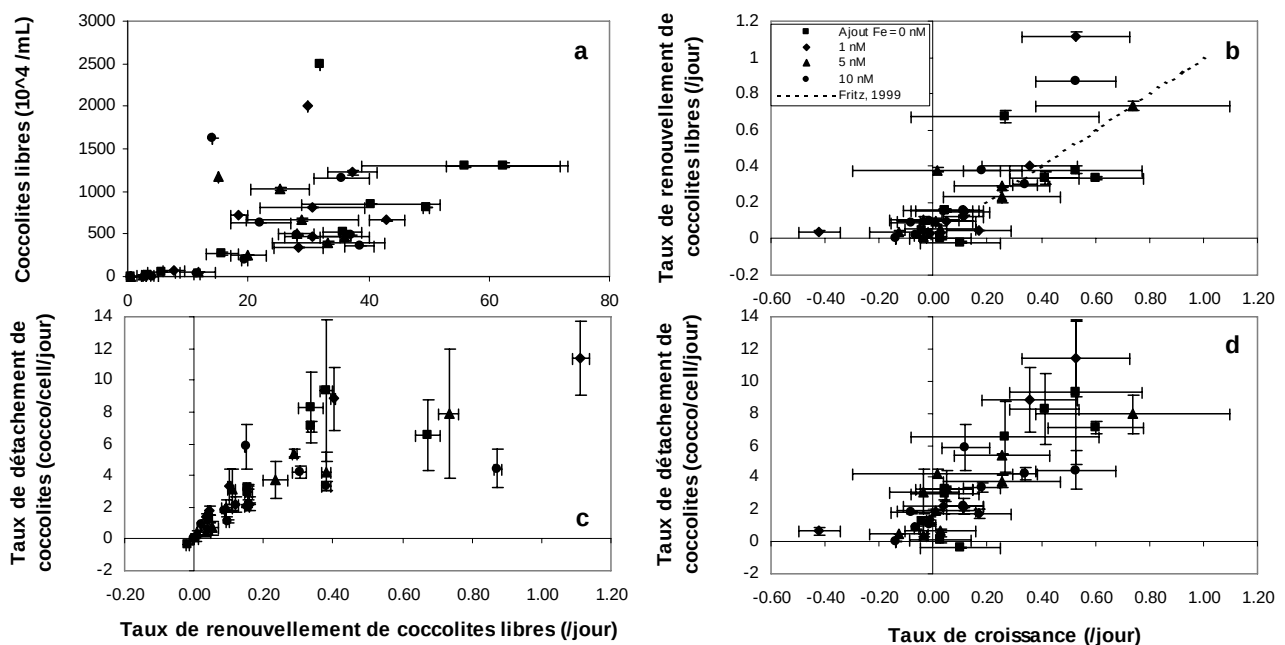


Figure 2.13 : Relation de couplage du réservoir inorganique avec la croissance

Mise en évidence des relations entre le taux de renouvellement (issu de la figure 2.7c) et : a) la quantité de coccolithes libres (issue de la figure 2.6b) et c) le taux de détachement (issu de la figure 2.7d) ; et également du couplage entre le taux de croissance et b) le taux de renouvellement et d) le taux de détachement.

Les processus de population de cellules et de coccolithes libres montrent les mêmes relations entre eux quels que soient les ajouts de Fer. Les différences qui ont lieu dans ces relations concernent uniquement la phase de croissance (stimulation ou inhibition simultanée des processus organiques et inorganiques). Observe-t-on ce même couplage entre organique et inorganique lorsque l'on considère les réservoirs de carbone, qui eux tiennent compte des processus cellulaires dans leur totalité (PIC et coccolithes attachés) ?

2. Evolution inverse des réservoirs organiques et inorganiques

a. PIC /cell et coccolithes attachés en fonction de la croissance (Fig. 2.12b et d)

L'évolution du réservoir de coccolithes libres suit le réservoir de cellules et les processus associés aux coccolithes libres, variant dans le même sens que la croissance. Pourtant, les réservoirs de PIC /cell et de coccolithes attachés /cellule, montrent une anticorrélation avec la croissance. La quantité de PIC/cell augmente lorsque le taux de croissance diminue (Fig. 2.12b) ; reste autour de 4 pg cell⁻¹ lorsque le taux de croissance reste entre 0.1 et 0.5 jour⁻¹, et augmente jusqu'à un facteur 3 lorsque le taux de croissance diminue jusqu'à une valeur proche de 0 jour⁻¹ (Fig. 2.12b). De même, le nombre de coccolithes attachés mesurés au jour 10, lors de différents ajouts de fer et de NO₃ (cf. chap. 3), montre une augmentation quand le taux de croissance diminue (Fig. 2.12d). La quantité de coccolithes attachés est de l'ordre de 15 ± 1 coccolithes cell⁻¹ lorsque le taux de croissance est de 0.3 à 0.5 jour⁻¹, et augmente de 60% lorsque le taux de croissance devient inférieur à 0.3 jour⁻¹ (Fig. 2.12d). Cette anticorrélation serait due aux changements de la phase de croissance qui permettraient une accumulation des quantités de coccolithes attachés et de PIC/cell lorsque la croissance est faible (cf. Chap. 3, §IIIB2). De plus, l'augmentation du PIC/cell lorsque le taux de croissance diminue, serait également la conséquence d'une mortalité des cellules, qui diminue d'un facteur 2 entre le jour 10 et 20. Il en découlerait durant cette période une accumulation d'un facteur 2 du PIC/cell.

De la même façon qu'avec le réservoir de coccolithes libres, la croissance montre un couplage avec le réservoir inorganique comprenant les coccolithes attachés. L'accumulation de PIC semble suivre le nombre de cellules, et donc le PIC/cell reste constant autour de 4 pg cell⁻¹ jusqu'à la phase sénescence. Ceci rejoint les observations de Schulz *et al.* 2004 d'un étroit couplage entre croissance et calcification pour des stress très importants en fer inorganique (Fe' < 1pM). Par contre, le nombre de coccolithes attachés semble pouvoir être stimulé par de faible taux de croissance à l'issue de la phase de croissance, comme il est visible sur la stimulation de 60% à faibles NO₃.

b. Evolution du nombre de coccolithes libres en fonction du détachement (Fig. 2.14)

Il semble donc que l'ajout influence le réservoir inorganique (coccolithes attachés et détachés, processus de détachement et PIC) principalement à travers le réservoir organique (cellules et croissance). Il existerait ainsi un effet des ajouts en fer sur les blooms de coccolithes libres mais via l'effet sur le réservoir organique (§IIIB2a, Fig. 2.7a). Cet effet peut être suivi en terme de coccolithes libres /mL et de détachement de coccolithes en parallèle sur la figure 2.14. Le suivi du développement du bloom se fait dans le sens d'une augmentation de la croissance du nombre de coccolithes. Il apparaît également l'existence de deux phases durant le bloom de coccolithes, séparée par une annulation du taux de détachement au jour 15, quel que soit l'ajout.

Durant la première phase (entre les jours 0 et 15), le lien entre taux de détachement et nombre de coccolithes libres montre un plus grand nombre de coccolithes libres pour un taux de détachement plus important. Le taux de détachement moyen, de 6.8 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ en absence d'ajout, est associé à une quantité de coccolithes libres de 800 x10⁴ coccolithes libres cell⁻¹. Ces 2 grandeurs diminuent progressivement lorsque l'ajout augmente et atteignent des valeurs d'un facteur 2 plus faibles lors d'ajouts de 10 nM comparativement à l'absence d'ajout. Ce lien entre taux de détachement et coccolithes libres, durant la première phase de croissance est également visualisé par la surface qui est comprise entre l'axe vertical passant par un détachement de 0 et la courbe (Fig. 2.14).

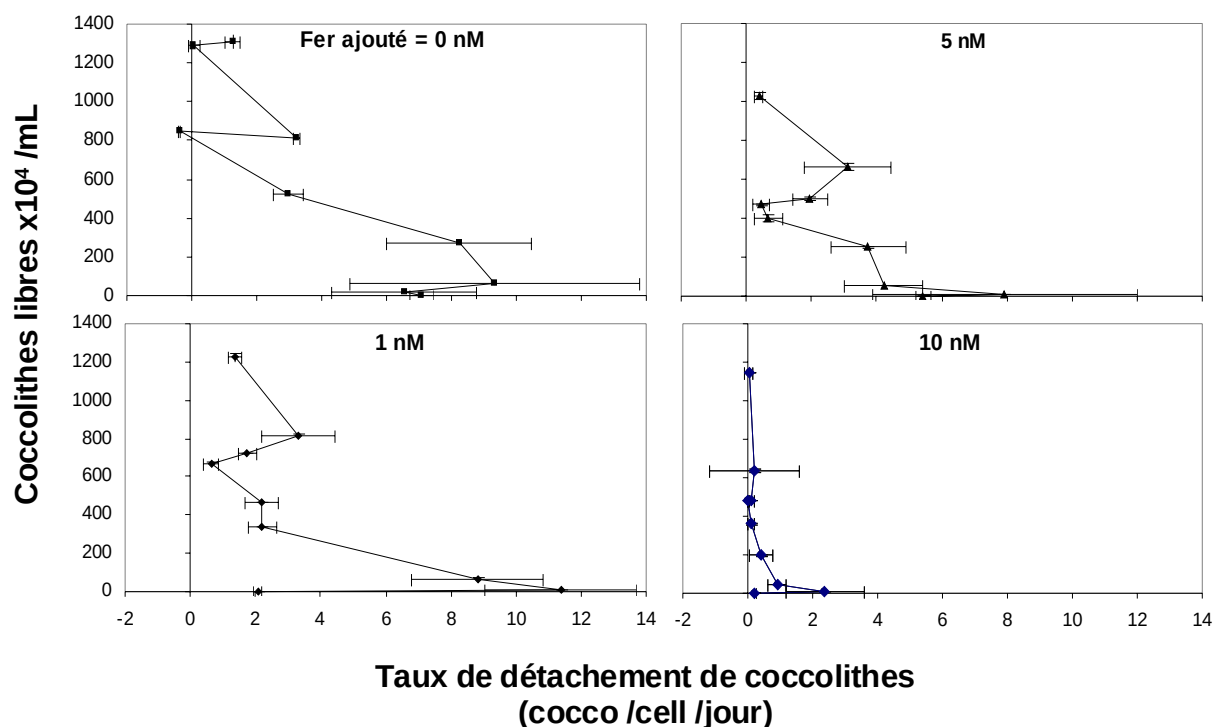


Figure 2.14 : Dynamique du bloom de coccolithes

Diagrammes de l'évolution, pour les 4 différentes intensités d'ajouts initiaux en ferIII (0, 1, 5 et 10 nM) et à chaque instant du bloom de 40 jours, de la relation entre la quantité de coccolithes libres/mL accumulée dans les batchs et le processus responsable de cette accumulation, le détachement.

La deuxième phase du bloom de coccolithes, commençant le jour 15, est similaire à la première : plus le taux de détachement est élevé durant cette phase et plus le nombre final de coccolithes est important. Ceci est visualisé par la surface comprise entre l'axe passant par un détachement de 0 et la courbe. Cette fois il semble que ce soient des ajouts forts de 10 nM qui produisent la plus forte augmentation du nombre de coccolithes/mL. Un taux de détachement moyen dans cette seconde phase (entre le jour 15 et 24) de 3 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ (66% plus faible que durant la première phase) produit une augmentation de 700 coccolithes mL⁻¹ (du même ordre de grandeur que celui de la première phase). Cette augmentation du nombre de coccolithes, lors d'ajout fort, est néanmoins 50 % plus intense que lors des autres ajouts, alors que le taux de détachement est plus faible de 25%.

L'évolution d'un bloom de coccolithes libres sous différents stress en fer serait contrôlée par le taux de détachement. Selon le couplage étroit que l'on a montré entre détachement et croissance, les blooms de coccolithes libres induits par une modification de la disponibilité en fer seraient déterminés uniquement à partir de l'effet du fer sur la croissance des cellules.

Conclusion

Les quatre expériences d'ajouts de Fe(III)' (1, 5, 10 nM et sans ajout) sans EDTA, et dans des concentrations initiales en Fed de 0.6 ± 0.3 nM conduisent à la reproduction en laboratoire des conditions naturelles d'un Bloom d'*E. huxleyi*. Les cellules d'*E. huxleyi* ont proliféré pendant toute la durée du bloom (40 jours), en bon état de santé (taux de croissance entre 0.4 et 0.8 j⁻¹), et de production de PIC (entre 1.46 et 2.5 µg mL⁻¹) et de coccolithes (entre 1200 et 2500 x10⁴ coccolithes libres mL⁻¹), de façon similaire aux observations dans les seuls blooms d'*E. huxleyi* documentés, ceux de l'océan Atlantique Nord.

Hormis en absence d'ajout, où la phase de croissance domine durant 24 jours, les phases de croissance sont similaires entre les différents ajouts. La population de cellules lors d'ajout de fer

montre une phase de croissance active, une phase à l'apogée du bloom courte suivi d'une phase sénescence soudaine (au jour 15). Entre les jours 20 et 24, une reprise de la croissance, plus ou moins significative suivant l'intensité de l'ajout, est observée. La durée de la phase de croissance, 50% plus importante qu'à faible NO_3 (cf. Chap. 3, Fig. 3.1a), suggère que le stress en fer appliqué ici, est beaucoup moins limitant que des NO_3 aussi faibles que $2 \mu\text{M}$.

Ces expériences, en conditions contrôlées sans EDTA, suggèrent premièrement que les deux formes de fer les plus importantes pour la productivité océanique, à savoir : le fer inorganique (Fe') et le fer organique (FeL , 99% du fer total), devraient être considérées pour comprendre l'impact des apports en fer sur les blooms de ce coccolithophoridé. Le fer inorganique serait dans nos expériences le seul fer biodisponible, puisqu'il stimulerait la croissance initiale (de 20% lors d'une augmentation de 10 pM), de la même façon que dans la seule étude antérieure étudiant l'effet de la spéciation de fer sur *E. huxleyi* (Boyé et van den Berg, 2000). En revanche, c'est le fer organique (99% du fer total) qui aurait un impact significatif sur l'intensité du bloom, à travers un effet positif et maximal sur la population de cellules et de coccolithes/mL, comme sur la concentration du PIC/mL.

La croissance d'*E. huxleyi* serait stimulée, de l'ordre de 15% seulement par des ajouts faibles de $\text{Fe(III)'} de 1 \text{ nM}$ dans un milieu ayant initialement des concentrations de Fed de 0.4 nM . Cette stimulation peu significative soutiendrait l'hypothèse que la croissance d'*E. huxleyi* nécessite peu de fer. La disponibilité du fer inorganique est marquée par une relation, entre croissance des cellules et une gamme de Fe' large (0.1 à $>100 \text{ pM}$), de type Michaelis Menten et qui conduit à un taux de demi saturation de l'ordre de 10 pM . Ceci implique une bonne adaptation d'*E. huxleyi* aux faibles concentrations de fer, mentionnée dans des études antérieures sur l'uptake de fer et la croissance, mais uniquement en présence d'EDTA. La limitation du fer dans l'océan pourrait, d'après nos résultats, être dirigée par à la fois les apports de fer et le stress initial, à travers l'action de la production de Ligands des cellules. Un stress relatif en Fed ($< 0.6 \text{ nM}$) pourrait produire des conditions favorables aux blooms, à l'issue de la phase de croissance, suite à un doublement de Fed, produit grâce à une capacité de complexation des ligands fortes (21.35 unité de pK_{FeL}) et à la présence de fer labile. A l'opposé, l'abondance de fer réduirait le stress et le pouvoir de complexation de 0.3 à 1 unité de pK_{FeL} . La conséquence de ce dernier cas de figure, serait une disparition du fer apporté, et des ligands moins efficaces pour rendre le fer labile. Cette stratégie de production de ligands est retrouvée à partir de données insitu dans les eaux de surface de l'océan. Des fortes concentrations de fer sont associées à de faibles pK (régions eutrophiques de l'Atlantique Nord), inversement, de faibles concentrations en fer sont associées à un fort pK_{FeL} (régions HLNC de l'océan Sud). Cette stratégie de production et de complexation de Ligands est, par contre, à l'inverse de celle proposée précédemment pour *E. huxleyi*, selon laquelle un stress en fer avait tendance à diminuer le pK_{FeL} .

Nos résultats, soulignent un effet potentiel des ajouts sur les blooms. Mais cet effet dépend à la fois de la concentration initiale dans laquelle grandit *E. huxleyi*, mais également d'un effet de rétroaction sur la biodisponibilité du fer, et donc sur l'efficacité d'utilisation du fer ajouté, qui serait contrôlé par l'algue.

Les ajouts en Fer stimuleraient les blooms de cellules d'*E. huxleyi*, ainsi que le nombre de coccolithes et la production de PIC ; mais uniquement, lorsque les cellules sont initialement stressées en fer. Cette stimulation serait due à un effet de rétroaction positive sur la biodisponibilité du fer en présence d'un stress en fer. Une absence d'ajout stimulerait la population de cellules et de coccolithes libres ainsi que la durée de la phase de croissance de 50% (10 jours de plus), comparativement aux conditions observées avec les trois différents ajouts de fer initiaux. Cette stimulation, en absence d'ajout, sur le bloom est associée à une augmentation du réservoir de Fed (apparition de 0.83 nM de Fed) ; alors que le Fed semble avoir « disparu » des cultures ayant reçu des ajouts. Cette apparition de fer se ferait grâce à la stimulation de la production de ligands à fort pouvoir complexant, produite en absence d'ajout,

situation qui peut être assimilée à un stress initial. Ainsi, l'inhibition du bloom d'*E. huxleyi* lors d'ajout (faible ou fort) par rapport à une absence d'ajout en Fer, observée dans cette étude, ne paraît plus contradictoire puisque la disponibilité du fer serait stimulée par la réponse des cellules au stress.

La spéciation de fer stimulerait le réservoir de coccolithes libres/mL et de PIC/mL dans le même sens que celui des cellules. Cette similarité indiquerait un couplage entre le réservoir organique et inorganique. Cette première étude sur la totalité des processus associés à un bloom d'*E. huxleyi* vis-à-vis du fer suggère que les fortes concentrations de Fed permettent également au réservoir de coccolithes libres d'augmenter. Mais inversement, de fortes concentrations de Fed (> 0.9 nM) inhiberaient le détachement de coccolithes (divisé d'un facteur 3.5) par rapport à des valeurs de 2 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ produit lorsque le Fed est faible (< 0.5 nM). De même, les concentrations de coccolithes et de PIC/cell seraient inhibées (divisées respectivement par 50 et par 2) lorsque le fer biodisponible devient supérieur à 10 pM. Ces tendances vont dans le même sens que la réponse de la croissance pour le détachement et à l'inverse pour les concentrations de coccolithes et de PIC/cell. Ces tendances seraient dues à : **(i)** un couplage entre la population de coccolithes et celle des cellules, à l'apogée du bloom. La stimulation du réservoir inorganique se ferait par l'intermédiaire du réservoir organique. Les processus organique et inorganique lors des variations de fer sont, lors de nos expériences, couplés et en accord avec la récente étude de Schultz *et al.* (2004) sur la calcification et le PIC/cell d'*E. huxleyi*, avec de l'EDTA. **(ii)** et à un découplage entre la quantité de PIC et de coccolithes attachés avec la croissance organique. Le PIC/cell serait stimulé à la mort des cellules lorsque le taux de croissance est proche de zéro ; et le nombre de coccolithes attachés et la concentration du POC/ml sont stimulés dans la phase de croissance, dans le cas d'un stress initial de fer (absence d'ajout).

Des variations de la concentration de fer dans la colonne d'eau peuvent inverser le mécanisme de rétroaction des cellules vis-à-vis de la spéciation du fer. Les cultures n'ayant pas solubilisé le fer, montrent une constante de dissociation qui augmente à la fin de la phase de la croissance et qui correspond à une reprise de la croissance. La production de ligands associée à ce relatif fort pouvoir complexant a lieu durant la phase de croissance et ne semble pas avoir de lien direct avec le stress, puisque proportionnel au nombre de cellules. Ce résultat permet d'affiner la stratégie de production des ligands, qui était connue auparavant pour être stimulée par les ajouts. Enfin, des ajouts suffisamment faibles pour ne pas inhiber la production de ligands des cellules, mais suffisamment forts pour stimuler leur croissance et en conséquence stimuler la production de ligands seraient les plus favorables pour les blooms d'*E. huxleyi* (ie. 1 nM, en tenant compte du taux de croissance de 0.7 jour⁻¹ au début de la phase de croissance associé à une production de Ligand de 20 nM à l'issue de la phase de croissance, observée à cette intensité d'ajout).

Ces résultats permettent de proposer pour l'océan 4 scénarios possibles de réponse aux apports, suivant que l'océan reçoit ou pas des apports extérieurs et que les eaux soient déjà *a priori* appauvries ou enrichies en fer. Les régions les moins productives seraient les régions pauvres en fer (< 0.6 nM) et qui, de plus, ne reçoivent pas d'apports en provenance par exemple de régions désertiques, c'est-à-dire sans source ponctuelle de fer externe. Par contre, ces régions pauvres en fer seraient potentiellement les plus aptes à être fortement stimulées par les apports de fer modérés (1 nM). La raison étant que ces régions déjà stressées en fer posséderaient une stratégie de production de Ligands (L faible) très complexant (pK_{FeL} fort), induite par l'environnement stressant. Les régions riches en Fer, où de fortes croissances peuvent déjà être soutenues par le Fed présent (> 0.6 nM) n'auraient pas une stratégie de complexation (L fort, pK_{FeL} faible) leur permettant d'être stimulées par des apports ponctuels. De plus, en cas d'apports trop abondants, ces régions *a priori* « riches » pourraient devenir, par rétroaction des cellules, un régime peu efficace pour maintenir le fer en solution. Dans ce scénario, les apports en fer disparaissent de la surface parce que devenant moins solubles. Un surplus d'apports en

Fer, dans ces régions riches en fer, provoquerait ainsi un changement vers un régime typique des régions à faible fer et donc dépendant des apports. Corollairement, trop d'apports dans des régions adaptées à un régime de faible fer, grâce à une stratégie d'utilisation des apports de fer, pourraient devenir un régime peu adapté par effet de rétroaction. Ces apports en augmentant fortement la disponibilité de fer, grâce à une stratégie favorable de prise et utilisation du fer ajouté, induiraient une augmentation de la concentration de fer, et transformeraient une région initialement pauvre en une région à fort Fed.

Des ajouts faibles produiraient paradoxalement des conditions plus favorables aux blooms (Fed et Fe' double et triple) grâce à une stimulation (doublement) de la production de ligands par les cellules à faible pK_{FeL} (0.3 unité de pK_{FeL}). Ces premières relations entre spéciation de fer et réservoir inorganique supposent que les blooms d'*E. huxleyi* seraient plus importants (50% en terme de coccolithes libres /mL) dans des régions riches en fer, comme l'Atlantique Nord ; et comparativement à des régions ayant de plus faibles concentrations en fer, comme l'Atlantique Sud Ouest (Fed <0.6 et $fe' < 1$ pM).

Cet effet de rétroaction des cellules permet de proposer l'hypothèse que des régions pauvres en fer, comme l'Atlantique Sud, auraient plus de capacité à capter le fer non dissous ou provenant de sources au départ non solubles, comme les poussières de la Patagonie, par rapport à des régions plus riches en Fer comme l'Atlantique Nord qui reçoit, de plus, l'apport des poussières du Sahara. Les études futures, devraient se focaliser sur les effets d'une fertilisation naturelle induite par le désert de la Patagonie sur un des blooms les plus intenses et étendus de l'océan, et des eaux relativement appauvries en fer : la mer Patagonienne.

Chapitre 3 : La déplétion de NO₃, un facteur d'apparition de blooms visibles par satellite

Introduction

Les coccolithophoridés sont considérés comme les principaux organismes calcifiants fabricant du carbonate de Calcium (CaCO₃ sous la forme de calcite) de l'océan pélagique (Milliman *et al.*, 1999). Comprendre quels facteurs déclenchent et déterminent l'extension de blooms de coccolithophoridés à l'échelle globale, est fondamentale pour l'évaluation de leur contribution au cycle du carbone océanique (Westbroek *et al.* 1993). L'extension des « blooms » du coccolithophoridé *Emiliania huxleyi* dans l'océan actuel à l'échelle globale, est connue grâce aux signaux blancs détectés par les images satellitales de type « couleur de l'océan » depuis l'année 1979 (eg : les satellites CZCS de 1978 à 1986 ; Brown and Yoder 1994 et SeaWiFS de 1997 à 1999 ; Iglesias-Rodriguez *et al.* 2002). Spatialement, ces blooms d'*E. huxleyi* « visibles » par les satellites en surface sont observés uniquement dans les hautes latitudes (supérieures à 50° Nord et Sud) des océans Atlantique et Pacifique (cf. Fig. 0.6a en Introduction générale). Ces signaux visibles blancs présentent une grande variabilité saisonnière, avec des périodes d'apogée correspondant à l'été austral et boréal (Brown and Yoder, 1994, cf. Chap. 4, §I). Ces distributions de signaux blancs ont été associées à de relativement fortes concentrations de NO₃ (entre 5 et 15 μM, Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2002). Ce rôle des forts nitrates est en accord avec l'apparition de blooms de cellules en association avec des NO₃ supérieurs à 4 μM (Sud de l'Iceland, Fernandez *et al.* 1994 ; Mer du Nord, van der Waal *et al.*, 1995 ; mésocosme, Egge et Heimdal, 1994). A l'opposé, le déclenchement saisonnier et l'apparition en surface de signaux blancs dans les régions tempérées et subpolaires ont été associés, dans l'étude d'Iglesias-Rodriguez et co-auteurs, à une baisse de NO₃ de 0 à 15 μM mois⁻¹. Les questions qui se posent alors sont : comment comprendre que l'apparition et l'étalement de signaux « coccolithes libres » détectés par satellite puisse être associée à la fois une baisse et de fortes concentrations de NO₃ ? Que signifie ce signal visualisé par les satellites ?

Ce rôle de la diminution des NO₃ dans les signaux blancs, considérés jusqu'à aujourd'hui comme correspondant aux blooms dans le sens d'efflorescence de cellules, est en contradiction avec leur rôle mis en évidence dans des études physiologiques à l'échelle de la cellule en laboratoire. De forts besoins en NO₃ pour la croissance de ce coccolithophoridé et une hypothèse d'une limitation par N (N-limited) ont été proposés, d'après des résultats de chemostat simulant la cinétique de prise de NO₃ et de PO₄ (Riegman *et al.* 1998). Cette hypothèse d'une limitation par le nitrate repose sur une faible compétitivité envers les forts NO₃, caractérisée par une cinétique lente envers les NO₃ qui se traduit par de faibles valeurs d'affinité (0.3 L mol⁻¹ h⁻¹) et d'uptake maximale (0.07 h⁻¹). Une deuxième contradiction apparaît entre le fait qu'*E. huxleyi* soit limitée par les nitrates et simultanément adaptée aux faibles concentrations de NO₃, tel que suggéré par une constante de demi-saturation de prise du NO₃ faible (K_{1/2} de 0.2 μM ; Eppley *et al.* 1967 ; Riegman *et al.* 1998). Ces études reposent sur des mesures d'uptake du NO₃ en chemostat, basées uniquement sur la réponse à une seule concentration de NO₃, relativement forte (25 μM) et donc relativement peu limitante. Résoudre ces contradictions et valider l'hypothèse de limitation de NO₃ nécessitent : (i) l'analyse de l'effet de différentes concentrations de NO₃, allant des plus faibles au plus fortes rencontrées dans la couche éclairée de surface, sur la croissance d'une même population d'*E. huxleyi*, et (ii) la

conduite de ces expériences de croissance dans des conditions proches du milieu naturel (sans EDTA, cf. Chap. 2, §IA2).

Pour comprendre la signification des signaux blancs détectés par les satellites, les connaissances physiologiques et écologiques (cf. Chap. 1, §IIE et revue Paasche, 2002) du rôle des nitrates, non seulement sur la croissance, mais également sur le réservoir de coccolithes libres et du PIC fabriqué (CaCO₃ : Particulate Inorganic Carbon), sont probablement la clé. La raison principale étant que les signaux « visibles » blancs, détectés par les satellites, correspondent majoritairement au pouvoir de réflectance des coccolithes libres (Holligan *et al.* 1983 ; Balch *et al.* 1991) formés de calcite. La compréhension du processus, à travers lequel se libèrent de la coccosphère les coccolithes attachés, c'est à dire le détachement, est fondamentale. Le détachement a été peu étudié et reste relativement mystérieux (Chap. 1, §IIF4). Le rôle potentiel du NO₃ sur ce processus de détachement et sur la fabrication de coccolithes libres n'est pas connu directement ; mais des observations en laboratoire appuient cette hypothèse. La présence et la variation du nombre de coccolithes attachés et détachés, dépendraient du réservoir organique à travers la production de polysaccharides qui permettent la cohésion des coccolithes attachés (Paasche and Brubak, 1994). Le signal visible par satellite étant dû uniquement à des coccolithes libres, il paraît indispensable de connaître la réponse vis-à-vis du NO₃ du processus qui les produit (le détachement) et cela séparément des coccolithes attachés. L'importance des coccolithes attachés est due premièrement au fait que de leur nombre dépendrait le nombre potentiel de coccolithes libérés et deuxièmement qu'ils marquent le degré de calcification de la coccosphère (Paasche, 2002). Deux expériences s'accordent sur une proportionalité dans la réponse entre les taux de détachement et de croissance, mais uniquement lorsque la croissance est positive, c'est à dire en phase de croissance (Fritz et Balch, 1996 ; Fritz, 1999). Des indices un peu plus directs du rôle du NO₃ sont fournis par exemple par des résultats de chemostat : le nombre de coccolithes détachés par cellule augmente d'un facteur 3.5 et atteint des concentrations de 35 coccolithes cell⁻¹ lors d'une baisse de la croissance d'*E. huxleyi* (de 0.67 à 0.2 jour⁻¹) en NO₃ limitant (20 µM, Fritz 1999). Ces résultats suggèrent que la compréhension de l'effet de différentes intensités d'ajouts de NO₃ sur les mécanismes de production de coccolithes libres visualisés par les satellites, doit être associé à un suivi des diverses phases de croissance pour la durée totale d'un bloom : déclenchement (forte croissance), apogée (population maximale de cellules) et déclin (baisse de la croissance voire mortalité).

A ces effets du NO₃ s'ajoute, un effet potentiel, mais contradictoire, du NO₃ sur le PIC d'*E. huxleyi*. D'un côté, en batch, dans une eau de l'Atlantique Nord avec une concentration de NO₃ proche de 0 µM, la calcification et le PIC/mL aurait été stimulés respectivement d'un facteur 2 (lors d'un ajout de 2 µM) et d'un facteur 3 (50 heures après un ajout de 1 µM de NO₃, Balch *et al.*, 1992). D'un autre côté, dans un chemostat limité en NO₃, la quantité de PIC/coccolithe fut inhibée de 25% lorsque la croissance diminua d'un facteur 3 (de 1.4 à 0.46 jour⁻¹, Paasche, 1998). Cette diminution du PIC/coccolithes traduit une diminution de la calcification suite à une baisse de NO₃ et est en accord avec la diminution de la calcification de 50% obtenue en cyclostat (20 µM de NO₃ ; Fritz, 1999). Cette diminution est cependant en opposition avec les stimulations, associées à un stress en NO₃ (25 à 8.7 µM de NO₃), de trois autres paramètres traduisant la calcification : le PIC/cell de 50% à 100% (Paasche, 1998 ; Fritz, 1999), le PIC/POC de 20% à 50% (Riegman *et al.* 1998 ; Paasche, 1998) et le nombre de coccolithes totaux/cell d'un facteur 2 (Paasche, 1998). Comment concilier le fait que les faibles NO₃ pourraient inhiber la calcification et la quantité de PIC produite par volume et par coccolithe et au contraire stimuler la quantité de PIC/cell, de PIC/POC et de coccolithes totaux/cell ? Les études existantes sur le réservoir inorganique n'ont abordé qu'indirectement la possible dépendance du réservoir de PIC vis-à-vis de la cellule organique. Il apparaît donc indispensable d'étudier les variations du réservoir inorganique dans sa totalité : coccolithes attachés, détachés et totaux, PIC par volume et par cellule, en réponse à différentes concentrations de NO₃ (stressantes et moins stressantes).

Les questions que nous adressons sont les suivantes: Le NO₃ est-il l'élément limitant de la croissance dans l'océan ? Quels sont les effets d'un manque ou d'une abondance de NO₃ sur la production du PIC et sur les différents processus impliqués durant toute la durée d'un bloom d'*E. huxleyi* ? Le stress en NO₃ stimule-t-il ou inhibe-t-il le détachement et le nombre de coccolithes libres, et par conséquent celle de blooms visibles ?

Cette étude a pour objectif de quantifier l'impact de conditions pauvres et riches en NO₃ sur la croissance et la population de cellules, la production de coccolithes attachés et détachés séparément et celle du PIC, durant les trois différentes étapes du bloom : déclenchement, apogée (phase stationnaire) et déclin.

Pour atteindre cet objectif, une expérience en laboratoire, en conditions entièrement contrôlées, de 3 ajouts de NO₃ (fort de 44 µM, faible ou modéré de 2 µM, et sans ajout) est effectuée en batch cultures, sur des cellules d'*E. huxleyi* (souche Atlantique Nord N°PML 92/B). L'expérience consiste à suivre, les effets de trois conditions d'ajouts de nitrates à partir d'un milieu de culture d'environ 0.5 µM de NO₃, sans EDTA (Acide EthylèneDiamine Tétra-acétique) et en conditions axéniques, durant 40 jours (cf. Chap.2, §I). Cette période est supposée couvrir les 3 étapes d'un bloom d'*E. huxleyi*. Ces expériences présentent les particularités de suivre l'impact du NO₃ simultanément (i) sur la population de cellules, les réservoirs de carbone organique (POC/cell) et inorganique (PIC par volume de solution, par cellule et par coccolithes) ; (ii) sur l'évolution de 3 différents réservoirs de coccolithes (attachés, libres et totaux) et (iii) sur les processus qui conduisent à la fabrication de ces réservoirs : croissance et mortalité de la population, variation de coccolithes attachés, détachés et totaux, la taille des cellules et des coccolithes, et aux processus de libération ou de détachement de coccolithes.

I. Stratégie

Les expériences d'ajouts de NO₃, ont été conduites simultanément à celles présentées pour l'étude des effets des ajouts du fer sur les réservoirs organiques et inorganiques d'*E. huxleyi*, au chapitre 2. Pour cette raison le lecteur doit se référer au chapitre 2 (§1) pour les descriptions et justifications de la stratégie et des protocoles des expériences conduites en laboratoire en batch culture en conditions entièrement contrôlées et communes pour le NO₃ et le fer. Seront décrites ci-dessous, uniquement la justification de la méthodologie spécifique aux expériences de NO₃, ainsi que les techniques analytiques n'ayant pas été utilisées pour les expériences du fer. Pour l'échantillonnage et les techniques analytiques des paramètres suivants, se référer aux paragraphes respectifs du chapitre 2 : (i) l'origine de la souche (cf. §IA1a), (ii) l'expérience d'ajouts de NO₃ (§IA1b, Fig. 3.1), (iii) la stratégie de prélèvements (Fig. 3.2), (iv) les conditions d'incubations (§IA1c et §IB5), (v) les paramètres mesurés en continu et ponctuellement (cf. §IA1d et §IA1e, Fig. 3.2 et Fig. 3.3 pour les réplicats). Enfin, pour le matériel et le milieu de culture employé : vaisselle (type et préparation, §IB1 et §IB2), solution mère d'*Emiliania huxleyi* (type et préparation, cf. §IB3 et §IB4).

A. Justifications des expériences d'ajouts de NO₃

Temps d'incubation : En dehors des expériences conduites par Paasche (1999) dans des conditions limitantes en lumière, les études en batch publiées dans la littérature concernant le réservoir de coccolithes, qu'ils soient attachés et/ou détachés, sont limitées à 15 jours (Balch *et al.* 1992, 1993). Par ailleurs, celles effectuées en chemostat (Paasche *et al.*, Riegman *et al.*, Tab. 3.2), contraignant le taux de croissance constant et positif ne permettent pas d'étudier la phase sénescence ou de déclin du bloom. Cependant, nous avons vu dans la synthèse (Chap. 1, §IIF4) que pour *E. huxleyi* les coccolithes peuvent se détacher de manière continue, durant les différentes phases de croissance. Mais, d'une phase à l'autre (démarrage du bloom, apogée et

sénescence) la proportion du détachement peut également varier (tel que suggéré ici par la relation détachement en fonction de la croissance, Fig. 3.5b). C'est pourquoi il apparaît fondamental de suivre lors des expériences ces différentes phases de croissance. Un autre argument en faveur d'une durée des expériences au-delà de la phase de croissance, est fourni par un processus de détachement, responsable *a priori* de la fabrication de coccolithes libres, qui continuerait même lorsque la croissance s'arrête (Balch *et al.* 1993). Cette augmentation de coccolithes libres, lorsque la croissance diminue ou s'annule, est supportée de plus par des observations *in situ* du bloom d'*E. huxleyi* de l'Atlantique Nord (Holligan *et al.* 1993), le seul bloom à notre connaissance à avoir été suivi *in situ* temporellement durant 13 jours. Enfin, il est également connu que le nombre de coccolithes libres varie avec l'âge du bloom : la quantité de coccolithes libres/cell, observée dans l'Atlantique Nord, varie de 10 (pour un bloom jeune de 12-15 jours) à 37 (pour un bloom âgé de 20 jours ; Balch *et al.* 1991) ; mais peut atteindre des concentrations de 300 à 1000 coccolithes libres cell⁻¹ en juillet (Fernandez *et al.* 1993). Ces observations impliquent que le nombre de coccolithes libres par cellule serait d'autant plus important que le bloom est ancien. Ainsi, pour tenir compte de la durée possible et des différentes étapes d'un bloom *comprenant les phases de croissance exponentielle, stationnaire et sénescence, il est proposé que les expériences en laboratoire soient d'une durée totale de 40 jours.*

Concentrations des ajouts de NO_3 : Trois ajouts de 3 concentrations différentes sont effectués à l'instant initial, au jour 0 des expériences en laboratoire : 0 (1 batch), 2 μM (2 batchs) et 44 μM d'ajout (3 batchs). L'intensité des ajouts a été choisie pour permettre de simuler l'effet d'une fourchette de concentrations des NO_3 correspondant à la gamme observée dans l'océan. Les concentrations en NO_3 <1 μM correspondant aux eaux de surface de régions subtropicales 30° (World Ocean Atlas, 2001) et des NO_3 >40 μM sont mesurés par exemple dans le Pacifique Nord (50°N, 170°E à 200 m de profondeur ; WOA, 2001). Les ajouts de 2 μM permettront d'atteindre des concentrations 10 fois supérieures à la constante de demi-saturation de prise des NO_3 de 0.2 μM (Riegman *et al.* 1998) ; soit théoriquement une croissance équivalente à 90% de la croissance maximale, ce qui aiderait à tester l'hypothèse d'une limitation par les NO_3 , proposée par les précédentes études (Riegman *et al.* 1998). Les ajouts initiaux de NO_3 ont été effectués au temps initial $t=0$, dans le but d'imposer des concentrations différentes sur une même population de cellules. Les ajouts s'effectuent au moment même de l'inoculation des cellules et dans une eau de mer ayant une concentration en NO_3 connue 0.5 μM . Cette étude en batch, contenant différentes concentrations initiales de NO_3 sur une même population, permet de suivre l'évolution dans le temps de ces populations et d'en déduire les différences dans l'évolution, induites uniquement par cette perturbation initiale du milieu (sans perturbation ultérieure du milieu comme dans un milieu semi-continu ou chemostat). Le temps total des expériences de 40 jours permet donc de relier la concentration initiale de NO_3 , due à l'ajout, aux populations (cellules et coccolithes), quantité (PIC et POC) et processus (croissance, détachement,...) aux différents instants de temps du bloom (phases de croissance, de sénescence et fin du bloom).

B. Techniques analytiques

De la même manière que pour les expériences des ajouts de fer, seront suivies simultanément dans ces expériences, l'évolution durant 40 jours des réservoirs particulaires (organique et inorganique) et l'évolution du dissous (ici NO_3). Les paragraphes cités en référence se rattachent au chapitre 2. Pour le comptage des cellules, des coccolithes libres et de l'estimation de la taille des cellules, des prélèvements ont été effectués tous les 2 à 4 jours (et 1 fois durant les 15 derniers jours, §IC3a). Pour l'analyse du particulaire, des filtrations à trois instants, au jour 10, 20 et 39, ont été effectuées (§IC1, Fig. 3.2). Ces filtrations sont utilisées pour : (i) le comptage des coccolithes attachés et la mesure de leur taille et de la taille des cellules (au jour 10, SEM, §IC3b) ; (ii) la concentration du Carbone Inorganique Particulaire (Calcium) et Total Particulaire (§IC3c). L'estimation de paramètres dans le particulaire, tels que la croissance des cellules

journalière et initiale, le renouvellement et le détachement des coccolithes, du POC et du PIC, a été décrite et détaillée également dans le chapitre 2 (§IC4).

1. Analyse du NO₃

L'analyse de la concentration de NO₃ des filtrats récoltés dans des tubes en verre a été effectuée par colorimétrie (à l'Université de Liverpool par Mme Murphy, technicienne dans le Département des Sciences de la Terre et de l'Océan, de l'Université de Liverpool). Cette analyse utilise une chaîne Technicon, et permet une reproductibilité de 15% (correspondant à 0.1 µM), évalué sur 3 replicats. Les échantillons ont été conservés à -25°C pendant près d'un an avant analyse.

Les résultats présentés dans ce chapitre correspondent à une concentration initiale (jour 0) de fer total dissous (Fed) autour de 0.5 ± 0.1 nM aussi bien pour les conditions d'ajouts forts de NO₃ (44 µM) que faibles (2 µM). Le fer total dissous a été analysé par polarographie (Chap. 2, §IC2b). Ces conditions initiales en fer ont été enrichies de 10 nM et ont été démontrées, comme n'étant pas limitantes pour la croissance initiale d'*E. huxleyi* (Chap. 2, §IIB1b). Toutefois, au jour 10, avec une concentration de Fed de 0.58 nM dans les deux conditions d'ajouts de NO₃, il est possible que la population maximale et la durée de la phase de croissance soient inhibées de 30% par rapport au Fed de 1.24 nM (Chap. 2, §IIB1a). Les concentrations de Fed, étant identiques lors de ces 3 expériences sur le NO₃, ne seraient pas impliquées dans les comparaisons entre les différentes expériences et peuvent donc être ignorées.

2. Paramètres calculés propres aux expériences d'ajout de NO₃

Le taux d'augmentation de la concentration des coccolithes libres (T_t), représentant la vitesse d'augmentation de la quantité de coccolithes libres entre t et $t+1$ par unité de volume. Ce paramètre est calculé selon la relation suivante :

$$T_t = (C_{t+1} - C_t) / (t+1 - t) \text{ (Eq. 3.1)}$$

avec C_t représentant la concentration de coccolithes libres par volume de solution (obtenue par microscope optique, cf. Fig. 3.1, comme indiqué au §IC3a du Chap. 2) au jour t et C_{t+1} la concentration de coccolithes libres au jour du comptage suivant.

Le nombre de coccolithes totaux par volume de solution et par cellule, représente la somme des coccolithes libres par volume (obtenue comme indiqué §IC3a du Chap. 2) et des coccolithes attachés par cellule, dénombrés au jour 10 par SEM (obtenu comme indiqué §IC3b).

II. Résultats

A. Évolution de la cellule pour différents ajouts de NO₃

1. Concentration de cellules par mL (Fig. 3.1a)

L'évolution de la concentration de cellules présente 3 phases de croissance, caractérisées par une concentration maximale qui augmente avec l'ajout, et un taux de mortalité, qui au contraire diminue avec l'ajout. Ces 3 phases de croissance sont les suivantes : **(i)** une phase de croissance proprement dite, d'augmentation de la concentration de cellules, entre le jour 0 et les jours 8 à 12, suivant l'ajout. L'apogée du bloom de population est marqué par un maximum de la concentration de cellules de $38.5 \pm 2 \times 10^4$ cells mL⁻¹, lors d'un ajout initial de NO₃ de 44 μM (jour 12), alors qu'elle est 5 et 10 fois plus faible lors de faible ajout (jour 12) et sans ajout (jour 10) de NO₃. **(ii)** Une phase dite stationnaire, parce que présentant des évolutions de la population relativement faibles (inférieures à 30%), qui s'étend selon les ajouts en NO₃, entre le jour 12-15 (fort), 8-12 (faible) et 8-10 (en absence d'ajout). Cette phase stationnaire dure donc entre 2 jours (sans ajout) et 4 jours (faible ajout). **(iii)** Enfin, une phase sénescence ou d'effondrement de la population, marquée par une diminution de la concentration de cellules entre la fin de la phase stationnaire, atteinte les jours 15, 12 et 10 et un minimum atteint les jours 20 (pour le fort NO₃) et 15 (pour faible et sans ajout). Entre ces deux périodes, l'effondrement de la population est marqué par une diminution de la concentration de cellules d'autant plus intense que l'ajout est faible : de 40%, 60% et 75% (pour respectivement fort, faible et sans ajout de NO₃). **(iv)** Remarquable est l'absence totale de cellules en absence d'ajout, alors que se forme un maximum secondaire de cellules, au-delà de la première phase de mortalité lors d'ajouts faibles (jour 20) et forts (jour 24). Ce maximum secondaire est de 35.5 cells mL⁻¹ le jour 24 lors d'ajouts forts et de seulement 4 cells mL⁻¹ le jour 20, lors d'ajouts faibles. Ce maximum de population secondaire est entre 90% et 50% du maximum principal observé durant la première phase de croissance (12 premiers jours).

2. Taux de croissance des cellules (Fig. 3.1b et c)

L'évolution du taux de croissance au cours du temps est irrégulière, mais peuvent être dégagées une tendance à la baisse tout au long de l'expérience quel que soit l'ajout, et deux phases bien distinctes (Fig. 3.1b). **(i)** Une phase de croissance proprement dite associée à un taux de croissance toujours supérieur à 0, jusqu'au jour 12 (pour le fort et faible NO₃) et au jour 10 (sans ajout). **(ii)** Au-delà de la phase de croissance (i.e. de jours 10 et 12) et jusqu'à la fin de l'expérience (le jour 39), apparaît une phase appelée de mortalité, caractérisée par des taux de renouvellement de cellules très faibles ou négatifs (Fig. 3.3c). Durant cette phase, le taux de croissance est faible, compris entre -0.14 et 0.12 jour⁻¹ lors d'ajouts forts et jusqu'à deux fois plus faible avec de faibles ajouts et sans ajout de NO₃.

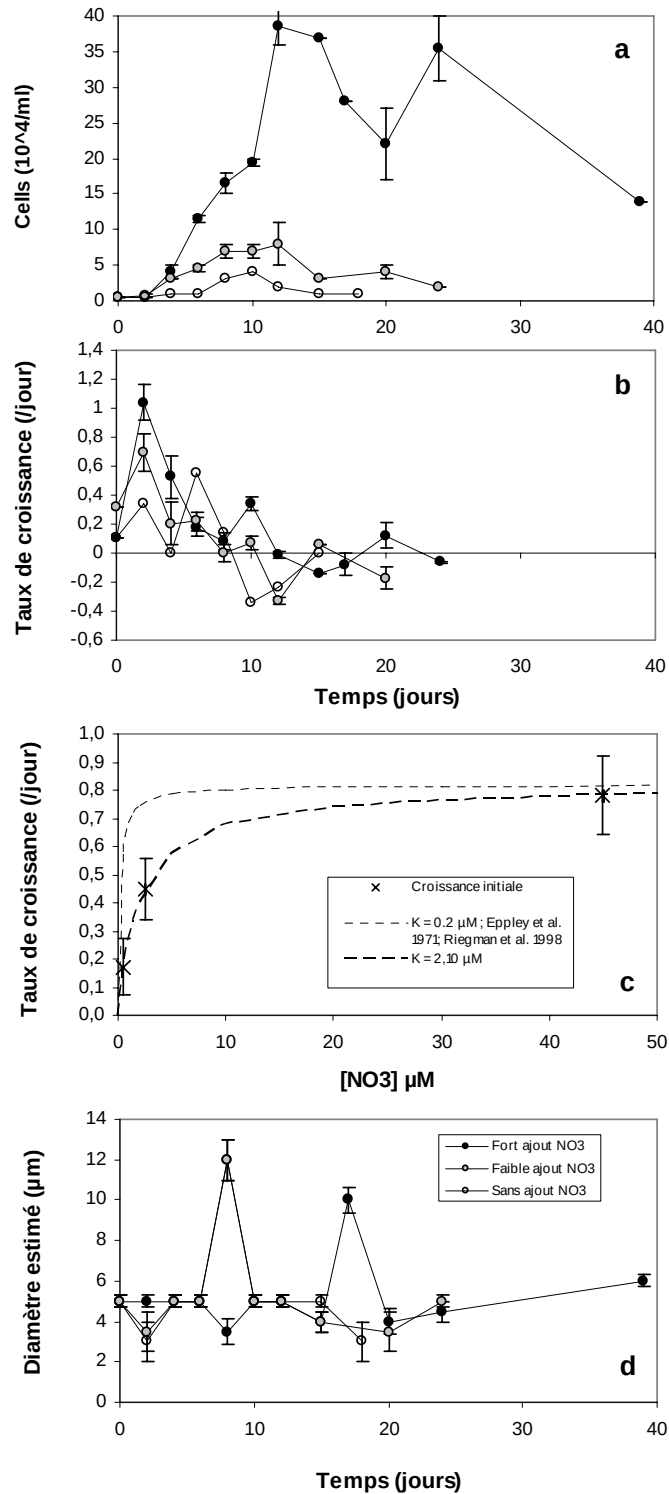


Figure 3.1 : Population et croissance des cellules dans les différentes conditions de NO_3

Pour les trois différents ajouts initiaux de NO_3 durant toute la durée de l'expérience et en fonction du temps : a) concentration moyenne de cellules par volume de milieu de culture ; b) taux de croissance des cellules (issu de la figure 3.1a ; cf. calcul Chap. 2, §IC4) ; c) taux de croissance moyen du début (jours 2 à 4 ; cf. calcul Chap. 2, §IC4) de la phase exponentielle associée à la concentration de cellules (issue de la figure 3.1a) en fonction de la concentration de NO_3 au jour 0 après enrichissement (valeurs de NO_3 dans le tableau 3.1). d) diamètre moyen des cellules estimé par microscopie optique.

Le taux de croissance initial en fonction du NO₃ est indispensable pour l'évaluation de paramètres cinétiques (saturation maximale, constante de demi-saturation de NO₃). Le taux de croissance moyen du début de la phase de croissance augmente entre les jours 2 et 4⁽¹⁰⁾ et est d'autant plus intense que l'ajout initial de NO₃ est fort (Fig. 3.1c). Le taux initial de croissance moyenne des cellules dans le batch sans ajout est très faible, de 0.17 jour⁻¹ pour une concentration initiale en [NO₃] estimée à 0.5 µM (cf. Tab. 3.1). Ce taux augmente d'un facteur 2.6 et 4.6 dans le batch à faible et fort ajout, correspondant alors respectivement à des concentrations en NO₃ de 2.55 µM et 45 µM (Tab. 3.1). L'extrapolation du profil de croissance moyenne en fonction de la concentration de NO₃ selon une courbe de Michael Menten (Fig. 3.1c) permet d'estimer un taux de saturation de la croissance (µ_{max} de 0.82 jour⁻¹) et une constante de demi-saturation (K_{1/2} de 2.1 µM).

3. Diamètre des cellules estimé par microscope optique (Fig. 3.1d)

Tout le long de l'expérience (39 jours), le diamètre estimé des cellules présente une variabilité temporelle significative. Lors de faibles ajouts et sans ajout, le diamètre moyen des cellules de 5.8 ± 0.5 µm en phase de croissance (jour 0 à 12), diminue de 25% dans la phase sénescence (jours 12 à 24). En absence d'ajout s'observent les plus petites cellules, avec un diamètre de 3 µm (jour 2), et les plus grosses, avec un diamètre de 12 µm (le jour 8). Un relatif important diamètre de 10 µm, lors de forts ajouts de NO₃, est observé dans la phase sénescence (jour 17). L'effet du stress de NO₃ produit un impact marqué sur la taille, mais est différent durant les différentes phases de croissance. Dans la phase de croissance (jours 0 à 12), le diamètre moyen, de 5.8 ± 0.5 µm pour de faibles ajouts et sans ajout, diminue de 20% lors d'ajouts forts. Par contre, dans la phase stationnaire et sénescence (jour 12 à 39), le diamètre moyen, de 5.5 ± 0.5 µm lors de forts ajouts, diminue de 20% pour de faibles ajouts et sans ajout. Le diamètre est le plus grand lors d'ajouts faibles, durant la phase de croissance ; et au contraire lors d'ajouts forts, durant les phases stationnaire et sénescence.

Ces résultats suggèrent que l'intensité de NO₃ joue un rôle important sur la population de cellules, leur croissance et leur diamètre. Mais cette influence de NO₃ est différente pour chaque paramètre et varie en fonction des phases de croissance. La population de cellules connaît une évolution similaire mais d'intensité différente au cours du temps pour les trois concentrations de NO₃, et permet de distinguer deux phases importantes. Une phase d'augmentation de la population (jours 0 à 12), associée à un taux de croissance positif, mais qui diminue rapidement (à partir du jour 4) jusqu'au jour 12. Une phase sénescence (entre les jours 15 et 24) durant laquelle la population diminue, associée à un taux de croissance proche de zéro ou négatif. L'intensité de l'ajout stimule la croissance, la population maximale ainsi que la durée entre le démarrage du bloom de cellules et le moment de leur effondrement. La mortalité est au contraire inhibée par l'intensité de l'ajout. Les faibles NO₃ ou fort stress, joueraient un rôle important en réduisant d'un facteur 10 la population maximale de cellules, d'un facteur 4 le taux de croissance et en augmentant la taille de la coccosphère d'un facteur 2 durant la phase de croissance ; mais la réduisant d'un facteur 2 durant la phase sénescence.

¹⁰ : Le taux de croissance au jour 0 n'est pas considéré puisque issu d'une estimation de la concentration de cellule à partir de l'inoculation de la solution mère (cf. chapitre 2, §IB4).

B. Évolution de coccolithes pour différents ajouts de NO_3

1. La coccosphères et les coccolithes attachés et totaux (Fig. 3.2)

Le diamètre mesuré des coccosphères à partir de photos de coccosphères au SEM, permet d'observer leur aspect et leur degré de calcification, d'évaluer leur taille « réelle » et de la comparer à celle estimée par microscope optique. Le diamètre de la coccosphère issu du SEM, de $5.5 \mu\text{m}$ lors de forts ajouts en NO_3 (Fig. 3.2a) est similaire à celui estimé par microscope optique, quel que soit l'ajout (Fig. 3.1d). Cependant, le diamètre par microscope optique, est 30% plus faible que celui obtenu par SEM lors d'ajouts faibles (Fig. 3.2b). Il apparaît donc que la taille réelle (déterminée à partir du SEM) est différente de celle estimée le jour 10 (diamètre issu du microscope optique), à l'issue de la phase exponentielle de croissance.

Afin d'analyser les causes de ces différences de taille entre le SEM et le microscope optique, sont comparées leurs valeurs, à divers jours, obtenues lors de nos expériences en laboratoire avec celles issues d'expériences antérieures. Le fort diamètre de cellules, de $12 \mu\text{m}$, estimé le jour 8 (Fig. 3.1d) pour de faibles ajouts de NO_3 , est en accord avec la photo SEM prise 2 jours plus tard (jour 10, Fig. 3.2b), et suggère que les cellules auraient encore (ie. au jour 10) une taille importante. De même, la forte taille estimée, de $10 \mu\text{m}$, des cellules à fort ajout de NO_3 le jour 17, est en accord avec une reprise de la croissance visible uniquement trois jours plus tard (Fig. 3.1a). Cette reprise de la croissance, entre les jours 20 et 24, suppose que les cellules aient accumulé suffisamment de matière pour que la division cellulaire puisse avoir lieu. Toutefois, la présence de ces grosses cellules (de 12 et $10 \mu\text{m}$ au jour 8 et 17) pourrait être la conséquence d'une observation effectuée tôt dans la matinée (8-9h du matin) ; alors que la division cellulaire n'avait probablement pas encore eu lieu. Ceci implique que les cellules n'avaient pas encore partagé leurs coccolithes à l'issue de la division cellulaire (Linschooten et al. 1991). La taille estimée au microscope optique ne correspondrait pas exactement à la taille de la coccosphère, puisque ces contours ne sont pas totalement bien délimités à l'œil nu, et par conséquent non détectés au microscope optique. En conséquence, la taille estimée peut alors être représentative plutôt de la taille de la cellule organique et non pas de la coccosphère.

a



b

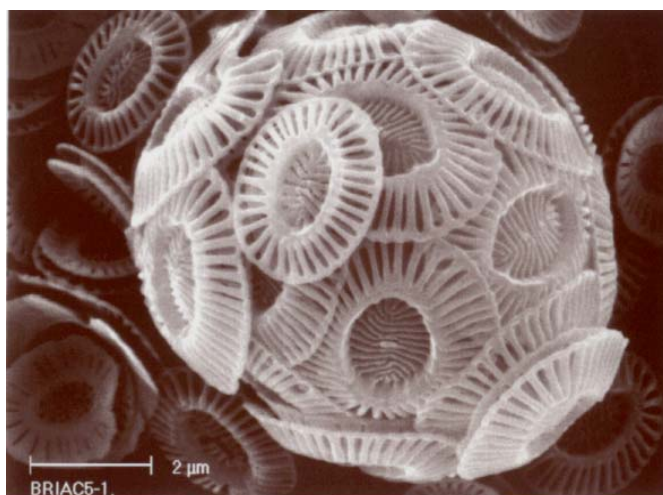


Figure 3.2 : Aspect des coccosphères au microscope électronique dans les différentes conditions de NO_3 . Clichés d'une cellule type dans la culture à fort (a- gauche) et faible (b- droite) ajout initial de NO_3 , pris à l'issue de la phase exponentielle de croissance (jour 10) par SEM (Scanning Electron Microscopy).

D'après ces images du SEM, il est possible également d'estimer *le nombre de coccolithes attachés* autour de la cellule. Ce nombre est, au jour 10, d'environ 14 coccolithes attachés cell⁻¹ pour de forts ajouts et de 23 coccolithes attachés cell⁻¹ lors de faibles ajouts (Tab. 3.1). Cette accumulation, produite lors de forts et faibles ajouts de NO₃, correspondrait à une coccosphère formée, respectivement, de 1 ou 2 couches (Fig. 3.2a) et d'au moins 3 couches (Fig. 3.2b) de coccolithes superposées.

Concernant *l'aspect des coccolithes*, les coccolithes sont bien formés et complètement calcifiés dans les deux conditions d'ajouts en NO₃. La longueur, entre 2.5 et 4 µm, et le degré de calcification des coccolithes, ainsi que le nombre « d'inner-éléments », représentant les bâtonnets parallèles disposés en couronne autour du coccolithe (Westbroeck *et al.* 1984) sont très hétérogènes dans le cas d'ajouts faibles (Fig. 3.2b) et comparativement à ceux observés lors d'ajouts forts (Fig. 3.2a). De forts (Fig. 3.2a) aux faibles (Fig. 3.2b) ajouts de NO₃, les coccolithes sont en moyenne 15% plus petits, moins densément calcifiés, et la partie centrale où se joignent les « inner-éléments » est moins épaisse et présente moins de dépôt de calcite. La taille moyenne (de 3.5 µm lors d'ajouts forts) est réduite de 15% et la densité de la calcite du centre des coccolithes est plus faible, lors d'un faible ajout de NO₃. La conséquence est que les faibles NO₃ inhiberaient le contenu de calcite et diminueraient le degré de calcification des coccolithes ; alors que les forts NO₃ au contraire augmenteraient le degré de calcification et la taille de coccolithes.

Le rapport des *coccolithes totaux /cell attachés + détachés /cell* est maximal lors d'ajouts faibles en NO₃, avec des valeurs aux jours 10 et 20 de 50 et 152 coccolithes cell⁻¹ (Tab. 1). Aux mêmes jours, la quantité totale de coccolithes totaux/cellule représente 50% et 20% lors d'un fort ajout et jusqu'à 80% et 60% sans ajout comparativement à leurs concentrations maximales obtenues lors de faibles ajouts (Tab. 3.1). La quantité totale de coccolithes (attachés + détachés) par cellule serait donc stimulée aux modérément faibles NO₃ (faible ajout). Cette réponse est similaire à celle de la quantité de coccolithes attachés (Fig. 3.2) et libres/cell (présentée Fig. 3.4a, §IIB3).

2. Population de coccolithes libres

La concentration de coccolithes libres/mL (Fig. 3.3a) augmente de manière continue au cours du temps quel que soit l'ajout, mais atteint des concentrations en fin d'expérience qui sont d'autant plus fortes que l'ajout est important. La concentration de coccolithes libres, initialement identique dans tous les batchs, et avec une concentration estimée à 4 x10⁴ coccolithes libres mL⁻¹, évolue avec le temps de façon différente avec ou sans ajout de NO₃. Son augmentation, lors des 15 premiers jours, est de 32 x10⁴ coccolithes libres mL⁻¹ jour⁻¹, et concomitante que l'ajout soit faible ou fort et elle est 5.6 fois plus intense qu'en absence d'ajout. Au jour 15, la concentration de coccolithes libres présente une stagnation quel que soit l'ajout de NO₃. Ce palier correspond à une concentration de coccolithes libres/ml 120 fois supérieure, pendant 2 et 5 jours (ie. entre les jours 15 et 20) lors de forts et faibles ajouts, et de seulement un facteur 20 pendant 3 jours en absence d'ajout, et comparativement à leur concentration initiale. Lors de forts ajouts, entre les jours 17 et 24, se produit une augmentation de 665 x10⁴ coccolithes libres mL⁻¹, ie. 37% plus importante et 2 fois plus rapide que celle observée durant les 15 premiers jours. Cette augmentation du nombre de coccolithes libres est également 6.6 fois plus intense que celle observée lors de faibles ajouts. Au-delà du jour 24, la concentration de coccolithes libres dans le cas de forts ajouts, continue d'augmenter et atteint une concentration maximale de 1630 x10⁴ coccolithes mL⁻¹ à la fin de cette expérience (jour 39). Lors d'ajouts faibles et forts, la concentration de coccolithes libres à la fin de la phase de croissance des cellules (jours 10 et 12 ; cf. Fig. 3.1a), représente moins de 50% de leur concentration maximale (575 et 1630 x10⁴ coccolithes mL⁻¹) observée à la fin des expériences (jours 24 et 39). Ceci implique que la concentration la plus intense de coccolithes libres est toujours observée à la fin

des expériences (phase sénescence) et que dans cette phase, elle est d'autant plus intense que l'ajout de NO_3 est fort.

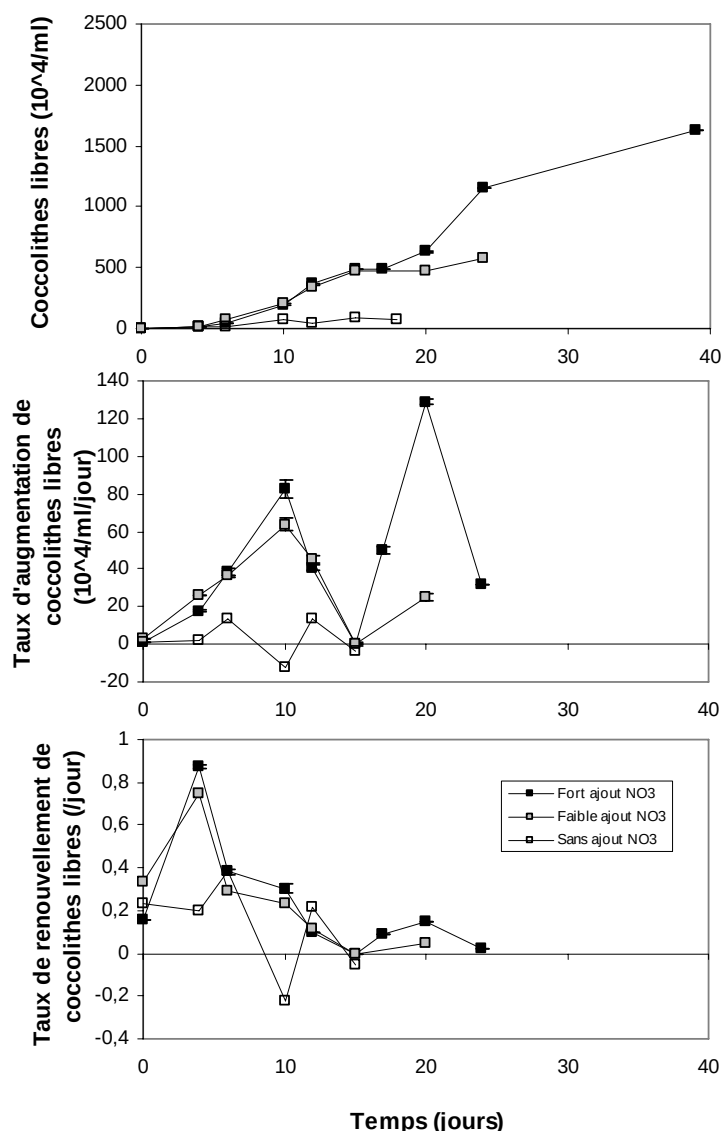


Figure 3.3 : Population et processus de détachement de coccolithes dans les différentes conditions de NO_3

Pour les trois différents ajouts initiaux de NO_3 pour toute la durée de l'expérience et en fonction du temps : a) concentration de coccolithes libres par volume de milieu de culture ; b) vitesse d'augmentation journalière de la concentration de coccolithes libres par volume de milieu de culture (issue de la figure 3.3a ; cf. Chap. 2, §IC4) ; c) taux de renouvellement des coccolithes libres ou vitesse d'augmentation journalière de la concentration de coccolithes libres (issue de la figure 3.3b) normalisée par coccolithe libre (issue de la figure 3.3a ; cf. pour le calcul Chap. 2, §IC4).

L'évolution de la vitesse ou *taux d'augmentation du nombre de coccolithes libres mL^{-1}* (Fig. 3.3b) présente deux maxima d'intensité du même ordre de grandeur. Les intensités de ces maxima et le moment de leur intervention sont différents en présence et en absence d'ajout de NO_3 . En absence d'ajout, le taux d'augmentation de coccolithes libres reste faible tout le long de cette expérience (jours 0 à 15). Les 2 maxima, d'intensité équivalente de $13.5 \pm 0.5 \times 10^4$ coccolithes libres $\text{mL}^{-1} \text{ jour}^{-1}$, se produisent aux jours 6 et 12. Ces maxima sont séparés par un minimum de -15.5×10^4 coccolithes libres $\text{mL}^{-1} \text{ jour}^{-1}$, qui intervient le jour 10. Les *taux négatifs observés aux jours 10 et 15 peuvent être dus à une dissolution des coccolithes (ne pouvant pas être confirmée parce que la dissolution n'a pas été mesurée durant cette expérience)*. Avec un ajout de NO_3 faible ou fort, le taux d'augmentation de la concentration de coccolithes libres peut se décomposer en trois phases marquées par les deux maxima des jours 10 et 20, et le minimum du

jour 15. **(i)** Une première phase, depuis le début de l'expérience où le taux d'augmentation de coccolithes augmente de façon continue et similaire quel que soit l'ajout jusqu'à un maximum au jour 10. Cette phase est caractérisée par un faible taux d'augmentation de coccolithes libres ($< 3 \times 10^4$ coccolithes libres mL⁻¹ jour⁻¹) au jour 0, et une augmentation jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance (jour 10), où le taux d'augmentation atteint des valeurs de 64 et 83 $\times 10^4$ coccolithes libres mL⁻¹ jour⁻¹ pour respectivement un ajout faible et fort (ie. presque 30 fois supérieur au taux d'augmentation du début de cette phase). **(ii)** Une seconde phase, entre les jours 10 et 15, où le taux de production de coccolithes diminue de façon continue et similaire quel que soit l'ajout, et à l'issue de laquelle ce taux est nul. **(iii)** Le second maximum produit le jour 20, correspond à un taux d'augmentation de la concentration de coccolithes libres de 25 et 129 coccolithes jour⁻¹ pour de faibles et forts ajouts. Le taux maximal d'augmentation de la concentration de coccolithes libres de toute l'expérience est donc atteint lors d'ajouts forts de NO₃. Il est observé lors de la deuxième phase d'augmentation (jour 20), et est 50% supérieur à l'augmentation observée lors de la première phase (jour 10).

Le *taux de renouvellement des coccolithes libres* (Fig. 3.3c), de même que le taux d'augmentation de coccolithes libres, présente deux maxima, quel que soit l'ajout en NO₃. Le deuxième maximum (jour 20) est un ordre de grandeur plus faible que le premier (jour 4), et leur intensité augmente avec l'ajout de NO₃. Le premier maximum du renouvellement de coccolithes correspond à la phase de croissance de cellules (Fig. 3.1a). Il est de 0.87 et 0.75 jour⁻¹, le jour 4, lors de respectivement un ajout faible et fort, et atteint un taux 50% plus faible, le jour 6, en absence d'ajout. A partir de ce maximum, le taux de renouvellement diminue pour atteindre une valeur nulle le jour 15 quel que soit l'ajout. Ce minimum de renouvellement correspond à la phase de stagnation de la concentration de coccolithes libres observée lors de deux, forts et faibles ajouts (Fig. 3.3a). Le deuxième maximum, du jour 20, est caractérisé par un taux de renouvellement de coccolithes libres de 0.15 jour⁻¹ lors d'ajouts forts (ie un facteur 6 plus faible que le premier maximum de renouvellement du jour 4) et qui diminue d'un facteur 3 lors que l'ajout est faible. Le renouvellement de coccolithes libres se ferait donc de manière plus intense lorsque l'ajout de NO₃ est intense et majoritairement durant les 10 premiers jours de croissance d'*E. huxleyi*.

3. Paramètres liés à la production de coccolithes libres

La concentration de coccolithes libres par cellule (Fig. 3.4a) augmente tout le long de l'expérience et est maximale lors d'ajouts faibles. Cette augmentation se décompose en deux phases : **(i)** du début de l'expérience jusqu'au jour 12 (phase de croissance des cellules, Fig. 3.1a), l'augmentation de la quantité de coccolithes libres par cellule lors d'ajouts forts, est d'environ 1 coccolithe libre par cellule de plus par jour. Cette augmentation est plus intense d'un facteur 4 et 2 lors de faibles ajouts et en absence d'ajout, et conduit au jour 12 à des concentrations relativement fortes de respectivement 42.5 et 22.5 coccolithes libres cell⁻¹. **(ii)** A partir du jour 12 et jusqu'à la fin de l'expérience, l'augmentation de la quantité de coccolithes libres par cellule est 4 fois plus intense que durant la première phase, et cela quel que soit l'ajout. Cette augmentation est régulière, de 4 coccolithes par cellule de plus par jour lors d'ajouts forts et son intensité augmente d'un facteur 5 et 2 dans des conditions de faibles ajouts et en absence d'ajout. La fin de l'expérience est marquée ainsi par un maximum de coccolithes libres par cellule quelle que soit l'intensité de l'ajout. Ce maximum atteint, 290 coccolithe cell⁻¹ au jour 24 lors d'ajouts faibles, et il est d'un facteur 2.5 et 3.5 plus faible lors d'ajouts forts (jour 39) et en absence d'ajout (jour 15). Le jour 15, la concentration de coccolithes libres cell⁻¹ est de 158 lors d'ajouts faibles (Fig. 3.4a) ; soit une concentration 2 à 12 fois plus forte qu'en absence et lors de fort ajout de NO₃. Cette stagnation de coccolithes libres/cell correspond à un plateau de stagnation de la quantité de coccolithes libres/mL (Fig. 3.3a) et est également associée à un taux d'augmentation de la concentration de coccolithes libres qui est nul (Fig. 3.3b).

L'évolution du *taux de détachement de coccolithes* (Fig. 3.4b) dépend de l'ajout en NO₃. Sans ajout, le taux de détachement varie de manière importante entre -4 et 14 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ du début jusqu'à la fin de l'expérience. Néanmoins, peut être dégagée une tendance moyenne à la baisse de 0.5 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹, et qui couvre la durée totale de cette expérience (15 jours). Avec des ajouts de NO₃, l'évolution du taux de détachement peut se décomposer en 3 phases. **(i)** Entre les jours 0 et 10, le taux de détachement est constant quel que soit l'ajout et en moyenne de 8.2 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ lors d'ajouts faibles, soit 2 fois plus intense qu'en absence ou lors d'ajouts forts. **(ii)** Entre les jours 10 et 15, le taux de détachement diminue de 9.1 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ lors d'ajouts faibles et de 4.2 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ lors d'ajouts forts et devient nul le jour 15. Ce taux de détachement nul du jour 15 correspond à la même phase de stagnation observée pour la concentration de coccolithes libres/mL (Fig. 3.3a). **(iii)** La dernière phase, entre les jours 15 et 24, est marquée par un maximum, le jour 20, de 6 ± 0.2 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ pour les deux intensités d'ajouts de NO₃. Lors de forts ajouts, le jour 24, est marqué par un taux de détachement faible (<1 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹) mais qui apparaît lié à une faible augmentation de 480 coccolithes libres mL⁻¹ qui a lieu durant 15 jours (entre les jours 24 et 39, Fig. 3.3a). Le taux de détachement est le plus intense durant les 10 premiers jours du bloom et est deux fois plus intense avec de faibles ajouts qu'avec de forts ajouts de NO₃.

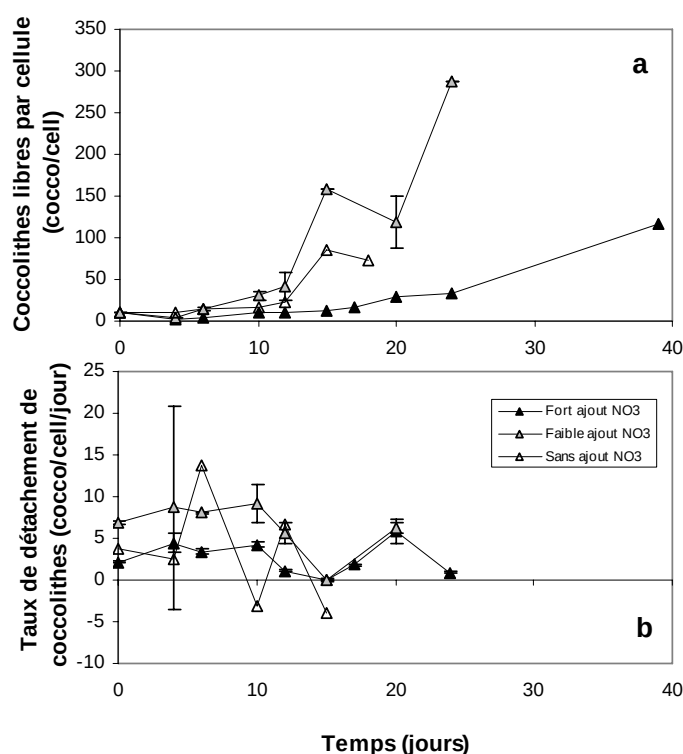


Figure 3.4 : Paramètres liés au détachement des coccolithes dans les différentes conditions de NO₃

Pour les trois différents ajouts initiaux de NO₃ pour toute la durée de l'expérience et en fonction du temps : a) quantité de coccolithes libres normalisée par cellule (calcul issu du rapport entre la concentration de coccolithes libres par volume -Fig. 3.3a- et la concentration de cellules par volume -Fig. 3.1a-) ; b) taux de détachement des coccolithes ou vitesse d'augmentation journalière de la concentration de coccolithes libres (issu de la figure 3.3a) normalisée par cellule (issue de la figure 3.1a ; cf. pour le calcul Chap. 2, §IC4)

Le nombre de coccolithes libres /mL et de coccolithes /cell augmentent tout au long de l'expérience quel que soit l'ajout de NO₃. Le jour 15 est particulier et marque une stagnation de la population de coccolithes, associée à des taux de renouvellement et de détachement de coccolithes nuls quel que soit l'ajout. Entre le début (jour 0) et cette stagnation (jour 15), le nombre de coccolithes /mL augmente de manière similaire que l'ajout soit fort (44 µM) ou faible (2 µM). Cette première période est marquée par i) un taux de renouvellement de coccolithes libres initial et une taille des coccolithes inférieure de 20% et 15% ; ii) un détachement de coccolithes, un nombre de coccolithes attachés et une taille des coccosphères d'un facteur 2, 1.8 et 1.4 plus intense lorsque l'ajout est faible. Alors que la quantité de

coccolithes /mL augmente au même rythme lors de la première période pour les deux intensités d'ajouts, la quantité de coccolithes/cell est au contraire 8 fois supérieure aux faibles et sans ajout qu'aux forts ajouts de NO₃. Au-delà de la stagnation (jour 15), l'augmentation du nombre de coccolithes/mL reprend, lors de forts NO₃, à un rythme similaire à celui de la première période. Cette reprise est associée à un détachement similaire ; mais à un taux de renouvellement d'un ordre de grandeur plus faible que ceux observés durant la première période de production de coccolithes (jour 0 à 14). Durant la phase sénescence de cellules, sont observées les plus grandes concentrations de coccolithes libres par mL et par cellule. Mais, alors que les coccolithes/mL sont maximales lorsque l'ajout est fort, c'est l'effet contraire qui est observé pour les coccolithes/cell (plus abondants à la fin de l'expérience lorsque l'ajout de NO₃ est faible).

C. Évolution pour différents ajouts du Carbone Total, Carbone Organique et Carbone Inorganique (Tab. 3.1)

1. Quantités de Carbone par volume de solution

Le jour 10, le *TPC/mL*, de 2.77 µg mL⁻¹ lors d'ajouts faibles, est 20% supérieur à celui obtenu lors d'ajouts forts. Entre les jours 10 et 20, le *TPC/mL* diminue d'un facteur 10⁽¹¹⁾ lors d'ajouts faibles, alors qu'il augmente de 25% lors d'ajouts forts. Ainsi, dans la phase sénescence (jour 20), le *TPC/mL* lors d'ajouts faibles, de 0.20 µg mL⁻¹, augmente d'un facteur 15 lorsque l'ajout est fort. L'effet du stress en NO₃ sur le *TPC/mL* à l'issue de la phase de croissance (jour 10) est opposé à celui en phase sénescence (jour 20). Un faible ajout en NO₃ stimule le *TPC/mL* au jour 10, mais l'inhibe au jour 20.

Le jour 10, le *POC/mL*, de 2.65 µg mL⁻¹ lors d'ajouts faibles, est 65% plus intense que celui observé lors de forts ajouts. Entre les jours 10 et 20, le *POC/mL* diminue de presque 100% lors d'ajouts faibles, mais de seulement 20% lors ajouts forts. Cette réponse du *POC/mL* est contraire à celle du *TPC/mL* qui augmente lors de faibles ajouts. Dans la phase sénescence, le *POC/mL*, de 0.05 µg mL⁻¹ lors d'ajouts faibles, augmente d'un facteur 25 lors d'ajouts forts. L'effet du stress en NO₃ sur le *POC/mL*, va dans un sens similaire à celui sur le *TPC/mL* mais il est 2 fois plus intense. Le stress stimule le *POC/mL* lors de la phase de croissance mais l'inhibe lors de la phase sénescence.

Le jour 10, le *PIC/mL*, de 0.76 µg mL⁻¹ lors d'ajouts forts, diminue d'un facteur 6 et 15 lors de faibles ajouts et sans ajout. Entre les jours 10 et 20, le *PIC/mL* augmente d'un facteur 2 lors d'ajouts forts et de seulement 25% lors d'ajouts faibles ; alors qu'il diminue de 40% en absence d'ajout. Ainsi, dans la phase sénescence (jour 20), le *PIC/mL*, de 1.62 µg mL⁻¹ lors d'ajouts forts, diminue d'un facteur 10 et 50 lors de respectivement faibles ajouts et sans ajout. Enfin, il est à noter qu'entre les jours 20 et 39, et pour les forts ajouts le *PIC/mL* reste du même ordre de grandeur. Le stress en NO₃ inhiberait le *PIC/mL* quelle que soit la phase, mais cette inhibition serait 2 fois plus intense dans la phase sénescence (jour 20) que dans la phase de croissance (jour 10).

2. Carbone par cellule et Quota de PIC

L'effet du stress en NO₃ sur le *POC/cell* est similaire à celui sur le *POC/mL*. Au jour 10, le *POC/cell*, de 33.1 pg cell⁻¹ lors d'ajouts faibles de NO₃, est 4 fois plus intense que lors d'ajouts

¹¹ : Les très faibles valeurs au jour 20, lors d'ajout faible seraient probablement dues à une dégradation de la matière organique de cet échantillon survenue à cause d'un stockage trop long (1 an).

forts. Entre les jours 10 et 20, le POC/cell diminue lors de forts ajouts ; mais d'un facteur 20 et 10 fois moins intensément qu'avec faibles ajouts. Ainsi, dans la phase sénescence, le POC/cell, de 1.67 pg cell⁻¹ lors d'ajouts faibles, est d'un facteur 2 plus intense qu'avec ajouts forts. Les faibles ajouts stimuleraient le POC/cell durant les deux phases, celle de croissance et celle de sénescence.

Au jour 10, le *PIC/cell*, avec 3.8 pg cell⁻¹ lors de forts ajouts, diminue d'un facteur respectivement de 2.5 et 3 lors de faibles ajouts et sans ajout. Quelle que soit la concentration de NO₃, le PIC/cell augmente entre les jours 10 et 20, de 15% lors d'ajouts forts. Ainsi, l'augmentation du PIC/cell lors d'ajouts forts est moins intense d'un facteur 6 et 3 à l'augmentation respectivement aux faibles ajouts et sans ajout. Au jour 20, le PIC/cell de 4.38 ± 0.6 pg cell⁻¹, est très différent de celui du jour 10, il est du même ordre de grandeur aux faibles et forts ajouts, mais plus faible d'un facteur 1.5 en absence d'ajout. Enfin, entre les jours 20 et 39, et contrairement au PIC/mL, le PIC/cell augmente de 50% lors d'ajouts forts. Ainsi, le stress modéré en NO₃ inhiberait le PIC/cell en phase de croissance marquant alors un effet contraire à celui sur le POC/cell. Uniquement un très fort stress en NO₃ inhiberait, en phase sénescence, le PIC/cell.

Deux types de quotas peuvent être analysés, le *PIC/POC* et le *PIC/coccolithe*. Au jour 10, le PIC/POC, de 0.47 mol mol⁻¹ lors d'ajouts forts, diminue d'un facteur 10 lors d'ajouts faibles. Entre les jours 10 et 20, le PIC/POC augmente d'un facteur 2.6 lors d'ajouts forts et cette augmentation est 30 fois plus intense lors d'ajouts faibles. Ainsi, le jour 20, le PIC/POC, de 1.23 mol mol⁻¹ lors d'ajouts forts, diminue d'un facteur 2.5 lorsque l'ajout diminue. Le stress en NO₃ inhiberait le PIC/POC dans la phase de croissance et le stimule dans la phase sénescence. Cet effet est similaire à celui sur le PIC/cell et contraire à celui sur le POC/cell.

Le jour 20, le PIC/coccolithe, de 0.14 pg coccolithe⁻¹ lors d'ajouts forts, diminue d'un facteur 5 lorsque l'ajout diminue. En absence de mesures directes, *les mêmes valeurs et la même tendance du PIC/coccolithe au stress en NO₃ sont supposées a priori à la fin de la phase de croissance. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'à faibles comme à forts ajouts, la concentration de NO₃ au jour 10 (de 1.8 et 22.5 μM) est similaire à celle du jour 20 (de 2.6 et 19.5 μM ; Tab. 3.1).* Entre les jours 20 et 39 pour des ajouts forts, le PIC/coccolithe est divisé par 2 mais la concentration totale en PIC/mL reste du même ordre de grandeur. La réponse du PIC au stress en NO₃ dans la phase sénescence, lorsqu'est considérée sa normalisation par coccolithe, répond dans le sens d'une inhibition. Cette inhibition est contraire à la stimulation que produisent les faibles NO₃, tant sur le PIC/mL comme sur le PIC/cell.

En conclusion, l'intensité de NO₃ produit un effet important à la fois sur le rapport PIC/POC de même que sur le PIC/mL et le PIC/cell et PIC/coccolithe ; mais qui est différent en fonction des phases de croissance. A l'issue de l'expérience (jour 20), les forts ajouts conduisent à produire 10 fois plus de PIC/mL que les faibles ajouts. De même les coccolithes apparaissent, d'après leur contenu en PIC, 5 fois plus calcifiés lors de forts que lors de faibles ajouts de NO₃. La réponse du PIC au stress en NO₃ dans la phase sénescence, lorsqu'est considérée sa normalisation par coccolithe, va dans le sens d'une inhibition. Cette inhibition est contraire à la stimulation que produisent les faibles NO₃, tant sur le PIC/mL que sur le PIC/cell. Le stress stimule également le POC/mL, le POC/cell et le TPC/mL lors de la phase de croissance; cet effet est deux fois plus intense sur le POC que sur le TPC et contraire à celui sur le PIC/mL. Le PIC/POC aurait tendance à augmenter au cours du temps ; mais durant la phase de croissance il reste d'un ordre de grandeur plus faible lors de faibles ajouts, et devient au contraire 2 fois plus intense par rapport au PIC/POC obtenu aux forts ajouts durant la phase sénescence. Le faible PIC/POC associé aux faibles NO₃, pourrait être dû à un POC /mL, qui est maximal et 4 fois plus important durant la phase de croissance ; mais qui disparaît presque totalement durant la phase sénescence.

Tableau 3.1 : Carbone particulaire organique et inorganique dans les différentes conditions de NO₃

Concentration en carbone organique, inorganique et total associée à la quantité de cellules et de coccolithes (attachés, détachés et totaux) pour chacun des batchs analysés par filtration (cf. Chap. 2, §IC3) dans les trois conditions expérimentales de NO₃ et échantillonnée pour différentes phases de croissance, état initial (jour 1), fin de phase de croissance (jour 10) et phase sénescence (jour 20 et 39).

Jour Expérience	NO ₃ Ajout	[NO ₃] μmol/L	Cellules		Coccolithes			Total μg /ml	PIC Cellule pg /cell	Coccolite pg /cocco	TPC Total μg /ml	POC		PIC/POC Total mol /mol
			Libres x10 ⁴ /ml	Détachés x10 ⁴ /ml	Attachés /cell	Totaux x10 ⁴ /ml	Totaux /cell					Total μg /ml	Cellule pg/cell	
0	Fort	~45	0.4 (a)	4 (a)	15 (b)			-	-	-	-	-	-	-
	Faible	2,55	0.4 (a)	4 (a)	15 (b)			-	-	-	-	-	-	-
	Sans	~0.5	0.4 (a)	4 (a)	15 (b)			-	-	-	-	-	-	-
10	Fort	22,5	20 +/- 5	260 +/- 30	14 +/- 1	540	27	0.76 +/- ? (c)	3.8 +/- ?	0.14 +/- ? (g)	2.37 +/- ?	1.61 +/- ? (h)	8.05 +/- ? (h)	0.47 +/- ? (h)
	Faible	1,8	8 +/- 2	220 +/- 20	23 +/- 1	404	50	0.12 +/- ? (c)	1.52 +/- ?	0.03 +/- ? (g)	2.77 +/- ?	2.65 +/- ? (h)	33.1 +/- ? (h)	0.04 +/- 0.09 (h)
	Sans	~0.5	4 +/- 1	70 +/- 10	23 (b)	162	40	0.05 +/- ? (d)	1.22 +/- ?	0.03 (g)	-	-	-	-
20	Fort	19,5	37 +/- 5	600 +/- 60	5 +/- 2 (b)	1155	31	1.62 +/- ?	4.38 +/- 0.6	0.14 +/- 0.02 (e)	2.94 +/- ?	1.32 +/- 1.7	3.57 +/- 5	1.23 +/- 0.4
	Faible	2,6	3 +/- 1	410 +/- 30	5 +/- 2 (b)	455	152	0.15 +/- ?	5.00 +/- 1.7	0.03 +/- 0.004 (e)	0.20 +/- ?	0.05 +/- 4	1.67 +/- 100	3 +/- 100
	Sans	~0.5	1 +/- 1	73 +/- 10	15 (b)	88	88	0.03 +/- ? (d)	3.00 +/- ?	0.03 (f)	-	-	-	-
39	Fort	16,5	24 +/- 5	1680 +/- 115	5 +/- 2 (b)	2040	85	1.59 +/- ?	6.63 +/- 1.4	0.08 +/- 0.02 (e)	-	-	-	-
	Faible		-	-	-			-	-	-	-	-	-	-
	Sans		-	-	-			-	-	-	-	-	-	-

NO₃ ajout : Fort quand 44 μM NO₃ ; Faible quand 2 μM ; sans quand 1 μM a été ajouté au début de l'expérience

En gras : Valeurs mesurée

En italique : Estimations ou calculs

(a) valeurs théorique 1ml de solution mère dans 30ml de la culture

(b) valeur provenant de la taille estimée des cellules Figure 1b

(c) valeur calculée à partir du nombre de coccolithes et de l'estimation de PIC /coccolithes

(d) valeur calculée à partir des estimations du nombre de coccolithes et de PIC /coccolithes

(e) valeur calculée à partir de la quantité de PIC Total et de l'estimation du nombre de coccolithes

(f) valeur estimée égale à l'estimation dans la culture avec High stress dans la même phase de croissance

(g) valeur de l'estimation des mêmes cultures dans la phase stationnaire

(h) valeur provenant de la quantité de TPC Total et de l'estimation de PIC Total

III. Discussion

Lors des trois expériences conduites en conditions entièrement contrôlées, deux types de régimes de bloom peuvent être dégagés suivant la concentration de NO_3 :

(i) Lors de fortes concentrations de NO_3 , le bloom est associé à un maximum de cellules et de coccolithes/mL, et de fortes concentrations de PIC/mL et de POC/mL. Ce bloom, produit lors de forts ajouts de NO_3 , est associé à un taux de croissance de cellules, un renouvellement initial de coccolithes libres, un PIC/cell, un PIC/coccolithe et une taille des coccolithes tous stimulés par rapport à ceux observés lors de faibles ajouts de NO_3 . Ces conditions créées par de forts ajouts de NO_3 conduiraient donc à former à la fois un intense bloom de population de cellules et les plus intenses concentrations de PIC.

(ii) Quelle que soit la concentration de NO_3 , un bloom de coccolithes apparaît durant les 15 premiers jours, et est plus intense en terme de coccolithes/cell. Ce bloom est associé à un taux de détachement, une quantité de coccolithes/cell, une taille des coccosphères, un POC/mL, plus intenses, lors de faibles ajouts que de forts ajouts de NO_3 . Remarquable est le plus grand nombre de coccolithes libres/mL produit à la phase sénescence (20 derniers jours de l'expérience), et le plus grand nombre de coccolithes libres par cellules correspond aux plus faibles concentrations de NO_3 . Des conditions très stressantes en NO_3 ne produiraient ni l'un ni l'autre des blooms. En effet, sans ajout de NO_3 , tant la population de cellules, leur croissance, le détachement que le renouvellement de coccolithes et leur contenu en PIC, restent très faibles.

Les questions qui se posent alors sont : quels seraient les processus responsables des différentes situations de blooms : forts coccolithes/forte population de cellules (phase de croissance) et fort coccolithes/faible population de cellules ? Quels seraient les processus qui conduisent à la forte production du PIC observée à forts ajouts de NO_3 ? Pour répondre à ces questions, sera tout d'abord analysé l'effet des diverses conditions d'ajout de NO_3 sur les processus physiologiques agissant sur la population à la fois de cellules et de coccolithes : croissance et POC (Partie A) ; concentration/mL, détachement, renouvellement de coccolithes et rapport coccolithes/cell (partie B) ; et PIC (partie C). Il apparaît d'après l'analyse des résultats précédents que les conditions de NO_3 qui conduisent à un bloom de PIC/mL ou de cellules (fort NO_3) ne sont pas les mêmes que celles qui conduisent à un intense bloom de coccolithes libres/cell (faible NO_3). Pour cette raison seront analysés séparément les processus qui pourraient conduire à des forts signaux visibles par satellite, *a priori* fabriqués uniquement lors d'une forte production de coccolithes libres (partie D) et ceux qui conduiraient à des blooms de forte production de PIC (partie E). Ces derniers étant ceux qui importent pour améliorer la connaissance du bilan global de carbone que représenterait les coccolithophoridés dans l'océan (cf. Introduction générale, §IIB).

A. Les faibles NO_3 inhibent le bloom de population

1. Les trois différentes phases de croissances et leur modulation par le NO_3

La phase de croissance est importante pour les différents régimes de blooms : celui dû à la quantité de cellules (Fig. 3.1a) et qui est marqué par une diminution à partir du jour 12 et celui de coccolithes /mL (Fig. 3.3a) qui au contraire continue à augmenter jusqu'à la fin de l'expérience.

La phase exponentielle de nos expériences est relativement longue de 12, 8 et 8 jours, suivant que l'ajout ait été fort, faible ou inexistant (visible tant sur l'arrêt de l'augmentation de la

population -Fig. 3.1a- que sur le taux de croissance nul -Fig. 3.1b-). Elle est plus longue que celle observée dans les études antérieures, dans lesquelles cette phase se termine en général avant 8 jours. Par exemple, la durée de la phase exponentielle est de 6 jours à 20°C dans les expériences de Paasche (1998) en conditions de limitation en NO₃ (8.7 µM) ou en PO₄ (0.55 µM). Alors que dans nos expériences, un stress modéré en NO₃ (+2 µM) entraîne une diminution de 4 jours de la durée de la phase de croissance par rapport à des conditions non stressantes en NO₃ (+44 µM, §IIA1, Fig. 3.1a), la durée de la phase de croissance reste 2 jours plus forte que pour un stress 4 fois moins important (8.7 µM) des expériences de Paasche (1998). Par conséquent, la relativement plus longue phase exponentielle, observée dans nos expériences ne serait pas due à l'intensité des ajouts de NO₃. La plus longue phase exponentielle dans nos expériences pourrait être due à une température ou à un éclairage (*bien que non mesurée dans notre étude*) plus faibles ou encore à la non-utilisation d'EDTA. En effet, la baisse de température est connue pour ralentir la croissance des cellules (Chap. 1, §IIB) et par conséquent la température de 16.5°C dans nos expériences pourrait avoir produit un allongement de la durée de la phase de croissance. De même, une limitation par la lumière accroîtrait considérablement la durée de la phase exponentielle (eg. au-delà de 50 jours pour une intensité lumineuse de 8 µmol de photons m⁻² s⁻¹, Paasche 1999). Une limitation de la croissance par la lumière pourrait donc être invoquée pour expliquer une plus longue phase de croissance dans nos expériences. Néanmoins, compte tenu de la relative bonne calcification (cf. §IB1 ; Fig. 3.2) un effet néfaste produit par de faibles intensités lumineuses ne serait pas retenu pour l'interprétation d'une phase de croissance plus longue dans nos expériences. Enfin, la non-utilisation d'EDTA rendrait le fer moins disponible (Gerringa *et al.* 2000) et pourrait être une des causes d'une phase de croissance longue de 13 jours (Boyé et van den Berg, 2000) et de 12 jours dans nos expériences.

La durée de la phase stationnaire obtenue ici est de 3, 4 et 2 jours pour un ajout fort, faible ou inexistant (Fig. 3.1a). Cette phase, à la différence de la phase de croissance, ne semble pas être influencée par l'intensité des ajouts. La durée dans nos expériences est comparable à celle observée dans l'expérience de Lecourt *et al.* (1996), de 2 à 3 jours ; mais elle est 2 fois plus courte que celle observée dans les expériences de Balch *et al.* (1992), qui se prolongerait au-delà de 7 jours en absence de limitation par les NO₃. La durée de cette phase stationnaire obtenue en laboratoire pourrait donc correspondre à un équilibre entre croissance et mortalité, ce qui devrait être validé avec des observations *in situ* de la formation et évolution complète d'un bloom de coccolithophoridés.

La phase sénescence intervient 15, 12 et 10 jours après le début de l'expérience, suivant que l'ajout ait été fort, faible ou inexistant (Fig. 3.1a). Cette phase serait, à la différence de la phase stationnaire, déterminée par la concentration de nitrates, plus intensément d'ailleurs que lors de la phase de croissance. La phase sénescence est marquée par une diminution de la population de cellules qui peut être deux fois plus intense lorsque les concentrations en NO₃ sont très faibles (Fig. 3.1a). Cet effondrement peut être observé sur le taux de croissance journalier (Fig. 3.1b), qui diminue avec l'ajout au début de l'effondrement : -0.35 jour⁻¹ au jour 10 (lors de très faibles NO₃), -0.33 jour⁻¹ au jour 12 (faibles NO₃) et -0.14 jour⁻¹ au jour 15 (pour les forts NO₃). Il apparaît donc que la rapidité de l'intervention de la phase sénescence (5 jours plus tôt) et l'importance de la mortalité seraient inversement proportionnelles à la concentration de NO₃. Cette durée est en accord avec les observations en mésocosmes (dans un fjord norvégien, Egge et Heimdal, 1994), d'une durée des blooms d'*E. huxleyi* (30 jours), incluant la phase sénescence.

La reprise de l'augmentation de la population de cellules observée après le jour 20 et 24 peut être considérée comme une anomalie ou une seconde phase de croissance (Fig. 3.1a). Cette anomalie, après 3 et 5 jours de décroissance observée lors de faibles et forts ajouts de NO₃, pourrait être attribuée à un rétablissement de la source d'azote dissous (tel qu'observé dans les régions de fortes régénération comme l'été de l'Atlantique Nord ; Fernandez *et al.* 1993). Dans cette situation, la phase sénescence aurait bien lieu le jour 15 pour de forts ajouts de NO₃ et la

reprise de l'augmentation de la population, observée à partir du jour 20 et 24, représenterait alors un nouvel équilibre entre mortalité et reminéralisation des cellules.

Ainsi des concentrations en NO₃ relativement faibles de 2.5 µM, peuvent être considérées comme fortement limitantes pour le bloom de cellules d'*E. huxleyi*. En effet, la population maximale, de 38 x10⁴ cells mL⁻¹ dans des conditions de NO₃ abondantes (45 µM), diminue d'un facteur 5 avec des NO₃ de 2.5 µM (Fig. 3.1a). Cet effet sur la population maximale s'ajoute à celui observé, 3 jours plus tôt, sur la phase sénescence (§IIIA1, Fig. 3.1a), et à celui sur taux de croissance maximal (µ_{max}, §IIIA2b) qui diminue de 40% (Fig. 3.1c), lorsque le NO₃ diminue de 45 à 2.5 µM. Ces trois effets montrent que l'intensité du bloom de population de cellules d'*E. huxleyi* est très sensible aux concentrations de NO₃. L'intensité des ajouts détermine non seulement l'intensité de la population, mais également sa mortalité, le déclenchement des phases de croissance et leur durée. Ainsi la population de cellules en phase de croissance peut être d'un facteur 10 plus intense lorsque l'ajout de NO₃ est fort et leur mortalité (effondrement de la population) au contraire être deux fois plus intense et atteindre une forte proportion (80%) en absence d'ajout de NO₃. L'intensité des ajouts retarde à la fois la fin de la phase de croissance et celle de la phase sénescence ; mais intensifie leur durée. De la mise en évidence de ces phases et de l'importance de la détermination de la population comme de sa mortalité, il apparaît que le NO₃ déterminerait l'intensité du bloom de cellules.

Les durées de la phase de croissance exponentielle (8-12 jours) et stationnaire (2-4 jours) obtenues ici pour une température de 16.5°C (Fig. 3.1a) sont respectivement plus longues et plus courtes que celles observées dans les études antérieures (en batch) de limitation par les nutritifs (cf. Tab. 3.2). La phase sénescence en culture d'une durée de 5 jours a été décrite ici pour la première fois. Ces phases de croissance marquées par l'augmentation et la baisse de la population (Fig. 3.1a, §IIA1), sont différentes des phases propres aux variations des coccolithes, caractérisées par une augmentation continue quel que soit l'ajout (Fig. 3.3a, §IIB2). Ces variations de coccolithes libres seront analysées dans la discussion §IIB1. Ces phases de croissance pourraient représenter les étapes caractérisant un bloom dans l'océan aux vues des similitudes avec les études en mésocosmes.

2. Comparaison de la population de cellules avec les données de la littérature

Le tableau 3.2 présente la comparaison, entre les résultats de nos expériences et ceux publiés dans la littérature, sous différentes conditions limitantes en laboratoire et *in situ*. Cette comparaison permet de vérifier si les conditions de blooms que reproduisent nos expériences sont représentatives du milieu nature. Les populations maximales de cellules de 38, 8 et 4 x10⁴ cells mL⁻¹, correspondant à des concentrations de NO₃ respectivement de 45, 2.5 et 0.5 µM, sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en laboratoire précédemment. (30 x10⁴ cells mL⁻¹; Balch *et al.* 1992; Paasche et Brubak, 1994). De part la similitude des populations mesurées lors de nos expériences en absence d'EDTA avec toutes celles publiées dans la littérature utilisant de l'EDTA et celles effectuées *in situ*, il semble que nos conditions expérimentales reproduisent convenablement les ordres de grandeur couramment associés à un bloom de coccolithophoridés.

Comme pour la durée des phases, la population maximale enregistrée lors de nos expériences à 16.5°C dans les batchs à fort NO₃ (Fig. 3.1a) est 50% plus faible que celle mesurée à une température de 15°C avec deux fois moins de NO₃ initial (Dong *et al.* 1993), et 20% plus faible qu'avec une température de 20°C avec 5 fois moins de NO₃ initial (Paasche 1998). Cependant la situation peut être contraire : c'est-à-dire que la population obtenue dans nos expériences est 30 % plus forte que celle obtenue à une température de 19-20°C et avec un NO₃ 3 fois supérieur (Paasche and Brubak, 1994). Ainsi, les différences de 20% à 50% entre la population maximale enregistrée dans cette étude et celles précédemment effectuées en

laboratoire (Tab. 3.2), pourraient être dues à des différences dans les paramètres environnementaux (température, éclairage), ou bien à l'utilisation de différents milieux de culture. La température de 16.5°C utilisée ici pourrait produire une population moins abondante que celle produite à 20°C (Paasche, 1998). La lumière, *bien que non mesurée* dans cette étude pourrait être moins favorable à la croissance pour des intensités lumineuses inférieures à 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Paasche, 1967). Les milieux de culture ne sont pas composés des mêmes éléments nutritifs. Leur concentration dépend du protocole, notamment l'ajout d'EDTA (pas utilisé lors de nos expériences) qui aurait comme propriété de rendre moins disponible le Fer (cf. Chap. 2, §IA2b). Sa présence aurait pu induire une plus grande population 2 fois plus forte dans les expériences de Dong *et al.* (1993) et Nimer *et al.* (1995), et ce malgré une température 10 % plus faible et des nutritifs 50 % moins abondants.

Les concentrations de cellules maximales mesurées dans les batchs limités en NO₃ (0.5 et 2.5 μM de NO₃) sont respectivement de 4 et 8 $\times 10^4$ cells mL^{-1} (Fig. 3.1a). Ces concentrations de cellules sont du même ordre de grandeur que celles observées *in situ* de 11.5 $\times 10^4$ cells mL^{-1} dans un fjord norvégien et associées à des concentrations en NO₃ relativement faibles de l'ordre de 4 μM (Berge, 1962). Par contre, ces concentrations sont d'un ordre de grandeur supérieures à la population observée dans le bloom de l'Atlantique Nord, qui est inférieure à 1 $\times 10^4$ cells mL^{-1} pour des concentrations de NO₃ de 2 μM (Holligan *et al.* 1983, 1993, Tab. 3.2). Cependant, cette différence d'un ordre de grandeur entre la population maximale enregistrée sous faible NO₃ dans notre étude et les observations *in situ*, peut être attribuée aux facteurs naturels qui jouent un rôle dans l'océan mais qui sont absents des cultures monospécifiques en laboratoire sous conditions contrôlées. Parmi ces facteurs, les plus importants sont les termes de pertes, abordés dans le Chap. 1, §IIF : la prédation, l'activité bactérienne ou virale, les effets de sédimentation, la turbulence et la dynamique de la couche de mélange.

Cette reproduction en laboratoire de conditions proches des conditions *in situ* a principalement été possible grâce à l'utilisation, pour la première fois en laboratoire, de concentrations de l'ordre de 2 μM de NO₃, à notre connaissance jamais utilisées précédemment dans les expériences en laboratoire.

Par conséquent, la similitude entre les populations mesurées dans nos expériences lors de faibles concentrations de NO₃ avec les observations *in situ*, permet d'extrapoler nos résultats en ce qui concerne les effets qu'un stress en NO₃ pourrait produire dans l'océan. Ceci serait le cas par exemple d'un bloom d'*E. huxleyi* de l'Océan Atlantique Nord, en été, avec des NO₃ de l'ordre de 4 μM (Fernandez *et al.* 1996c). Compte tenu des conditions plus proches des conditions naturelles dans nos expériences, il est possible de conclure que les durées de phases ici obtenues et les intensités de la population représentent potentiellement un bloom qui se produirait dans l'océan en conditions naturelles.

Tableau 3.2 : Comparatif des données de PIC des résultats en batchs et en chemostat.

Comparaison des données existantes de POC et de PIC de par cellule et par coccolithe, associé au nombre de cellules, de coccolithes (détachés ou totaux) et le taux de croissance, obtenues en laboratoire sous conditions contrôlées en chemostat sous diverses limitations de NO₃ (N-), PO₄ (P-), de CO₂ (C-) et de lumière (L-), en batchs et également en mésocosmes et *in situ*, à titre de comparaison.

Auteurs (Chemostat)	Température °C	NO ₃ μM	Note	Cellules 10 ⁴ /ml	Croissance /jour	Détachés coccolithes 10 ⁴ /ml	Détachés /cellule	Total /cellule	POC/cell pg/cell	PIC/cell pg/cell	PIC/cocco pg/cocco	PIC/POC
Cette étude	16.5°C	45	-	20-37- 24	0.62	260-600- 1680	13-16- 70	27-31- 85	8.05-3.6	3.8-4.4- 6.6	0.14-0.14- 0.08	0.47-1.22
	"	2.5	N-limited	8- 3	0.44	220- 410	27- 137	50- 152	33- 1.67	1.52- 5	0.03- 0.03	0.04- 2.95
	"	0.5	N-limited	4- 1	0.24	70- 73	17- 73	40- 88	-	1.22- 3	-	-
Paasche 1962	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,165	-
Paasche and Brubak 1994	"	125	-	28	1,26	-	20-30	45	8,2	7,4	-	0,90
Chemostat	"	"	P-limited	-	0.67	-	20-30	108	13.1	18	-	1,37
Paasche et al. 1996	"	"	-	-	-	-	-	30	8	6	0,2	0,75
Paasche 1998	"	8.7	N-limited	50	1.2	-	-	110	-	-	-	-
Chemostat	"	"	"	-	1.41- 0.46	-	-	35- 75	6- 12	6- 10.5	0.18- 0.135	1- 0.88
Paasche 1998	"	135	P-limited	50	1.2	-	-	120	-	-	-	-
Chemostat	"	"	"	-	1.41- 0.46	-	-	35- 110	6- 15	6- 22.5	0.18- 0.22	1- 1.5
Paasche 1999	"	125	L-limited	-	2.3	-	-	110	-	-	-	-
Semi-continuous	"	"	"	-	2.3- 0.1	-	-	26- 15	6- 3	22- 7	0.27- 0.15	3.67- 2.33
Balch et al. 1992	14-19	35	-	30	0.7	2000	65	-	4.2	1.5	0.26	0,36
Balch et al. 1993	19	884	L-limited	30	-	2500	100	-	-	-	0.2	-
Linschooten et al. 1991	18	35	Nut-limited	-	-	-	-	110	-	-	0.06-0.08	-
Fritz et Balch 1996	17	400	L-limited	-	0.99- 0.24	-	6- 1.5	-	10	12- 3	-	1.2- 0.3
Fritz 1999	"	20	N-limited	-	0.67- 0.2	-	10- 35	-	-	1.5- 4	0.03-0.09	-
Dong et al. 1992	15	"	C-limited	80	0.5	-	-	-	-	15	-	-
Nimer et Merret 1995	"	"	C-limited	80	-	-	-	-	-	11.75	-	-
Bleijswijk et al. 1994	"	30-39	-	-	0.89	-	-	-	14	10	-	0,71
Riegman et al. 1998	"	25	N-limited	-	0.6- 0.15	-	-	-	9.4- 6.5	3.4- 3.1	-	0.36- 0.46
"	"	300	P-limited	-	0.63- 0.14	-	-	-	9- 15	2.1- 7.6	-	0.2- 0.5
"	"	300	L-limited	-	0.61- 0.14	-	-	-	9.27- 5.45	4.3- 1.48	-	0.47- 0.27
Fagerbakke et al. 1994	mesocosme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22-0.34	-
Holligan et al. 1983	in situ	-	-	0.9	-	7.8	9	-	34	16	0.5-0.6	0,47

En gras : dans les conditions limitantes indiquées

En italique : On suppose un rapport Ca/PIC de 1

N (NO₃); P (PO₄); L (light) -limité

3. Un Taux de croissance journalier indiquant une plus forte limitation d'*E. huxleyi* par le NO₃

La dépendance de la croissance initiale au NO₃ est une relation peu connue et pour laquelle les données existantes dans la littérature conduisent à des conclusions contradictoires. D'un côté, les cellules peuvent être adaptées aux faibles NO₃, telle que l'indique la faible constante de demi-saturation (0.2 µM ; Eppley *et al.* 1967 ; Riegman *et al.* 1998). D'un autre côté elles peuvent être simultanément limitées par les faibles NO₃ et présenter une faible compétitivité vis-à-vis des forts NO₃ (Riegman *et al.* 1998), en accord avec une limitation du bloom de cellules dans l'Atlantique Nord (Fernandez *et al.* 1993, Wal *et al.* 1995). Les données acquises durant nos trois expériences d'ajouts permettent d'élucider cette contradiction.

Le taux de croissance moyen du début de la phase de croissance, entre les jours 2 et 4⁽¹²⁾ augmente avec l'ajout initial de NO₃ (Fig. 3.1c). Le taux de croissance moyen des cellules dans le batch sans ajout est très faible de 0.17 jour⁻¹ pour une concentration initiale en NO₃ estimée à 0.5 µM (cf. [NO₃], Tab. 3.1). Ce taux augmente d'un facteur 2.6 et d'un facteur 4.6 dans le batch à faibles et forts ajouts, correspondant alors respectivement à des concentrations en NO₃ de 2.55 µM et 45 µM.

L'extrapolation du profil de la croissance moyenne en fonction de la concentration de NO₃ selon une courbe de Michael Menten (Fig. 3.1c) permet d'estimer le taux de saturation de la croissance (µ_{max}) et la constante de demi-saturation (K_{1/2}). µ_{max} est de 0.82 jour⁻¹ pour une constante de demi-saturation de 2.1 µM (Fig. 3.1c). La croissance initiale maximale durant la phase exponentielle est de 0.82 jour⁻¹ au-delà de 45 µM de NO₃ (Fig. 3.1c, §IIA2b). Cette croissance est comparable de 10% à 70% près à celles obtenues lors des travaux en laboratoire effectués à des températures similaires à celles utilisées dans cette étude (16.5°C) : 0.89 jour⁻¹ (15°C, Bleijswijk *et al.* 1994) ; 0.73 jour⁻¹ (15°C, Nielsen 1997) ; 0.68 jour⁻¹ (16°C, Fernandez *et al.* 1996c) ; 0.50 jour⁻¹ (17°C, Lecourt *et al.* 1996) ; et 0.48 jour⁻¹ (16°C, Muggli et Harrison, 1996). Par contre, cette croissance est de 0.5 à 2.8 fois plus faible, lorsqu'elle est comparée à des températures plus fortes de 1 à 4°C : 1.26 jour⁻¹ (20°C, Paasche et Brubak, 1994) ; 1.6 jour⁻¹ (17°C, Paasche *et al.* 1996) ; 2.3 jour⁻¹ (20°C, Paasche *et al.* 1996, Paasche 1999). Outre la température, ces différences importantes qui existent avec les dernières études pourraient être également dues à l'origine de la souche. Les cellules des fjords norvégiens peuvent croître avec un taux 50% plus important que celui de certaines souches de l'Atlantique Nord (Paasche *et al.* 1996). En conséquence, la croissance maximale ici obtenue de 0.82 jour⁻¹ pour une souche d'Atlantique Nord est en accord avec les valeurs antérieurement publiées pour *E. huxleyi* dans la littérature. Malgré l'accord en ce qui concerne la croissance maximale (µ_{max}) avec les expériences antérieures, la réponse du taux de croissance à une augmentation de nitrates est ici 10 fois moins efficace que celle observée dans des travaux antérieurs. Cette faible efficacité se traduit par une constante de demi-saturation (K_{1/2}) pour le NO₃ de 2.1 µM qui est 10 fois plus forte que celle obtenue par exemple par Eppley *et al.* (1969) et Riegman *et al.* (1998 ; cf. Fig. 3.1c). Malgré cette différence pour le K_{1/2}, l'affinité (alfa=µ_{max}/K_{1/2}) de 0.4 jour⁻¹ µM⁻¹ est du même ordre de grandeur que celle obtenue par d'autres auteurs (cf. Chap. 1, §IIC, Tab. 1.1). Ainsi, bien que dans nos expériences la concentration de NO₃ à faible ajout (+2 µM) soit 10 fois supérieure à la constante de demi-saturation proposée à partir des résultats de chemostat (K_{1/2} = 0.2 µM; Riegman *et al.* 1998 ; Fig. 3.1c), la population maximale atteinte et la croissance calculée au début de la phase exponentielle avec de faible NO₃ sont en revanche 5 et 2 fois plus faibles que lors d'ajouts de 45 µM (cf. Fig. 3.1a et 1c).

¹² : Le taux de croissance au jour 0 n'est pas considéré puisque issu d'une estimation de la concentration de cellule à partir de l'inoculation de la solution mère (cf. chapitre 2, §IB4).

Cette différence d'un facteur 10 entre la constante de demi-saturation obtenue dans cette étude en batch et celle obtenue antérieurement en chemostat pourrait être attribuée à un effet dans nos expériences de disponibilité du Fer (probablement plus faible, mais plus proche des conditions naturelles dans nos expériences). En effet, l'absence d'EDTA dans le milieu rend les métaux moins disponibles que dans un milieu avec EDTA, tel que présenté dans le Chap. 2, §IIA2b. Le Fer total dissous mesuré dans nos expériences est de l'ordre de 0.58 nM, au jour 10, dans les cultures à forts et à faibles ajouts de NO₃ (cf. §IB1). Il est également possible que la faible efficacité face aux nitrates soit due également à un manque relatif de lumière (*non mesurée lors de nos expériences*), qui peut affecter la croissance (Paasche, 1967) tel que présenté antérieurement (§IIIA1a). Mais, le taux de croissance maximal comparable à la littérature (cf. §IIIA2a) et la bonne calcification visualisée dans les SEM (Fig. 3.2 et Chap. 2, Fig. 3.6) suggèreraient que nos expériences aient été conduites sans limitation importante de disponibilité lumineuse suffisante (cf. Chap. 1 §IIB et IID1).

La croissance de par sa forte constante de demi-saturation (2.1 µM), 10 fois supérieure au chemostat, pour une affinité du même ordre de grandeur que celle obtenue dans des études antérieures (0.4 jour⁻¹ µM⁻¹), indiquerait qu'*E. huxleyi* pourrait être 10 fois plus limité par les NO₃. Cette limitation serait 5 fois plus intense que celle du phytoplancton de plus grande taille comme les diatomées (Sarthoux *et al.* 2005). Cette plus grande limitation serait un argument supplémentaire dans le sens de la contradiction déjà évoquée dans l'introduction au sujet des blooms visibles qui seraient stimulés à faibles NO₃. Ehux ne peut pas être stimulé à faible NO₃ et donc les blooms ne se produiraient pas à faible NO₃. La signification de ces blooms sera analysée dans la partie C.

4. L'effet du NO₃ sur le POC/cell dépend de la phase de croissance

Pour avancer dans la compréhension de l'effet des nitrates sur le bloom de cellule, l'analyse de la réponse du contenu en POC aux différents NO₃ est ici effectuée. La quantité de POC dans les batchs suit une tendance différente de la population de cellules avec un maximum lors de faibles NO₃, durant la phase de croissance (cf. §IIC2, Tab. 3.1). Cette tendance est-elle cohérente avec les données de la littérature ? Quelle serait la conséquence sur les caractéristiques du bloom de cellules ?

La quantité de POC/cell est dans la gamme des valeurs observées antérieurement en laboratoire (Tab. 3.2). Le POC/cell à l'issue de la phase exponentielle de croissance (jour 10) sous des conditions de forts ajout de NO₃ est similaire (8 pg cell⁻¹, §IIC2) à celui obtenu en conditions non limitantes en NO₃ (Paasche and Brubak, 1994 ; Paasche *et al.* 1996) ou à fort taux de dilution en chemostat (Paasche 1998, Riegman *et al.* 1998). Par contre, le POC/cell de 3.6 pgC cell⁻¹ dans la phase sénescence (jour 20), est parmi le plus faible jamais mesuré et du même ordre de grandeur que celui mesuré par Balch *et al.* (1992, Tab. 3.2). Cependant, ce faible POC/cell est similaire à celui mesuré lors d'une limitation par la lumière (Paasche 1999) ou d'une limitation par le Fer en présence d'EDTA (Sunda et Huntsman, 1995). En conséquence et par effet d'adaptation au faible fer, les cellules d'*E. huxleyi* seraient plus petites et contiendraient moins de POC à fort stress, comme ces auteurs l'avaient remarqué. Cette similarité est en accord avec l'effet d'une co-limitation par le fer dans notre étude, qui est visible sur le taux de croissance (§IIIA1) et également sur la population maximale (§IIIA2), jusqu'à 50% plus faibles par rapport à d'autres études (Dong *et al.* 1992 ; Paasche, 1998).

Le POC par cellule diminue d'un facteur 2 et 20 entre la fin de la phase de croissance (jour 10) et la phase sénescence (jour 20), suivant que la concentration en NO₃ est forte ou faible (Tab. 3.1, §IIC2). Cette tendance à la baisse du POC/cell se produit dans un sens, soit similaire (Riegman *et al.* 1998), soit contraire (Paasche, 1998) à celle obtenue en chemostat. Il est important de remarquer que ces études en chemostat simulent l'évolution d'un bloom par la diminution du taux de croissance, mais celui-ci reste toujours positif et donc ne reproduit et ne correspond

pas à une phase sénescence. Néanmoins, l'étude de Riegman *et al.*, avec un taux de croissance minimal faible de 0.15 jour⁻¹ (3 fois plus faible que le minimum atteint dans l'étude de Paasche), présente une évolution du POC/cell semblable à celle de notre étude. La diminution de POC/cell lors de la phase sénescence pourrait être associée à une consommation de carbone plus importante que dans la phase de croissance, selon des mécanismes qui restent inconnus.

L'effet du stress en NO₃ sur le POC/cell varie avec les phases, il peut être stimulant durant la phase de croissance ou au contraire inhibant durant la phase sénescence. Dans la phase de croissance, le POC/cell est stimulé d'un facteur 4 lors de faible ajout de NO₃, par rapport à un ajout fort (§IIC2). Ce POC/cell est cependant du même ordre de grandeur que celui observé *in situ* (34 pgC cell⁻¹ ; Atlantique Nord ; Holligan *et al.* 1983). Ce fort POC/cell pourrait être dû à un stockage de lipides au détriment de protéines, et qui ne peuvent être produites par manque de NO₃ dans le stade avancé du bloom de l'Atlantique Nord (Fernandez *et al.* 1993). Cette stimulation de l'accumulation du stock de carbone à l'issue de la phase de croissance avait de plus été proposée comme un facteur pouvant stimuler la flottabilité. En effet, les lipides (réserves d'énergie) étant plus léger que celui des protéines (composante plus générale de la structure des cellules), et pourrait diminuer le taux de sédimentation et expliquer ainsi la persistance de la population d'*E. huxleyi* en surface dans des conditions de faible NO₃ (Fernandez *et al.* 1993 et chapitre 1, §IIC2). Par contre dans la phase sénescence (jour 20), le POC/cell de 3.6 pgC cell⁻¹, pour des NO₃ forts de 20 µM, était inhibé d'un facteur 2 lorsque le NO₃ diminue d'un facteur 7 (Paasche, 1998 ; Tab. 1, §IIC2). Cette première mise en évidence en laboratoire de l'inhibition du POC/cell par le stress en NO₃ (comparativement à l'effet produit par un fort NO₃) lors de la phase sénescence, est en accord avec les résultats des études effectuées en chemostat. Par exemple Riegman *et al.* (1998) avaient montré que le POC/cell lors d'un stress en NO₃, était inhibé d'un facteur 2.3 par rapport à l'effet produit par un stress en PO₄. Par contre l'effet du NO₃ sur le POC/cell serait du même ordre de grandeur que celui produit par un stress en lumière (Paasche, 1999 ; Tab. 3.2).

La croissance, le nombre de cellules et la quantité de POC produits dans des conditions de faibles NO₃, dans nos expériences, sont similaires aux observations du bloom *in situ* de l'Atlantique Nord ; Les réponses de ces paramètres aux variations de NO₃ sont également cohérentes avec celles observées dans les études précédentes en laboratoire. Les tendances de la quantité de POC et de prise des NO₃ souvent contradictoires observées en chemostat, dans lesquelles le taux de croissance est imposé, pourraient être dues à l'évolution entre phase de croissance et sénescence qui a lieu durant un bloom. A faible NO₃, le POC/cell est fortement stimulé lors de la phase de croissance et par contre fortement inhibé lors de la phase sénescence.

Les NO₃ forts stimulent la croissance et la population maximale mais au contraire inhibent fortement le POC lors de la phase de croissance (jusqu'au jour 10). Ces effets à faibles NO₃ auraient tendance à accroître le bloom de population de cellules. Le POC, par contre fort lors de la phase de croissance (jour 10), aurait tendance à maintenir les cellules en surface tel qu'observé *in situ* dans l'océan Atlantique Nord.

B. Bloom visible ou forte production de coccolithes libres

Alors que la population de cellules nécessite de forts NO₃ pour augmenter, la quantité de coccolithes libres, jusqu'au jour 15, est autant abondante à faible et à fort NO₃ (cf. IIB2, Fig. 3.3a). Quels sont les processus responsables de la fabrication de coccolithes libres et quelle est la relation entre ces processus et le NO₃ pouvant expliquer la similitude à faible et fort NO₃ ? Pour répondre à ces questions, nous analyserons **i)** la variation des différents réservoirs de coccolithes (attachés et libres) au cours du bloom en relation avec la phase de croissance et le NO₃ ; **ii)** les relations entre ces réservoirs de coccolithes et les processus de production de

coccolithes comme le détachement ; **iii)** une comparaison critique de ces relations avec le peu de données de la littérature sera effectuée.

1. Les coccolithes libres stimulés à faibles NO_3 et durant la phase sénescence

a. Comparaison avec les données de la littérature en laboratoire et *in situ*

La quantité de coccolithes libres par volume, de 480×10^4 coccolithes mL^{-1} , atteinte au plateau (ou stationnarité) de la croissance (jour 15), est similaire que l'ajout en NO_3 soit faible ou fort (Fig. 3.3a). Pourquoi la quantité de coccolithes/ mL est similaire à fort et faible NO_3 ? Cette similarité pourrait être due à une plus faible population de cellules (Fig. 3.1a), associée à un plus grand nombre de coccolithes libres/cell (Fig. 3.4a) lors de NO_3 faibles par rapport à de forts NO_3 . Par exemple, aux jours 12 et 15, la population de cellules diminue d'un facteur 5 et 12, alors que le rapport coccolithes libres/cell, au contraire, augmente d'un même facteur (5 et 12) entre un ajout fort et un ajout faible. L'importance du rapport coccolithes libres/cell dans le cas d'un stress modéré en NO_3 peut être due à simultanément un plus grand nombre de coccolithes produits par les cellules et à un plus grand nombre de coccolithes se détachant de la cellule. Ces deux effets du NO_3 sur le nombre de coccolithes attachés (§IIIB2b) et leur détachement (§IIIB3a) seront analysés ultérieurement. Une stimulation de faibles NO_3 sur le rapport coccolithes libres/cell avait été observée précédemment en chemostat par Fritz (1999). Dans l'étude de Fritz, le rapport coccolithes libres passait de 10 à 35 coccolithes libres cell^{-1} lorsque la croissance diminuait de 0.59 à 0.2 jour^{-1} sous des conditions initiales de NO_3 de 20 μM . Même si le stress était moins important dans ces chemostats, le rapport coccolithes libres/cell de 30 coccolithes libres cell^{-1} était au contraire similaire à celui observé dans notre expérience de faible ajout (Fig. 3.4a) à l'issue de la phase de croissance (jour 10). La situation est contraire pour la stagnation de la concentration de coccolithes libres, qui est ici plus faible et plus lentement atteint que lors d'études antérieures. Le plateau de 480×10^4 coccolithes mL^{-1} du jour 15 (Fig. 3.3a) est d'un facteur 5 inférieur et intervient 4 jours plus tard que ceux observées en batch (2000 à 2500×10^4 coccolithes mL^{-1} au jour 11, Balch *et al.* 1992, 1993 ; Tab. 2). Les différences entre nos résultats et ceux de Balch et co-auteurs, dans le cas de fort ajout peuvent être associées à une concentration maximale de cellules supérieures, mais à un rapport coccolithes libres/cell inférieure dans notre étude. En effet, la concentration de cellules de 38×10^4 cells mL^{-1} (Fig. 3.1a) est d'un facteur 1.5 à 2 plus important que celle obtenue par Balch *et al.* ; par contre la quantité de 15 coccolithes libres cell^{-1} (Fig. 3.4a) de nos expériences, est 5 fois plus faible (Tab. 3.2). Le décalage de 4 jours pourrait être dû à une durée de la phase de croissance, lors de nos expériences, décalée également de 4 jours comparativement aux études antérieures (tel que nous l'avons vu §IIIA1). La différence de l'intensité du plateau de coccolithes libres pourrait être due à une perte des coccolithes attachés qui interviendrait plus tardivement ou alors de façon incomplète dans nos expériences. Le détachement, dans les expériences de Balch *et al.*, reste constant au-delà de la phase de croissance (jour 8) ; alors que la population ne croît plus et ne calcifie plus. Ce processus est observé jusqu'à la perte totale des coccolithes recouvrant les cellules et jusqu'au jour 11, c'est-à-dire 3 jours après l'arrêt de la croissance de la population. Au contraire, dans nos expériences, l'arrêt de la calcification ainsi que le détachement total des coccolithes lors de forts ajouts ne se produit pas. Ceci est suggéré par la reprise de l'augmentation du nombre de coccolithes/ mL au jour 17 (cf. §IIB2 et discuté §IIIA1), ainsi que par la quantité de PIC/ mL (observé §IIC1 et discuté §IIID). Cette reprise de l'augmentation de coccolithes libres après deux jours de stationnarité ne s'observe pas chez Balch *et al.*, où le plateau est stable pendant 5 jours. Par conséquent, l'augmentation de la concentration de coccolithes libres/ mL au-delà de la phase stationnaire pourrait ici être due à une calcification et un détachement actifs au-delà de la phase de croissance dans le cas d'ajouts forts.

Le rapport coccolithes libres/cell à fort NO₃ comparé à celui de Balch *et al.*, est 5 à 15 fois plus faible au début de la phase de croissance (2 coccolithes libres cell⁻¹ au jour 4 (Fig. 3.4a), contre 30 ou 10 coccolithes cell⁻¹ au jour 3 (Balch *et al.*, 1992, 1993) et augmente 5 fois plus lentement (en 35 jours, Fig. 3.4a). Malgré un nombre maximum de coccolithes libres/cell, de 70 coccolithes cell⁻¹ similaire aux observations de Balch *et al.*, l'augmentation du nombre de coccolithes se fait dans nos expériences plus rapidement. L'explication de ces différences dans la production de coccolithes libres par cellule est à chercher dans les variations du processus de détachement lui-même (cf. IIIB4a). A fort NO₃, le rapport de coccolithes libres/cell, d'un facteur 4.5 plus faible, peut être relié à un processus de détachement qui serait plus fort et à des cellules qui auraient totalement détaché leur coccolithes dès le jour 10 (figure 2b dans Balch *et al.* 1992). Cette situation est contraire à nos expériences dans lesquelles les coccolithes continueraient de se détacher continuellement et durant les 40 jours de l'expérience (Fig. 3.3a). Cette différence dans le détachement pourrait éventuellement être due à une agitation des cultures plus importante dans les expériences de de Balch *et al.* (1992) et qui aurait provoqué le détachement de la totalité de coccolithes dès le 10^{ème} jour.

La question qui se pose alors est de savoir si les concentrations de coccolithes libres obtenues en laboratoire sont similaires, ou reproduisent les conditions d'un bloom en conditions naturelles. Pour répondre à cette question, les concentrations maximales de coccolithes libres observées dans nos expériences peuvent être comparées avec quelques observations *in situ*. Les concentrations maximales de 1630, 575 et 85 x10⁴ coccolithes mL⁻¹ (Fig. 3.3a) sont plus intenses d'un facteur 50 (fort NO₃), 20 (faible ajout de NO₃) et 3 (sans ajout) que celles enregistrées dans l'océan Atlantique Nord (A.N.) d'environ 30 x10⁴ coccolithes mL⁻¹ (Balch *et al.* 1991 ; Holligan *et al.* 1993 ; Twonsend *et al.* 1994 ; Wal *et al.* 1995) et jusqu'à 65 x10⁴ coccolithes mL⁻¹ dans les fjords norvégiens (Fernandez *et al.* 1996c). Cette différence dans le nombre de coccolithes par volume entre nos expériences et les observations *in situ* peut être attribuée à une plus forte concentration de cellules (50, 10 et 3 fois plus de cellules dans le cas respectivement des batches avec fort, faible ou sans ajout ; §IIIA2). Il apparaît donc que la comparaison des ordres de grandeur entre nos expériences *in vitro* et des observations *in situ* devrait être effectuée en terme de coccolithes/cellule. Des rapports aussi élevés que 300 coccolithes libres cell⁻¹ (Fig. 3.4a) observés le jour 24 avec des faibles ajouts, ont été uniquement observés *in situ* lors d'une phase de déclin du bloom dans la mer du Nord (Wal *et al.* 1995). Mais, ce rapport coccolithes libres/cell lors du déclin du bloom peut augmenter et atteindre des concentrations aussi fortes que plusieurs milliers de coccolithes libres/cell, tel qu'observé par exemple dans l'Atlantique Nord Est (golfe du Maine ; Balch *et al.* 1991). Cependant, le plus souvent lors du pic de population, autour de 1 x10⁴ cells mL⁻¹, le rapport de coccolithes libres/cell est 10 fois plus faible (de l'ordre de 10-30 ; Atlantique Nord ; Holligan *et al.* 1993).

Les conditions de faibles NO₃ simulées ici *in vitro* permettent d'atteindre des concentrations en coccolithes/mL fortes et équivalentes à celles de certains blooms d'Atlantique Nord. L'effet de ces conditions de NO₃ sur les blooms de population de cellules et de coccolithes bien que faible par rapport à des concentrations de NO₃ 10 fois plus fortes, permettrait d'atteindre les niveaux observés *in situ*.

b. Deux processus de libération de coccolithes : le détachement et la désagrégation

Le nombre de coccolithes libres augmente de manière continue (Fig. 3.3a). Mais cette augmentation se produit durant deux phases de croissance distinctes. L'une associée à la phase d'augmentation de la population et l'autre à la phase sénescence, avec un rapport de coccolithes libres/cell associé qui augmente d'un facteur 3 pendant que les cellules meurent (faibles ajouts de NO₃, Fig. 3.4a). En tenant compte que le nombre de coccolithes attachés est fort lors de faibles ajouts, il est nécessaire de distinguer d'une part un processus de détachement lors de la phase de croissance et d'autre part un autre processus, probablement différent, capable de

libérer des coccolithes dans l'eau durant la phase sénescence de fin de bloom. La libération des coccolithes pendant que les cellules meurent est mesuré, puis ce processus est analysé à forts et faibles NO_3 et comparé à celui du détachement, à proprement parlé, de la phase de croissance.

Le détachement de coccolithes (Fig. 3.5a). Durant les 10 premiers jours, correspondant à la phase de croissance de cellules, le taux de détachement est constant autour de 8 coccolithes $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ pour de faibles ajouts ; et il est 2 fois plus fort que celui observé pour de forts ou en absence d'ajouts de NO_3 (Fig. 3.4b). Cette différence dans le taux de détachement expliquerait pourquoi durant cette même phase de croissance le rapport coccolithes libres cell^{-1} est 3 fois plus élevé pour de faibles NO_3 (Fig. 3.4a). Au début de la phase sénescence au jour 12, le taux de détachement, de l'ordre de 6 coccolithes $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ (Fig. 3.4b) lors de faibles ajouts, est 5 fois supérieur à celui observé lors d'ajouts forts. Cette différence dans le taux de détachement expliquerait que le rapport de coccolithes/cell soit 10 fois supérieur lors d'ajouts faibles que lors de forts NO_3 . Le détachement dépend du NO_3 . L'évolution du taux de détachement en fonction de la phase de croissance peut être résumée sur la figure 5b. La relation entre taux de détachement des coccolithes et phase de croissance (Fig. 3.5b) montre un taux de détachement 2 fois supérieur lors d'ajouts faibles, lorsque la croissance est positive, par rapport au détachement produit lors de forts ajouts. Ce taux de détachement est, par ailleurs, aussi intense que celui obtenu lors d'une étude antérieure en laboratoire (Fritz, 1999). Lorsque la croissance est négative, le taux de détachement reste inchangé, autour de 6-8 coccolithes $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$, pour de faibles ajouts de NO_3 . Au contraire, le détachement est très faible de 1 coccolithes $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ pour de forts ajouts de NO_3 . On observe que le taux de détachement est nul (voire négatif) lorsque la croissance est nulle (Fig. 3.5b). Cela suggère, d'un côté, que les coccolithes libres ne se détachent pas lorsque les cellules ne se divisent plus. Egalement, et par conséquence, le taux de détachement mesuré au-delà de la phase stationnaire, fort de 5 coccolithes $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$, peut être associé uniquement à la désagrégation des cellules. **Ainsi, le processus de détachement, deux fois plus fort lors de faible NO_3 , expliquerait les différences de rapport coccolithe/cell entre forts et faibles ajouts de NO_3 .**

La désagrégation des coccolithes (Fig. 3.5b). La stimulation du rapport coccolithes libres par cellule au jour 12 est associée dans le cas de faibles ajouts (Fig. 3.1a), à la mort « soudaine » des cellules, mise en évidence à travers une diminution de la population rapide (en seulement 3 jours entre jours 12 et 15) et intense (perte de 60%). Ainsi, alors que le détachement au jour 12 est 30% inférieur à celui durant la phase de croissance, la mort des cellules durant ces 3 jours permet au rapport coccolithes/cell d'augmenter d'un facteur 4 (entre 40 et 160 coccolithes cell^{-1}) entre les jours 12 et 15 (Fig. 3.4b) ; soit une augmentation 12 fois inférieure à celui produit durant les 12 premiers jours (phase de croissance). De même, dans le cas d'ajouts forts de NO_3 , une mortalité moins intense (40% en 5 jours) par rapport à celle produite lors de faibles ajouts (Fig. 3.1a), associée à un taux de détachement faible, de l'ordre de 1 coccolithe $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ (Fig. 3.4b), 5 fois plus faible, expliquerait l'augmentation de seulement 40% du rapport coccolithes libres par cellule entre les jours 12 et 15 (Fig. 3.4a).

D'autres arguments supplémentaires peuvent être évoqués en faveur de l'hypothèse que la mort des cellules provoquerait le bloom de coccolithes. Le lien entre augmentation du rapport coccolithes/cell et mort des cellules est encore plus marqué dans la relation coccolithes libres/cell en fonction de la population (Fig. 3.5a). Cette relation permet, pour les faibles ajouts de NO_3 , d'associer : **(i)** une augmentation forte d'un facteur 4, du rapport coccolithes libres/cell, à une baisse de la population de 60% et **(ii)** une faible augmentation d'un facteur 1.5 du rapport coccolithes libres/cell à une baisse de la population de 40%. Un argument supplémentaire en faveur d'un détachement important propre au faible NO_3 , est la quantité importante de coccolithes attachés autour de la cellule (23 coccolithes attachés cell^{-1} au jour 10 (Tab. 3.1). Leur libération dans le milieu par disparition des cellules en phase sénescence lors d'ajouts faibles, incrémenterait la quantité de coccolithes libres/cell 80% plus intensément que la disparition de cellules lors d'un fort ajout de NO_3 . En effet dans le cas de forts ajouts, seulement 13 coccolithes

attachés cell^{-1} sont observés alors qu'ils atteignent une concentration 10 fois supérieurs dans de faibles NO_3 (Tab. 3.1). Ainsi, la fabrication de coccolithes libres dans la phase sénescence aurait lieu à travers un processus de désagrégation des coccolithes autour de la cellule plutôt qu'à travers celui du détachement « simple », majoritaire durant la phase de croissance.

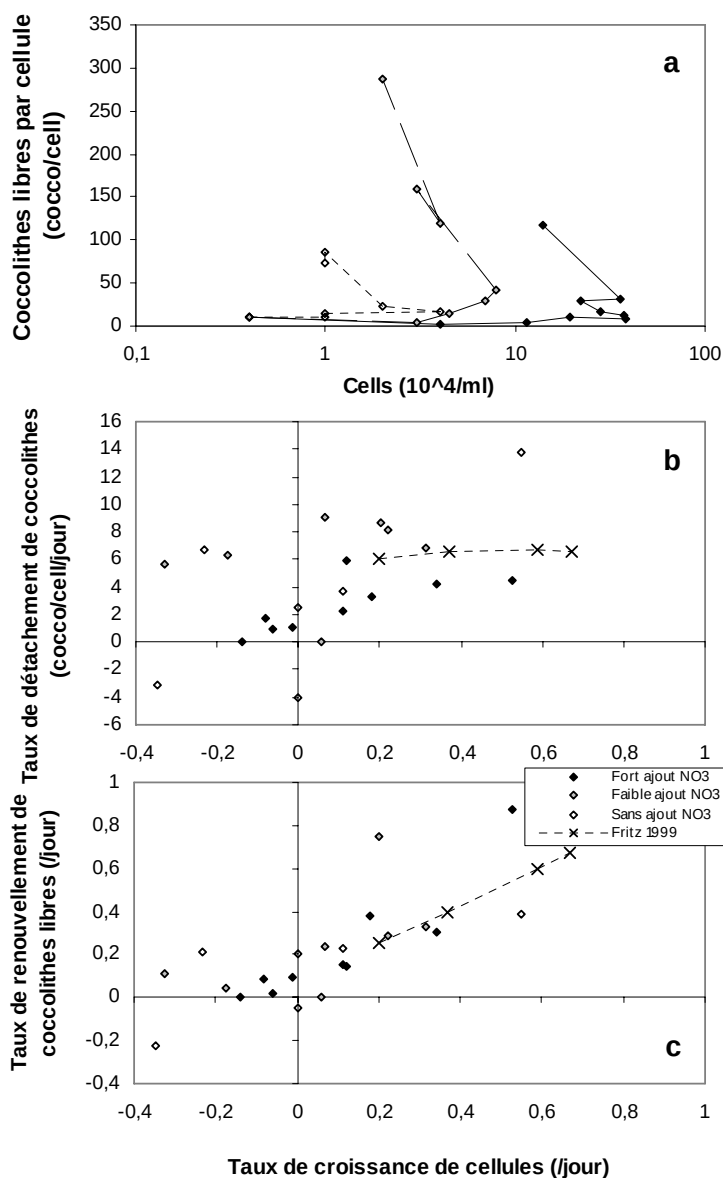


Figure 3.5 : Relation entre paramètres inorganiques et organiques

a) relation de la quantité de coccolithes libres normalisée par cellule (issue de la figure 3.4a) *versus* la concentration moyenne de cellules par volume de milieu de culture (issue de la figure 3.1a) ; b) relation du taux de détachement des coccolithes (issue de la figure 3.4b) ; et c) relation du taux de renouvellement des coccolithes libres (issue de la figure 3.3c) *versus* le taux de croissance des cellules (issue de la figure 3.1b).

Le renouvellement de coccolithes libres et la croissance de cellules (Fig. 3.5c). Le taux de renouvellement des coccolithes libres permet de représenter l'évolution du nombre de coccolithes libres par une fonction de même nature que celle utilisée pour la croissance des cellules (cf. Chap. 2, §IC4). Ainsi, il sera possible de définir un mode de détachement des cellules par rapport à cette croissance organique et de détecter un éventuel couplage entre les deux processus. La figure 5c représente le taux de renouvellement du stock de coccolithes libres (Fig. 3.3c) en fonction de la croissance des cellules (Fig. 3.1b). Cette relation ($R = 0.975 \mu + 0.10$; $r = 0.68$; Eq. 3.2) durant la phase de croissance positive ($\mu > 0$ /jour), suggère que le taux de renouvellement des coccolithes libres reste proportionnel au taux de croissance selon un rapport proche de 1:1, quel que soit l'ajout de NO_3 . Ce type de calcul aurait été effectué par Fritz

(1999), également dans le cas d'une situation de stress en NO_3 , mais en cyclostat (chemostat avec un cycle nycthéral appliqué). Une même corrélation avait été observée lors des expériences en chemostat et cyclostat antérieures et ceci dans des conditions soit stressantes en lumière ou en NO_3 ou encore non stressantes (Fritz et Balch, 1996 et Fritz, 1999). Cette corrélation implique que le stock de matière organique et inorganique se renouvelle à une même vitesse. Cette caractéristique peut être associée à un détachement « simple » propre à la phase de croissance. **Dans la phase de croissance, le stock de coccolithes libres se renouvellerait au même rythme que celui des cellules.** A l'opposé, durant la phase sénescence (marquée par un taux de croissance négatif), le taux de renouvellement des coccolithes libres, étudié ici pour la première fois, reste supérieur à 0 (Fig. 3.5c). Cette différence par rapport à la corrélation 1:1 entre le taux de renouvellement des coccolithes et le taux de croissance lors de la phase de croissance, implique un renouvellement du stock inorganique qui se ferait au-delà du renouvellement du stock organique. Ce renouvellement de coccolithes se ferait à travers un processus de libération de coccolithes induit par la désagrégation de cellules bien calcifiées, et est différent de celui du détachement « simple », propre à la phase de croissance. **Dans la phase sénescence, le renouvellement de coccolithes libres est contraire au taux de croissance des cellules. C'est à dire que les coccolithes libres continuent à augmenter alors que les cellules meurent.** La fabrication de coccolithes libres serait donc principalement due à un processus de détachement durant la phase de croissance (10 premiers jours) et à une désagrégation de la coccosphère durant la phase sénescence. Ce taux de détachement, constant de 8.2 coccolithes $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ à faible NO_3 , est 2.5 fois plus intense qu'à fort NO_3 (Fig. 3.5b), mais caractérisé par un taux de renouvellement des coccolithes libres similaire au taux de renouvellement des cellules quel que soit le stress en NO_3 (Fig. 3.5c). Ce taux de détachement de 8.2 coccolithes $\text{cell}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ est en accord avec les études de Fritz et Balch (1996) et de Fritz (1999), quel que soit le stress en NO_3 . Le taux de détachement dans la phase sénescence (> 10 jours) est fonction de la mortalité des cellules, de leur taille et du nombre de coccolithes attachés. Ces paramètres sont 50% plus intenses à faible qu'à fort NO_3 . **C'est donc un taux de mortalité, de 0.3 jour^{-1} au jour 12, qui fabriquerait la plus grande quantité de coccolithes libres observée à la fin de l'expérience (jour 39).** A l'opposé, le nombre de coccolithes libres atteint des concentrations aussi intenses lors de faibles et forts ajouts de NO_3 au jour 15, grâce à une stimulation de la production du nombre de coccolithes attachés. Cette stimulation de coccolithes attachés est accompagné d'une stimulation du détachement des coccolithes attachés à la coccosphère lors de la mort des cellules, provoquée par de faibles NO_3 , et dans cette étude pour la première fois quantifiée.

2. Origine de la production de coccolithes libres

Le nombre de coccolithes attachés est stimulé à faible NO_3 (cf. §IIB1a, Fig. 3.2). Ce phénomène aurait été observé lorsque les cellules sont stressées en NO_3 et PO_4 (Linschooten *et al.* 1991). Ce réservoir est important pour la compréhension du bloom visible puisqu'il dirige indirectement le nombre de coccolithes libres par détachement des coccolithes attachés. Cette stimulation du nombre de coccolithes attachés peut être interprétée comme une stimulation de la calcification en nombre de coccolithes mais est observée et photographiée (SEM, Fig. 3.2b) pour la première fois à notre connaissance.

a. La taille et les coccolithes attachés stimulés à faible NO_3

Le stress en NO_3 stimulerait la taille de 50% (Fig. 3.2), puisque associé à une stimulation également du nombre de coccolithes attachés d'un facteur 2 ; quelles sont les causes de cette stimulation ? Le diamètre de 5.5 μm , mesuré hors stress en NO_3 (Fig. 3.2a, §IIB1a), est soit du même ordre de grandeur (Paasche, 1962), soit 20% à 40% plus grand que celui observé antérieurement en conditions non limitantes en laboratoire (Bleijswijk *et al.* 1994 ; Riegman *et al.*

1998 ; Lecourt *et al.* 1996). Le diamètre de 7.5 µm, mesuré sous stress de NO₃ (Fig. 3.2b), est similaire à celui de cellules de type B stressées en PO₄ (Bleijswijk *et al.* 1994). Il apparaît donc que par rapport aux données existantes dans la littérature, la taille de la cellule (SEM, Fig. 3.2) est plus élevée hors stress et avec stress et correspondrait au diamètre d'une souche de type B (Bleijswijk *et al.* 1994). La diminution de 20% du diamètre entre la phase stationnaire et la phase sénescence lors d'ajouts faibles et sans ajout (Fig. 3.1d, §IIA3) pourrait correspondre à un changement de nutrition du NO₃ vers le NH₄. Une différence similaire du diamètre de 10% entre la phase de croissance et le déclin avait été observée lors d'une nutrition par NH₄, alors qu'elle était absente sous nutrition de NO₃ (Lecourt *et al.* 1996). **La stimulation de la taille des coccosphères à faible NO₃, probablement due à la présence de plusieurs couches de coccolithes, conduirait à un effet stimulant de la densité des coccosphères et par conséquent à une stimulation du taux de sédimentation. Cependant, le taux de sédimentation des coccosphères pourrait être contrebalancé par la diminution de la densité des cellules organiques, en cas de stress en NO₃, qui serait associé à la production d'un important stockage de carbone organique sous forme de lipides plus légers que les protéines (§IIIA4).**

Les causes de l'augmentation de la taille mesurée de 5.5 à 7.5 µm (Fig. 3.2) produit par un stress en NO₃ sont à rechercher dans l'augmentation du nombre de coccolithes attachés formant la coccosphère. Hors du stress en NO₃ (45 µM), le nombre de coccolithes attachés au jour 10 est de 13 coccolithes cell⁻¹ (Tab. 3.1) et il correspond à 1 ou 2 épaisseurs de coccolithes formant la coccosphère (Balch *et al.* 1993 ; Fritz et Balch, 1996). Ce nombre de couches de coccolithes autour de la coccosphère est en accord avec le résultat des observations antérieures. En effet, le nombre de coccolithes attachés autour de la cellule est compris entre 15 et 20 coccolithes cellule⁻¹ en laboratoire, en conditions non limitantes en nutritifs (Paasche 1962, 1999 ; Linschooten *et al.* 1991) et *in situ* (A.N., Holligan *et al.* 1983). En revanche, l'effet du stress en NO₃ sur le nombre de coccolithes attachés n'avait pas, à notre connaissance, été analysé auparavant. Un stress modéré (2.5 µM) par rapport à une condition sans stress en NO₃ (45 µM) induit une augmentation du nombre de coccolithes attachés par cellule de 13 à 23 coccolithes cell⁻¹ (jour 10, Tab 1). Cette augmentation correspond au passage d'une à deux couches de coccolithes autour de la coccosphère, couches ayant été produites sous l'effet d'un stress en NO₃. Cette augmentation de coccolithes attachés/cell observée au jour 10, lorsque les ajouts de NO₃ passent de forts à faibles, est en accord avec l'augmentation de la quantité de coccolithes attachés autour de la cellule sous un stress simultané en NO₃ et PO₄ obtenue en batch par Linschooten *et al.* (1991). Cette augmentation (du moins dans le cas d'un stress en PO₄) a été associée à une augmentation de la production d'un polysaccharide extracellulaire ayant pour propriété de coller les coccolithes plus fermement sur la coccosphère (Paasche and Brubak 1994). Cette augmentation du nombre de coccolithes autour de la coccosphère, produite par un stress en NO₃, correspond au passage d'une à deux couches de coccolithes, mais reste cependant 2 fois plus faible que lors d'un stress en PO₄ (Paasche and Brubak, 1994). La variation du nombre de coccolithes attachés en fonction de la concentration de nutriments n'est pas bien connue. La seule étude en culture, Paasche et Brubak (1994), nous apprend que le stress en PO₄ produit une forte accumulation de coccolithes autour de la cellule. En effet, entre un état de non-stress (>10 µM de PO₄, en batch) et un état de stress (croissance faible en chemostat contenant 0.6 µM de PO₄), le rapport du nombre de coccolithes totaux (attachés et détachés) sur le nombre de cellules augmente passant de 45 à 108 coccolithes cell⁻¹. Le résultat est contraire pour le rapport nombre de coccolithes libres/nombre de cellules qui reste autour de 20-30. C'est-à-dire qu'avec un stress de PO₄ en chemostat, la quantité de coccolithes attachés par le nombre de cellules aurait augmenté de 15-25 à 78-88 coccolithes cell⁻¹. Ces quantités correspondraient au passage de 1 ou 2 couches de coccolithes superposées autour d'une coccosphère à 4 couches (Balch *et al.* 1993, Fritz et Balch, 1996). **Le stress en NO₃ stimule le nombre de coccolithes attachés et pourrait ainsi contribuer à une stimulation du taux de sédimentation des coccosphères ou bien du nombre de coccolithes libres. La stimulation de**

la sédimentation des coccosphères pourrait toutefois être contrebalancée par une densité plus faible des coccolithes (§IIC2) et des cellules organiques (§IIIA4).

b. Les coccolithes totaux par cellule sont stimulés aux faibles NO₃

Le nombre de coccolithes totaux/cell est stimulé d'un facteur 2 lors d'un stress par les NO₃ (Tab. 3.1 ; §IIB1). Cette augmentation pourrait signifier une stimulation de la calcification en terme de production de coccolithes lors d'ajouts faibles en NO₃. Généralement, le nombre de coccolithes totaux/cell est la seule concentration de coccolithes mesurée dans les études (Linschooten *et al.* 1991 ; Paasche and Brubak, 1994). Nous analyserons ce terme de production de coccolithes en comparant avec la littérature tout d'abord la cohérence de nos valeurs, puis l'effet du stress en NO₃ sur cette quantité dans la phase de croissance et celle de sénescence.

La stimulation du nombre de coccolithes totaux/cell avec un stress en NO₃ est cohérente avec celle précédemment observée. Contrairement à la quantité de PIC/cell et PIC/POC au jour 10, inhibée lors de faibles NO₃ (§IIC1 et §IIC2) la quantité totale de coccolithes (attachés + détachés) par cellule est stimulée de 50% à 85% aux faibles NO₃ (spécialement lors de faibles ajouts ; §IIB1c). La stimulation de la quantité de coccolithes totaux par cellule lors de faibles ajouts comparativement à des forts ajouts de NO₃ est en accord avec les observations de Paasche (1998). En effet, cet auteur, montre qu'une limitation par NO₃, en chemostat (<8.7 µM), stimule la production totale de coccolithes d'un facteur 2 (Tab. 3.2). Les coccolithes totaux/cell maxima (50 coccolithes totaux cell⁻¹) obtenus à l'issue de la phase de croissance (jour 10) représentent 33%-45% de ceux observés (également dans la phase stationnaire de croissance) lors de cultures sous des conditions N-limited (Paasche, 1998), P-limited (Paasche et Brubak, 1994 ; Paasche, 1998), N et P-limited (Linschooten *et al.* 1991) (Tab. 3.2). Ces plus faibles concentrations peuvent être associées à des différences entre les souches d'*E. huxleyi* employées, provenant essentiellement de fjords norvégiens lors des études antérieures ; alors qu'ici, nous avons utilisé une souche d'Atlantique Nord. Le maximum de coccolithes totaux/cell représente également 45% du rapport observé au bout de 50 jours de croissance, lors d'une étude en batch, sous conditions limitées en lumière (Paasche, 1999). Dans ce dernier cas, le rapport coccolithes totaux/cell aussi intense peut être issu d'une augmentation plus lente de coccolithes totaux et de cellules, mais ininterrompue et plus durable (50 jours) par rapport aux études en batchs limités en NO₃ (10 et 6 jours de croissance dans respectivement notre étude et celle de Paasche, 1998). Le maximum obtenu, au jour 20, de 152 coccolithes totaux par cellule est par contre plus fort de 20% à 30%, que le maximum enregistré dans d'autres études en culture (Tab. 3.2). Ce plus grand rapport de coccolithes totaux/cell, ici obtenu, peut être attribué au fait qu'il a été mesuré lors de la phase sénescence avec un triplement de la quantité de coccolithes totaux /cell entre le jour 10 (fin de phase de croissance) et le jour 20 associé à une diminution de moitié de la population de cellule (Tab. 3.1). Alors que dans les études précédentes aucune mesure dans la phase sénescence n'avait été effectuée, probablement en raison de l'utilisation de chemostat généralement non employés lors de la phase sénescence. Ce rapport de coccolithes totaux élevé dans nos cultures est au contraire en accord avec les rapports coccolithes libres/cell documentés *in situ* en Atlantique Nord (cf. §IIB1 ; Balch *et al.* 1991 ; Wal *et al.* 1995).

La quantité de coccolithes totaux/cell dans notre étude présente un triplement au passage de la phase de croissance vers la phase sénescence. Ils atteignent des concentrations de 150 coccolithes totaux/cell, 20% plus importantes que celles observées antérieurement en culture mais similaires aux blooms d'Atlantique Nord.

3. Production de coccolithes, croissance et mortalité : trois facteurs clés du bloom visible

a. Effet de la phase de croissance et du NO₃ sur les différents facteurs qui déterminent le bloom visible

L'effet du stress en NO₃ est d'inhiber la croissance et de stimuler le détachement de coccolithes et la mortalité. En effet, un stress fort et modéré en NO₃ inhibe la croissance dans la phase exponentielle, avec une valeur de 0.17 et 0.45 jour⁻¹ qui est 80% et 60% plus faible que lors des forts NO₃ (Fig. 3.1c). Durant les 15 premiers jours du bloom est produite une concentration de coccolithes similaire, quel que soit l'ajout, et un détachement de coccolithes (en moyenne de 7.7 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹). Le taux de détachement est toutefois stimulé d'un facteur 2.5 et 1.6 (Fig. 3.4b) lors d'un stress modéré en NO₃ par rapport à des forts NO₃ et des conditions très stressantes en NO₃. La mise en évidence pour la première fois en batch culture, du déclin de la population de cellules, suggère que la phase sénescence se produit, lors de forts ajouts, 3 et 4 jours plus tard que lors de faibles ajouts (jour 12) et sans ajouts de NO₃ (jour 10) (Fig. 3.1a). De forts NO₃ permettent aux cellules de retrouver un pic secondaire de population de 35.5 x10⁴ cells mL⁻¹, au jour 24 (Fig. 3.1a). Lorsque le NO₃ est très stressant le détachement durant ces deux mêmes phases est inhibé d'un facteur 2 et 3 par rapport à un stress modéré (Fig. 3.4b).

Les phases de croissance auraient des effets différents sur la variation de la population de cellules et sur celle du processus du détachement. Durant cette phase, la population de cellules augmente selon un taux de croissance initial qui suivrait une courbe de type Michaelis Menten avec la concentration de NO₃. La saturation de la croissance de 0.82 jour⁻¹ et une constante de demi-saturation de 2.1 µM (cf. §IIA2, Fig. 3.1). Le taux de renouvellement des coccolithes libres se fait selon un rapport 1:1 comparativement taux de croissance des cellules (cf. §IIB3c, Fig. 3.5c). Par contre, la quantité de coccolithes/cell augmente selon un taux de détachement, de 8.2 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹, qui est maximum lors d'un stress modéré en NO₃ (cf. §IIB3, Fig. 3.4b et 3.5b). De même, le nombre de coccolithes attachés autour de la cellule, de 23 coccolithes cell⁻¹, ainsi que la taille de la cellule, de 7.5 µM, serait maximale lors de faibles NO₃ (2.5 µM ; cf. §IIB1, Tab. 3.1). Ces valeurs de taille et de quantité de coccolithes attachés attesteraient d'une différence dans la croissance des cellules qui permet une accumulation de coccolithes autour de la cellule lorsqu'elle est faible.

Durant la phase sénescence, la population de cellules diminue, alors que la quantité de coccolithes continue d'augmenter (50% des coccolithes sont produits dans cette phase) quel que soit l'ajout en NO₃ (Fig. 3.3a). Le taux de croissance associé à la mortalité des cellules diminue pour atteindre une valeur inférieure à 0 et d'autant plus faible et d'autant plus tôt que le NO₃ est faible (Fig. 3.4b) : le taux de croissance, de -0.35 jour⁻¹ au jour 10, est 2 fois plus faible et intervient 5 jours plus tôt que lors d'ajouts forts. La quantité de coccolithes continue d'augmenter selon un taux de renouvellement de 0.15 jour⁻¹ et reste supérieur à la croissance des cellules. Il existe un palier après la phase sénescence au jour 15 où le nombre de coccolithes stagne associé à un taux de renouvellement et de croissance nul. Cette stagnation interviendrait 3 jours après le début de la phase sénescence. Par contre, la quantité de coccolithes libres serait plus stimulée lors de faibles ajouts de NO₃, tel qu'attestée par un rapport de coccolithes libres/cell qui augmente d'un facteur 4 entre les jours 12 et 15 (Fig. 3.3a), et 10 fois plus intensément qu'à fort NO₃, durant cette phase de sénescence. Le taux de détachement associé au rapport de coccolithes libres, diminue d'un facteur 2 par rapport à sa valeur durant la phase de croissance, mais est supérieur à faible qu'à fort NO₃. Cet avantage à faible NO₃ est associé à une mortalité des cellules et à une désagrégation des coccolithes attachés autour des cellules qui seraient plus importantes et expliqueraient l'apparition d'un bloom de coccolithes de même ordre de grandeur quel que soit l'ajout de NO₃. **La phase de croissance est propice à**

l'accroissement des cellules et au détachement simple ; alors que la phase sénescence serait au contraire propice à la mortalité des cellules et à la désagrégation.

b. Effet des NO₃ sur l'intensité des blooms visibles

Les résultats des effets conjugués du NO₃ sur les différents paramètres clé d'un bloom (croissance, mortalité et détachement) permettent de distinguer des conditions en NO₃ propices à leur formation. Néanmoins, compte tenu du fait que les blooms visibles par satellite doivent *a priori* être formés et sont visibles uniquement lorsqu'il y a une forte population de cellules et que celle-ci produit une grande quantité de coccolithes libres. Ces derniers sont les premiers responsables des signaux blancs détectés en surface par le satellite, lorsque leur concentration est importante (ie. supérieure à $>10 \times 10^4$ coccolithes libres mL⁻¹ d'après Holligan *et al.*, 1983). Nous analyserons séparément dans ce paragraphe, dans un premier temps les conditions en NO₃ propices à une forte population et dans un second temps celles propices à la fabrication de coccolithes.

L'effet des ajouts de NO₃ sur la population de cellules (§IIA1, Fig. 3.1a) n'est pas similaire à celui observé sur les coccolithes (§IIB2, Fig. 3.3a) : le fort NO₃ favoriserait la population ; alors qu'au contraire des NO₃ modérément faibles seraient les plus favorables à une forte production de coccolithes.

(i) *Les blooms de cellules*, seraient favorisés lors de fort NO₃ ($>20 \mu\text{M}$). Ces forts NO₃ permettent d'atteindre une population intense de cellules (38×10^4 cells mL⁻¹, Fig. 3.1a) à l'apogée du bloom (jour 10), fruit de la forte croissance, de 0.78 jour^{-1} , observée au début de la phase exponentielle de croissance (Fig. 3.1c). Par contre, ces cellules soumises aux forts NO₃ produisent relativement peu de coccolithes par cellules, avec à l'apogée du bloom de population de cellules, une concentration de seulement 13 coccolithes attachés cell⁻¹ (Tab. 3.1) et de coccolithes détachés aussi faible que 10 coccolithes libres cell⁻¹ (Fig. 3.4a), respectivement 2 et 10 fois plus faible qu'à faibles NO₃. Par conséquent, le bloom de coccolithes, dans des eaux riches en NO₃, pourrait être dû à une grande production de cellules. La particularité des forts NO₃ serait alors de permettre l'intensification des blooms visibles par le satellite au cours du temps, de l'étendre au-delà de la phase stationnaire, à travers une production intense de coccolithes libres (1630×10^4 coccolithes libres mL⁻¹, Fig. 3.3a). Cette production de nombreux coccolithes libres s'effectue grâce à un maintien de la population de cellules au-dessus de 20×10^4 cells mL⁻¹ durant la phase sénescence (Fig. 3.1a) ; mais aussi et principalement, grâce à une reprise de la croissance de la population de cellules (0.12 jour^{-1} ; Fig. 3.1b) au-delà du jour 20. Cette reprise de la croissance est accompagnée d'une reprise du taux de détachement de 5.85 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ (Fig. 3.4b), qui conduit à un rapport coccolithes libres/cell maximal de 70 coccolithes libres cell⁻¹ à la fin de l'expérience (jour 39, Fig. 3.4a). Ce comportement d'*E. huxleyi* suggère la possibilité de production de blooms de coccolithes libres de manière continue, par un processus de détachement moyen relativement faible, de 2.5 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹ mais continu et qui persisterait au cours du temps, dans les régions où le NO₃ reste fort (supérieur à $20 \mu\text{M}$). C'est le cas par exemple des eaux de subsurface des hautes latitudes du Pacifique Nord ou du sud des Océans (Atlantique, Pacifique et Indien), ainsi que des upwellings d'Afrique et d'Amérique du Sud-Ouest, toutes des régions où sont visualisées d'intenses et/ou grandes surfaces couvertes par des signaux blancs associés à *Emiliania huxleyi* par les données satellitales (CZCS, SeaWiFS ; cf. Chap. 4, Fig. 4.1a et Tab. 4.1).

(ii) *Les blooms de coccolithes libres* seraient au contraire favorisés lorsque le NO₃ est modérément faible ($>2 \mu\text{M}$). Le bloom de coccolithes (480×10^4 coccolithes libres mL⁻¹, Fig. 3.3a) dans le cas d'ajouts modérément faibles de NO₃ se produisant au jour 15, correspond à la phase sénescence et non pas à celle de forte croissance de cellules. Les concentrations atteintes en terme de coccolithes à faibles NO₃ sont similaires à celles observées lors de forts NO₃ ; mais, le bloom de coccolithes libérés lors de faibles NO₃ est le fruit d'une population, de seulement 8

$\times 10^4$ cells mL⁻¹ le jour 12 (Fig. 3.1a) et qui reste 5 fois plus faible que celle atteinte à l'apogée du bloom de cellules à fort NO₃ (jour 12, Fig. 3.1a). Cette relativement faible population de cellules est le fruit d'une relativement faible croissance (0.45 jour⁻¹), conséquence de l'effet potentiel de limitation provoqué par le manque de NO₃ durant la phase exponentielle de croissance (Fig. 3.1c). En revanche, cette limitation de la croissance favoriserait au contraire la production de coccolithes par cellule, qui atteint à l'issue de la phase de croissance (jour 10) un nombre de coccolithes attachés/cell qui est deux fois (23 coccolithes attachés cell⁻¹, Tab. 3.1) et détachés 30 fois plus abondants (30 coccolithes libres cell⁻¹, ig. 3.4a) que ceux produit sans limitation de NO₃. Le fait remarquable est que cette limitation par les NO₃, en étant inhibante pour la production de cellules et en provoquant leur mort, stimule simultanément la quantité de coccolithes. Ainsi, dans la phase sénescence (entre le jour 12 et 15), serait produit plus de 50% du nombre de coccolithes libres observés le jour 15 (Fig. 3.3a). Cette forte production de coccolithes libres serait alors le fruit d'une désagrégation des cellules, provoquée à leur mort et non pas la conséquence d'un processus de détachement associé à une forte croissance. Cette désagrégation, lorsque le taux de croissance est négatif, est équivalente approximativement, en terme de mise en libération dans l'eau de coccolithes, au nombre produit par un taux de détachement similaire à celui observé durant la phase de croissance (6 coccolithes cellule⁻¹ jour⁻¹, Fig. 3.4a et 3.5b). Ce comportement d'*E. huxleyi* suggère l'existence de blooms de coccolithes par volume (/mL) dans les régions océaniques avec des concentrations relativement faibles de NO₃ (>2 μM). Ces blooms de coccolithes seraient aussi intenses que ceux produit par une population de cellules non limitée par le NO₃; mais ils seraient provoqués par un processus de désagrégation de coccosphères suite à la mort subite de cellules, probablement sur-calcifiées par le manque de NO₃ et non par un détachement classique. Ce serait le cas, par exemple, des eaux de surface des régions tempérées des 3 grands océans, ainsi que celui de la région centrale du Pacifique équatorial.

Il ressort donc que, malgré une concentration dans la phase stationnaire de croissance de 480×10^4 coccolithes libres mL⁻¹ (jour 15, Fig. 3.3a), similaire à fort et faible NO₃, les processus responsables de ce bloom de coccolithes libres sont différents et propres à chaque condition de NO₃. Durant les 15 premiers jours du bloom, un stress modéré en NO₃ (2 μM) stimulerait le bloom visible avec un taux d'augmentation de coccolithes libres de 36 coccolithes mL⁻¹ jour⁻¹ (Fig. 3.3b). Cette augmentation est néanmoins similaire en intensité à celle produite lors d'abondants NO₃ (45 μM) durant les 15 premiers jours. Cette similarité de la variation de coccolithes libres serait causée par une quantité de coccolithes libres par cellule (en moyenne de 44 coccolithes libres cell⁻¹) stimulée d'un facteur 5.5 (Fig. 3.4a) à NO₃ modéré durant les 15 premiers jours. De plus, cette stimulation du nombre de coccolithes est observée malgré une population de cellules en moyenne relativement faible (4.2×10^4 cell mL⁻¹), et qui semble inhibée d'un facteur 4, lorsque le NO₃ est faible (Fig. 3.1a). Cette stimulation du nombre de coccolithes libres par cellule serait la conséquence d'une stimulation, à la fin de la phase de croissance (jour 10), de la production de coccolithes attachés autour de la cellule, et qui augmente de 14 à 23 coccolithes attachés cell⁻¹ (Fig. 3.2) lorsque le NO₃ passe de fort à faible. Ce lien entre coccolithes attachés et libres se ferait à travers la coexistence du détachement et de la désagrégation et qui permettrait de libérer encore plus de coccolithes lors de la phase sénescence que lors de la phase de croissance. Les deux conditions de NO₃ faible (>2 μM) et fort (>20 μM), existent dans diverses régions océaniques à différentes profondeurs de la couche éclairée de surface (couche euphotique), et seraient toutes les deux propices aux blooms visibles. Mais alors que les premières (pauvres en NO₃) sont des conditions fréquentes à la surface de l'océan et pouvant couvrir des grandes extensions (eg : régions tempérées 40-50° Nord et Sud des 3 grands océans, Fig. 4.1d), les secondes (riches en NO₃) sont caractérisées par des surfaces plus réduites et elles sont plus rarement rencontrées en surface : comme dans le cas des blooms visibles (Fig. 4.1a) au Sud de 65°S dans les trois océans (Atlantique, Pacifique et Indien), et au Nord (latitudes >65°N) dans le Pacifique Nord. Uniquement un très fort stress en NO₃ (<1 μM) pourrait inhiber le

bloom de coccolithes. Celui-ci serait, dans ces faibles NO₃, associé à un taux d'augmentation de la concentration de coccolithes libres (de 3.7 coccolithes/mL/jour les 15 premiers jours) et qui est en moyenne 10 et 6 fois plus faible que lorsque des ajouts de NO₃ ont lieu. L'inhibition de coccolithes libres, lors du fort stress en NO₃, serait due à une population plus faible d'un facteur 10 (en moyenne de 1.6×10^4 cell mL⁻¹, Fig. 3.1a) comparativement à celle observée lors de forts ajouts et cela, bien que la concentration de coccolithes libres par cellule, de 27 coccolithes cell⁻¹, reste plus forte de 30 % que celle produite lors de forts ajouts. Ces différences dans la concentration de coccolithes libres, dues au stress en NO₃, permet de définir un seuil de 2 µM, au-dessous duquel un bloom de coccolithes libres ne peut pas être similaire à celui produit lorsque le NO₃ est abondant.

C. Production de PIC et influence du NO₃

Le NO₃ fort stimule la population de cellules (cf. §IIIA3a), alors que c'est au contraire un NO₃ faible qui stimulerait le nombre de coccolithes (cf. paragraphes). Ces deux effets du NO₃, peuvent également affecter la production de PIC durant toute la durée du bloom et ne pas être similaires durant les deux phases de croissance.

1. Effet de la phase de croissance et du NO₃ sur le PIC/cell et /POC

Les résultats ont montré que le PIC/cell et le PIC/POC augmentent respectivement d'un facteur 3 et 10 lors de forts ajouts et diminuent au contraire lorsque le NO₃ est faible. L'effet du NO₃ sur le PIC/cell est différent en fonction de la phase de croissance : à l'issue de la phase de croissance (jour 10) le PIC/cell est inhibé par l'ajout faible. Au contraire, quel que soit l'ajout initial de NO₃, le PIC/cell et le PIC/POC augmentent entre la fin de la phase de croissance (jour 10) et la phase sénescence (jour 20). Ces effets potentiels sont ici comparés avec les quelques expériences antérieures ayant abordé l'étude potentielle des éléments nutritifs sur le réservoir de carbone inorganique particulaire. Un effet indirect du NO₃ sur le mécanisme lui-même de calcification, à partir de son effet sur le PIC/cell est proposé.

Lorsque sont comparées les réponses à l'issue de la phase de croissance du PIC/cell et du PIC /POC avec les résultats des expériences publiées dans la littérature, la réponse varie en fonction de l'intensité du NO₃. A fort NO₃ la réponse est similaire aux effets observés par les études antérieures. Dans des conditions de forts ajouts de NO₃, un PIC/cell de 3.8 pgC et un PIC/POC de 0.47 mol mol⁻¹ à l'issue de la phase de croissance (jour 10, Tab. 3.1) sont du même ordre de grandeur que ceux observés lors des expériences en cultures conduites avec des nutritifs non limitants pour la croissance (Balch *et al.* 1992 ; Bleijswijk *et al.* 1994 ; Paasche et Brubak, 1994 ; Paasche *et al.* 1996 ; Tab. 3.2). Par contre, toujours à l'issue de la phase de croissance (jour 10) ; mais dans des conditions de faibles ajouts et sans ajout de NO₃, le PIC/cell de 1.22 et 1.52 pgC cell⁻¹ et le PIC/POC de 0.04 mol mol⁻¹ (Tab. 3.1) sont 2 à 8 fois et 9 à 200 fois plus faibles que ceux obtenus antérieurement, dans des chemostats limités en N et correspondent à une phase de croissance avancée (Riegman *et al.* 1998 ; Paasche, 1998 ; Fritz, 1999 ; Tab. 3.2). Le plus faible PIC/cell mesuré lors de nos expériences pourrait être dû à l'utilisation d'une souche d'*E. huxleyi* de l'Atlantique Nord ; alors que la majorité des expériences précédentes avaient été conduites avec des souches originaires des fjords norvégiens. Le réservoir de calcite peut varier en fonction de l'origine des souches ; et cela même dans des conditions environnementales (température et de lumière) similaires. A titre d'exemple, des différences d'un facteur 10 peuvent être remarquées entre le PIC/cell par Bleijswijk *et al.* (1994) ayant utilisé une souche provenant des fjords norvégiens et Balch *et al.* (1992) qui avaient travaillé avec une souche d'Atlantique du Nord-Ouest (Tab. 3.2). En revanche, le relatif faible PIC/POC obtenu lors de nos expériences, à l'issue de la phase de

croissance dans le cas de faibles ajout de NO₃ (§IIIA4, Tab. 3.1), peut être attribué à une relative forte concentration de POC de 33 pg/cell, c'est-à-dire 6 fois supérieur à celle observée dans l'expérience de Riegman *et al.* (1998, Tab. 3.2).

L'effet simultané d'un stress en NO₃ sur le PIC/cell et sur le PIC/POC sur une même souche pour différentes concentrations de NO₃ est, à notre connaissance, pour la première fois réalisée ici en conditions contrôlées. Des études antérieures ayant stressé une même souche d'*E. huxleyi* par divers nutritifs en chemostat uniquement, permettent néanmoins de comparer le changement du PIC/cell uniquement entre des conditions limitantes en NO₃ et en PO₄. Le PIC/cell à l'issue de la phase de croissance (jour 10) lors d'ajout faible est inhibé d'un facteur 2.5, comparativement à l'effet de forts NO₃ (Tab. 3.1). Cette inhibition est du même ordre de grandeur que la diminution observée dans la phase avancée de croissance (μ faible en chemostat) lorsque est comparé l'effet d'une limitation en NO₃ par rapport à une limitation en PO₄ (Paasche 1998, Riegman *et al.* 1998 ; Tab. 3.2). Par contre, une inhibition du PIC/POC aussi intense qu'un facteur 10, observée à l'issue de la phase de croissance (jour 10, Tab. 3.1) n'avait pas été observée précédemment. Effectivement, la diminution du PIC/POC lors des expériences de Riegman *et al.* (1998) et Paasche (1998) avaient été de seulement 10% à 50% (Tab. 3.2).

Quel que soit l'ajout initial de NO₃, dans nos expériences le PIC/cell et PIC/POC, au contraire augmentent entre la fin de la phase de croissance (jour 10) et la phase sénescence (jour 20). Le PIC/cell augmente d'un facteur 1.2, 3.3 et 2.5 pour des ajouts respectivement forts, faibles et nuls. De même, durant ces phases, le PIC/POC augmente mais d'un facteur 2.6 et 74, pour des ajouts en NO₃ respectivement forts et faibles (Tab. 3.1). Cette augmentation du PIC/cell entre les phases stationnaire et sénescence est en accord avec celle d'un facteur 2 à 4 du PIC/cell observée dans les études antérieures, mais qui avaient été conduites uniquement à N-limité et en chemostat (Paasche, 1998 ; Fritz, 1999 ; Tab. 3.2). La seule exception qui montre, au contraire, une diminution du PIC/cell de 10% entre le début et la fin de la phase de croissance en chemostat est celle de Riegman *et al.* (1998 ; Tab. 3.2). Ainsi, l'augmentation du PIC/POC, entre les jours 10 et 20 est, soit en accord avec l'augmentation de 30% observée entre le début (μ fort) et la fin (μ faible) de la phase de croissance (dans un chemostat limité en N, Riegman *et al.* 1998), soit contraire à la diminution de 10% obtenue par Paasche (1998 ; Tab. 3.2)

L'inhibition de la production de PIC produite par un effet de stress en NO₃ peut impliquer des variations du processus de calcification. L'augmentation de PIC/cell observée entre les jours 10 et 20 (phase sénescence) dans le cas de faibles ajouts et sans ajout de NO₃, supérieure d'un facteur 2 par rapport à celle obtenue lors de forts ajouts, ne représenterait cependant pas une stimulation du PIC/cell par le stress en NO₃. La raison serait que cette augmentation du PIC/cell est associée à une mortalité des cellules de 60% et 75% (§IIA1, Fig. 3.1a), et également à une faible augmentation, voir à une diminution du PIC/mL (§IIC1, Tab. 3.1). L'augmentation du PIC/mL est de 25% lors de faibles ajouts et la diminution est de 40% en absence d'ajout (§IIC1) ; alors que lors du fort ajout, l'augmentation du PIC/mL peut atteindre un facteur 2. La relative faible augmentation ou stagnation du PIC/mL dans le cas de faibles ajouts de NO₃, voire la diminution sans ajouts suggère deux interprétations différentes. D'un côté, que la calcification pourrait vraisemblablement rester nulle durant la phase sénescence ; et d'un autre côté qu'une dissolution de la calcite pourrait bien avoir eu lieu durant la phase sénescence. De même l'augmentation de PIC/POC, durant cette phase, lors de faibles ajouts, pourrait être attribuée à une diminution d'un facteur 20 du POC/cell (§IIC2). De plus, la calcification dans le cas de forts ajouts en NO₃ s'arrêterait entre les jours 20 et 30, puisque le PIC/mL n'évolue plus durant cette période (Tab. 3.2) et que l'augmentation apparente du PIC/cell, de 50%, pourrait alors être attribuée à une phase de mortalité des cellules de 40% (Tab. 3.1). Il apparaît donc que de même que la production de cellules, la production de calcite par cellule et par POC pourrait être inhibée durant la phase de croissance avec un PIC/cell plus faible d'un facteur 2.5, lors des faibles ajouts de NO₃, et qui s'arrêterait, autour du jour 10, c'est-à-dire 10 jours plus tôt qu'en

conditions non stressantes en NO₃. **En conclusion, un stress en NO₃ inhiberait la production de PIC par cellule et par mL alors que de fortes concentrations en NO₃ au contraire stimuleraient ce PIC.** Le PIC/mL produit par le bloom d'une population d'*E. huxleyi* faiblement limitée en NO₃ (2 µM) est mesuré ici pour la première fois, grâce à des cultures en batch. Ces expériences montrent, de façon simple, que le PIC/mL fabriqué par une telle population, produirait 10 fois moins de PIC (0.15 µg/mL) qu'une population non limitée en NO₃ (20 µM), et cela durant un bloom 2 fois moins long (10 jours). Par contre ce faible stress en NO₃ produirait 3 fois plus de PIC qu'une population fortement stressée en NO₃ (0.5 µM).

2. Le PIC/coccolithe inhibé au faible NO₃ et intense au forts NO₃

La concentration de PIC/coccolithe à fort ajout de NO₃ est de 0.14 pg coccolithe⁻¹ ; et en accord avec la gamme de 0.165 à 0.26 pgC coccolithe⁻¹ obtenue dans des études antérieures, mais uniquement hors de conditions limitantes (Paasche, 1962 ; Balch *et al.* 1992 ; Paasche *et al.* 1996 ; Tab. 3.2). La concentration de PIC par coccolithe (attachés ou détachés) est réduite le jour 20 lors d'un stress en NO₃ (Tab. 3.1). Cette réponse du PIC/coccolithe, d'une diminution lors d'ajouts faibles ou sans ajout d'un facteur 4.5 par rapport à l'effet de forts ajouts en NO₃ est similaire à la réponse sur le PIC/cell et du PIC/POC (§IIC2, Tab. 3.1). Le faible PIC/coccolithe, lors de faibles ajouts de NO₃ est en accord avec des concentrations de 0.03 à 0.135 pgC coccolithe⁻¹, mesurées à NO₃ limitant, dans les études de Linschooten *et al.* (1991); Paasche (1998) ; Fritz, (1999 ; Tab. 3.2). Ces faibles PIC à faibles ajouts de NO₃ peuvent être considérés néanmoins, selon les conclusions de Paasche (2002), et à partir de mesures du CaCO₃ des coccolithes au rayons X (Fagerbakke *et al.* 1994) comme de 30% à 90% trop faibles pour pouvoir permettre la formation de coccolithes normalement calcifiés

La diminution de la quantité de calcite par coccolithe, d'un facteur 5, entre forts et faibles ajouts de NO₃, est de 40% entre la phase stationnaire et sénescence (Tab. 3.1). Cette inhibition avec le stress de NO₃ n'avait pas été observée dans des études antérieures. Les résultats de chemostat avaient déjà montré par contre une diminution avec le taux de croissance qui diminue. Cette diminution était de 70%, lorsque les cellules étaient limitées en NO₃ entre le début (µ fort) et la fin (µ faible) de la phase de croissance (Paasche, 1998 ; Fritz, 1999 ; Tab. 3.2), soit 2 fois plus inhibée. L'aspect des coccolithes attachés à la coccosphère, suggère que durant la phase de croissance, les coccolithes seraient moins calcifiés à faible NO₃ (§IIB1, Fig. 3.2). Cette sous-calcification représentée par des tailles de 3.5 et 3 µm en fonction des concentrations en NO₃, abondantes et/ou stressantes, est similaire à celle obtenue hors limitation (NO₃ de 3.2 à 3.6 µM) par Paasche *et al.* (1996), ou sous limitation (NO₃ de 2.8 à 3.1 µM) par Fritz (1999). Le stress en NO₃ inhiberait donc non seulement le PIC/coccolithe, mais également la taille des coccolithes.

A l'issue du bloom, de faibles NO₃, à l'inverse des forts NO₃, stimuleraient la calcification en terme de coccolithes totaux, attachés et libres par cellule, mais au contraire inhiberaient la concentration de coccolithes totaux /mL ainsi que celle du POC/cell, du PIC /mL et du PIC/coccolithe significativement. Cet effet des faibles NO₃ sur le PIC/mL et le POC/mL, déjà suggéré par Balch *et al.* (1992) par des expériences semi *in situ*, conduirait à des rapports de PIC/POC relativement faibles lorsque les régions océaniques sont oligotrophes (faible NO₃) mais à des concentrations de PIC et de POC 10 et 20 fois plus faibles en zone oligotrophique (faible NO₃) que lorsque *Emiliania huxleyi* grandit dans des régions eutrophiques (riches en NO₃).

3. Bloom de PIC visible et non visible

La quantité de CaCO₃ (ou PIC) produite dépend essentiellement de la concentration en NO₃. La concentration de PIC/mL, de 1.6 µg pour des concentrations de NO₃ de 20 µM, peut être un

facteur 10 plus important que lors de concentrations 10 fois plus faibles (§IIID1, Tab. 3.1). Cet effet des NO_3 sur le PIC/mL suggère que le bloom de PIC peut être jusqu'à 10 fois plus important en subsurface où la concentration de NO_3 peut atteindre des concentrations de 20 μM (eg. entre 50 et 100 m de profondeur dans le Pacifique Nord et Equatorial Est, le plateau de la Patagonie, l'Upwelling du Maroc et du Benguela ; base de données WOA, 2001), par rapport aux eaux de surface dans lesquelles la concentration de NO_3 est faible autour de 2 μM , comme c'est le cas dans le Nord de l'Atlantique en été ; WOA 2001). Le fort NO_3 stimulerait donc le bloom de PIC en subsurface

La situation est contraire pour le stress en NO_3 , lequel inhiberait le bloom de PIC. Un stress modéré en NO_3 (2 μM) conduit à un PIC/mL 10 fois plus faible que sans stress (§IIID1). Ceci implique qu'un stress modéré ne produise pas, comme pour la concentration de coccolithes libres (§IIC2), un PIC/mL similaire à celui fabriqué lors de fort NO_3 (de 1.62 $\mu\text{g/mL}$, Tab. 3.1). Les cellules dans de faibles NO_3 arrêteraient la production de calcite, telle que marquée par la faible évolution de PIC/mL entre le jour 10 et 20, une dizaine de jours plus tôt que les cellules soumises à de fort NO_3 (le PIC/mL restent constant entre les jours 20 et 39), cf. §IIID1, Tab. 3.1). Cette inhibition pourrait être due, malgré la stimulation de la quantité de coccolithes par cellule (libres, §IIB1 ; attachés, §IIB2 ; et totaux, §IIID3), au fait qu'un stress modéré en NO_3 (2 μM) ne permet pas la fabrication d'un PIC par cellule (1.52 pg cell^{-1}) et par POC (0.04 mol mol^{-1}) intense à l'issue de la phase de croissance. Le PIC/cell et le PIC/POC restent, en effet, 5 et 10 fois plus faibles que lors de forts NO_3 (cf. Tab. 3.1). Cette inhibition de la quantité de PIC/cell et du rapport PIC/POC par un stress modéré en NO_3 pourrait être également la conséquence d'une inhibition du PIC/coccolithe, qui avec 0.03 $\text{pg coccolithe}^{-1}$, reste 5 fois plus faible que lors de fort NO_3 (Tab. 3.1). Malgré l'inhibition du PIC/cell et du PIC/POC dans la phase de croissance, une stimulation par un stress modéré apparaît en phase sénescence (jour 20 ; cf. §IIC2 et §IIC3, Tab. 3.1). Ces forts PIC/cell et PIC/POC durant la phase sénescence, de respectivement 5 pg cell^{-1} et 3 mol mol^{-1} , c'est-à-dire 15 % et 2 fois plus forts qu'à NO_3 fort, seraient dus à des faibles concentrations de cellules (3 $\times 10^4$ cells mL^{-1}) et de POC (0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$) provoquées par leur importante perte (respectivement -60% et -95%). Cette perte est à son tour provoquée par la forte mortalité des cellules produites entre la phase de croissance (jour 10) et la phase sénescence (jour 20 ; alors que parallèlement le PIC/mL reste constant (Tab.1, et §IIID1).

Le stress en NO_3 inhiberait probablement la calcification en terme de quantité de PIC fixé par cellule et par coccolithe durant la phase de croissance, comme cela a été visualisé à travers les faibles concentrations du PIC/mL et du PIC/coccolithe au jour 10 (Tab. 3.1). Par contre, ce même stress en NO_3 stimulerait la production de coccolithes totaux par cellule durant la phase de croissance (§IIID3). Cette stimulation permet de supposer que si la concentration de PIC/coccolithe était plus forte que celle estimée pour nos expériences, alors le stress en NO_3 produirait une stimulation de la calcification (ie. du PIC/cell issue du produit PIC/coccolithes et du nombre de coccolithes/cell), similaire à celle proposée antérieurement par Paasche (1998) et Fritz (1999). *Cette hypothèse pourrait aider à concilier la contradiction selon laquelle, le PIC par cellule augmente (Paasche 1998, Fritz 1999) ou diminue (Riegman et al. 2000) avec les stress en NO_3 dans les études antérieures en chemostat.* Mais, ce même stress en NO_3 , qui produit une plus forte quantité de coccolithes, de plus petite taille et contenant moins de PIC que lors de forts NO_3 , serait stimulant pour la fabrication de blooms visibles plus intenses. Ces blooms visibles intenses seraient le fruit alors d'un détachement deux fois plus important de coccolithes (cf. §IIC2c), coccolithes moins sujets à la sédimentation de par leur petite taille et leur faible densité (cf. §IIC2). De même, la diminution du diamètre d'environ 20% (§IIB1a, Fig. 3.1d) durant la phase sénescence par rapport à la phase exponentielle favorise la thèse d'une persistance des coccosphères en surface lors de la mort ou déclin de cellules.

Un fort stress en NO_3 (<1 μM) inhiberait, dans la phase de croissance (jour 10) et la phase sénescence (jour 20), de manière encore plus importante la concentration de PIC (0.05 et 0.03 μg

mL⁻¹) qu'un stress modéré, le PIC étant 2.5 et 5 fois plus faible lors du fort stress que lors d'un stress modéré en NO₃ (Tab. 3.1). Il est à noter, qu'un fort stress en NO₃ (NO₃<1 µM) aurait un effet contraire, inhibant le PIC/cell et qui ne serait pas compensé par un effet stimulant du nombre de coccolithes totaux/cell (Tab. 3.1).

Le stress modéré en NO₃ stimulerait donc l'intensité du bloom visible et le fort NO₃ stimulerait le bloom de cellules et de PI/:mL. De forts NO₃ stimuleraient les blooms de PIC/mL et cette stimulation serait due, du moins en partie, à la stimulation du bloom de cellules d'*E. huxleyi*, conséquence de l'effet positif de forts NO₃ sur sa croissance. La quantité de PIC produite serait ainsi 10 fois supérieure pour des cellules seulement 4 fois plus nombreuses. Cette stimulation de la production de PIC/mL est associée à une stimulation de la quantité de PIC/coccolithe 5 fois plus importante dans la phase de croissance. De par les effets stimulants du détachement dans la phase de croissance et sénescence (§IIIC2) et les effets inhibants de la quantité de PIC/cell et de PIC/coccolithe (§IIID4), un stress modéré en NO₃ intensifierait les blooms visibles. Il est possible de distinguer deux types de conditions favorables aux blooms de coccolithes, suivant qu'il s'agisse du détachement « simple » des coccolithes ou de la mort (la désagrégation) qui induirait les blooms visibles. Le premier cas est celui de forts NO₃ (20 µM, P.N. et Océan Sud) qui permettent le développement de blooms de coccolithes à travers celui des cellules de faible diamètre. Le second cas est celui de conditions faibles en NO₃ (2 µM, Atlantique Nord) qui permettent le développement de blooms de coccolithes par le phénomène de désagrégation, associé à une faible densité des coccolithes. Dans le premier cas, une déplétion des NO₃ à l'apogée du bloom pourrait produire les conditions propices à la mort des cellules et à leur désagrégation avant leur sédimentation. Cette désagrégation pourrait donc être un facteur aidant à comprendre l'apparition des blooms visibles tels que prédit par la pseudo niche d'Iglesias-Rodriguez *et al.* (2002). L'augmentation du détachement de coccolithes est associée à une diminution de la concentration en PIC/coccolithe dans le cas d'un stress en NO₃. Ainsi, cette association supporte l'hypothèse selon laquelle l'apparition et l'incrémentation des blooms visibles par satellite (dus aux coccolithes détachés de petite taille et de faible contenu en PIC), pourraient être causées par le manque de NO₃. Dans cette situation, l'apparition des blooms visibles correspondrait non pas à une croissance importante de cellules mais à la mort de celles-ci. Ce manque de NO₃ restent bien sûr à ajouter aux autres causes possibles (virus, broutage, mortalité,... cf. §IIF, Chap. 1), pouvant provoquer la mort des cellules et par conséquent le déclin des blooms véritables (ou blooms de cellules).

Conclusion

L'effet des ajouts faibles (2 µM) à forts (45 µM) de NO₃ sur la population de cellules et le réservoir inorganique d'*E. huxleyi* suggère que cet élément peut être le limitant principal de sa croissance et également affecter la fabrication du réservoir de Carbone Inorganique très complexe qu'est la coccosphère.

Les expériences, en conditions entièrement contrôlées, d'une durée totale de 40 jours, ont permis de mettre en évidence trois phases de croissance : une de croissance proprement dite, une stationnaire et une sénescence. Les durées de ces trois phases sont de respectivement : 12, 3 et 5 jours, lorsque le NO₃ est abondant (45 µM). Ces durées peuvent être réduites en moyenne de 25% lorsque le NO₃ diminue d'un facteur 10. L'observation de la phase sénescence fut possible, grâce en particulier, à la mise en place de cultures en batchs de longue durée. La distinction et le suivi de la phase sénescence sont apparus primordiaux pour la compréhension de la formation de blooms détectables par satellite. Cette approche a permis de reproduire les mêmes caractéristiques des blooms *in situ* en terme de durée et d'intensité.

Le double effet du NO₃ sur *E. huxleyi* permet de définir deux types de blooms : celui plus classique de cellules, observé dans la phase de croissance, et un autre correspondant au

maximum d'intensité de la concentration de coccolithes libres par cellule, observé tout le long du bloom mais maximal durant la phase sénescence. L'évolution de ces deux types de blooms et leur dépendance vis-à-vis du NO₃ seraient les facteurs clés de la fabrication de signaux visibles et intenses, détectables par satellite. Le bloom de cellules apparaît fortement limité par le NO₃. Sa population maximale, de 40×10^4 cells mL⁻¹ (au jour 12, pour NO₃ de 25 µM) diminue d'un facteur 5 lorsque le NO₃ est réduit d'un facteur 10. Cette inhibition du bloom de cellules, aux faibles NO₃ est produite par un effet de limitation de la croissance, d'un facteur 2, durant sa phase de croissance. Cette limitation correspondrait à une constante de demi-saturation pour la croissance, $K_{1/2}$ de 2.1 µM (ie. 10 fois supérieure à celle obtenue antérieurement en chemostat). Ce fort $K_{1/2}$, malgré une similitude de l'affinité ($0.4 \text{ jour}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) suggère qu'*E. huxleyi* puisse être encore plus mal adapté aux faibles concentrations de NO₃ et valide l'hypothèse qu'*E. huxleyi* serait limitée par l'azote. L'absence d'EDTA, lors des expériences de croissance ici présentées, pourrait être la clé de ces différences et indiquerait que ces cultures d'*Emiliania huxleyi*, reproduisent des conditions plus proches des conditions observées *in situ*. Une faible adaptation d'*E. huxleyi* aux faibles nitrates et une mortalité au contraire stimulée, expliquerait qu'*E. huxleyi* puisse être à la fois limité en NO₃ et avoir de forts besoins en NO₃ pour produire une efflorescence (4 µM en Atlantique Nord). Les faibles NO₃ (2 µM) inhibent non seulement l'intensité du bloom de cellules, mais également sa durée. La phase sénescence intervient 3 jours plus tôt (le jour 12) et la mortalité est 50% plus intense (perte de 60% de la population).

Un bloom de coccolithes libres intense est observé durant l'apogée du bloom de cellules dans le cas d'ajout fort, et durant la phase sénescence dans le cas d'ajout faible. Ces blooms de coccolithes sont produits par deux processus distincts : un processus de détachement et un autre de désagrégation des cellules. Le détachement, ayant lieu majoritairement lors de la phase de croissance des cellules, est classiquement impliqué dans la fabrication du bloom de coccolithes visibles par satellite. Le processus de désagrégation des cellules serait, au contraire, impliqué majoritairement dans la fabrication des signaux visibles (coccolithes libres), à la fin du bloom, lorsque les cellules meurent. Le NO₃ contrôlerait le mode d'apparition des blooms de coccolithes par ces deux processus. A fort NO₃, le processus dominant serait le détachement de coccolithes, puisque à l'issue de la phase de mortalité (jour 20), 80% des coccolithes libres sont fabriqués avant le jour 15 (début de la phase sénescence). A faible NO₃, à cause de son effet de limitation sur la croissance, le processus majeur est celui de désagrégation des cellules, avec plus de 50% des coccolithes libres, qui sont fabriqués à la mort des cellules entre le jour 12 et 20. En plus de la désagrégation, la forte concentration de coccolithes libres, lors de faible NO₃, serait due à un processus classique de détachement, de l'ordre de 8 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹, stimulé d'un facteur 2 à 5 par rapport à ceux produits à fort NO₃. La stimulation de la fabrication d'un grand nombre de coccolithes libres serait plus intense durant la phase sénescence : le fort nombre de coccolithes libres serait dû ici à une désagrégation des coccolithes attachés autour de la cellule (23), 75% plus nombreux, provoquée par une mortalité de cellules 50% plus intense à faible NO₃. L'apparente contradiction entre l'apparition du grand nombre de coccolithes libres (blooms visibles d'*E. huxleyi*), corrélée à une diminution de NO₃, et le fait que cette espèce puisse être N-limitée, est observée dans les trois expériences d'ajouts. Les signaux visibles par satellite correspondent à une libération rapide (doublement) du nombre de coccolithes libres, provoquée par la mort des cellules en phase sénescence. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'*E. huxleyi* soit une espèce peu compétitive vis-à-vis des NO₃ (ie. Caractérisé par un $K_{1/2}$ de 2.1 µM).

La persistance d'une forte concentration de coccolithes libres/mL à la surface de l'océan serait, au contraire de la population de cellules, stimulée par les NO₃ faibles et 2 fois supérieur dans la phase de déclin que dans la phase de croissance. Mais des NO₃ de 2 µM produiraient au jour 15 un bloom de coccolithes libres (480×10^4 coccolithes libres mL⁻¹) aussi intense que celui produit par des NO₃ 10 fois plus forts. Cette similarité serait due à une stimulation du nombre de coccolithes libres cell⁻¹ (250) d'un facteur 10 à faible NO₃. Cette forte concentration de

coccolithes libres par cell reproduit les valeurs enregistrées lors des blooms d'*E. huxleyi* en Atlantique Nord.

L'intensité du NO₃ affecte également la taille des coccolithes, leur contenu en PIC, respectivement de 3.5 µm et de 0.14 pg coccolithe⁻¹ à forts NO₃. Ces deux paramètres, d'importance majeure pour les signaux détectés par satellite apparaissent inhibés de 15% et d'un facteur 5 lorsque l'eau de mer est pauvre en NO₃. La taille de la coccosphère, de 7.5 µM aux faibles NO₃, est stimulée de 30% par rapport à celle observée due aux forts NO₃. Cet effet du NO₃ sur la coccosphère, ajouté aux effets inhibants des faibles NO₃ sur la taille de coccolithes et leur contenu en PIC, en induisant une diminution de la densité d'*E.huxleyi* permettrait également une plus grande persistance du bloom visible par les satellites en surface de l'océan. Le contrôle du PIC produit par le NO₃ suggère que le PIC/mL maximal est produit uniquement en subsurface, par exemple à une profondeur de 100 m, associé à un NO₃ de 20 µM, et reste non détectable ou invisible par satellite. Cette concentration de PIC/mL pourrait être supérieure d'un facteur 10 au bout de 20 jours de bloom (c'est le cas par exemple des zones équatoriales du Pacifique), comparée à celle de PIC/mL produit en surface (0 à 10 m) où les NO₃ sont plus faibles (2 µM). C'est le cas en surface du bloom de l'Atlantique Nord en été.

La persistance des cellules en surface lors de blooms produits dans des eaux pauvres en NO₃ peut être également affectée par le contenu en POC (de 33 pg cell⁻¹) résultant de l'effet du NO₃. Un NO₃, faible de 2 µM stimule le POC/cell, d'un facteur 4 à l'issue de la phase de croissance comparativement à l'effet produit par un NO₃ 10 fois plus fort. Cette stimulation est en accord avec les observations *in situ* de l'apogée des blooms d'*E. huxleyi* de l'Atlantique Nord. L'augmentation du POC produirait un effet d'accumulation des réserves de carbone sous forme de lipides (composés riches en carbone, moins denses que les protéines). Une forte concentration de carbohydrates aurait pour effet d'augmenter la flottabilité des cellules, ce qui induirait que les cellules puissent rester plus longtemps en surface.

La conséquence serait qu'il n'y aurait donc plus de contradiction entre la limitation de la croissance d'*E. huxleyi* aux faibles NO₃ et l'observation de blooms par satellites associé à une diminution du NO₃, tel que proposé par Iglesias-Rodriguez *et al.* (2002). Les coccolithes libres seraient produits en quantité similaire, que les NO₃ soient forts ou faibles, jusqu'à la fin du bloom de cellules (Jour 15). Mais, les NO₃ faibles induisent une faible densité des coccolithes et des cellules favorisant la persistance des blooms visibles à la surface. Une baisse des NO₃ sur un bloom de population d'*E. huxleyi*, proliférant initialement dans de forts NO₃, pourrait induire le passage d'un bloom de coccolithes provoqué par le détachement et associé à une forte croissance des cellules à un bloom de coccolithes provoqué alors par la désagrégation et dû à la mort des cellules (au 15^{ème} jour du bloom).

La disponibilité en NO₃ contrôlerait le réservoir inorganique, non seulement à travers son impact sur la concentration de coccolithes, mais également et directement sur le PIC fabriqué par *E. huxleyi*. Les faibles NO₃, dans la phase de croissance, inhibent fortement la production de PIC/mL et la concentration de PIC/coccolithe, mais selon un mécanisme inconnu. La concentration du PIC/mL à l'issue du bloom (jour 40), de 1.6 µg mL⁻¹ pour des NO₃ de 20 µM, est inhibée d'un facteur 10 et 30 lorsque les NO₃ diminuent à 2 µM et deviennent nuls. Cette inhibition avait été supposée par Balch *et al.* (1992). Remarquable est la production de PIC d'*E. huxleyi*, durant toute la durée du bloom et pour de faibles NO₃, ait été inhibée deux fois plus intensément que la population de cellules.

La production de PIC, au contraire stimulée par les forts NO₃, impose un PIC/cell et un PIC/POC plus faibles d'un facteur 2.5 et 10 qu'à forts NO₃. La mort des cellules et la reminéralisation du POC de cellules mortes durant la phase sénescence expliqueraient l'apparition d'une stimulation de la quantité de PIC/cell et de PIC/POC dans la phase sénescence. La concentration de PIC apparaît stimulée par les forts NO₃ en terme de PIC/mL d'un facteur 10 par rapport aux faibles NO₃. Cette inhibition avait été détectée *in situ* pour des

NO₃ de 1 µM de manière ponctuelle et reste donc à être validée avec des observations couvrant toute la durée d'un bloom.

L'opposition entre des conditions en NO₃ favorables aux blooms visibles par satellite (blooms de petits coccolithes, faible NO₃), avec les blooms de PIC et de cellules (à fort NO₃), suggère qu'il soit nécessaire de reconsidérer la nature des signaux satellitaires. Ces signaux représentent plutôt la mort de cellules et ne seraient pas forcément associés à un maximum de population et de croissance de cellules, et/ou de production de PIC. Ce rôle des NO₃, mis en évidence ici pour la première fois sur la totalité du réservoir inorganique : coccolithes attachés et détachés, et totaux et le PIC, suggère que la niche écologique permet de comprendre le succès ou l'ubiquité de cette algue puissent être différente de celle de ses blooms visibles par satellite (abordé au chapitre 4). Ces définitions de niches doivent prendre en compte non seulement l'effet du NO₃ sur sa croissance mais aussi sur les processus de fabrication de coccolithes libres et sur le processus lui-même de calcification. Ce lien entre PIC, coccolithes, croissance de cellules et NO₃, suggère que, dans le contexte du changement climatique actuel, l'évolution future des organismes calcifiants comme les coccolithophoridés, peut être contrôlée non pas uniquement par l'augmentation de l'acidification de l'eau de mer, induite par la pénétration dans l'océan du CO₂ atmosphérique, mais également par une redistribution des NO₃.

La stratégie de mise en culture développée pour nos expériences : concentration de NO₃ de l'ordre des concentrations naturelles lors des blooms d'*E. huxleyi* en été (2 µM, WOA, 2001), la non-utilisation d'EDTA, l'utilisation de batch culture, ainsi que l'observation pour la première fois de la phase sénescence, et le suivi simultané de la réponse des réservoirs carbonés de POC/cell, et PIC/cell et de coccolithes (totaux et attachés : coccolithes libres/mL et de coccolithes libres/cell) nous a permis de reproduire en laboratoire des conditions similaires à celles observées *in situ* dans le bloom de l'Atlantique Nord. Ce type de stratégie d'expérimentation en conditions contrôlées serait à privilégier dans les études futures associant chimie fine de spéciation des métaux et contraintes écologiques des algues calcifiantes, destiné à proposer des paramétrisations de modèles mathématiques à l'échelle cellulaire (cf. chapitre 1).

PARTIE II

ECHELLE DE L'OCEAN GLOBAL

Chapitre 4 : Qu'est-ce qu'un bloom visible et comment les prévoir ?

Pourquoi la mer devient blanche ? Les images satellitales d'*Emiliania huxleyi* connus comme des blooms signifieraient la mort

Le Vu¹ B. and D. Ruiz-Pino¹

¹ Université de Paris VI, LOCEAN

4 Place Jussieu, Boîte 134, 75005, Paris, levu@ccr.jussieu.fr

Abstract

Le CaCO₃ fabriqué dans l'océan ouvert par les coccolithophoridés, est un des composants principaux du cycle du carbone océanique à être modifié par les changements climatiques, naturels ou anthropiques, associés à une augmentation du CO₂ atmosphérique. L'étude de la distribution spatiale de blooms de coccolithophoridés et des conditions environnementales qui conduisent à leur formation dans l'océan moderne, est une condition préalable indispensable à toute prédiction paléoclimatique et/ou future de l'évolution du CaCO₃. Le coccolithophoridé *Emiliania huxleyi* ayant la capacité de former des blooms monospécifiques visualisés par satellite, offre la possibilité unique de déterminer la surface et la quantité de CaCO₃ pélagique à l'échelle globale. Dans cette étude, est analysée et quantifiée la distribution globale et l'apparition saisonnière de signaux blancs visibles par satellite à partir des images satellitales SeaWiFS, 1997-2003. Il est proposé, à l'échelle de l'algue et validé à l'échelle globale, une "niche écologique" permettant d'expliquer la distribution de signaux blancs détectés en surface par les satellites, et interprétés jusqu'à aujourd'hui comme des blooms. La définition de cette niche prend en compte les résultats de la synthèse sur la relation physiologique d'*Emiliania huxleyi*, en relation avec d'autres paramètres environnementaux (salinité, turbulence, CO₂, cf. Chap. 1 et data base ironages, www.nioz.nl), et nos résultats des effets du fer et du NO₃ en cultures d'*E. huxleyi* (Chap. 2 et 3). La niche est validée grâce à la détermination à l'échelle globale de la distribution de la couche de mélange, température (T), salinité (S), nitrates (NO₃) et silicates issus de bases de données (World Ocean Atlas 1998).

La « niche écologique de blooms visibles » montre qu'il est indispensable, pour comprendre pourquoi la mer devient blanche, essentiellement dans les latitudes supérieures à 50°Nord et 50°Sud et en été austral et boréal, de prendre en compte (i) la période de 3 mois (mai à juillet pour l'hémisphère nord et de novembre à janvier pour le sud), période qui couvre le démarrage, l'apogée et le déclin d'un bloom ; (ii) les conditions physiques (T entre 8° et 15°C, S < 35.4, lumière > 20 $\mu\text{molphoton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et augmentation de la couche de mélange hivernale de 200 m et 600 m) car telles sont les contraintes majeures qui permettraient de produire d'intenses signaux blancs à la surface. La niche écologique d'*E. huxleyi*, définie et validée, suggère néanmoins que les coccolithes détachés ou désagrégés de la coccosphère, visualisés par le satellite sont intensément libérés (4 fois plus qu'à l'apogée du bloom) lorsque le NO₃ est faible (2 μM), que la croissance devient nulle et que le bloom décline. Ce résultat expliquerait les corrélations obtenues à l'échelle globale entre images de SeaWiFS et distribution du NO₃ (1997 - 1999, Iglesias-Rodriguez *et al.* 2002) mais indiquerait que le signal visualisé par SeaWiFS représenterait la mort et non l'apogée du bloom. Par conséquent, la seule utilisation de signaux blancs issus des satellites, pourraient conduire à une sous-estimation du CaCO₃ précipité dans l'océan ouvert.

Introduction

Les coccolithophoridés sont considérés comme les producteurs majeurs de calcite au niveau mondial dans l'océan ouvert (Milliman, 1993), et par conséquent contrôlèrent le « rain ratio » de Carbone (Dymond and Lyle, 1985) et la dominance des sédiments calcaires durant les périodes interglaciaires (Francois *et al.*, 1990). *Emiliana huxleyi*, est le coccolithophoridé dominant les assemblages sédimentaires depuis plus de 85000 ans (Thierstein *et al.*, 1977) et possède la capacité de former des blooms monospécifiques qui peuvent couvrir de grandes surfaces (eg 10⁵ Km² dans l'océan Atlantique Nord, Tyrell et Taylor, 1996). Cette espèce fut proposée (Westbroeck *et al.* 1993) et utilisée comme organisme modèle tant pour la compréhension du mécanisme de biocalcification (De Vriend-De Jong *et al.* 1994) que pour l'évaluation du bilan global du CaCO₃ pélagique (Brown et Yoder, 1994). Depuis la dernière décennie l'intérêt porté dans la littérature scientifique pour *E. huxleyi* a crû, probablement pour trois raisons : **(i)** les expériences en laboratoire suggèrent que sa calcification devrait décroître en réponse aux valeurs élevées du CO₂ atmosphérique anthropogénique, prédit pour 2100 en comparaison avec les niveaux pré-industriels (Riebesell *et al.* 2000, Sciandra *et al.* 2003). Mais, à l'opposé une intensification de la stratification, prédite par les modèles climatiques (IPCC) pour les décennies à venir, pourrait d'un autre côté augmenter son habitat et donc accroître la calcification à une échelle globale (Broerse, 2000). **(ii)** Elle combine les trois principaux mécanismes par lesquels la biota pélagique marine peut influencer le climat global. Elle régule le cycle du carbone marin et les échanges océan-atmosphère, à travers deux mécanismes : « la pompe à carbone » induite par sa photosynthèse (Holligan *et al.* 1993b) et « la pompe à carbonate » due à sa production de CaCO₃ induite par la calcification ($2\text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, Robertson *et al.* 1994). De plus, *E. huxleyi* peut affecter l'albédo en permettant la formation de nuages à forte réflectance en raison de ses émissions gazeuses de diméthylsulphide (Diméthylsulphide -DMS-, Matrai and Keller, 1993).

Emiliana huxleyi présente en outre des avantages pour l'établissement du bilan du CaCO₃ à l'échelle globale et pour l'étude des causes de formation et de maintien des blooms monospécifiques de grande surface **(i)** être cultivé et maintenu en laboratoire dans de bonnes conditions de croissance et de calcification (Paasche, 2002). Ainsi, les résultats des expériences en laboratoire en conditions contrôlées (cf. synthèse chapitre 1 et les expériences d'ajouts de fer et de NO₃ de chapitre 2 et 3) permettent d'analyser quantitativement les dépendances entre processus physiologiques (eg croissance, calcification, photosynthèse, détachement de coccolithes) et paramètres environnementaux (eg : température, salinité, nutriments, CO₂) et **(ii)** être un des rares phytoplanctons à pouvoir être visualisé par les satellites (CZCS et SeaWiFS) depuis la fin des années 70 (Holligan *et al.* 1989). Cette distribution globale à la surface, fournie par les satellites, est précieuse pour l'estimation de la production et du réservoir de CaCO₃ que peuvent représenter les coccolithophoridés pélagiques. Elle nécessite cependant la compréhension de la nature exacte des blooms visualisés par satellite, de la cause de leur formation, de leur extension et de leur variabilité. Une première étude (Iglesias-Rodriguez *et al.* 2002) avait proposé, grâce à la détermination d'une pseudo-niche¹³ de la distribution de signaux blancs donnée par des images satellitales SeaWiFS pour la période 1997-1999, que cette distribution soit principalement imposée par une baisse des NO₃ (entre 0 et 15 µM) associée à un relativement intense éclaircissement (25 et 150 µmolphotons m⁻² s⁻¹), mais couvrant une grande gamme de température (entre 3° et 15°C). Cette pseudo-niche ne permet pas de comprendre la formation des signaux blancs des blooms visibles puisque : premièrement, de par sa définition

¹³ : Niche des conditions favorables aux blooms visibles déterminés par la mise en corrélation des signaux blancs détectés par satellite et des conditions environnementales au moment de leur détection.

elle ne tient pas compte des aspects physiologiques entrant en jeu dans un bloom visible (croissance, détachement des coccolithes, densité et taille des particules produites, cf. Chap. 3, §IIIB). Ces divers mécanismes, agissant à l'échelle de la cellule lors de la formation d'un bloom, sont contrôlés par les faibles NO_3 (eg. de $2 \mu\text{M}$; Chap. 3, § IIIB), de la manière suivante : à la fois stimulés, en ce qui concerne la taille de la coccosphère et le détachement des coccolithes, et inhibés, en ce qui concerne la croissance et la quantité de PIC. Deuxièmement, parce que l'explication issue de l'analyse d'Iglesias-Rodriguez *et al.* (2002) est en contradiction avec le fait qu'une baisse de nitrates, limite potentiellement la croissance de cette algue (§IIC du Chap. 1 et §IIIA du Chap. 3). Cette contradiction pose la question de la signification de ces signaux blancs détectés par le satellite et connus jusqu'à aujourd'hui comme des blooms dans le sens de la définition classique (Holligan *et al.* 1983). La clé probablement de cette contradiction est que la biogéographie d'*E. huxleyi* basée sur la croissance (ubiquité, Fig. 1.1a, §I du Chap. 1) pourrait être différente de la distribution fournie par les satellites, basée sur la production de coccolithes libres.

Pour être en mesure d'analyser la distribution globale, spatiale et tenir compte à la fois de la variabilité saisonnière des signaux satellitaires, du comportement physiologique de cette algue et de sa dépendance à divers paramètres environnementaux (dont l'analyse a été faite dans la PARTIE I de cette thèse), il est proposé dans cette étude de définir une véritable niche écologique¹⁴ de signaux blancs aux blooms visibles par satellite.

La définition d'une telle niche doit tenir compte de processus physiologiques comme : le détachement et la désagrégation, sources majeures de coccolithes libres (§IIIB du Chap. 3), dont les propriétés optiques sont responsables de leur détection par satellite (Balch *et al.* 1991). Cette niche doit prendre en compte l'augmentation de ces processus aux faibles NO_3 ($2 \mu\text{M}$) (Chap. 3, Fig. 3.4a). Cependant, en plus du rôle du NO_3 sur la croissance, le PIC et les coccolithes attachés et détachés (§IIIB du Chap. 3), il serait également nécessaire pour la définition d'une telle niche de prendre en compte le rôle stimulant du fer (Chap. 2), mais également celui de tous les autres paramètres environnementaux susceptibles de faire varier les processus physiologiques responsables de blooms visibles en surface : par exemple croissance optimale pour une température de 20°C (Fig. 1.3, §IIB du Chap. 1), faibles PO_4 stimulant la quantité de PIC/cell (Chap.1, §IIE, Tab.1.3) ou les faibles lumières stimulant le rapport C/P (Fig.1.4c , §IID du Chap. 1).

La niche de blooms visibles en surface sera définie dans un premier temps à échelle de l'algue en prenant en compte divers processus physiologiques et sera validée à échelle globale en utilisant les images SeaWiFS pour *E. huxleyi* entre 1997 et 2004 et les paramètres hydrologiques, issus de la base de données globales du World Ocean Atlas 1998 (T, S, NO_3 , PO_4 , Si). Cette définition permettra de caractériser les principales zones de blooms visibles, d'en déduire leur surface et de proposer des hypothèses permettant d'analyser pourquoi *E. huxleyi* produit des blooms visibles uniquement dans certaines régions de l'océan, alors qu'elle est ubiquiste (présente partout dans l'océan, §I du Chap. 1).

L'hypothèse principale de ce travail est que les mécanismes physiologiques, d'après l'étude à l'échelle de l'algue (PARTIE I), fondamentaux pour la fabrication de blooms visibles sont : sa production de carbone organique (croissance) et inorganique (calcification, taille de la coccosphère et des coccolithes, nombre de coccolithes et leur taille). La stratégie suivie et les données utilisées pour atteindre ces objectifs sont les suivants :

¹⁴ : Niche des conditions favorables aux blooms visibles déterminés par la connaissance de la réponse aux conditions environnementales des processus physiologiques expliquant l'apparition du signal visible par satellite.

(i) définition des critères de la niche de blooms visibles en considérant tous les mécanismes qui, à l'échelle de la cellule, seraient propices aux blooms de coccolithes. Ces critères sont définis à l'aide des résultats de la synthèse de la littérature (Chap. 1 des expériences en laboratoire et des mésocosmes) et des nouvelles expériences développées dans ce travail de thèse (Chap. 2 et 3). La dépendance de ces processus physiologiques à divers paramètres environnementaux seront pris en compte : température, salinité, lumière, nutriments : NO_3 et PO_4 , couche de mélange. Ces dépendances seront quantifiées à partir de la totalité des résultats de laboratoire (cultures en batch ou chemostat) et des mésocosmes présentés et discutés également dans la première partie de cette thèse (Chap. 1, 2 et 3).

(ii) La validation de la niche des blooms visibles en surface, définie à l'échelle cellulaire, s'effectue en trois étapes : **(a)** définition, à l'échelle de l'océan global, des régions océaniques dans lesquelles les conditions environnementales optimales d'apparition de blooms visibles, issus de la prise en compte des processus physiologiques à l'échelle cellulaire, sont remplies. Pour cette étape seront utilisées les moyennes saisonnières des données du World Ocean Atlas 1998 (T, S, NO_3 , PO_4 , Si ; Fig. 4.1c, d, et f ; www.nodc.noaa.gov) en surface. **(b)** Confrontation de ces régions définies en (a) avec le composite des images SeaWiFS de l'apparition des blooms visibles entre 1997 et 2003 (C. Brown, com. Pers ; Fig.4.1). **(c)** Confrontation à l'échelle régionale des écarts aux conditions environnementales ou hydrologiques rencontrées lors des blooms hebdomadaires *in situ* (site web de C. Brown : cics.umd.edu/~chris/ehux_www.html) avec les valeurs des conditions environnementales définies comme étant adaptées à l'échelle cellulaire à l'étape (i).

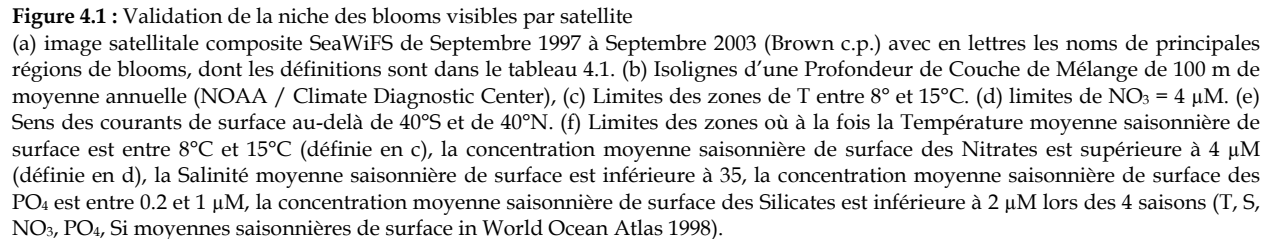
I. La distribution globale d'*Emiliana huxleyi* par imagerie satellitale SeaWiFS (Fig. 4.1a ; Tab. 4.1)

Afin de déterminer où et quand se produisent les blooms de surface et quels sont les plus importants, il est nécessaire de décrire spatialement et temporellement la série la plus récente des signaux satellites. La connaissance globale du bloom d'*Emiliana huxleyi* est relativement plus aisé que n'importe laquelle des autres espèces de phytoplancton, grâce à sa facilité de détection par satellite (Holligan *et al.* 1983). Cette distribution de surface visible par satellite avait tout d'abord été décrite pour les signaux satellites CZCS (Brown and Yoder en 1994, pour le composite de 1978 à 1986). Ensuite la distribution a été revue, en particulier grâce à la correction d'artefacts dus aux algorithmes, par de nouvelles données *in situ*, à travers les données du satellite SeaWiFS plus récent (Fig. 4.1a, composites SeaWiFS de 1997 à 2003, Brown c.p.).

Distribution spatiale des blooms visibles par satellite (Fig. 4.1a)

Les études basées sur les images obtenues jusqu'en 1985 montraient que 71% de la surface des blooms annuels se produiraient dans l'Atlantique Nord (Brown and Yoder, 1994- Fig. 0.3c). D'après nos estimations (Tab. 4.1) basées sur le calcul des surfaces couvertes par les signaux blancs, les régions de plus grandes surfaces concernées par les blooms visibles se trouvent principalement dans l'hémisphère Sud à hauteur de 60%.

b- Isolignes de deltaMLD [200-600]



Chapitre 4 : Qu'est-ce qu'un bloom ? Les prévoir

Tableau 4.1 : Surface des régions océaniques concernées par un bloom particulier

Surfaces (en km²) qu'occupent tous les signaux entre 1997 et 2003 (et non la surface des signaux blancs durant une année), classées par régions océaniques, de la plus vaste à la plus petite. Les surfaces proviennent du composite de la Fig. 4.1 et la période d'apparition du bloom provient d'un suivi hebdomadaire utilisant les images SeaWiFS de Septembre 1997 à Septembre 2003 traitées par C. Brown (cf. cics.umd.edu/~chrisb/ehux_www.html). Les symboles des régions désignent les régions de blooms concernés sur la Fig. 4.1a.

Area	Surface x10 ⁶ km ²	Bloom period		Map symbol	Details
		Begin	End		
Subpolar	11,51				
<i>North Atlantic (50°-70°N)</i>					
40°-10°W South of Iceland	1,50	early June	late July	SI	
0°-8°E North Sea	1,13			NHS	
0°-25°E Norway Sea	1,05	middle June	early Aug	NYS	and Novegian fjord
<i>North Pacific (40°-60°N)</i>					
150°E-140°W Alaska Stream	2,76			SA	from gulf of Alaska to Kuril Island
<i>South Pacific (55°-65°S)</i>					
170°E-70°W North of Polar Front	2,48	early Dec	late Jan	NPFP	
<i>SW Atlantic (40°-55°S)</i>					
40°-70°W Falkland Islands	1,88	late Nov	late Dec	FI	Bresil-Malvinas confluence Patagonia shell and North Scotia Sea
<i>South Indian (50°-60°S)</i>					
60°-110°E North of Polar Front	0,71			NPFI	
Polar	6,96				
<i>Southern Ocean Atlantic sector (50°-75°S)</i>					
40°W-20°E South of Polar Front	4,26	early Jan	early March	SPFA	
<i>North Pacific (54°-66°N)</i>					
157°-180°W Bering Sea	0,85	late May	early Aug	BGS	
<i>Southern Ocean Pacific sector (65°-70°S)</i>					
150°E-100°W South of Polar Front	0,78	early Jan	early March	SPFP	
<i>Southern Ocean Indian Sector (60°-70°S)</i>					
75°-100°E South of Polar Front	0,65			SPFI	
<i>North Atlantic (68°-77°N)</i>					
25°-50°E Barents Sea	0,42	early Aug	middle Sep	BSS	
Temperate	2,98				
<i>SW Pacific (40°-50°S)</i>					
140°E-170°W New Zeland	2,19			NZ	Tasmania, NewZeland and Chatland Islands
<i>NE Atlantic (45°-50°N)</i>					
0°-10°W Armorican shell	0,21			CSB	Celtic Sea and Bay of Biscay
<i>NW Atlantic (45°-50°N)</i>					
50°-60°W Newfoundland island	0,21			NFI	Gulf of St Laurent and Gran Bank
<i>Black Sea (41°-47°N / 28°-42°E)</i>	0,37	middle May	early July	BKS	

Chapitre 4 : Qu'est-ce qu'un bloom ? Les prévoir

Tableau 4.1 (suite)

Area	Surface x10 ⁶ km ²	Bloom period		Map symbol	Details
		Begin	End		
SubTropical					
Convergence	2,74				
<i>South Indian (40°-45°S)</i>					
30°-80°E Open Ocean	0,57			SIC	
120°-140°E South Australia	0,46			AO	
<i>North Pacific (35°-40°N)</i>					
180°-150°W Open Ocean	0,74			NPC	
135°-130°W USA offshore	0,05			UO	
150°-145°E Japan offshore	0,05			JO	
<i>North Atlantic (40°-45°N)</i>					
40°-20°W Open Ocean	0,37			NAC	
15°-10°W Portugal offshore	0,09			PO	
<i>South Atlantic (40°-45°S)</i>					
0°-30°W Open Ocean	0,41			SAC	
Upwelling	0,80				
<i>South Atlantic (18°-30°S)</i>					
8°-16°E Benguela offshore	0,34	early Nov	late Dec	BU	
<i>South Pacific (30°-50°S)</i>					
80°-75°W Chili stream	0,28			CU	
<i>Pacific Equator (0°-10°S)</i>					
95°-80°W Peru offshore	0,18			PU	Galapagos
<i>North Atlantic (10°-20°N)</i>					Equateur
15°W Morocco offshore				MU	
Subtropic- Tropic spots					
<i>North Atlantic</i>					
Gulf of Mexico				GMO	
Bahamas Islands				BI	
Caribbean Sea				CAS	
<i>North Indian</i>					
Arabian Sea				ARS	
Persian Gulf				GP	
<i>North Pacific</i>					
Coasta Rica offshore				CO	
<i>South Pacific</i>					
Java Sea				JS	

Les plus grandes surfaces de blooms sont observées dans les régions de hautes latitudes (entre 50° et 80°) et sont par ordre d'importance : les régions subpolaires et polaires (Tab. 4.1). Ces régions comptent pour 74% de la surface de l'océan concernée par les blooms. Ils se répartiraient ainsi : le sud de l'Atlantique et le secteur Atlantique de l'océan austral (28%), puis le sud du Pacifique et le secteur Pacifique de l'océan austral (24%). Par ordre d'importance suivent les zones de l'Atlantique Nord (21%), puis du Pacifique Nord (18%) et la partie sud de l'océan Indien (10%). **Les régions comportant des blooms moins étendus, mais qui comptent cependant pour environ 23%** de la surface de l'océan concerné par les signaux blancs satellitaires, toujours de grande intensité, observés dans les régions de moyennes latitudes (entre 35° et 50°). Ces blooms des moyennes latitudes sont par ordre d'importance : les régions tempérées (autour de la Nouvelle Zélande) et celles au niveau des convergences subtropicales (au nord de l'Atlantique et du Pacifique et au sud de l'Atlantique et de l'Indien), avec respectivement 12% et 11% (Tab. 4.1). **Les 3% restant de la surface de l'océan concerné par les blooms visibles par satellite** sont les régions tropicales et subtropicales (<35°) avec par ordre d'importance les régions d'upwelling (Benguela et le long du courant du Chili) et le Pacifique Equatorial au large du Pérou, représentant respectivement 1.4%, 1.1% et 0.7% (Tab. 4.1). Ainsi, aucun bloom visible n'est détecté dans les zones correspondant aux gyres subtropicaux. Dans ces régions sont pourtant observées des concentrations de cellules d'*E. huxleyi* de l'ordre de 1000 cellules par mL, suggérant une relativement importante présence de ce coccolithophoridé (Hawaiï, Cortès *et al.* 2002 ; Bermudes, Thierstein *et al.* 2002 ; Pacifique central Ouest, Hagino *et al.* 2000).

Distribution temporelle des blooms visibles par satellite (cics.umd.edu/~chrisb/ehux_www.html)

Les signaux blancs fournis par les satellites sont saisonniers. Le signal se propage des basses latitudes vers les hautes latitudes, de la fin du printemps à la fin de l'automne. Il est indispensable afin de pouvoir valider la niche écologique, qui va être ici définie (cf. §II), de définir et connaître les périodes d'apparition des signaux satellites associées au moins aux blooms les plus étendus. Ces signaux commencent au milieu du Printemps (Mai, Novembre) dans les régions tempérées (Armorican shell, au large du Portugal, Mer Noire, au large du Japon, Tasmanie et Nouvelle Zélande) et d'upwelling (Benguela, Sud du Chili), mais également dans le golfe d'Alaska et dans la mer de Béring, pourtant des régions respectivement subpolaires et polaires. Ces signaux sont visibles entre 2 et 4 semaines pour la plupart. Cependant, certains blooms persistent durant plusieurs mois (Mer Noire, Mer de Béring) ou réapparaissent de façon ponctuelle pendant tout l'été (Tasmanie, Nouvelle Zélande). D'autres blooms semblent moins systématiques car ils apparaissent lors d'une ou deux années seulement sur les 7 années de données SeaWiFS (au large du Portugal en 2002 et 2003, le large du Japon en 2000 et 2003). **Le signal blanc se propage à la fin du printemps (juin, décembre)** dans les régions subpolaires (sud de l'Iceland, mer du Nord et Skagerrak, mer de Norvège, Courant d'Alaska et île Kuril, nord du front polaire, autour des îles Falkland) et dans le Golfe du St Laurent. Ces signaux qui durent environ 2 mois par saison, marquent l'apogée de la surface totale des blooms visibles. Certains signaux apparaissent durant l'été à des périodes de temps différents d'une année sur l'autre (courant d'Alaska, Golfe du St Laurent, nord du Front Antarctique). Par exemple, les signaux apparaissent au nord du Front Antarctique entre décembre et février. Certains autres ne sont pas systématiquement observés car les signaux blancs apparaissent une seule année sur les 7 années de données (par exemple le Golfe de St Laurent en 2002). **Le signal se propage** durant l'été (Août, Janvier) et gagne les régions polaires (mer de Barents, océan Austral). Ces signaux polaires persistent alors pendant deux à trois mois.

Certains signaux sont en rupture par rapport à ce cycle : dans le Pacifique équatorial au large du Pérou des signaux apparaissent en octobre et en avril 1998. D'autres sont présents de façon discontinue sur de longues périodes, même en hiver (armorican shell, Mer de Bering et autour des Falkland). Ces signaux hivernaux pourraient correspondre cependant à des artefacts dus à une resuspension de tests calcaires ou siliceux déposés sur le plateau continental peu

profond lors de blooms de l'année précédente, observés par exemple sur des comptages au microscope dans la Mer de Béring (Broerse *et al.* 2003).

Certains des signaux satellites ne correspondent pas à des données de blooms de coccolithophoridés documentés *in situ* et pourraient être des artefacts. D'autres signaux détectés par SeaWiFS comme par CZCS (Brown et Yoder, 1994) pourraient correspondre à des artefacts, car les zones sont reconnues pour ne pas abriter de coccolithophoridés. Ces régions correspondent : (i) à celles des grands lacs canadiens et à la mer Baltique dont les signaux seraient probablement dus respectivement, aux périodes de dégel et à la présence d'une espèce de *Trichodemimum* pour la mer Baltique (Brown et Yoder, 1994). (ii) A la mer de Béring et Celtique en hiver, n'ayant jamais été auparavant documentées en bloom de coccolithophoridés (Brown et Yoder, 1994). D'après Broerse *et al.* (2003), les signaux détectés par SeaWiFS en mer de Béring pourraient être dus à la resuspension de tests calcaires ou siliceux. D'autres signaux restent à être confirmés : par exemple, les signaux hivernaux sur le plateau de la mer Patagonienne. Les secteurs peu profonds avec des sédiments carbonatés, comme le Golfe du Maine, les Bahamas, la mer de Java, pourraient également être des artefacts (selon Iglesias-Rodriguez *et al.* 2002). Cependant, des observations *in situ* montrant des fortes concentrations de cellules d'*E. huxleyi* dans le Golfe du Maine (2400 cells/mL en subsurface ; Townsend *et al.* 1994), suggère une situation contraire à un signal uniquement dû à des artefacts. Par contre, d'autres espèces de coccolithophoridés pourrait provoquer également des blooms visibles : c'est le cas de *Gephyrocapsa oceanica*, par exemple en Nouvelle-Zélande (Rhodes *et al.* 1995) et en mer de Java (Brown et Yoder, 1994).

Les blooms visibles sont concentrés entre 50° et 70° Nord et Sud et apparaissent vers la fin du printemps (Mai, Novembre) et couvrent la plus grande surface en Atlantique Nord et Sud. La surface concernée par ses blooms Nord et Sud semble avoir augmentée depuis les années 80 (CZCS de 78 à 86, Fig. 0.3c) et s'être également étendue vers les hautes latitudes (SeaWiFS de 1997 à 2003, Fig. 4.1). Mais une analyse temporelle plus fine ainsi qu'une analyse des algorithmes, restent à être effectuée pour évaluer saisonnièrement et interannuellement cette évolution. Nous proposons comme première étape de nous pencher sur l'analyse des facteurs environnementaux qui permettent aux processus physiologiques de produire ces blooms.

II. Définition d'une niche écologique des signaux visibles par satellite

A. Critères de visibilité des blooms de surface détectés en surface par les satellites (Fig. 4.2a, Tab. 4.2)

La première condition *sine qua non* de production de signaux blancs est une **production importante de coccolithes libres** pour que les signaux soient visibles et détectables par le satellite. La deuxième est que les coccolithes libres une fois produits aient **un temps de résidence suffisamment long en surface**. Ce temps de résidence est contraint par : (i) une faible sédimentation de la coccosphère pour que les coccolithes soient proches de la surface lorsqu'ils se détachent ; (ii) une légèreté et une faible taille des coccolithes libres, pour qu'ils restent proches des eaux de surface et que les signaux perdurent deux mois (tels que nous l'avons vu au paragraphe précédent de ce chapitre).

1. Croissance et calcification

Une croissance forte : ce critère physiologique est suffisant et souvent le seul considéré dans les études classiques d'écophysiologie définissant l'affinité d'*E. huxleyi* par rapport aux conditions environnementales. Un bloom détectable par satellite aurait lieu à la condition

nécessaire (mais pas suffisante) que les cellules soient en concentration importante (intensité du signal) durant une longue période (durée du signal d'environ 1 mois). Pour cela, les conditions environnementales doivent être favorables, le plus longtemps possible, à une forte croissance durant la phase de développement du bloom (qui débute quelques semaines avant l'apparition des signaux satellites).

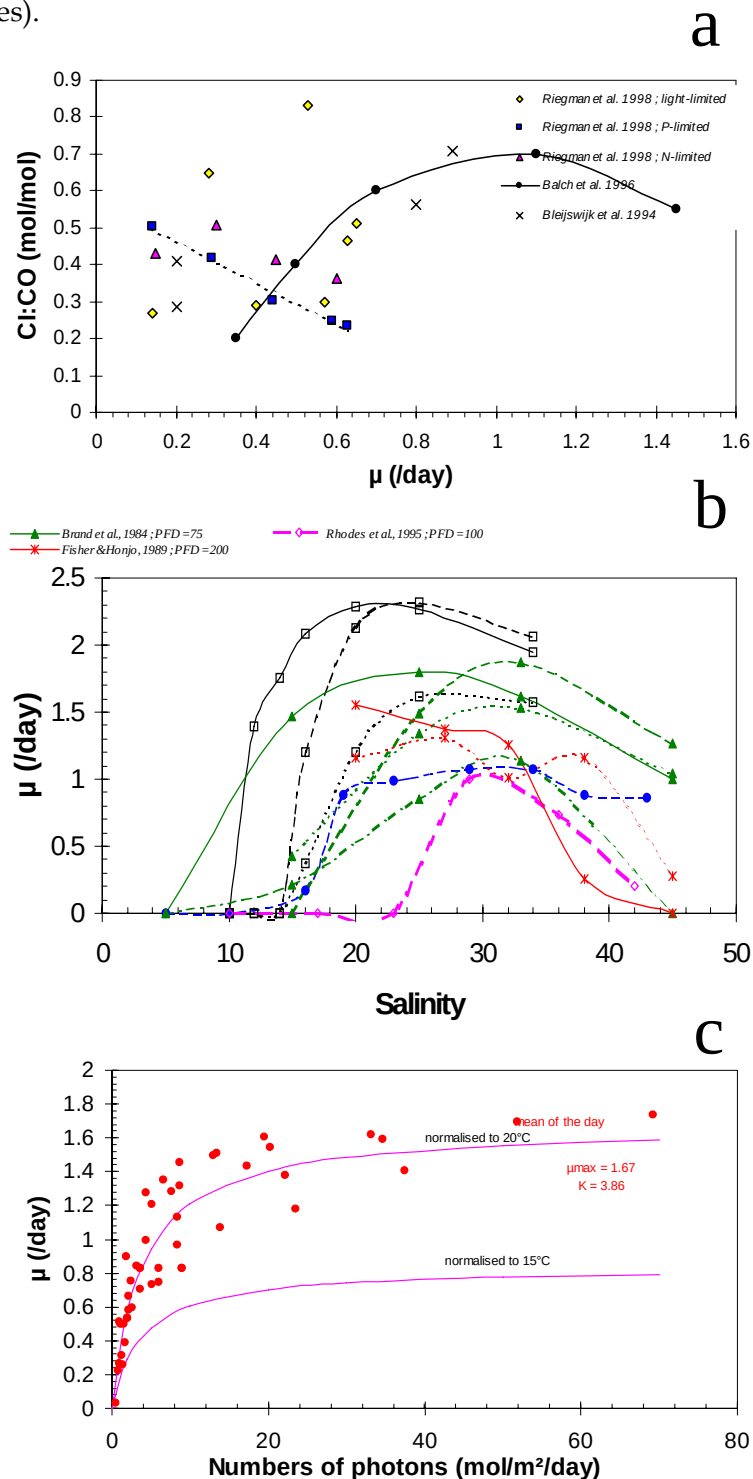


Figure 4.2 : Relations physiologiques supplémentaires pour la niche
 (a) Relation entre rapport des contenus en Carbone Inorganique (PIC) des coccolithes attachés et détachés par rapport au Carbone organique (POC) produit par la cellule avec la croissance pour différentes limitations de la croissance (NO₃, PO₄ et lumière). (b) relation de la croissance avec la salinité issue des études ayant mesuré la croissance à différentes salinités en laboratoires. (c) relation de la croissance avec la quantité totale de lumière reçue par jour des études ayant étudié sa variation à différentes conditions d'intensités lumineuses et de durée d'éclairement, normalisée à 20°C et les mêmes données normalisées à 15 °C grâce à la relation de la croissance en fonction de la température sur les données de la croissance à différentes températures de Paasche (1967 ; Fig. 1.3).

Une calcification forte : les coccolithes libres étant les particules responsables en majorité du signal détecté par satellite, la forte production de carbonate de calcium (de coccolithes) par rapport à la production de carbone organique (de cellules) est une condition indispensable pour qu'un bloom puisse être détectable par satellite. Les conditions environnementales doivent être favorables à cette production de CaCO_3 tout le long de la phase de développement du bloom, mais également et principalement après cette phase, lorsque la croissance organique s'effondre, produisant ainsi un excès de coccolithes susceptibles d'être libérés dans la couche de surface et d'être visibles par les satellites.

Une croissance (μ) optimale autour de 1 jour^{-1} pour que soit possible une production active de coccolithes par rapport à la croissance de la cellule. La relation entre calcification et croissance (Fig. 4.2a : $C/P=f(\mu)$) suggère que la production de calcite et la division cellulaire (μ) sont liées l'une à l'autre. Ce lien entre calcification et croissance dépend des conditions environnementales. Un trop fort μ peut être défavorable à la calcification car la vésicule fabriquant les coccolithes serait détruit pendant la division cellulaire (Bleijswijk *et al.*, 1994). Par conséquent, ces deux processus influençant les blooms peuvent être en opposition, mais des conditions environnementales favorables permettent un compromis optimal pour, à la fois, la division cellulaire et la calcification. La phase de croissance jouerait également un rôle important. Dans la phase active de croissance, une valeur de μ de 1 day^{-1} devrait permettre au rapport PIC/POC d'être maximum et d'être associé à un pic de population (Fig. 4.2a, Balch *et al.* 1996). Par conséquent, ce taux de croissance permettrait l'observation de forts blooms visibles.

2. Fabrication d'un grand nombre de coccolithes libres

Parce que les coccolithes libres correspondent au signal visualisé par le satellite, **un fort détachement** des coccolithes de la coccosphère est une autre condition nécessaire pour qu'un bloom soit visible par satellite (Chap. 3, Intro). Les conditions environnementales doivent être favorables au détachement tout au long du bloom, pour produire un signal visible par satellite qui s'étend dans le temps, mais surtout à l'apogée du bloom. En effet, l'apogée du bloom est marqué par une population de cellules et un détachement de coccolithes, tout les deux maximaux (§IIIB du Chap. 3) et permettraient la production d'un signal intense. Au déclin du bloom le détachement tel que nous l'avons vu au chapitre 3 (§IIIB4, Fig. 3.4b) est remplacé par un processus intense de désagrégation des cellules qui produit un grand nombre de coccolithes libres.

Enfin, **une faible sédimentation** est indispensable à la fois pour les cellules et les coccolithes. **Une petite taille des cellules :** ce paramètre est proportionnel au nombre de coccolithes attachés autour de la cellule (Chap. 3 ; Fig. 3.2) et donc au taux de sédimentation car la calcite composant les coccolithes est plus dense que la matière organique (Balch *et al.* 1993). Plus ce critère de la taille est faible, plus le taux de sédimentation est faible, et plus les cellules seront concentrées plus longtemps en surface et pourront ainsi produire un signal satellitaire de plus longue durée. Les conditions environnementales (T, NO_3 , PO_4 ,...) doivent être favorables à une faible taille des cellules tout le long de la phase de développement du bloom ; mais principalement à l'apogée du bloom où la concentration de cellules est maximale. **Une petite taille des coccolithes :** de même ce paramètre est proportionnel à sa quantité de PIC (cf Tab. 3.1) coccolithe et donc à sa densité et à son taux de sédimentation. Plus la taille d'un coccolithe libre est faible et plus sa participation au signal visible par satellite persistera dans le temps. De plus, pour un même taux de calcification par cellule, une cellule peut produire plus de coccolithes si leur degré de calcification est faible ; cette situation conduirait également à un signal plus intense.

D'autres **critères complémentaires** dus aux contraintes physiologiques et écologiques doivent être pris en compte pour la définition d'une niche écologique de blooms visibles. Les processus

de mortalité sont positifs pour le bloom visible à l'apogée du bloom de cellules, car cela accroît la désagrégation des coccosphères, par exemple par la mort des cellules due au manque de nutritifs (Chap. 3, §IIB) ou alors par des agressions telles que les attaques virales (Chap. 1, §IIF). Mais par contre l'ingestion des cellules et des coccosphères par les brouteurs pourrait réduire le nombre de cellules et donc nuire à l'intensité du bloom. De plus, la compétition avec les autres espèces dont les niches de conditions favorables ne permettent pas à *E. huxleyi* de « bloomer » (en tout cas de façon monospécifique), doit être considérée. Parmi ces autres espèces, les plus importantes sont les diatomées qui « blooment » sous les mêmes latitudes qu'*E. huxleyi* (Sarthoux *et al.* 2005). Mais d'autres espèces dominantes comme *Phaeocystis spp.*, *Trichodesmium spp.* ou les dinoflagellés, permettent d'effectuer un contraste dans cette niche de blooms visibles, puisque qu'elles domineraient dans des régions différentes (tropicales et subtropicales) de celles des signaux blancs détectés par le satellite. Certaines préférences physiologiques seront donc comparées pour dégager les conditions plus favorables à l'une ou l'autre des espèces phytoplanctonique vis-à-vis d'*E. huxleyi*.

Les multiples critères concernant la physiologie et l'écologie nécessaires (croissance, mais aussi calcification, sédimentation et compétition avec d'autres espèces), pour entièrement contraindre la niche des blooms visibles, contrastent avec l'unique critère couramment employé pour définir les blooms d'*E. huxleyi* qu'est la croissance.

B. Définition de la niche écologique d'*E. huxleyi* à partir de critères physiologiques (Fig. 4.2b,c ; Tab. 4.2 ; Fig. 4.3)

Les critères proposés pour l'apparition de blooms *E. huxleyi* en surface, visibles par satellites, sont les suivants (première ligne du tableau 4.2) : **(i)** une croissance durant la phase exponentielle autour d'un doublement par jour; **(ii)** une taille de la coccosphère la plus faible possible avec peu de coccolithes attachés ; **(iii)** une taille faible des coccolithes contenant peu de PIC et **(iv)** le maximum de coccolithes détachés par cellule. A partir de la connaissance des processus physiologiques à l'échelle de la cellule (synthèse chapitre 1 et complétée par le fer et le NO₃, aux chapitres 2 et 3) il est possible de déterminer qualitativement les conditions nécessaires pour que ces blooms visibles se produisent.

1. Influence des conditions environnementales sur la physiologie

a. Salinité

Les eaux de mer de basse salinité (30-35) sont favorables aux blooms de coccolithophoridés mais les eaux côtières de basse salinité (20-30) favoriseraient d'avantage les blooms de cellules d' *E. huxleyi* (Fig. 4.2b). Plus *S* est important, plus le *C/P* est fort; plus *S* est bas, plus est haut le nombre de cellules et de coccolithes détachés ; plus bas est le taux de sédimentation et plus long est le signal du bloom.

La plus basse limite de salinité de 20 correspond à la valeur minimale en dessous de laquelle la croissance est inhibée et 35 correspond à la limite supérieure au delà de laquelle la croissance d'*E. huxleyi* diminue en dessous de 1 jour⁻¹. Un taux de croissance autour de 1 est observé pour des cellules vivantes dans de relatives basses salinités (entre 30 et 35, Fig. 4.2b) pour des températures de 20°C (pour des souches du Nord et de la côte atlantique). La fourchette de 20 à 35 de salinité pour la croissance est accentuée plus favorablement pour les blooms visibles au vu de l'effet inhibant des faibles salinités sur la taille des coccolithes et le nombre de coccolithes des coccosphères. Les coccolithes produits par des cellules cultivées dans une salinité de 17, sont 10% plus petits et contiennent 30% moins de calcium que ceux produits dans une salinité de 34 (Paasche *et al.* 1996). Ainsi, plus la salinité est faible, moins les cellules sont calcifiées et

plus elles sont petites et légères, par conséquent, elles peuvent rester plus longtemps dans la zone euphotique et le bloom serait plus dense pour le signal de réflectance. Des observations *in situ* de bloom après le « run off » dans la mer de Bering (Whitledge pers. com.) confirment que de faibles S ou sa diminution favoriserait les blooms.

Tableau 4.2 : tableau de la niche

Critères physiologiques énoncés §IIA (eg. première ligne : croissance forte, de 1 jour⁻¹, taille de la coccospère et des coccolithes et nombre de coccolithes forts) et la fourchette de valeurs optimales de paramètres environnementaux répondant à chacun de ces critères et le choix de la fourchette faisant le compromis pour chacun des paramètres environnementaux (justifié dans le texte).

Paramètres	Optimale C°							Références
	Croissance (μ) forte >1	faible <1	μ~1 surface (C/P) max	Taille coccospère faible	Taille coccolithe faible	Nbre coccolithe fort	Bloom visibles nbre & μ fort taille faible	
S	20-35	>35 <20	30-35	-	17	17	20-35.4 (a)	Fig. 4.2b ; §IIB1a
T °C	12-27	>27 <12	10-17	20	<7 >24	-	8 (a)-15	Fig. 4.2a ; §IIB1b
Turbulence	large	<>	-	-	-	-	-	Fig. 4.3 ; §IIB1g
MLD m	-	-	-	-	-	-	<30(a)	§IIB1g
Light mol/m ² /d	>10	<10	10-20	<2	<8	>8	>20 (b)	Fig. 4.2c ; §IIB1c
NO ₃ μM	>2	<0.2	>4(a)	>2	<2	-	>4(a)	Fig. 3.1c ; §IIB1d
PO ₄ μM	>0.01	<0.001	-	>0.03	>0.03	<0.55	0.2-1(b)	§IIB1d
Si μM	-	-	-	-	-	-	<2 (d)	§IIB1d
CO ₂ μM	>12	<12	-	-	>5	-	12-30	§IIB1f

(a) observation in situ

(b) observations mésocosmes

(c) approximation

(d) fonction de la compétition avec les autres phyto

b. Température

La gamme de **température** optimale pour un fort bloom s'étend entre 8°C et 15°C (Fig. 1.3).

Même si la croissance est >1 jour⁻¹ entre 12 et 27°C (Fig. 1.3), une température entre 10°C et 17°C devrait favoriser la meilleure association entre la croissance par jour et le C/P (ie. fourchette de température pour μ=1 jour⁻¹ sur la Fig. 1.3 du Chap. 1). Cependant, le minimal de température a été choisi à 8°C car il correspond à la valeur pour laquelle les blooms d'*E. huxleyi* ont été observés *in situ* dans le Golfe du Maine (Ackelson *et al.*, 1989). La tolérance inférieure à laquelle *E. huxleyi* pourrait survivre, pourrait être en dessous de 2°C comme vu dans le Pacifique Sud (Mc Intyre and Bé, 1967 ; Fig. 1.3) et même sous 0°C (Findlay and Giraudeau, 2000). La température adéquate pour les blooms est déterminée par des performances de calcification. En effet, la calcification, comme la taille, croît entre 10°C et 15°C (Bleijswijk *et al.* 1994), mais c'est une diminution de calcification qui est observée quand les températures augmentent de 15°C à 20°C (Balch *et al.*, 1992). Malheureusement, le manque de données entre 10°C et 20°C nous empêche de connaître la température optimale pour la calcification, il devient alors difficile d'identifier la température seuil pour laquelle la calcification diminue. La valeur de 15°C a été choisie comme la limite supérieure d'apparition des blooms puisqu'elle correspond à un taux de calcification élevé (0.3 pgC cell⁻¹ heure⁻¹ ; Balch *et al.* 1992) et reste dans la gamme des températures favorables à la croissance.

c. Eclairement

Concernant l'influence de l'**éclairement**, deux grandeurs sont importantes dans la détermination de la surface des blooms. La quantité de lumière journalière optimale par unité de surface devrait être entre 20 mol m⁻² d⁻¹ et 70 mol m⁻² d⁻¹ pour des blooms et un éclairement « instantané » entre 100 μmol m⁻² s⁻¹ et 2000 μmol m⁻² s⁻¹ devrait stimuler la calcification.

Il faut retenir que l'éclairement journalier optimal se détermine également en fonction de la température (Fig. 4.2c croissance avec lumière normalisée à 15 et à 20 °C). Une croissance de 1 jour⁻¹ est rencontrée à des lumières limitantes <10 mol de photon m⁻² j⁻¹ -50 m- dans les eaux subtropicales (T>20 °C) alors qu'une croissance de 1 jour⁻¹ est rencontrée pour des lumières saturantes >10 mol de photon m⁻² j⁻¹ dans les eaux tempérées et subpolaires (T<15°C). La croissance d'*E. huxleyi* est saturée pour un éclairement journalier entre 10 mol m⁻²d⁻¹ et 70 mol m⁻² d⁻¹ (valeur maximale étudiée ; Fig. 4.2c). Pour les très hautes conditions d'éclairement pouvant être observées dans l'océan (au-dessus de 100 mol m⁻² d⁻¹), la réponse de *E. huxleyi* n'a pas été encore étudiée dans des conditions contrôlées. Une valeur de seuil plus basse, de 20 mol m⁻² d⁻¹ au lieu de 10 mol m⁻² d⁻¹, a été préférée ici car, à cette valeur, des blooms d'*E. huxleyi* ont été observés *in situ* (0-30m, voir synthèse Nanninga and Tyrrell, 1996) et dans des mésocosmes face à la compétition de *Phaeocystis* (Egge and Heimdal, 1994). Cette valeur la plus basse correspond aussi à l'éclairement en été à de hautes latitudes (hémisphères nord et sud), où les plus intenses blooms d'*E. huxleyi* ont été observés (SeaWiFS, Brown, 2000).

L'éclairement «instantané» de 100 µmol m⁻² s⁻¹ à 2000 µmol m⁻² s⁻¹ est favorable à la croissance d'*E. huxleyi* (Thompson and Calvert, 1995; Muggli and Harrison, 1996b; Nielsen, 1997; Zondervan, 2001). En ce qui concerne les rapides fluctuations d'éclairement, le fait que des blooms seraient seulement visibles à la surface, pourrait être dû à deux aspects du couple photosynthèse-calcification: **(i)** calcification et photosynthèse augmentent tous les deux avec l'éclairement « instantané » (Fig. 1.4a pour P et 1.4b pour C) et aucune photoinhibition est observée. Ces relations impliquent qu'ensemble photosynthèse et calcification sont maximales pour des cellules en surface recevant un éclairement maximal. **(ii)** Le taux de photosynthèse est inhibé sous un éclairement instantané cinq fois plus bas (2.5 mol m⁻² s⁻¹, Riegman *et al.*, 1998) que celle inhibant la calcification (10 mol m⁻² s⁻¹, Bleijswijk *et al.*, 1994). Ceci pourrait expliquer pourquoi des cellules nues peuvent être observées à la base de la zone euphotique. Cependant, l'affinité (rapport entre la pente à faible éclairement et le taux maximum à fort éclairement) moyenne de la calcification en fonction de la lumière (1 pgC / 100 mol m⁻² s⁻¹) est deux fois plus forte que celle de la photosynthèse (0.5 pgC / 100 mol m⁻² s⁻¹). Cette différence d'affinité en fonction de la lumière conduit à l'accroissement de la calcification par rapport à la photosynthèse en profondeur (Balch *et al.*, 1992). De plus, une rapide baisse de l'éclairement instantané (<100 mol m⁻² s⁻¹) stimule la calcification (et la production de coccolithes par cellules, cf. Chap. 1, IID, Bach *et al.* 1992) et conduit à un maximum du rapport calcification sur photosynthèse (C/P). Ainsi, pour une réduction en lumière instantanée, peu de cellules mais beaucoup de coccolithes par cellules devraient être produits, et dans ces conditions les blooms devraient être plus denses et visibles. La situation pourrait avoir lieu pendant des éclaircies (quand l'éclairement instantané est périodiquement réduit) dans un ciel d'été (comme observé dans la mer de Barentz, Brown, NOAA website). L'éclairement instantané maximal, 2000 mol m⁻² s⁻¹, correspond à l'éclairement journalier le plus favorable pour les blooms, i.e. 70 mol m⁻² d⁻¹.

d. Nutritifs (PO₄, NO₃)

De forts NO₃ sont préférables pour la croissance et la production de blooms visibles mais une limitation par les NO₃ est nécessaire.

Afin que la cellule n'accumule pas de calcite et reste petite, des concentrations de NO₃ plus fortes 0.2 µM sont requises (Paasche, 1998 ; Tab. 1.3) ; mais nos expériences ont montré que des concentrations de NO₃ de 2 µM pouvaient également provoquer une augmentation de volume (Fig. 3.2). L'accumulation du nombre de coccolithes autour de la cocsphère ainsi que la limitation de la croissance aux valeurs de NO₃ 2 µM fournissent la limite inférieure. Par contre, cette même concentration de NO₃ de 2 µM réduit la quantité de calcite produite par POC et par coccolithes d'un facteur 10 et d'un facteur 5 dans nos expériences (Tab. 3.1) ce qui suggère un

effet positif pour une faible sédimentation en cas de désagrégation des coccosphères. Cette libération de coccolithes a été effectivement avérée même lors de la phase de croissance, avec une stimulation d'un facteur 2 du taux de détachement à des NO_3 de 2 μM (Fig. 3.4b). D'un autre côté, *E. huxleyi* est connu pour utiliser le NH_4 plus efficacement que le NO_3 avec un faible f-ratio (0.08, Fernandez *et al.* 1994) inhibant la prise de NO_3 (Harrison *et al.* 1999) et dans ce cas les observations *in situ* de la gamme de NO_3 favorable aux blooms d'*E. huxleyi* sont $> 4\mu\text{M}$ (Fernandez *et al.*, 1994; Van der Wal *et al.*, 1995). Cette valeur définit la plus faible limite pour NO_3 . Un très faible NO_3 induit un accroissement du nombre de coccolithes produits et limite la croissance. Ainsi une surproduction de coccolithes est suivie par la production d'un bloom visible.

E. huxleyi peut grandir dans des eaux pauvres en **phosphates**, grâce à deux enzymes lui permettant d'utiliser du phosphore organique. Cependant, des blooms d'*E. huxleyi* en mésocosmes et en cultures sont observés sur une large gamme de PO_4 (0.2-1 μM).

La cinétique de prise de phosphate d'*E. huxleyi* semble assez spécifique. La constante de demi-saturation ($K_{1/2} = 0.1\text{-}0.4 \text{ M}$) est faible comparée à celle des diatomées ($K_{1/2} = 0.71\text{M}$) et suggère que les besoins d'*E. huxleyi* en phosphates soient plus faibles. En fait, avec une affinité pour le phosphore 20 fois plus forte que d'autres algues phytoplanctoniques et similaires aux bactéries (Thingstad *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1995; Falkner *et al.*, 1996; Stolte *et al.* 2000), *E. huxleyi* peut croître dans des concentrations en phosphates de seulement 10nM (Riegman *et al.*, 2000). Cette habilité à se développer dans des conditions très faibles en phosphates est due son activité de phosphatase (Kuenzler et Perras, 1965) et sa capacité unique d'avoir deux différents systèmes d'enzymes phosphatiques (Riegman *et al.* 2000). Cette habilité a été validée en mésocosmes, où des blooms d'*E. huxleyi*, en présence de diatomées et *Phaeocystis*, se produisent lorsque PO_4 est $< 1 \text{ M}$ et limitant pour les autres espèces (Riegman *et al.*, 1992; Egge and Heimdal, 1994). Un très faible PO_4 ($< 0.03 \mu\text{M}$) est toujours bénéfique pour la croissance mais induirait un fort PIC/POC (Bleijswijk *et al.* 1994, Riegman *et al.* 1998, Paasche, 1998), une grande taille de coccosphère (jusqu'à 5 couches de coccolithes, Paasche, 1998) et de coccolithes. En conséquence, le taux de sédimentation augmente (d'un facteur 3 ; Lecourt *et al.* 1996) et les cellules quittent plus rapidement la couche de surface, lors d'une limitation par le PO_4 . Ainsi, ces particules seraient exportées avant que le bloom soit visible. Nous choisissons une limite plus haute pour le PO_4 afin de garder une limitation par le NO_3 plutôt que par le PO_4 , ce qui est plus favorable pour le détachement et un faible contenu de calcite par coccolithe. Cette limite de 0.2 représente la concentration de PO_4 calculée à partir de la limite inférieure de NO_3 dans le rapport de Redfield (ie. 16), ce qui est proche du taux d'incorporation de N and P dans *E. huxleyi*.

NO_3 doit être supérieur à 4 μM mais aussi être le facteur limitant des blooms. Alors que le PO_4 doit être inférieur à 1 μM pour limiter la communauté des gros organismes comme les diatomées mais rester suffisamment fort ($> 0.2\mu\text{M}$) en fin de bloom pour ne pas produire de gros coccolithes.

Pour qu'*E. huxleyi* bloome en mésocosme en présence de diatomées et de *Phaeocystis*, il est indispensable que les phosphates soient faibles ($< 1 \text{ M}$) et que, simultanément, le rapport NO_3/PO_4 soit supérieur à 16 mol mol⁻¹ (Egge and Heimdal, 1994). Etant donné la cinétique de prise des NO_3 et des PO_4 , et également les conditions de nutritifs dans lesquelles les blooms d'*E. huxleyi* sont observés dans l'océan ouvert et les mésocosmes, il est proposé ici (en accord avec les observations de Riegman), en tant qu'hypothèse, que les faibles nitrates seraient le facteur principal limitant la formation de blooms d'*E. huxleyi* (conditions de contrôle par l'N pour la communauté phytoplanctonique). **Un fort N/P devrait être stimulant pour la calcification et un fort CaCO_3 exporté. Un faible N/P induirait de petites coccolithes et un détachement par mort des cellules.**

e. Système du CO₂ et des Carbonates

*La gamme de CO₂ dans l'océan actuel (5 to 15 μM) pourrait être favorable aux blooms d' *E. huxleyi*; mais une réduction de la calcification serait à prévoir comme la conséquence de l'accroissement du CO₂ atmosphérique avant la fin du 21^{ème} siècle.*

La disponibilité de CO₂ dans l'eau a été analysée comme jouant un rôle pour déterminer les latitudes et les périodes de l'année où *E. huxleyi* peut devenir prédominante. Cependant, la croissance d'*E. huxleyi* ne serait limitée par le CO₂ (eg. Zondervan, 2001 and Buitenhuis, 1999). Les coccolithophoridés tels que *E. huxleyi* sont supposés posséder un avantage compétitif aux faibles concentrations de CO₂ dû au potentiel d'utilisation de HCO₃⁻ (grâce à l'activité de la carbonique anhydrase, Nimer and Merret 1995) et la production de CO₂ par précipitation du CaCO₃ (Westbroeck *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 1994). Même si la photosynthèse décroît sous faible CO₂, ce processus ne serait pas limité par CO₂, étant donné l'absence supposée chez *E. huxleyi* d'un mécanisme de concentration de carbone (Raven and Johnston, 1991; Brownlee *et al.*, 1994). Mais les résultats d'un modèle cellulaire suggèrent que la distribution des blooms saisonniers en Atlantique Nord ne coïncide pas avec les régions de faible CO₂, contrairement à l'hypothèse faite qu'*E. huxleyi*, en évoluant, ait réussi à être compétitive à faible CO₂ (Tyrrell and Taylor, 1996).

*Les conditions actuelles de CO₂ dans l'océan seraient favorables à la calcification mais ce processus diminuerait si le CO₂ augmentait, et le CO₃²⁻ (Zondervan, 2001) et/ou HCO₃⁻ (Buitenhuis *et al.*, 1999) diminuerait.*

Pour *E. huxleyi*, une baisse significative de la calcification (15.7%), une faible hausse dans la fixation du carbone de photosynthétique (8.5%) et une baisse de la production de calcite par rapport à la matière organique (calcite:POC), rapport de 21.0%, sont observés avec l'accroissement du pCO₂ de 280 (pré-industriel) à 750ppmv (triple du niveau pré-industriel, envisagé pour 2100 par l' IPCC, Riebesell *et al.*, 2000). Riebesell et co-auteurs (2000, Fig. 0.4), montre cependant que les valeurs du CO₂ présent et pré-industriel induiraient des taux de calcification du même ordre de magnitude, c'est à dire l'ensemble des conditions favorables pour les blooms d'*E.huxleyi*.

f. Turbulence

*Du point de vue de l'océan dynamique, les coccolithophoridés semblent être adaptés à une large gamme de conditions de **turbulences** et sont capables de former les blooms les plus denses autour des aires de hautes énergies tels que des fronts (eg. la zone de confluence Brésil-Malouines ou autour du front polaire ; Fig 4.1a).*

Emiliana huxleyi est considéré comme étant r-selected parmi des coccolithophoridés (K-selected) et semble hautement tolérant aux variations des turbulences (Fig. 4.3a ; Margalef, 1983 et adapté par Cachao *et al.* 1998). Cependant, une haute stratification est bénéfique aux blooms en surface. Une faible colonne d'eau stratifiée devenant hautement stratifiée pourrait favoriser un bloom de cellules. Egalement, les blooms naturels d'*E. huxleyi* révèlent que tous ont lieu dans des hautes eaux stratifiées, où la profondeur des couches de mélange est usuellement autour de 10-20 m, et est toujours ≤ 30 m (Nanninga and Tyrrell, 1996). Ceci est en accord avec le fait que de fortes intensités lumineuses puissent influencer la création de blooms et en accord avec le moment de leur apparition, au milieu de l'été quand les éclaircissement de surface sont importants. Une faible turbulence et une haute stratification (mer calme) induiraient une meilleure détection des blooms l'été à de hautes latitudes, quand le vent est plus faible et la couche de mélange a été réduite.

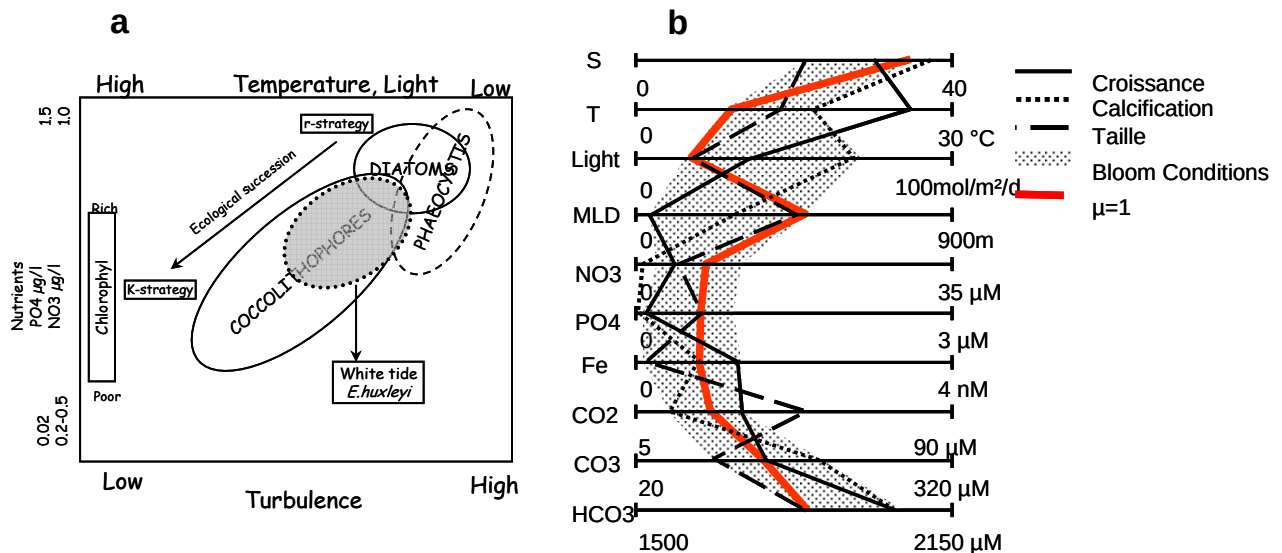


Figure 4.3 : Diagramme de Margalef et de la niche des blooms visibles

(a) Fenêtre d'adaptation à la turbulence vis-à-vis des nutritifs pour les deux classes de phytoplancton en compétition (Diatomées et coccolithophoridés) ; adaptée de Cachao et al. 1998. La température et la lumière ont été rajoutées dans le sens inverse de la turbulence, ainsi que les espèces particulières de Phaeocystis et *E. huxleyi* ; d'après la synthèse IRONAGES. (b) Diagramme des conditions environnementales favorables à l'apparition des blooms visibles d'*E. huxleyi* ; avec les critères en terme de processus (croissance forte, croissance $\sim 1 \text{ jour}^{-1}$, taille minimale et calcification forte).

2. La niche des blooms visibles (Tab. 4.2)

La niche des blooms visibles est un compromis entre les différents critères de croissance, calcification, détachement et taille (conclusion de la figure résumant la niche). Les conditions environnementales optimales de production d'un bloom visible par satellite ou d'un bloom de CaCO_3 de subsurface, tiennent compte d'un compromis entre les différents processus de production, de détachement des coccolithes et de maintien dans la couche de surface (croissance, calcification et aussi taille des coccosphères et des coccolithes), ainsi que des interactions entre espèces phytoplanctoniques en concurrence pour les nutritifs basées sur des observations *in situ*. Ces compromis sont en parti dus à l'inhibition de la calcification lors d'une croissance trop forte (cf. critères supplémentaires), mais aussi à la contradiction entre une calcification forte et une faible taille de coccosphère ou de coccolithes. Ainsi par exemple, pour une même calcification, la production de nombreux coccolithes petits sera plus favorable à un bloom visible intense que la production de gros coccolithes peu nombreux. Ces compromis font ressortir que les conditions favorables pour un bloom visible en surface sont : une salinité faible (30-35), une température faible (8-15 °C), une stratification forte (<30 m, Nanninga and Tyrrell, 1996), une lumière forte (20-70 $\text{mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, Egge et Heimdal, 1994), des nitrate forts ($>4 \mu\text{M}$) plus limitants que des PO_4 faibles mais pas trop (0.2-1 μM), un CO_2 relativement faible (12-30 μM , valeur actuelle) correspondant à un pH >8 .

Les conditions optimales pour chaque processus physiologique qui sont des critères indépendants. Les conditions environnementales pour une croissance optimale d'*E. huxleyi* (forte) sont issues de travaux en laboratoire : une salinité faible (<25, Paasche *et al.* 1996), une température relativement forte (21 °C, Paasche, 1967), une stratification large (Margalef, 1979), une lumière journalière forte ($>10 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, Paasche *et al.* 1967), une forte concentration de NO_3 ($>2 \mu\text{M}$, Chap. 3), une faible concentration en PO_4 (0.01 μM , Riegman *et al.* 1998) et présence de Phosphore organique (Riegman *et al.* 2000), de faibles concentrations en Fer inorganique ($\text{Fed} >0.6 \text{ nM}$, Chap. 2 et $\text{Fe}' >10 \text{ pM}$, Chap. 2 et Sunda et Huntsman, 1995), un CO_2 fort ($>12 \mu\text{M}$, Raven and Johnston, 1992).

Les conditions pour une taille optimale des coccosphères (faibles) sont : une température moyenne (20°C, Kooijman *et al.* 2000), une lumière faible (<2 mol m⁻² d⁻¹, Riegman *et al.* 1998), une concentration de NO₃ relativement forte (>2 µM, Chap. 3), une nutrition par le NO₃ plutôt que par le NH₄ (Lecourt *et al.* 1996), une concentration de PO₄ relativement forte (>0.03 µM, Paasche, 1998), une concentration de Fe inorganique faible (<10 pM, Sunda et Huntsman, 1995).

Les conditions pour une taille optimale des coccolithes (faible) sont : une salinité faible (17, Paasche *et al.* 1996), une température faible (<7 °C) ou très forte (>24 °C, Wilbur et Watabe, 1966), une lumière faible (<8 mol m⁻² d⁻¹, Paasche, 1999), une concentration en NO₃ relativement faible (<2 µM, Chap. 3), une concentration en PO₄ relativement forte (>0.03 µM, Paasche, 1998), une concentration en CO₂ relativement forte (>5 µM, Riebesell *et al.* 2000).

Les conditions environnementales pour lesquelles le nombre de coccolithes (attachés et détachés) par cellules est optimal (grand) sont : une salinité faible (17, Paasche *et al.* 1996), une lumière forte (>8 mol m⁻² d⁻¹, Paasche, 1999), une concentration de NO₃ relativement faible (<2, Chap. 3), une concentration en PO₄ relativement faible (<0.03µM, Paasche, 1998).

Les conditions environnementales pour que la calcification d'une cellule soit optimale (forte) sont : une salinité forte (>34, Paasche *et al.* 1996), une température moyenne (15 °C, Bleijswijk *et al.* 1994), une lumière faible (2 mol m⁻² d⁻¹, Bleijswijk *et al.* 1994), des NO₃ forts (>2 µM, Chap. 3), des PO₄ faibles (<0.03 µM, Paasche, 1998), une concentration de CO₂ faible (<5 µM, Riebesell *et al.* 2000), une concentration HCO₃ forte (>1750 µM), Buitenhuis *et al.* 1999).

A ces effets, il est indispensable d'ajouter les relations avec les autres espèces et le rôle de la turbulence. Parmi les K-stratégues que sont les coccolithophoridés, *E. huxleyi* aurait un caractère très r-stratégique qui lui permettrait d'être adapté à une large gamme de turbulence (Fig. 4.3a). Ceci nous fait dire que cette algue ne serait pas contrainte par la turbulence.

III. Validation : la niche écologique pourrait expliquer la distribution des blooms d'*E. huxleyi*.

A. La distribution globale fournie par SeaWiFS est expliquée par la niche de bloom visible, (Fig. 4.1 et Tab. 4.3)

Les résultats de l'application des valeurs de divers paramètres définis pour la niche (Tab. 4.2), au niveau de l'océan global, sont présentés sur la figure 4.1. Les paramètres présentés (T, Fig. 4.1c et NO₃, Fig. 4.1d) correspondent aux paramètres qui possèdent le plus grand poids dans la détermination des régions propices aux blooms (ie. surface des régions favorisées pour chaque paramètre). Les régions, pour lesquelles la température est entre 8 et 15°C, sont situées dans une bande allant de l'ouest à l'est dans tous les océans, entre 40° et 60° pour le Sud et 40° et jusqu'à 70° pour le Nord. Les régions définies par la niche favorables aux nitrates (>4 µM) correspondent aux régions au Nord de 35°N et au sud de 35°S, avec des régions subtropicales (Benguela) et équatoriales (Pacifique Est et golfe d'Aden). La superposition des régions (Fig. 4.1f), définies par les niches de la température (Fig. 4.1c) et du NO₃ (Fig. 4.1d) avec celles correspondantes aux régions pour la niche de PO₄, de salinité et du Si (non montrés), est montré sur la figure 4.2f. Les régions concernées par la somme de ces différents critères spécifiques à ces 5 paramètres environnementaux sont concentrées dans l'hémisphère sud entre les latitudes 35° et 60° Sud. D'autres régions avec des surfaces plus réduites de moitié se trouvent dans le Nord du Pacifique, au Nord de 30°N, et également dans le Nord de l'Atlantique au sud du Groenland, de la Norvège et dans la mer du Nord. Les régions mineures existent dans le Benguela et la mer Noire

Les zones d'apparition du signal de bloom visible par satellite aux hautes latitudes (subpolaires et polaires au dessus de 50°) se trouvent dans la niche (cf. Fig. 4.1f et Tab. 4.3, §IIIA) et possèdent avant tout les caractéristiques générales suivantes : profondeur de couche de mélange (MLD) possèdent d'intenses variations entre l'hiver et l'été ($\Delta\text{MLD}=200\text{-}600\text{m}$; Fig. 4.1b) et des concentrations en nutriments très importantes au début du printemps (jusqu'à $30\text{ }\mu\text{M}$ de NO_3) à cause de l'augmentation de l'épaisseur de la couche de mélange durant l'hiver (jusqu'à 600 m , Fig. 4.1b).

Au moment du bloom, ces zones possèdent également des conditions environnementales de surface caractérisées par : des températures ($T=0\text{-}13^\circ\text{C}$) et des salinités ($S=30\text{-}35.4$) relativement basses, malgré leur grande fourchette, les journées les plus longues ($\text{DL}=15\text{-}21\text{ h}/24$) et des intensités lumineuses couvrant une large gamme ($2\text{-}78\text{ mol photon m}^{-2}\text{ d}^{-1}$, correspondant à presque toutes les saisons de toutes les latitudes). Toutes ces conditions environnementales physiques, au moment du signal détecté par satellite, sont à l'intérieur de la niche à une ou deux valeurs près

T minimale peut être trop faible de 3 ou $4\text{ }^\circ\text{C}$, S maximale peut-être trop élevée de 0.4 , NO_3 minimal trop faible de $1\text{ }\mu\text{M}$ par rapport à la niche et PO_4 peut-être trop fort de $0.8\text{ }\mu\text{M}$ ou trop faible de $0.1\text{ }\mu\text{M}$.

Au sud du front antarctique des 3 océans, parmi ces grandes régions de blooms, où les conditions de température sont entièrement en dehors de la niche ($T=0\text{-}4^\circ\text{C}$). Cet écart par rapport à la niche peut être associé à une dynamique très active, qui doit l'Océan Austral est accompagné au front et à la divergence antarctiques (Fig. 4.1e). Ces signaux pourraient être dus à des fortes concentrations de cellules et de leur coccolithes détachés qui se seraient concentrés en certaines zones du front par transport.

Ces écarts de T , S , NO_3 et de PO_4 par rapport à la niche au moment du signal ainsi qu'aux caractéristiques générales de ces régions de grands blooms (MLD_{max} , apport en nutriments au printemps) peuvent être expliqués par des spécificités régionales et permettent de redéfinir une niche plus fine pour T , S , NO_3 et d'analyser les rôles spécifiques de MLD et de la durée des journées dans ces régions (DL).

Les grandes zones sans signal blanc visible à la surface par SeaWiFS, par exemple les gyres subtropicaux entre 35°N et 35°S , sont en dehors de la niche, avec des températures ($>20^\circ\text{C}$) et les salinités (>35) fortes, des durées d'éclairement et de MLD moyennes et peu variables d'une saison à l'autre ($12\text{-}13\text{ h}/24$; $\sim 100\text{ m}$), des concentrations en NO_3 relativement faibles ($<4\text{ }\mu\text{M}$).

B. Distribution à la méso-échelle : la niche proposée explique des blooms régionaux visibles en surface

1. Blooms de l'Atlantique Nord et Sud

Les conditions favorables requises pour les blooms d'*E. huxleyi* sont présentes en été dans le Nord et le Sud de l'océan Atlantique. Pourquoi alors les blooms du Nord sont-ils plus forts et plus étendus que ceux du Sud ?

Le bloom du Sud de l'Islande ($45\text{-}55^\circ\text{N}$) apparaît à la fin du mois de juin quand la température est autour de 15°C , la stratification est haute (réduction de la couche de mélange $> 200\text{ m}$), l'éclairement à la surface est haute (autour de $50\text{ mol m}^{-2}\text{ d}^{-1}$) et les silicates appauvris (autours $2\text{ }\mu\text{M}$, WOA,1998, Tab. 4.3), conséquence probable du bloom printanier de diatomées (Holigan et al., 1993a). Finalement, les périodes nuageuses et pluvieuses, favorables pour la calcification selon la niche, ont été détectées à cette période par les images satellitales (cics.umd.edu/~chrisb/ehux_www.html, Brown ; SeaWiFS).

Les différences entre l'hémisphères Nord et Sud se présentent comme suit : au Sud un océan plus froid en température ($< 10^{\circ}\text{C}$), aussi bien dans la région polaire que dans le bassin argentin (6°C en juillet et 10°C en février pendant l'été 1998) et plus intense en salinité (34). Ces deux paramètres hydrologiques induisent une plus faible croissance et calcification dans le Sud de l'Atlantique que probablement dans le Nord. Alors que ces deux régions de l'Atlantique présentent des concentrations similaires (5 à $10\mu\text{M}$) en NO_3 , les valeurs des biomasses sont opposées, avec une forte chlorophylle (HC) dans le Nord et une plus faible chlorophylle (LC) dans le Sud. La forte biomasse dans le nord favorise les blooms d' *E. huxleyi*, puisqu'ils induisent une déplétion des nutritifs plus forte que dans le Sud. Une autre différence majeure entre ces deux océans concerne la limitation en fer de l'océan Austral (Baar *et al.*, 1999), alors que cet élément est abondant dans le Nord (Fig 0.6b). Cette non-limitation du fer pourrait induire des blooms plus denses, plus intenses et plus forts dans le Nord. *Emiliania huxleyi* peut grandir dans des concentrations en fer deux fois plus faibles que celles nécessaires aux diatomées (cf. Chap.2). En conséquence, *E. huxleyi* pourrait répondre à ses besoins en fer avec relativement peu d'ajout en fer, puisque disposant d'une stratégie d'adaptation au stress en fer. Ainsi, de ponctuels ajouts « from above or below » (associés par exemple avec les zones polaires), pourraient induire, de petits blooms d' *E. hux* dispersés tels que ceux observés dans l'océan austral et atlantique (SeaWiFS, Fig. 4.1). Des ajouts éoliens mêmes faibles du désert de Patagonie à l'Océan Austral pourraient favoriser *E. huxleyi* mais pas les diatomées. Les forts blooms observés le long du plateau Argentin pourraient donc être dus aux ajouts de fer de Patagonie dans des eaux pauvres en silicates ($\text{Si} < 2\mu\text{M}$).

Toutes ces conditions optimales sont combinées dans les régions où les plus importants blooms d'*E. huxleyi* sont observés grâce aux images de SeaWiFS : la Mer Noire, les océans Atlantique Nord et Sud. L'intensité du bloom et son expansion à l'intérieur du bassin de la mer noire pourraient en revanche être corrélées à de faibles salinités (< 22) et donc de faibles AT. De faibles salinités devraient favoriser la production de coccolithes par cellule et induiraient la formation régulière d'un bloom, dans cette région.

2. Des écarts par rapport à la niche qui peuvent s'expliquer

A une échelle spatiale plus fine (mésos-échelle) les conditions environnementales régnant lors de l'apparition des signaux satellitaires (Tab. 4.2) présentent certains écarts aux valeurs de paramétrisation de la niche. Les particularités hydrologiques régionales peuvent expliquer ces écarts.

Ecart à la salinité : La salinité de la mer noire (18-22) peut être de 2 unités en dessous de la limite inférieure de ce que peut supporter la croissance. (Fig. 4.3b). Cette anomalie peut être expliquée par une adaptation de la population d'*E. huxleyi* de cette région à de faibles salinités comme une population de région côtière qui est mieux adaptée à de faibles salinités (Fig. 4.2b). La limite supérieure de la salinité à laquelle la présence d'un bloom d'*E. huxleyi* est détectée par SeaWiFS au Sud de l'Iceland est au dessus de la niche de 0.4 unité de salinité. Cette anomalie dans le secteur de l'Atlantique Nord n'est pas très importante pour le critère de croissance ($\mu \sim 1 \text{ jour}^{-1}$) puisque la population d'*E. huxleyi* de ce secteur possède un taux de croissance assez fort (cf. Fig. $\mu\text{-S}$). Cette anomalie se fait juste au détriment d'une taille de coccolithes plus grande et donc éventuellement un signal visible par satellite plus court que dans des salinités < 35 . Les courants de cette région pourraient légalement avoir tendance à faire dériver les blooms vers ce secteur plus salé de l'Atlantique Nord (Voir les courants qui partent de la zone prévue par la niche (Fig. 4.1f).

Ecart à la température : La limite inférieure de la température à laquelle les signaux satellitaires montrent la présence d'*E. huxleyi* dans les régions subpolaires du Sud de l'Atlantique et du Pacifique et dans les régions polaires du Nord de l'Atlantique (Mer de

Bering) et du Pacifique (Mer de Barents), est plus basse de 1 à 6°C par rapport à ce que propose la niche (Tab. 4.2). Cette anomalie pourrait s'expliquer par : **(i)** une niche proposée à l'aide principalement d'observations dans l'Atlantique Nord et de données en laboratoire sur des souches provenant de régions subpolaires de l'Atlantique Nord. Les souches d'autres régions plus froides pourraient être adaptées à des températures plus basses (comme observé dans le Sud de l'océan Pacifique ; Honjo et Okada, 1979) et il faudrait revoir alors à la baisse la niche pour la température. **(ii)** L'apparition des blooms pourrait se faire en faveur d'un réchauffement ponctuel des eaux de surface lors d'épisodes particulièrement ensoleillés par exemple ou encore à cause du réchauffement que provoquent les blooms eux-mêmes (+0.5°C déjà observé dans le golfe du Maine, Ackelson *et al.* 1989). **(iii)** Cette apparition pourrait être due à des changements récents des conditions de température de surface à cause du changement climatique ; enfin on peut invoquer le déplacement vers les hautes latitudes des cellules durant le temps que dure le bloom (2/4 semaines- Fig. 4.1).

Ecart aux nutritifs : La limite inférieure de la concentration en NO_3 dans la mer de Norvège, la mer de Barentz ou la mer de Bering est inférieure à la niche. Cette anomalie peut s'expliquer par la rapide déplétion de NO_3 , à l'apogée d'un bloom dans ces régions où la couche de mélange est très stratifiée. De plus, cette anomalie est en accord avec le fait que c'est l'appauvrissement en NO_3 qui stimulerait de forts rapports coccolithes/cellules durant la phase de déclin du bloom (cf. définition de la niche), comme l'ont montré les résultats de nos manipulations sur le NO_3 (Chap. 3). La fourchette de PO_4 et de NO_3 supérieure à la niche au nord du Front Antarctique (secteur Pacifique et Atlantique) peut s'expliquer par la faible concentration en silicate potentiellement limitante pour les diatomées à ces concentrations (de 0-5 μM , WOA 1998) et en compétition pour les nutritifs dans ces régions (Tab.4.3a). De plus, éventuellement, de faibles concentrations en fer permettent également dans ces régions (Fig. 0.6b) de revoir à la hausse les limites supérieures des concentrations en nutritifs pour la niche lorsqu'un des nutritifs est déjà limitant pour les espèces en compétition avec *E. huxleyi*. De même dans le Pacifique Nord, des blooms sont parfois observés dans des PO_4 supérieurs à 1 M (Fig. 4.1f) mais cette limite de PO_4 pourrait être repoussée à cause d'une limitation par le fer ou par la présence de nombreux brouteurs qui permettent à *E. huxleyi* de bloomer. Par contre les fortes concentrations en silicate de la mer Noire et la mer de Barents ne favoriseraient pas la compétition des diatomées au détriment d'*E. huxleyi* car ce serait les autres nutritifs (NO_3 et PO_4) qui resteraient dans la niche et donc limiteraient les diatomées.

Enfin, les écarts par rapport à la limite supérieure pour la lumière totale (dans les régions subpolaires et tempérées – Tab. 4.3) ne sont pas à considérer car ces données sont issues d'un modèle ne considérant pas les nuages. Les écarts par rapport à la limite inférieure pour la lumière totale (mer de Barents) seraient compensés par la durée d'éclairement très importante (>15 heures jour⁻¹).

Tableau 4.3 : Validation de la niche des signaux visibles par zones.

Période de blooms visibles visualisé par suivi hebdomadaire des images SeaWiFS traitées par C. Brown (cics.umd.edu/~chrisb/ehux_www.html) associée avec les conditions environnementales de la région à la même période, en terme de température, de salinité, de lumière reçue, de durée du jour, de couche de mélange maximum connue dans la région (MLDmax), de couche de mélange au moment du signal visible et des conditions chimiques (PO₄, NO₃, SI et HCO₃).

Sea or area	Period	Physical						Chemical				Bloom	
		Temperature °C	Salinity	Total E/m ² /d	D h	MLDmax	Mixing depth m	Phosphate μM	Nitrate μM	Silicate μM	HCO ₃ -	satellite Yes or No	Inside window? Yes or No
Window		8-15	30-35	20-70				0.2-1	4-10	< 2	>1750		
New window				16-20	Large		Low						
North Atlantic	June	8-12	34.8- 35.4	66- 74	16-20	200-400	30	0.4-0.8	5-10	0-5	1880-2010	Y	Y (1,2)
Norwegian Sea	July	8-12	33-35	41-69	18-21	20-200	< 50	0.2-0.3	0.5-1	0-3	1980-2020	Y	Y (1, 3)
Barents Sea	August	5-9	34-35	14-50	15-21		20	0.1-0.2	0.5-3	2-10	-	Y	Y (1, 3, 4)
Patagonian Shelf and PFZ Atlantic	December	4-13	33.4-34.2	69- 78	15-18	100-400	< 100 North of PF	0.6-1.2	2-15	0-5	1850-2050	Y	Y (4, 5)
PFZ Pacific	December	2-9	34-34.4	60- 76	16-20	150-350	50-150 North of PF	1-1.8	10-25	0-5	1800-2050	Y	Y (4, 5, 6)
Bering Sea	July	7-9	30-32	63-70	16-20	100-250	30	0.2-1	0.5-4	2-10	1950-2010	Y	Y (1, 3, 4)
Black Sea	June	12- 16	18	65- 76	15-16		30	0.1-0.6	2-6	5-15	-	Y	Y (1, 7)
Benguela Upwelling (At 50 m)	November	15- 18 (13-16)	35- 35.4 (35.2-35.4)	72-80	13-14	50-100	Upwelling < 50	0.2-0.5 (1-1.4)	0.5-10 (2-20)	0-2 (0- 2.5)	1800-1980 (1820-2040)	Y	Y (2, 3, 6)
Morocco Upwelling (At 50)	May	17-20 (16-18)	35.8-36.6 (35.8-36.6)	70- 78	13-14		Upwelling < 50	0.1-0.7 (1-1.4)	0.5-10 (15-20)	1-3 (2.5-5)	1700-1790 (1900-2010)	N	N (T, S)
Mediterranean Sea (At 50m)	June	18-24	36-39.5	65- 80	14-15		30	0-0.4	0-2	0-2	1840-2100 (1870-2260)	N	N (T, S, NO3)
Gyre subtropicaux													
AZ Pacific	January	0-2	33-34	2-70	6-22	150-300	< 50 DA	1.4-1.8	20-25	10-50	1860-2050	Y	N (T, Nut)
AZ Atlantic and CZ	January	0-4	33.4-34	0-78	4-24	100-350	< 50 DA and CZ	1.2-1.8	15-25	5-70	1900-2050	Y	N (T, Nut)

- (1) high Silicate can be observed due to the low concentration of other nutrients
- (2) high Salinity produces big coccoliths
- (3) low NO₃ observed due to the rapid decrease during the bloom inducing bloom collapsing
- (4) relative low Temperature can be observed due to T perturbation? Adaptation? Flow?
- (5) Bloom observed in cold rich area due to Antarctic Convergence
- (6) water limited by Si or/and Fe
- (7) low Salinity observed due to the adaptation at low salinity of coastal strains

3. La niche des blooms visibles en surface ne marche pas mais une explication possible par la dynamique

Des conditions environnementales, observées en dehors de la niche lors d'un bloom en surface visible par satellite, peuvent être expliquées par la dynamique océanique. En effet, dans ce cas, le critère de la taille des coccolithes, dont le déplacement dépendrait plus des courants que de la gravité. Les conditions environnementales, dans lesquelles sont observés des blooms satellitaires, celles où les coccolithes sont produits, diffèrent. Ce serait dû au déplacement des coccolithes libres produit, par exemple, par des courants ou par une turbulence intense. Les conditions de production de coccolithes doivent alors correspondre avec des conditions environnantes qui ne tiennent pas compte du critère de faible taille. Les blooms peuvent alors être observés pour une salinité plus élevée (>35) et des PO_4 plus faibles ($< 0.2 \mu\text{M}$) qui favorisent des coccolithes plus gros et plus calcifiés.

En surface de l'*upwelling* du Benguela, la température et la salinité en surface sont trop fortes pour que normalement puissent être observés des blooms, mais ils sont néanmoins observés. Cette anomalie peut être associée à une dynamique active de la région. On observe d'ailleurs à 50 m de profondeur dans cette région les conditions environnementales de T ($> 15^\circ\text{C}$) et de S (> 35) adéquates pour une production de coccolithes et pour une croissance importante (la taille des coccolithes n'est pas à considérer). En ce qui concerne la compétition avec les organismes siliceux pour les nutritifs, ce serait la faible concentration en silicate qui ne permettrait pas à ces organismes d'utiliser la totalité des nutritifs, ce qui peut simplement profiter à la croissance d'*E. huxleyi*. Il se peut également que, dans cette région, les organismes siliceux rentrent en compétition pour les faibles concentrations en fer dissous (Fig. 0.6b et Chapitre 2) ou alors à cause de la présence de brouteurs, qui profiteraient à *E. huxleyi* par un effet de cascade.

De même l'*upwelling* équatorial du Pacifique est trop chaud (supérieur de 5°). Cet écart peut être dû à de bonnes conditions de température en subsurface et une remontée du bloom de coccolithes vers la surface. Ce déplacement des coccolithes a été effectivement observé dans cette région (Balch *et al.* 1996).

Pourquoi l'*upwelling* du Maroc n'est-t-il pas analogue au Benguela ? Le contraste entre ces deux zones peut donc être attribué selon la niche à une différence en température en profondeur : supérieure à la niche dans le cas du Maroc. En silicate : faible dans le cas du Benguela et fort dans le cas du Maroc. Il pourrait aussi être attribué aux apports en fer (faibles au Benguela et fort au Maroc) et/ou à la présence de brouteurs (forte aux Benguela et faible au Maroc) (Minas c.p).

Certains signaux ont lieu en hiver et en dehors de la niche (plateau de la Patagonie, d'Armorique, de la mer de Béring - images non montrées ici). Ces régions, où la marge continentale est peu profonde, et qui connaîtraient des blooms d'*E. huxleyi* en été, pourraient être alors sujettes à la resuspension des sédiments en faveur de vents forts comme cela a été montré dans la mer de Béring (Broerse *et al.* 2003). Cette remarque impliquerait que ces signaux ne correspondent pas à des blooms de coccolithes.

Certains signaux blancs apparaissent vraiment en dehors de la niche, par exemple lorsque que la température est trop basse de 8°C , sud du front antarctique. Ces signaux pourraient être dus à des coccolithes morts, et l'origine de la production de cellules serait à rechercher au nord du Front Polaire, qui a une température plus clémente, supérieure de 2 degrés et plus favorable à *E. huxleyi*. Mais une adaptation des populations des hautes latitudes à de plus faibles températures de la niche (de 4 degrés) comme dans l'atlantique Nord (SIIIB1). Cela peut être également dû à un problème de satellite ou encore à des changements récents des conditions de température de surface, dus au changement global.

Conclusion

La surface totale couverte par les signaux blancs de SeaWiFS, sur la période de 1997 à 2003, représente 20×10^6 km², soit 7% de l'océan mondial. Ces signaux connus classiquement, comme des blooms associés à *E. huxleyi* ne sont pas observés dans tous les océans. Il se développent majoritairement entre 45° et 70° Sud et Nord des océans Atlantique, Pacifique et uniquement dans les régions subpolaires de l'océan Indien Sud. Régionalement, les blooms visibles les plus importants sont situés : dans l'Atlantique Sud qui, incluant son secteur austral, représente 27% ; dans le Pacifique Sud, avec 23% ; et dans l'Atlantique Nord, 21% de la surface totale des signaux blancs détectés par satellite. D'autres signaux blancs, de relative grande intensité mais de faible surface, correspondent aux upwellings du Benguela, du sud du Chili et du Pacifique Est à l'Equateur. Enfin la Mer Noire, couverte parfois à 90% par des signaux blancs, constitue un cas d'étude de ces blooms.

La distribution des signaux satellitaires à échelle globale apparaît, d'après la niche écologique des blooms visibles, dirigée par la physique. La validation de cette niche, avec la distribution des paramètres environnementaux *in situ* à échelle globale, a révélé que l'apparition des plus grandes régions de blooms visibles (hautes latitudes > 60°), ainsi que les régions d'upwelling (Benguela), peut être expliquée par le transport des cellules et des coccolithes depuis leur lieu de prolifération (50° de latitude ou bien en subsurface), plus chaud (Température de 15°C) et plus riche en nutriments ($\text{NO}_3 > 4 \mu\text{M}$), vers le lieu d'intense détachement de leurs coccolithes, produits à la mort des cellules. Ces régions de blooms de coccolithes libres correspondent en général à des eaux plus froides ($T = 10^\circ\text{C}$), moins salées ($S < 35$) et limitées en NO_3 par rapport au PO_4 (ie. $\text{N/P} < 16$).

La niche des blooms visibles, optimale en surface, est rencontrée lorsque les conditions environnementales produisent à la fois : - une croissance d'*Emiliana huxleyi* relativement forte de 1 jour⁻¹ ; ce qui avantage une grande production de PIC/POC, de l'ordre de 0.8 mol mol⁻¹ ; - une production de PIC sous forme de nombreux (>100 cell⁻¹) et petits coccolithes (3 μm). Ces coccolithes sont constitués de peu de calcite (<0.1 pgC) et détachés de la coccosphère grâce à un processus de détachement ou à une désagrégation intense des cellules (perte de 6 coccolithes cell⁻¹ jour⁻¹) ; - une forte concentration de POC (30 pg cell⁻¹) qui a comme conséquence de promouvoir une plus grande flottabilité. La compréhension de la formation de blooms visibles dépend donc de la relation entre ces divers processus physiologiques et principalement trois paramètres environnementaux : température, salinité et nutriments (NO_3).

Les NO_3 contrôleraient de plus la production de PIC dans les blooms visibles et détermineraient leurs durées. De relativement forts NO_3 , de 4 μM , sont nécessaires à la production d'une population importante de cellules (30 000 cells mL⁻¹). Leur maintien à des niveaux forts favorise un export de PIC, tandis que leur déplétion produit des blooms visibles, plus longs de plusieurs jours, pour un même nombre de coccolithes libres et une intensité de signal similaire. Ces blooms, visibles plus longtemps, se formeraient alors avec 5 fois moins de cellules, produisant 10 fois moins de PIC, des coccolithes plus petits et 5 fois moins calcifiés que ceux qui bénéficient d'un maintien de forts NO_3 . Lors d'un maintien des NO_3 forts et une déplétion de PO_4 , les conditions d'export seraient encore accrues et le rapport PIC/POC de 1.4 mol mol⁻¹ serait jusqu'à 3 fois plus fort. Une telle augmentation de PIC, concentré dans les coccosphères, avec peu de détachement aurait pour conséquence de rendre le bloom invisible, et très productif pour l'export de PIC.

En revanche, la période d'apparition de ces signaux blancs et leur étendue semblent conditionnées par la distribution d'autres paramètres comme : les nutriments, les apports en poussières désertiques riches en fer, ou encore la baisse de la salinité. La différence d'étendue couverte par les blooms visibles (6% de la surface totale), entre le nord et le sud de l'Atlantique, pourrait être due à une dynamique et à un système de courants plus « larges » et plus complexe

au sud. Le bloom de la Mer Noire, un des plus longs (2 mois) et des plus envahissants (90% de sa surface occupée par le signal satellitale blanc), pourrait être dû à la fois à une stratification très intense et à une eau très peu salée ($S = 22$). Ces deux caractéristiques avantagent la croissance des cellules et produisent un maintien à la surface de coccolithes petits et peu denses.

La mer deviendrait blanche lorsque :

Elle est calme et que la surface est bien stratifiée,

Tempérée ($10 - 15^{\circ}\text{C}$) et peu salée (<35),

Quand le soleil brille (éclairage journalier $>20 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; ie. jours ensoleillés sous les hautes latitudes) mais avec de courts passages nuageux (réduisant brutalement l'éclairage en surface),

Si le PO_4 est faible ($0.2 \mu\text{M}$) mais que le phosphore organique est abondant, que le NO_3 est le nutritif limitant avec des concentrations minimales de $4 \mu\text{M}$, les silicates déplétés ($\sim 2 \mu\text{M}$), et

Que la concentration en fer inorganique est relativement faible ($\text{Fe}' < 10 \text{ pM}$) mais qu'elle reçoit des apports externes en fer nouveau ($\sim 1 \text{ nM}$).

Finalement, les blooms bénéficieraient d'un effet de cascade dû au broutage des autres espèces phytoplanctoniques et, également, du passage au printemps de diatomées qui après leurs blooms libèrent de la matière organique profitable à ce coccolithophoridé.

La prise en compte unique et exclusive de la croissance ne permettrait pas de prédire la formation de signaux en surface détectables par satellites, ces signaux étant en lien direct avec le déclin du bloom des cellules plutôt qu'avec son apogée. Les signaux blancs, considérés auparavant comme des « blooms », signifieraient avant tout la mort des cellules, produisant des coccolithes par détachement ou désagrégation, en réponse à de faibles NO_3 . Ces signaux n'indiqueraient donc pas des blooms de cellules et pas nécessairement des blooms de production de PIC. Par conséquent, utiliser des signaux blancs détectés par satellites pour l'évaluation du bilan du CaCO_3 , sous-estime sa production à l'échelle globale. Une nouvelle niche de véritables blooms de cellules et de production de PIC devrait être déterminée, en prenant particulièrement en compte la distribution d'*Emiliania huxleyi* dans la totalité de la couche lumineuse. Celle-ci suggère des maxima (abondance de cellules et PIC) en subsurface de l'océan (10-80 m) dans des régions sans signaux blancs et par conséquent ignorés des satellites.

Des signaux blancs au sud du front polaire, détectés par le composite de SeaWiFS ces 7 dernières années (1997-2003 ; Fig. 1.1b), constituent une observation nouvelle. Cette extension pourrait correspondre à un déplacement de l'apparition des blooms vers le sud et vers le nord de 60° S et N puisque, en effet, ces signaux très au sud n'avaient pas été détectés dans les données satellitales antérieures par CZCS entre 1979-1985, (Brown et Yoder, 1994) ou par SeaWiFS entre 1997-1999 (Iglesias-Rodriguez et al. 2002).

D'après ces données satellitales, la surface de l'océan couverte par des signaux blancs tendraient plutôt à s'étendre depuis 1999 (comparativement à la période 1979-1997). Comment les blooms peuvent-ils s'étendre alors que la calcification et la production de PIC diminuent, conséquence de l'acidification de l'eau de mer induite par la pénétration du CO_2 atmosphérique ? Ou bien ne serait-ce pas plutôt la modification du réservoir de nitrates, conséquence de la diminution de la formation d'eau profonde et de la stratification prédite pour les décennies à venir, qui déterminerait l'évolution de la biocalcification océanique future ? La prise en compte de la variabilité dans la colonne d'eau du PIC associée à *Emiliania huxleyi*, mais également à d'autres coccolithophoridés (encore peu étudiés au point de vue physiologique et écologique), semble être la voix adaptée pour l'amélioration de nos connaissances de la production du CaCO_3 de l'océan pélagique moderne. De nouvelles expériences en conditions contrôlées, inspirées de la stratégie des cultures en laboratoire développées dans cette thèse

(Partie I), tenant compte simultanément du rôle du NO_3 et PO_4 (en appliquant des variations régulières couvrant la gamme océanique) sur la calcification, seraient à privilégier pour avancer dans la compréhension de ce mécanisme mystérieux. Enfin, l'application de la niche visible aux blooms invisibles (de PIC et de cellules), ainsi que la prise en compte des résultats obtenus en conditions contrôlées dans cette thèse (effet des NO_3 et du fer sur la production de PIC et de coccolithes) dans les modèles biogéochimiques du cycle de carbone, devraient aider à améliorer les prévisions de la réponse de la biocalcification aux changements climatiques.

Références

Ackelson S., Balch W.M. and Holligan P.M. 1989. White Waters Of The Gulf Of Maine. *Oceanography* 1: 18-22.

Aknes D.L., Egge J.K., Rosland R. and Heimdal B.R. 1994. Representation of *Emiliana huxleyi* in phytoplakton simulation models. A first approach. *Sarsia* 79: 291-300.

Amat A. 2000. Croissance corallienne et variations du CO₂ atmosphérique: Implications biologiques et climatiques. Thèse. University Pierre et Marie Curie, Paris VI, France: 247 pp.

Andersen O.K. 1981. Coccolith formation and calcification in a N-Cell culture of *Emiliana huxleyi* during phosphorus-limited growth in batch and chemostat culture. Unpublished Ph.D. Thesis. University of Oslo, Norway: 66 pp.

Anning T., Nimer N., Merret M. J. and Brownlee C. 1996. Costs and benefits of calcification in coccolithophorids. *J. Mar. Syst.* 9: 45-56.

Archer D. 1994. A data-driven model of the global calcite lysocline. *Global Biogeochemical Cycles* 10(3): 511-26.

Archer D. Winguth A., Lea D. and Mahowald N. 2000. What caused the glacial/interglacial atmospheric pCO₂ cycles? *Reviews of Geophysics* 38(2): 159-89.

Baar de H.J.W and Boyd P.W. 1999. The role of iron in plankton ecology and carbon dioxide transfer of the global oceans. In *The dynamic carbon cycle: a midterm synthesis of the joint Global Flux Study*. International Geosphere Biosphere book Series. Hanson R.B, Ducklow H.W and Field J.G. [Eds]. Cambridge university press: Chap.4.

Balch W.M. 1986. Exploring the mechanism of ammonium uptake in phytoplankton with an ammonium analogue, methylamine. *Mar. Biol.* 92: 163-71.

Balch W.M., Holligan P.M., Ackelson S.G. and Voss K.J. 1991. Biological and optical properties of mesoscale coccolithophore blooms in the Gulf of Maine. *Limnol. Oceanogr.* 36(4): 629-43.

Balch, W.M., Holligan P.M. and Kilpatrick K.A. 1992. Calcification, photosynthesis and growth of the bloom-forming coccolithophore, *Emiliana huxleyi*. *Cont. Shelf Res.* 12(12): 1353-74.

Balch W.M., Kilpatrick K.A. and Holligan P.M. 1993. Coccolith formation and detachment by *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* 29: 566-75.

Balch, W.M., Fritz J. and Fernandez E. 1996. Decoupling of calcification and photosynthesis in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* under steady-state light-limited growth. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 142: 87-97.

Berman-Frank I., Cullen J.T., Shaked Y., Sherrell R.M., Falkowski P.G. 2001. Iron availability, cellular iron quotas, and nitrogen fixation in *Trichodesmium*. *Limnol. Oceanogr.* 46(6): 1249-1260

Berg C.M.G. van den 1984, Determination of the complexing capacity and conditional stability constants of complexes of copper(II) with natural organic ligands in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complexes. *Mar. Chem.* 15 : 1-18

Berge G. 1962. Discoloration of the sea due to *Coccolithus huxleyi* 'bloom'. *Sarsia* 6: 27-40.

Berger W.H. 1976 Biogenous deep-sea sediments: production, preservation and interpretation. *Treatise on Chemical Oceanography* Riley P. and Chester R. [Eds]. 1976. Academic, San Diedo, Calif.: 265-388.

Berger W.H. 1982. Deglacial CO₂ buildup: constraints on the coral reef model. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 40: 235-53.

Biddanda B. and Benner R. 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate flux during the production of particulate and dissolved

organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 42: 506-18.

Bienfag P.K. 1981. Sinking rate dynamics of *Cricosphaera carterae* Braarud. 1. Effects of growth rate, limiting substrate, and diurnal variation in steady-state populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 49: 217-33.

Bienfag P. and Ziemann D. 1992. The role of Coastal High Latitude Ecosystems in Global Export Production. In *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Falkowski P. and Woodhead A. [eds] Plenum Press : 285-298

Bijma J., Altabet M., Conte M., Kinkel H., Versteegh G.J.M., Volkman J.K., Wakeham S.G. and Weaver P.P. 2001. Primary signal: ecological and environmental factors - Report from Working Group 2. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 2: 2000GC000051.

Bleijswijk J.D.L. van, van der Wal P., Kempers R.S., Veldhuis M.J.W., Young J.R., Muyzer G., de Vrind-de Jong E. and Westbroek P. 1991. Distribution of two types of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) in the northern Atlantic region as determined by immunofluorescence and coccolith morphology. *J. Phycol.* 27: 566-70.

Bleijswijk J.D.L. van, Kempers R.S. and Veldhuis M.J.W. 1994. Cell and growth-characteristics of type-A and type-B of *Emiliania-huxleyi* (prymnesiophyceae) as determined by flow-cytometry and chemical-analyses. *J. Phycol.* 30: 230-41.

Bleijswijk J.D.L. van, Kempers R.S., van der Wal P., Westbroek P., Egge J.K. and Lukk T. 1994b. Standing stocks of PIC, POC, PON and *Emiliania huxleyi* coccospheres and liths in sea water enclosures with different phosphate loadings. *Sarsia* 79: 307-17.

Boyd P.W., Muggli D.L., Varela D.E., Goldblatt R.H., Chretien R., Orians K.J. and Harrison P.J. 1996. *In vitro* iron enrichment experiments in the NE Subarctic Pacific. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 136: 179-93.

Boyd P.W., Watson A.J., Cliff C.S., Abraham E.R. and Trull T. 2000. A

mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. *Nature* 407: 695-702.

Boyé M. 2000. Organic complexation and biogeochemistry of iron in the marine system: field data and culture experiment. Ph.D. Thesis. University of Liverpool, England: 240 pp.

Boyé M. and van den Berg C.M.G. 2000. Iron availability and the release of iron-complexing ligands by *Emiliania huxleyi*. *Marine Chemistry* 70: 277-87.

Boyé M., Aldrich A.P., van den Berg C.M.G., de Jong J.T.M, Veldhuis M.J.W., de Baar H.J.W. 2003. Horizontal gradient of the chemical speciation of iron in surface waters of the northeast Atlantic Ocean.

Bramlette M.N. 1961. Pelagic sediments. In *Oceanography*. Sears M. [Ed]. Am. Assoc. Adv. Sci. Publ. 67: 345-66.

Bramlette M.N. and Riedel W.R. 1954. Stratigraphic value of discoasters and some other microfossils related to recent coccolithophores. *J. Paleontol.* 28: 385-403.

Brand L.E. 1982. Persistent Diel Rhythms in the Chlorophyll Fluorescence of Marine Phytoplankton Species. *Mar. Biol.* 69: 253-62.

Brand L.E. 1984. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 18: 543-56.

Brand L.E. 1994. Physiological ecology of marine coccolithophores. In *Coccolithophores*. Winter A. and Siesser W.G. [Eds]. Cambridge, Cambridge university press: 39-49.

Brand L.E., Sunda W.G. and Guillard R.R.L. 1983. Limitation of marine-phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese, and iron. *Limnol. Oceanogr.* 28(6): 1182-98.

Brassel S.C., Eglinton G., Marlowe I.T., Pflaumann U. and Sarntinoranont M. 1986. Molecular stratigraphy: A new tool for climatic assessment. *Nature* 320: 130-3.

Bratbak G., Egge J.K. and Heldal M. 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliania*

- huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 93: 39-48.
- Bratbak G., Levasseur M., Michaud S., Cantin G. Fernandez E., Heimdal B.R. and Haldal M.I. 1995. Viral activity in the relation to *Emiliania huxleyi* blooms: a possible mechanism of DMSP release? *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 128: 133-42.
- Bratbak G., Wilson W. and Haldal M. 1996. Viral control of *Emiliania huxleyi* blooms? *J. Mar. Syst.* 9: 75-81.
- Broerse A. 2000. Coccolithophores export production in selected ocean environments: seasonality, biogeography, carbonate production. Ph.D. Thesis. University of Amsterdam, The Netherlands: 185 pp.
- Broerse A.T.C., Tyrrell T., Young J.R., Poulton A.J., Merico A., Balch W.M., Miller P.I. 2003. The cause of bright waters in the Bering Sea in winter. *Continental Shelf Research* 23: 1579-1596
- Broecker W. S., Peng T.H. (1982) Tracers in the sea. Lamont-Doherty geological observatory, Colombia university, Palisades, New York 10964, USA.
- Brown C.W. 2000. Spatial and temporal variability of *Emiliania huxleyi* blooms in SeaWiFS imagery. AGU 2000 Ocean Sciences Meeting, 24-28 January 2000, San Antonio, TX. EOS 80(49): 153.
- Brown C.W. and Yoder J.A. 1994. Coccolithophorids blooms in the global ocean. *J. Geophys. Res.* 99: 7467-82.
- Brownlee C., Nimer N., Dong L.F. and Merrett M.J. 1994. Cellular regulation during calcification in *Emiliania huxleyi*. In *The Haptophyte algae*. Green J.C. and Leadbeater B.S.C. [Eds]. Oxford, Clarendon Press 51: 133-48.
- Buitenhuis E.T. 2000. Interactions between *Emiliania huxleyi* and the dissolved inorganic carbon system. Ph.D. Thesis. University of Groningen, The Netherlands: 95 pp.
- Buitenhuis E.T., van Bleijswijk J., Bakker D., and Veldhuis M.J.W. 1996. Trends in inorganic and organic carbon in a bloom of *Emiliania huxleyi* in the North Sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 143: 271-282
- Buitenhuis E.T., de Baar H.J.W. and Veldhuis M.J.W. 1999. Photosynthesis and calcification by *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) as a function of inorganic carbon species. *J. Phycol.* 35: 949-59.
- Buitenhuis E.T., van der Wal P. and de Baar H.J.W. 2001. Blooms of *Emiliania huxleyi* are sinks of atmospheric carbon dioxide; a field and mesocosm study derived simulation. *Global Biogeochemical Cycles* 15(3): 577-87.
- Cachao M., Oliveira A. and Vitorino J. 1998. Coccolithophore assemblages from offshore Portugal. *Coccolithophorid evolutionary biodiversity and ecology network: First annual CODENET workshop*.
- Cadée G.C. 1985. Macroaggregates of *Emiliania huxleyi* in sediment traps. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 24: 193-6.
- Carlucci A.F. and Bowes P.M. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. *J. Phycol.* 6: 393-400.
- Cortès M.Y., Bollman J. and Thierstein H.R. 2001. Coccolithophore ecology at the HOT station ALOHA, Hawaii. *Deep-Sea Res. II* 48: 1957-81.
- Crawford D.W. and Purdie D.A. 1997. Increase pCO₂ during blooms of *Emiliania huxleyi*: theoretical considerations on the asymmetry between acquisition of HCO₃⁻ and respiration of free CO₂. *Limnol. Oceanogr.* 42(2): 365-72.
- Croot P.L. and Johansson M. 2000. Determination of iron speciation by cathodic stripping voltammetry in seawater using the competing ligand 2-(2-Thiazolylazo)-*p*-cresol (TAC). *Electroanalysis* 12(8): 565-576
- Dale T., Rey F. and Heimdal B.R. 1999. Seasonal development of phytoplankton at a light latitude oceanic site. *Sarsia* 84: 419-35.
- Dong L.F., Nimer N.A., Okus E. and Merrett M.J. 1993. Dissolved inorganic

carbon utilization in relation to calcite production in *Emiliana huxleyi* (Lohmann) Kamptner. *The New Phytologist* 123: 679-84.

Dortch Q., Thompson P.A. and Harrison P.J. 1991. Variability in nitrate uptake kinetics in *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 27: 35-9.

Doumenge F., Allemand D. and Toulemon A. 1994. Past and Present Biomineralization Processes. Considerations about the Carbonate Cycle. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, spécial 13.

Dymond, J. and Lyle M. 1985. Flux comparison between sediments and sediment traps in the eastern tropical Pacific: implications for atmospheric CO₂ variations during the Pleistocene. *Limnol. Oceanogr.* 30(4): 699-712.

Egge J.K. and Aksnes D.L. 1992. Silicates as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 83: 281-9.

Egge J.K. and Heimdahl B.R. 1994. Blooms of phytoplankton including *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). Effects of nutrient supply in different N:P ratios. *Sarsia* 79: 333-48.

Engel A. 2002 Direct relationship between CO₂ uptake and transparent exopolymer particles production in natural phytoplankton. *Journal of Plankton Research* Vol.24 no.1 pp.49-53, 2002

Eppley R.W., Holmes R.W. and Strickland J.D. 1967. Sinking rates of marine phytoplankton measured with a fluorometer. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1: 191-208.

Eppley R.W. and Thomas W.H. 1969. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 14: 912-20.

Eppley R.W., Rogers J.N., MacCarthy J.J. and Sournia A. 1971. Light/dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankters *Skeletonema costatum* and *Coccolithus huxleyi* in N-limited chemostat culture. *J. Phycol.* 7: 150-4.

Eppley R.W., Runger E.H. 1974. Nitrogen assimilation of an oceanic diatom in nitrogen-limited continuous culture. *J. Phycol.* 10: 15-23.

Erickson D.J. III and Hernandez J.L. 2003. Atmospheric iron delivery and surface ocean biological activity in the Southern Ocean and Patagonian region. *Geophysical Research letters* 30(12): 11-1 à 11-4

Eynaud F., Gireaudau J., Pichon J.-J. and Pudsey C.J. 1999. Sea-surface distribution of coccolithophores, diatoms, silicoflagellates and dinoflagellates in the South Atlantic Ocean during the late austral summer 1995. *Deep-Sea Research I* 46: 451-482.

Fagerbakke K.M., Heimdahl B.R. and Batvik H. 1994. *Emiliana huxleyi*. Chemical composition and size of coccoliths from enclosure experiments and a norwegian fjord. *Sarsia* 79: 349-55.

Fernandez E., Boyd P., Holligan P. M. and Harbour D.S. 1993. Production of organic and inorganic carbon within a large scale coccolithophore bloom in the northeast Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 97: 271-85.

Fernandez E., Balch W.M., Marañón E. and Holligan P.M. 1994. High rates of lipid biosynthesis in cultured, mesocosm and coastal populations of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 114: 13-22.

Fernandez E., Fritz J.J. and Balch W.M. 1996a. Chemical composition of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* under light-limited steady state growth. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 207: 149-60.

Fernandez E., Marañón E. and Balch W.M. 1996b. Intracellular carbon partitioning in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *J. Mar. Syst.* 9: 57-66.

Fernandez E., Marañón E., Harbour D.S., Kristiansen S. and Heimdahl B.R. 1996c. Patterns of carbon and nitrogen uptake during blooms of *Emiliana huxleyi* in two Norwegian fjords. *J. Plankton Res.* 18(12): 2349-66.

- Findlay C.S. and Giraudeau J. 2000. Extant calcareous nannoplankton in the Australian Sector of the Southern Ocean (austral summers 1994 and 1995). *Mar. Micropaleontol.* 40: 417-39.
- Fisher N.S. and Honjo S. 1989. Intraspecific Differences in Temperature and Salinity Responses in the Coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Biological Oceanography* 6: 335-61.
- Flynn K.J., Page S., Wood G. and Hipkin C.R. 1999. Variation in the maximum transport rates for ammonium and nitrate in the prymnesiophyte *Emiliana huxleyi* and the raphidophyte *Heterosigma carterae*. *J. Plankton Res.* 21(2): 355-71.
- Francois R., Bacon M. P. and Suman D. O. 1990. Thorium-230 profiling in deep-sea sediments: high- resolution records of flux and dissolution of carbonate in the equatorial Atlantic during the last 24,000 years. *Paleoceanography*. 5 : 761-787.
- Fritz J.J. 1999. Carbon fixation and coccolith detachment in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in nitrate-limited cyclostats. *Mar. Biol.* 133: 509-18.
- Fritz J.J. and Balch W.M. 1996. A light-limited continuous culture study of *Emiliana huxleyi*: determination of coccolith detachment and its relevance to cell sinking. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 207: 127-47
- Gayoso A.M. 1995. Bloom of *Emiliana huxleyi* (prymnesiophyceae) in the western South Atlantic Ocean. *J. Plankton Res.* 17(8): 1717-22.
- Geisen M., Bollmann, J., Herrle, J.O., Mutterlose J. and Young J.R. 1990. Calibration of the random settling technique for calculation of absolute abundances of calcareous nannoplankton. *Micropaleontol.* 45(4): 437-42.
- Gerringa L.J.A., de Baar H.J.W., Timmersmans K.R. 2000. A comparison of iron limitation of phytoplankton in natural oceanic waters and laboratory media conditioned with EDTA. *Marine chemistry* 68 : 335-346
- Gieskes W.W.C., KrayG.W., Nontji A., Setiapermana D. and Satomo. 1988. Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the Banda Sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints. *Neth. J. Sea Res.* 22: 123-37.
- Ginoux P. M., Chin, I., Tegen, J., Prospero, B. Holben O. Dubovik and S. J. Lin. 2001. Sources and global distributions of dust aerosols simulated with the GOCART model, *J. Geophys. Res.* 106: 24698-24712.
- Green J.C. and Leadbeater B.S.C. [Eds] 1994. *The Haptophyte Algae*. Oxford, Clarendon Press 51: 446 pp.
- Green J.C. and Harris R. [Eds] 1996. *EHUX (Emiliana huxleyi)*. *J. Mar. Syst.* 9: 136 pp.
- Green J.C., Course P.A. and Tarran G.A. 1996. The life-cycle of *Emiliana huxleyi*: A brief review and a study of relative ploidy levels using flow cytometry. *J. mar. Syst.* 9: 33-44.
- Guillard R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marines invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals*. Smith W. and Chaney M.H. [Eds]. New York, Plenum Publishing: 29-60.
- Hagino K., Okada H. and Matsuoka H. 2000. Spatial dynamics of coccolithophore assemblages in the Equatorial Western-Central Pacific Ocean. *Mar. Micropaleontol.* 39: 53-72.
- Haidar A.T and Thierstein H.R. 2001. Coccolithophore dynamics off Bermuda (N. Atlantic). *Deep-Sea Res. II* 48: 1925-56.
- Harris R.P. 1994. Zooplankton grazing on the coccolithophore *Emiliana huxleyi* and its role in inorganic carbon flux. *Mar. Biol.* 119: 431-9.
- Harris, R.P., 1996. Coccolithophorid dynamics: the European *Emiliana huxleyi* programme, EHUX. *Journal of Marine Systems* 9 : 1-11.

- Harrison W.G., Harris L.R., Irwin B.D. 1996. The kinetics of nitrogen utilization in the oceanic mixed layer: Nitrate and ammonium interactions at nanomolar concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 411: 16-32.
- Heimdal B.R., Egge J.K., Veldhuis M.J.W. and Westbroek P. 1994. The 1992 Norwegian *Emiliana huxleyi* experiment. An overview. *Sarsia* 79: 285-90.
- Holligan P.M., Viollier M., Harbour D.S., Camus P. and Champagne-Philippe M. 1983. Satellite and ship studies of coccolithophore production along a continental shelf edge. *Nature*, Lond 304: 339-42.
- Holligan P.M., and Groom S.B. 1986. Phytoplankton distributions along the shelf break. *Proc. R. Soc. Edinb., Ser. B* 88: 239-263.
- Holligan P.M., Fernandez E., Aiken J., Balch W.M., Boyd P., Burkill P.H., Finch M., Groom S.B., Malin G., Muller K., Purdie D.A., Robinson C., Trees C.C., Turner S.M. and van der Wal P. 1993a. A biogeochemical study of the coccolithophore, *Emiliana-huxleyi*, in the north-atlantic. *Global Biogeochemical Cycles* 7(4): 879-900.
- Holligan P.M., Groom S.B. and Harbour D.S. 1993b. What controls the distribution of the coccolithophore *Emiliana-huxleyi*, in the North Sea? *Fish. Oceanogr.* 2: 175-83.
- Honjo S. 1976. Coccoliths: production, transportation and sedimentation. *Mar. Micropaleontol.* 1: 65-79.
- Hudson R.J.M. and Morel F.M.M. 1990. Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of medium and cellular coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1001-20.
- Hulburt E.M. 1990. Description of phytoplankton and nutrient in spring in the western North Atlantic Ocean. *J. Plankton Res.* 12: 1-28
- Huskin I., Anadon R., Alvarez-Marquez F. and Harris R.P. 2000. Ingestion, faecal pellet and egg production rates of *Calanus helgolandicus* feeding coccolithophorid diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 248: 239-54.
- Hutchins D.A., Witter A.E., Butler A. and Luther G.W. 1999. Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature* 400: 858-861.
- Iglesias-Rodriguez M.B., Brown C.W., Doney S.C., Kleypas J., Kolper D., Kolber D., Kolber Z., Hayes P.K., Falkowski P.G. 2002. Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: Coccolithophorids. *Global Biogeochemical Cycles* 16(4): 47-1 à 47-20
- Jeffrey S.W. and Wright S.W. 1994. Photosynthetic pigments in the Haptophyta. In *The Haptophyte Algae*. Green J.C. and Leadbeater B.S.C. [Eds]. Oxford, Clarendon Press 51: 111-32.
- Kempe S. and Degens E.T. 1985. An early soda ocean? *Chemical Geology*, 53:95-108
- Kempe S. and Kazmierczak J. 1994. The role of alkalinity in the evolution of ocean chemistry, organization of living systems, and biocalcification processes. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, spécial 13: 61-117.
- Klaveness D. 1972. *Coccolithus huxleyi* (Lohmann) Kampner. I. Morphological investigation on the vegetative cell and the process of coccolith formation. *Protoplastologia* 8: 335-46.
- Kooijman S.A.L.M., Zonneveld C., Riegman R., Stolte W., Slezak D., Noordeloos A.A.M., Gieskes W.W.C., Faber F., van Rijssel M., Westbroek P., Corstjens P.L.A.M. and ter Kuile B. 2001. A model system approach to biological climate forcing: the example of *Emiliana huxleyi*. Project carried out in the framework of the Dutch National Research Programme on Global Air Pollution and Climate Change N° 951204.
- Kuenzler E.J. and Perras J.P. 1965. Phosphatases of marine algae. *Biol. Bull. Mar. Lab. Woods hole* 128: 271-84.
- Lambeck K. and Nakada M. 1990. Late Pleistocene and Holocene sea level change along the Australian coast. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 89 : 143-176.

- Lancelot C. and Mathot S. 1985. Biochemical fractionation of primary production of phytoplankton in Belgian coastal waters during short- and long-term incubations with ^{14}C -bicarbonate. II. *Phaeocystis pouchetti* colonial population. *Mar. Biol.* (Berlin) 86: 227-32.
- Lancelot C., Hannon E., Becquevort S., Veth C. and de Baar H.J.W. 2000. Modelling phytoplankton blooms and carbon export production in the Southern Ocean: dominant controls by light and iron in the Atlantic sector in Austral spring 1992. *Deep-Sea Res. I* 47: 1621-62.
- Landry M.R, Ondrusek M.E., Tanner S.J., Brown S.L., Constantinou J., Bidigare R.R., Coale K.H., Fitzwater S. 2000. Biological response to iron fertilisation in the eastern equatorial Pacific (IronEx II) I. Microplankton community abundances and biomass. *Mar. Ecol. Prog.* 201: 27-42
- Langdon C. 1987. On the cause of interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. Part I. A comparative study of the growth-irradiance relationship of three phytoplankton species: *Skeletonema costatum*, *Olisthodiscus luteus* and *Gonyaulax tamarensis*. *J. Plankton Res.* 9(3): 459-83.
- Langdon C. 2001. Review of Experimental Evidence for Effects of CO_2 on Calcification of Reef Builders. Proceedings of the 9th International Coral Reefs Symposium. Bali, Indonesia.
- Law E.A. and Wong D.C.L. 1978. Studies of carbon and nitrogen metabolism by three marine phytoplankton species in nitrate-limited continuous culture. *J. Phycol.* 14 : 406-416
- Law E.A., Popp B.N., Bidigare R.R., Riebesell U., Burkhardt S. and Wakeham S.G. 2001. Controls on the molecular distribution and carbon isotopic composition of alkenones in certain haptophyte algae. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 2002: 2000GC000057.
- Lecourt M., Muggli L. and Harrison P.J. 1996. Comparison of growth and sinking rate of non-coccolith- and coccolith-forming strains of *Emiliana huxleyi* (prymnesiophyceae) grown under different irradiances and nitrogen. *J. Phycol.* 32: 17-21.
- Leeuwe van M.A., Schrek R., De Baar H.J.W., De Jong J.T.M, and Goeyens L. 1997. Iron enrichment experiments in the Southern Ocean: physiological responses of plankton communities *Deep-sea Research II* 44: 189-207
- Le Quéré C., Harrison S.P., Prentice I.C., Buitenhuis E.T, Aumont O., Bopp L., Claustre H., Da Cunha L.C., Geider R., Giraud X., Klaas C., Kohfeld K.E., Legendre L., Manizza M., Platt T., Rivkin R.B., Sathyendranath S., Uitz J., Watson A.J., Wolf-Gladrow D. 2004. Ecosystem dynamics based on plankton functional types for global ocean biogeochemistry models. *Change Biology* (11): 1-25.
- Linschooten C.H., van Bleijswijk J.D.L., van Emburg P.R., de Vrind J.P.M., Kempers E.S., Westbroek P. and de Vrind-de Jong E.W. 1991. Role of light-dark cycle and medium composition on the production of coccoliths by *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae). *J. Phycol.* 27: 82-6.
- Lohmann H. 1902. Die Coccolithophoridae, eine Monographie der Coccolithen-bildenden Flagellaten, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis Mittelmeerauftriebs. *Arch Protistenk* 1: 89-165.
- Malin G., Turner S.M., Liss P.S., Holligan P.M. and Harbour D.S. 1994. Dimethyl sulfide and dimethylsulphoniopropionate in the Northeast Atlantic during the summer coccolithophore bloom. *Deep-Sea Research.* 40: 1487-508.
- Malin G. et Kirst G.O. 1997. Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role. *J. Phycol.* 33: 889-96.
- Marañón E., Fernandez E., Haris R.P. and Harbour D.S. 1996. Effects of the diatom-*Emiliana huxleyi* succession on photosynthesis, calcification, and carbon metabolism by size-fractionated phytoplankton. *Hydrobiologia* 317: 189-99.

- Marañón E. and Gonzalez N. 1997. Primary production, calcification and macromolecular synthesis in a bloom of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in the North Sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 157: 61-77.
- Margalef R. 1979. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* 1: 493-509
- Margalef R. 1983. *Limnologia*. Ediciones Omega, Barcelona: 1010 pp.
- Martin J.H., Fitzwater S.E and Gordon R.M. 1990 Iron in Antarctic waters. *Nature* 345: 156-158
- Matrai P.A. and Keller M.D. 1993. Dimethyl sulfide in a large-scale coccolithophore bloom in the Gulf of Maine. *Cont. Shelf Res.* 13: 831-43.
- McIntyre A. and Bé W.H. 1967. Modern coccolithophoridae of the Atlantic Ocean I. Placoliths and crytoliths. *Deep-Sea Research.* 14: 561-97.
- Milliman J.D. 1993. Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean: budget of non steady state. *Global Biogeochemical Cycles* 7(4): 927-957.
- Milliman J.D., Troy P.J., Balch W.M., Adams A.K., Li Y-H, Mackenzie F.T. 1999. Biologically mediated dissolution of calcium carbonate above the chemical lysoline? *Deep Sea Res. I* 46 : 1653-1669
- Mitchell-Innes B.A. and Winter A. 1987. Coccolithophores; a major phytoplankton component in mature upwelled waters off the Capes Peninsula, South Africa in March, 1983. *Mar. Biol.* 95: 25-30.
- Mjaaland G. 1956. Some laboratory experiments on the coccolithophorid *Coccolithus huxleyi*. *Oikos* 7: 251-5.
- Moestrup O. 1994. Economic aspects: 'blooms', nuisance species, and toxins. In *The Haptophyte Algae*. Green J.C. and Leadbeater B.S.C. [Eds]. Oxford, Clarendon Press 51: 133-48.
- Moore L.R., Goericke R. and Chisholm S.W. 1995. Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments fluorescence and absorptive properties. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 116: 259-75.
- Moore J.K., Doney S.C., Kleypas J.A., Glover D.M. and Fung I.Y. 2002. An intermediate complexity marine ecosystem model for the global domain. *Deep-Sea Res. II* 49: 403-62.
- Muggli D.L. and Harrison P.J. 1996a. EDTA suppresses the growth of oceanic phytoplankton from the Northeast Subarctic Pacific. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205: 221-7.
- Muggli D.L. and Harrison P.J. 1996b. Effects of nitrogen source on the physiology and metal nutrition of *Emiliana huxleyi* grown under different iron and light conditions. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 130(1-3): 255-67.
- Muggli D.L., Lecourt M. and Harrison P.J. 1996. Effects of iron and nitrogen source on the sinking rate, physiology and metal composition of an oceanic diatom from the subarctic Pacific. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 132: 215-27.
- Muggli D.L. and Harrison P.J. 1997. Effects of iron on two oceanic phytoplankters grown in natural NE subarctic pacific seawater with no artificial chelators present. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 212: 225-37.
- Nanninga H.J. and Tyrrell T. 1996. Importance of light for the formation of algal blooms by *Emiliana huxleyi*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 136(1-3): 195- 203.
- Nejstgaard J.C. 1997. Food web dynamics in flagellate-dominated marine environments. Trophics interactions between haptophytes, calanoid copepods and microzooplankton. Ph.D. Thesis. Department of Fisheries and Marine Biology. University of Bergen, Norway: 116 PP.
- Nejstgaard J.C., Gismervik I. and Solberg P.T. 1997. Feeding and reproduction by *Calanus finmarchicus*, and microzooplankton grazing during mesocosm blooms of diatoms and the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Mar Ecol. Progr. Ser.* 147: 197-217.

- Nelson D.M. and Brand L.E. 1979. Cell division periodicity in 13 species of marine phytoplankton on a light: dark cycle. *J. Phycol.* 15: 67-75.
- Nielsen M.V. 1995. Photosynthesis characteristics of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) exposed to elevated concentration of dissolved inorganic carbon. *J. Phycol.* 31: 715-9.
- Nielsen M.V. 1997. Growth, dark respiration and photosynthetic parameters of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (prymnesiophyceae) acclimated to different day length-irradiance combinations. *J. Phycol.* 33: 818-22.
- Nimer N.A. and Merrett M.J. 1993. Calcification rate in *Emiliana huxleyi* Lohmann in response to light, nitrate and availability of inorganic carbon. *The New Phytologist* 123: 673-7.
- Nimer N.A. and Merrett M.J. 1995. Calcification rate in relation to carbon dioxide release, photosynthetic carbon fixation and oxygen evolution in *Emiliana huxleyi*. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, 14 spécial issue : 37-42.
- Nimer N.A., Dong L.F., Guan Q. and Merret M.J. 1995. Calcification rate, dissolved inorganic carbon utilization and carbonic anhydrase activity in *Emiliana huxleyi*. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, spécial 14,2: 43-9.
- Obata H. and van den Berg C.M.G. 2001. Determination of picomolar levels of iron in seawater using catalytic cathodic stripping voltammetry. *Analytical chemistry* 73(11): 2522-2528
- Okada H. and Honjo S. 1973. The distribution of oceanic coccolithophorids in the Pacific. *Deep-Sea Res.* 20:355-674.
- Paasche E. 1962. Coccolith formation. *Nature* 193: 1094-5.
- Paasche E. 1963. The adaptation of the carbon-14 method for the measurement of coccolith production in *Coccolithus huxleyi*. *Physiologia Plantarum* 16: 186-200.
- Paasche E. 1964. A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid *Coccolithus huxleyi*. *Physiologia Plantarum Supplementum* 3.
- Paasche E. 1967. Marine Plankton algae grown with light-dark cycles. I. *Coccolithus huxleyi*. *Physiologia Plantarum* 20: 946-56.
- Paasche E. 1998. Roles of nitrogen and phosphorus in coccolith formation in *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Eur. J. Phycol.* 33: 33-42.
- Paasche E. 1999. Reduced coccolith calcite production under light-limited growth: a comparative study of three clones of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Phycologia* 38(6): 508-16.
- Paasche E. 2002. A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular référence to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* 40(6): 503-29.
- Paasche E. and Brubak S. 1994. Enhanced calcification in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) under phosphorus limitation. *Phycologia* 33: 324-30.
- Paasche E., Brubak S., Skattebol S., Young J.R. and Green J.C. 1996. Growth and calcification in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) at low salinity. *Phycologia* 35: 394-403.
- Page S., Hipkin C.R. and Flynn K.J. 1999. Interactions between nitrate and ammonium in *Emiliana huxleyi*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 236: 307-19.
- Perry M.J. 1976. Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic water of the central North Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 21(1): 88-100.
- Petit J.R., Jouzel J., Raynaud D., Barkov N.I., Barnola J.-M., Basile I., Bender M., Chappellaz J., Davis M., Delayque G., Delmotte M., Kotlyakov V.M., Legrand M., Lipenkov V.Y., Lorius C., Pépin L., Ritz C., Saltzman E., and Stievenard M. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000

- years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429-436.
- Pienaar R.N. 1994. Ultrastructure and calcification of coccolithophores. In *Coccolithophores*. Winter A. and Siesser W.G. [Eds]. Cambridge, Cambridge university press: 13-37.
- Platt T., Gallegos C.L. and Harrison W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38: 687-701.
- Prentice I.C., Le Quéré C., Buitenhuis E.T., House J.I., Klaas C., and Knorr W. 2004. Biosphere dynamics: questions for Earth system modelling, in *The State of the Planet: Frontiers and Challenges*. Hawkesworth C., Sparks R. [Eds]. in AGU, Monograph.
- Price L.L., Yin K. and Harrison P.J. 1998. Influence of continuous light and L:D cycles on the growth and chemical composition of Prymnesiophyceae including coccolithophores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 223: 223-34.
- Raven J.A. et Johnston A.M. 1991. Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine phytoplankton and their implications for the use of the other resources. *Limnol. Oceanogr.* 36 (8): 1701-1714.
- Rhodes L.L., Peake B.M., Mackenzie A.L. and Marwick S. 1995. Coccolithophores *Gephyrocapsa oceanica* and *Emiliana huxleyi* (prymnesiophyceae = Haptophyceae) in New Zealand's coastal waters: characteristics of blooms and growth in laboratory culture. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 29: 345-57.
- Riebesell U., Zondervan I., Rost B., Tortell P.D., Zeebe R.E. and Morel F.M.M. 2000. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* 407: 364-7.
- Riebesell U., Revill A.T., Holdsworth D.G. and Volkman J.K. 2000b. The effects of varying CO₂ concentration on lipid composition and carbon isotope fractionation in *Emiliana huxleyi*. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 64(24): 4179-92.
- Riegman R., Stolte W. and Noordeloos A.A.M. 1998. A model system approach to biological climate forcing: The example of *Emiliana huxleyi*. Nedelands Instituut voor Onderzoek der Zee report -8.
- Riegman R., Stolte W., Noordeloos A.A.M. and Slezak D. 2000. Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC: 3:1:3:1) activity of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) during the growth under N and P limitation in continuous cultures. *J. Phycol.* 36: 87-96.
- Robertson J.E., Robinson C., Turner D.R., Holligan P., Watson A.J., Boyd P., Fernandez E. and Finch M. 1994. The impact of a coccolithophore bloom on oceanic carbon uptake in the northeast Atlantic during summer 1991. *Deep-Sea Res.* 41(2): 297-314.
- Rue E.L. et Bruland K.W. 1995. Complexation of Iron (III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/adsorptive cathodic stripping voltammetric method.
- Rue E.L. and Bruland K.W. 1997. The role of organic complexation on ambient iron chemistry in the equatorial Pacific Ocean and the response of a mesoscale iron addition experiment. *Limnol. Oceanogr.* 42(5): 901-10.
- Sakshaug E., Johnson G., Andresen K. and Vernet M. 1991. Modeling of light dependent algal photosynthesis and growth: experiments with Barents Sea diatoms *Thalassiosira nordenskioeldii* and *Chaetoceros furcellatus*. *Deep-Sea Res.* 38(4): 415-30.
- Sarthou G., Timmermans K.R., Blain S., Tréguer P. 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of sea research* 53:25-42
- Schofield O., Bidigare R.R. and Prézelin B.B. 1990. Spectral photosynthesis, quantum yield and blue-green light enhancement of productivity rates in the diatom *Chaetoceros*

gracile and the prymnesiophyte *Emiliana huxleyi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 64: 175-86.

Schulz K.G., Zondervan I., Gerringa L.J.A., Timmermans K.R., Veldhuis M.J.W. and Riebesell U. 2004. Effect of trace metal availability on coccolithophorid calcification. *Nature* 430 : 673-676

Sciandra A., Harlay J., Lefèvre D., Lemée R., Rimmel P., Denis M. and Gattuso J.-P. 2003. Response of coccolithophorid *Emiliana huxleyi* to elevated partial pressure of CO₂ under nitrogen limitation. *Marine Ecology Progress Series* 261: 111-122.

Shackleton N. J., Hall M. A., Line J. & Crag, S. 1983. Carbon isotope data in core V19-30 confirm reduced carbon dioxide concentration in the ice age atmosphere. *Nature*. 306 : 319-322.

Sikes C.S. and Wilbur K.M. 1982. Functions of coccolith formation. *Limnol. Oceanogr.* 27: 18-26.

Sikes C.S. and Fabry V.J. 1994. Photosynthesis, CaCO₃ Deposition, Coccolithophorids, and the Global Carbon Cycle. In *Regulation of atmospheric CO₂ and O₂ by photosynthetic carbon metabolism*. Tolbert and Preiss [Eds]. Oxford, Oxford University Press: 217-33.

Simó R. 2001. Production of atmospheric sulfure by oceanic plankton: biogeochemical, ecological and evolutionary links. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 287-94.

Smayda T.J. 1971. Normal and accelerated sinking of phytoplankton in the sea. *Mar. Geol.* 11: 105-22.

Smetacek V.S. 1985. Role of sinking in diatom life history cycle: ecological, evolutionary, and geological significance. *Mar. Biol.* 84: 239-51.

Smetacek, V.S. 2001. EisenEx: International team conducts iron experiment in Southern Ocean. *U.S. JGOFS News* 11(1): 11-4.

Sprengel C., Baumann K.H., Henderiks J., Henrich R., Neuer S. 2002. Modern coccolithophore and carbonate

sedimentation along a productivity gradient in the Canary Islands region: Seasonal export production and surface accumulation rates. *Deep Sea Research I*. 49(17): 3577-3598.

Sunda W.G. and Huntsman S.A. 1995. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine Chemistry* 50: 189-206.

Sunda W.G. and Huntsman S.A. 1995b. Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton: biological and geochemical implications. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1404-17.

Sunda W.G. and Huntsman S.A. 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature* 390: 389-92.

Taylor A.H., Harbour D.S., Harris R.P., Burkhill P.H. and Edwards E.S. 1993. Seasonal succession in the pelagic ecosystem of the North Atlantic and the utilization of nitrogen. *J. Plankton Res.* 15: 875-91.

Thierstein, H.R., Geitzenauer K.R., Molfino B. and Shackleton N.J. 1977. Global synchronicity of late Quaternary coccolith datum levels: validation by oxygen isotopes. *Geology* 5: 400-4.

Thingstad T.F., Skjoldal E.F. and Bohne R.A. 1993. Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, Western Norway. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 99: 239-259

Thompson P.A. and Calvert S.E. 1995. Carbon isotope fractionation by *Emiliana huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.* 40(4): 673-79.

Townsend D.W., Keller M.D., Holligan P.M., Ackleson S.G. and Balch W.M. 1994. Blooms of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* with Respect to Hydrography in the Gulf of Maine. *Cont. Shelf Res.* 14: 979-1000.

Tyrrell T. and Taylor A.H. 1996. A modelling study of *Emiliana huxleyi* in the NE Atlantic. *J. Mar. Syst.* 9(1-2): 83-112.

Varela D.E. and Harrison P.J. 1999. Effect of ammonium on nitrate utilization by *Emiliana huxleyi*, a coccolithophore from the

- oceanic northeastern Pacific. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 196: 67-74.
- Varela D.E. and Harrison P.J. 1999b. Seasonal variability in nitrogenous nutrition of phytoplankton assemblages in the north-eastern subarctic Pacific Ocean. *Deep-Sea Res. II* 46(11-12): 2505-38.
- Veldhuis M.J.W., Admiraal W. and Colijn F. 1986. Chemical and physiological changes of phytoplankton during the spring bloom dominated by *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae): observations in Dutch coastal waters of the North Sea. *Neth.J. Sea Res.* 20: 49-60.
- Veldhuis M.J.W., Colijn F. and Admiraal W. 1991. Phosphate utilization in *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae). *Mar. Ecol.* 12: 53-62.
- Veldhuis M.J.W., Stoll M., Bakker D., Brummer G.-J., Kraak M., Kop A., van Weerlee E., van Koutik A. and Riddervold B. 1994. Calcifying phytoplankton in Bjornafjorden, Norway. The prebloom situation. *Sarsia* 79: 389-99.
- Veldhuis M.J.W. et van de Baar H.J.W. 2005. Iron resources and oceanic nutrients: advancement of global environment simulations. *Journal of sea research* 53: 1-6
- Veldhuis M.J.W., Timmermans K.R., Croot P., and van der Wagt B. 2005. Picophytoplankton; a comparative study of their biochemical composition and photosynthetic properties. *Journal of sea research* 53: 7-24
- Velkamp C.J., Chubb J.C., Birch S.P. and Eaton J.W. 1994. A simple freeze dehydration method for studying epiphytic and epizotic communities using the scanning electron microscope. *Hydrobiologia* 288: 33-38
- Vring-de Jong E.W. de, van Emburg P.R. and de Vrind J.P.M. 1994. Mechanisms of calcification: *Emiliania huxleyi* as a model system. In *The Haptophyte Algae*. Green J.C. and Leadbeater B.S.C. [Eds]. Oxford, Clarendon Press 51: 149-66.
- Wagner F., Falkner R. and Falkner G. 1995. Information about previous phosphate fluctuations is stored via an adaptive response of the high-affinity phosphate uptake system of the cyanobacterium. *Anacystis nidulans*. *Planta* 197: 147-155.
- Wal P. van der, van Bleijswijk J.D.L. and Egge J.K. 1994. Primary production and calcification rate in blooms of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay and Mohler developing in mesocosms. *Sarsia* 79: 401-8.
- Wal P. van der, Kempers R.S. and Veldhuis M.J.W. 1995. Production and downward flux of organic matter and calcite in a North Sea bloom of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Mar Ecol. Progr. Ser.* 126: 247-65.
- Watabe N. and Wilbur K.M. 1966. Effects of temperature in growth, calcification and coccolith form in *Coccolithus huxleyi* (Coccolithineae). *Limnol. Oceanogr.* 11: 567-75.
- Watson A.J., Bakker D.C.E., Ridgwell A.J., Boyd P.W., Law C.S. 2000. Effect of iron supply on Southern Ocean CO₂ uptake and implications for glacial CO₂. *Nature* 407: 730-733
- Westbroek P., de Jong E. W., van der Wal P., Borman T., de Vrind J.P.M., Kok D., de Bruijn W.C. and Parker S.B. 1984. Mechanisms of calcification in the marine alga *Emiliania huxleyi*. *Phil. Trans. Royal Soc. (London B)* 304: 435-44.
- Westbroek P., Brown C.W., van Bleijswijk J., Brownlee C., Brummer G., Conte M, Egge J., Fernandez E., Jordan R., Knappertsbush M., Stefels J., Veldhuis M., van der Wal P. and Young J. 1993. A model system approach to biological climate forcing. The example of *Emiliania huxleyi*. *Global Planetary Change* 8: 27-46.
- Westbroek P., van Hinte J.E., Brummer G.-J., Veldhuis M., Brownlee C., Green J.C., Harris R. and Heimdal B.R. 1994a. *Emiliania huxleyi* as a key to biosphere-geosphere interactions. In *The Haptophyte Algae*. Green J.C. and Leadbeater B.S.C. [Eds]. Oxford, Clarendon Press 51: 322-34.

- Westbroek P., Buddemeier B., Coleman M., Kok D.J., Fautin D. and Stal L. 1994b. Strategies for the study of climate forcing by calcification. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, spécial 13: 37-60.
- Winter A. and Siesser W.G. [Eds]. 1994. Coccolithophores. Cambridge, Cambridge university press: 242pp.
- Winter A., Jordan R.W. and Roth P.H. 1994. Biogeography of living coccolithophores in ocean waters. In *Coccolithophores*. Winter A. and Siesser W.G. [Eds]. Cambridge, Cambridge university press: 161-77.
- Wollast R. 1994. The relative importance of biomineralization and dissolution of CaCO_3 in the global carbon cycle. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, spécial 13: 13-35.
- Young J.R. 1994a. Function of coccoliths. In *Coccolithophores*. Winter A. and Siesser W.G. [Eds]. Cambridge, Cambridge university press: 63-82.
- Young J.R. 1994b. Variation in *Emiliana huxleyi* coccolith morphology in samples from the Norwegian EHUX experiment, 1992. *Sarsia* 79: 417-25.
- Ziveri P. and Broerse A. 1997. Coccolithophores in traps: global coccolith flux data. Seventh international Global *Emiliana huxleyi* Modelling Initiative (GEM VII) workshop report.
- Ziveri P., Thunell R.C. and Rio D. 1995. Export production of coccolithophores in an upwelling region: Results from San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Mar. Micropaleontol.* 24: 335-58.
- Zondervan I. 2001. Influence of carbonate chemistry and other environmental factors on the chemical and isotopic composition of coccolithophores, with emphasis on calcification and photosynthetic carbon fixation. Ph.D. Thesis. University of Bremen, Germany: 170 pp.
- Zondervan I., Zeebe R. E., Rost B. and Riebesell U. 2001. Decreasing marine biogenic calcification: A negative feedback on rising atmospheric pCO_2 . *Global Biogeochemical Cycles* 15(2): 507-516.
- Zondervan I., Rost B. and Riebesell U. 2002. Effect of CO_2 concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 272: 55-70.

Liste des tableaux

Table 1.1: Kinetic parameters	44
Table 1.2: Photosynthetic parameters	47
Table 1.3: Size and inorganic carbon content of the cell.....	51
Table 1.4: Respiration rate	54
Table 1.5: Grazing rate	55
Table 1.6: Sinking rate	57
Table 1.7 : Equation and advice for the SWAMCO model.	64
Tableau 2.1 : Spéciation du fer	91
Tableau 2.2 : Quantité de Carbone organique et inorganique dans les différentes conditions d'ajout de fer.....	105
Tableau 3.1 : Carbone particulaire organique et inorganique dans les différentes conditions de NO ₃	144
Tableau 3.2 : Comparatif des données de PIC des résultats en batchs et en chemostat.	149
Tableau 4.1 : Surface des régions océaniques concernées par un bloom particulier.....	178
Tableau 4.2 : tableau de la niche	185
Tableau 4.3 : Validation de la niche des signaux visibles par zones.	194

Liste de figures

Figure 0.1 : Bilan global du carbone.	10
Figure 0.2 : Modèle conceptuel Glaciaire-Interglaciaire	11
Figure 0.3 : Distribution du CaCO ₃ dans les sédiments, par un modèle et par les satellites	13
Figure 0.4 : Réduction de la calcification à l'augmentation de CO ₂	17
Figure 0.5 : Photos d' <i>Emiliana huxleyi</i>	20
Figure 0.6 : Corrélation entre bloom d'E. huxleyi et apports de fer.....	25
Figure 1.1 : Biogeography and blooms of coccolithophorids.....	33
Figure 1.2 : Quotas in Ehux with light	40
Figure 1.3 : Growth with temperature.....	42
Figure 1.4 : Photosynthésis (P), Calcification (C) and C/P ratio with light.....	49
Figure 2.1 : Conditions d'incubations.....	80
Figure 2.2: Stratégie de l'échantillonnage et des mesures ainsi que le nombre d'échantillons mesurés par paramètre.	81

Figure 2.3 : Echantillonnage, filtration et analyses effectués sur les réplicats.	83
Figure 2.4 : Spéciation de fer pour les différentes conditions d'ajout de fer.....	92
Figure 2.5 : Apparition et disparition de fer	95
Figure 2.6 : Population et croissance des cellules dans les différentes conditions d'ajout de fer.	97
Figure 2.7 : Population et processus de détachement des coccolithes dans les différentes conditions de fer.....	101
Figure 2.8 : Photos de coccopshères au microscope électronique.	108
Figure 2.9 : Relations entre spéciation de fer et ligands organiques	111
Figure 2.10 : Effets de la spéciation de fer sur la population et la croissance des cellules.....	116
Figure 2.11 : Effets de la spéciation de fer sur la population et le détachement des coccolithes.	118
Figure 2.12 : Relation du réservoir inorganique avec le fer inorganique et couplage avec la croissance.	120
Figure 2.13 : Relation de couplage du réservoir inorganique avec la croissance	122
Figure 2.14 : Dynamique du bloom de coccolithes.....	124
Figure 3.1 : Population et croissance des cellules dans les différentes conditions de NO ₃	135
Figure 3.2 : Aspect des coccosphères au microscope électronique dans les différentes conditions de NO ₃	137
Figure 3.3 : Population et processus de détachement de coccolithes dans les différentes conditions de NO ₃	139
Figure 3.4 : Paramètres liés au détachement des coccolithes dans les différentes conditions de NO ₃	141
Figure 3.5 : Relation entre paramètres inorganiques et organiques.....	156
Figure 4.1 : Validation de la niche des blooms visibles par satellite	177
Figure 4.2 : Relations physiologiques supplémentaires pour la niche	182
Figure 4.3 : Diagramme de Margalef et de la niche des blooms visibles.....	189

Liste des sigles

μ : Le taux de croissance journalière

C/P ratio : rapport calcification sur photosynthèse

CA : Carbonite Anhydrase

C-cell : Cellule calcifiante

Cells : Cellules

Chlo/CV : The Chlo by cell volume

CV : The coccosphere volume

CZCS : Coastal Zone Color Scanner (satellite)

DIC : Dissolved Inorganic Carbon

DL, TL : Daily light

DMS : Diméthylsulfide

DMSP : Diméthylsulfide production

DOC : Dissolved Organic Carbon

D : Le taux de détachement des coccolithes libres

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid

Fe' : Le fer inorganique

Fed : Le fer total dissous

g : The gravity acceleration

HNHC : High Nutrients High Chlorophyll

HNLC : High Nutrients Low Chlorophyll

IPCC : The Intergovernmental Panel on Climate Change

IPSL : L'Institut Pierre-Simon Laplace

IRONAGES : Iron Resources and Oceanic Nutrients - Advancement of Global Environment Simulations

L : Organic Ligands concentration

n : The seawater viscosity coefficient

N-cell : Cellule nue

PFD : Photon Flux Density

PFe : Particulate Iron

PIC : Particulate Inorganic Carbon

pK_{FeL} : Constante de complexation entre les formes inorganique et organique de fer.

POC : Particulate Organic Carbon

PON : Particulate Organic Nitrogen

rc : The cell density

rsw : The seawater density

R : Le taux de renouvellement du stock de coccolithes libres

S-cell : Cellule flagellée

SeaWiFS : The Sea-viewing Wide Field-of-view Sensor (project)

SEM : Scanning Electron Microscopy

SR : Sinking Rate

SWAMCO : Sea Water Microbial Community model

TEP : transparent exopolymer particles

TPC : Total Particulate Carbon

VLP : Virus-Like Particles

WOA : World Ocean Atlas

Tables des matières

REMERCIEMENTS	3
PLAN DE LA THESE	7
INTRODUCTION GENERALE	9
I. DE L'IMPORTANCE DU CaCO_3	9
A. <i>Le CaCO_3, acteur majeur du façonnage de notre planète</i>	9
B. <i>Le rôle du CaCO_3 océanique dans le climat</i>	10
C. <i>Bilan et distribution du CaCO_3 dans l'océan</i>	12
D. <i>La biocalcification, un processus océanique associé à divers organismes</i>	14
II. LES COCCOLITHOPHORIDES	15
A. <i>Importance des coccolithophoridés</i>	15
B. <i>Contribution des coccolithophoridés au bilan de CaCO_3</i>	17
III. <i>EMILIANIA HUXLEYI : UN COCCOLITHOPHORIDÉ MODÈLE</i>	19
A. <i>De l'importance d'<i>Emiliana huxleyi</i> ?</i>	19
B. <i>La distribution d'<i>Emiliana huxleyi</i></i>	21
OBJECTIF GENERAL : COMPRENDRE OU, POURQUOI ET COMMENT LA MER DEVIENT BLANCHE ?	26
STRATEGIE	27
CHAPITRE 1 : QUI EST <i>EMILIANIA HUXLEYI</i> ? SA STRATÉGIE DE VIE	31
"WHO" IS <i>EMILIANIA HUXLEYI</i> ? FROM A DATA SYNTHESIS TO A GROWTH QUOTA MODEL	31
ABSTRACT	31
INTRODUCTION : WHY INCLUDE <i>EMILIANIA HUXLEYI</i> IN AN ECOSYSTEM MODEL?	31
I. <i>EMILIANIA HUXLEYI</i> IN THE DIFFERENT OCEANS (GLOBAL AND BLOOMS DISTRIBUTION)	36
II. DATA DESCRIPTION	38
A. <i>Organic biomasses and quotas: a small species</i>	38
B. <i>Growth : an example of adaptation</i>	42
C. <i>Nutrient Kinetic: econome of rich areas</i>	43
D. <i>Photosynthesis and calcification: animator of the oceanic carbon</i>	46
E. <i>Inorganic quota: generous to give coccolith</i>	50
F. <i>Looses mainly at the end of the bloom</i>	53
III. MODEL CONSIDERATION	59
A. <i>Are the experimental datas adapted to constrain a growth model for <i>E. huxleyi</i> at the cell level? And new criteria</i>	59
B. <i>Model parametrisation: model SWAMCO parametrisation</i>	62
C. <i>Summarising of the growth and bloom strategy</i>	68
CONCLUSION	71
A. <i>strategy of growth and bloom</i>	71
B. <i>model and paramétrisation</i>	71
C. <i>experimental perspectives</i>	72
CHAPITRE 2 : ROLE DES APPORTS EN FER SUR LES BLOOMS D' <i>EMILIANIA HUXLEYI</i>	75
INTRODUCTION	75
A. <i>Pourquoi étudier le rôle du fer dans la croissance et dans la formation des blooms d'<i>E. huxleyi</i> ?</i>	75
B. <i>Questions spécifiques posées sur le rôle de la spéciation de fer pour <i>E. huxleyi</i></i>	77
C. <i>Objectifs et stratégie générale</i>	78
I. STRATEGIE	79
A. <i>Description de l'approche expérimentale et justification</i>	81
B. <i>Matériel et milieu de culture</i>	85
C. <i>Techniques de prélèvements et d'analyses</i>	87
II. RESULTATS	91
A. <i>Effet des ajouts sur la spéciation de fer et la production de ligands</i>	91

B. Effets des ajouts sur la production de cellules et de coccolithes.....	95
C. Effets des ajouts sur l'évolution dans le temps des quantités de Carbone et de la taille	104
III. DISCUSSION	109
A. Stratégie de production de ligands par <i>E. huxleyi</i> et effet de rétroaction des cellules sur la spéciation du fer (Fig. 2.9).....	110
B. Stratégie du bloom et effet de la spéciation de fer sur les parties organiques et inorganiques d' <i>E. huxleyi</i>	114
C. Couplage entre réservoir inorganique et organique.....	120
CONCLUSION	124
CHAPITRE 3 : LA DEPLETION DE NO₃, UN FACTEUR D'APPARITION DE BLOOMS VISIBLES PAR SATELLITE.....	129
INTRODUCTION	129
I. STRATEGIE.....	131
A. Justifications des expériences d'ajouts de NO ₃	131
B. Techniques analytiques	132
II. RESULTATS	134
A. Évolution de la cellule pour différents ajouts de NO ₃	134
B. Évolution de coccolithes pour différents ajouts de NO ₃	137
C. Évolution pour différents ajouts du Carbone Total, Carbone Organique et Carbone Inorganique (Tab. 3.1)	142
III. DISCUSSION	145
A. Les faibles NO ₃ inhibent le bloom de population.....	145
B. Bloom visible ou forte production de coccolithes libres.....	152
C. Production de PIC et influence du NO ₃	163
CONCLUSION	167
CHAPITRE 4 : QU'EST-CE QU'UN BLOOM VISIBLE ET COMMENT LES PREVOIR ?	173
POURQUOI LA MER DEVIENT BLANCHE ? LES IMAGES SATELLITALES D' <i>EMILIANA HUXLEYI</i> CONNUS COMME DES BLOOMS SIGNIFIERAIENT LA MORT	173
ABSTRACT	173
INTRODUCTION	174
I. LA DISTRIBUTION GLOBALE D' <i>EMILIANA HUXLEYI</i> PAR IMAGERIE SATELLITALE SEAWIFS (FIG. 4.1A ; TAB. 4.1).....	176
II. DEFINITION D'UNE NICHE ECOLOGIQUE DES SIGNAUX VISIBLES PAR SATELLITE.....	181
A. Critères de visibilité des blooms de surface détectés en surface par les satellites (Fig. 4.2a, Tab. 4.2)	181
B. Définition de la niche écologique d' <i>E. huxleyi</i> à partir de critères physiologiques (Fig. 4.2b,c ; Tab. 4.2 ; Fig. 4.3).....	184
III. VALIDATION : LA NICHE ECOLOGIQUE POURRAIT EXPLIQUER LA DISTRIBUTION DES BLOOMS D' <i>E. HUXLEYI</i>	190
A. La distribution globale fournie par SeaWiFS est expliquée par la niche de bloom visible, (Fig. 4.1 et Tab. 4.3)	190
B. Distribution à la méso-échelle : la niche proposée explique des blooms régionaux visibles en surface	191
CONCLUSION	196
REFERENCES	199
LISTE DES TABLEAUX	213
LISTE DE FIGURES	213
LISTE DES SIGLES	215
TABLES DES MATIERES	216
ANNEXE : DETERMINATION OF IRON SPECIATION BY AN AUTOMATIC CATHODIC STRIPPING VOLTAMETRY SYSTEM USING THE COMPETING LIGAND 2,3 DIHYDROXYNAPHTHALENE (DHN)	219
Introduction	219
Methods	220

Annexe : Determination of Iron Speciation by an Automatic Cathodic Stripping Voltametry System Using the Competing Ligand 2,3 dihydroxynaphthalene (DHN)

Introduction

The most accurate way to measure iron speciation in seawater is based on a titration by TAC using CSV-CLE method. Because this method still need a lot of seawater for the titration and cannot measure iron speciation in some seawater with iron particularly low, we propose a new method to determine iron speciation in sea water. This method is based on the CSV-CLE method using the compound which has shown the best sensitivity against iron (DHN). This method allows for the first time to determine the Fe-DHN stability constant and we are able to do a titration in a small unique aliquot of 20 mL with this compound by an automatic titration system by simple addition.

In order to measure the properties of the organic and inorganic iron in the culture seawater an adapted method is needed. This method should be i) very sensitive to measure iron at very low concentration (below 0.1 nM); ii) able to separate the different iron forms (Fe organically bound, inorganic dissolved and colloidal); iii) working with a very few treatment (changing the pH, passage through a resin,...) perturbing the equilibrium between the different iron forms iv) working with a minimum of contamination (metal, organic material) during the manipulation of samples changing the iron speciation.

The most usual methods to work in these condition is the method Cathodic Stripping Voltametry (CSV) with a titration by Competitive Ligand Equilibration (CLE method). This method had been used with success by different teams with different competitive ligand like: catechol (van den Berg and Huang, 1984), 1N2N 1-nitroso-2-naphtol (van den Berg et al. 1991), solochrome violet RS (Jagner et al. 1993), PAR 4-(2-pyridylazo)resorcinol (Wang et al. 1994), SA salicyladoxime (Rue and Bruland, 1995), *N*-benzoyl-*N*-phenylhydroxylamine (Lu et al. 1995), benzohydroxamic acid (Lu et al. 1995) and TAC 2-(2-thiazolylalo)-4-methylphenol (Croot and Johansson, 2000). The last remains the best before the present study.

The compound 2,3-dihydroxy-naphthalene (DHN) had shown a very good sensitivity for the total dissolved iron determined by CSV (3.5 fold than with TAC; Obata and van den Berg, 2001) but had not been set up with success for the iron speciation determination. With this setting up, the iron speciation could wins in sensitivity and also in limit detection for the iron concentration. The problem of this compound for the CLE could be due to the too long time it stays in presence of O₂ or light (see Amat-Guerri et al. 1998).

The purpose of the present study is to propose an other methodology keeping the advantage of the CSV-CLE approach but adapted for DHN. We will show that is possible by keeping the sample at very low O₂ during the equilibration. For this, we set up a installation to do the whole titration in a same small aliquot (15ml) without any contact with the O₂ ambient air. In addition to this we did the titration in a precise way by using an automatic burette driven by computer.

Methods

Apparatus and Computer

The voltammetric experiments were carried out using a μ autolab voltammeter (Ecochemie) connected to a hanging mercury drop electrode (HMDE, Metrohm model 663 VA). The reference electrode was double junction, Ag/AgCl, saturated with a salt bridge filled with 3 M KCl, and the counter electrode was a glassy carbon rod. Solution in the quartz voltammetric cell were stirred by a rotating Teflon (PTFE) rod. An automatic burette and its pipes were cleaned successively by EDTA (10^{-2} M), diluted hydrochloric acid (HCl 10^{-2} M) and Milli-Q water (MQ). The burette was hermetically connected to the cell by PTFE pipes. The potentiostat and the burette were computer controlled using a compiled Windows program (GPES 3.4 from Ecochemie).

Reagents (KBrO₃, POPSO, EDTA and Fe standard) and seawater samples before measurement were stored in polycarbonate tubs. MQ, HCL, DHN and seawater after sampling were stored in high density polyethylene (HDPE) containers cleaned by soaking 1 week in free-phosphate bath, followed by 1 week in 50% HCl, 1 week in 1% HCl, rinsed with MQ and filled by 0.1% HCl until used.

The electrode stand was situated under a laminar-flow clean hood with filtered air where sample manipulation and reagents were also carried out.

Reagents (KBrO₃, POPSO, DHN, Fe standard)

Water was purified by reverse osmosis using a Milli-RO system followed by deionisation using a milli-Q system. HCl, nitric acid (HNO₃), ammonia (NH₄OH) and MeOH were further purified by isothermal distillation.

The way to clean KBrO₃, POPSO and DHN is two successive recrystallisations. KBrO₃ is diluted in a minimum of very hot MQ, acidified by a few drops of concentrated HNO₃, stored in fridge and the day after the acidified water is removed. After two of this recrystallisation KBrO₃ is filtrated by pumping, rinsed 2 or 3 times by MQ till Ph~5 and dry in a dessicator. POPSO follows the same protocol but is dissolved in 2M very hot HCl. DHN is dissolved in a minimum of MeOH and 0.2M of very hot HCl (10 times the volume of MeOH) is added. Purified DHN is not rinsed but only dried in a dessicator.

A 0.4 M stock solution of KBrO₃ was prepared in MQ. A 0.7 M stock solution of POPSO was prepared in MQ and concentrated NH₄OH until dissolution of the precipitated (pH~8) is added. A 0.1 M stock solution of DHN is prepared in MeOH and stored in fridge when not used. A 0.1 mM stock solution of Fe^{III} from a BDH standard solution for atomic adsorption spectrometry in 0.05 M HCl. Fe standard from the stock solution were prepared by dilution with 0.05 M HCl.

Samples

Seawater used for the development of this method has been 0.2 μ m filtrated (Nucleopore) from Atlantic Ocean and stored in a dark container till use. A 0.2 μ m filtrated seawater from the bottom (FeD=0.1 nM) and the surface (FeD=1 nM) of the station P has also been used, stored in small containers and frozen until the measurement. Other samples from North Atlantic surface water were used for the calibration of the method. The results shown are iron speciation from the samples of the chapter 2 where addition of iron were performed at the beginning of the incubation (see chapter 2, §I).

Titration of the Fe Binding Ligands in Culture Seawater

An aliquot of 20 mL of culture seawater was pipetted into the quartz cell. A 200 μL aliquot of POPSO (final pH 8), 1 mL of KBrO_3 were added and 10-20 μL of DHN was added (final concentration 1-10 μM). The burette pipe is connected to the cell hermetically and the solution was deaerated by purging for 5 minutes with water-saturated nitrogen gas and stirring in the same time. The procedure used for all the scan measurement is a purge of 30 seconds, followed by a deposition time of 120 seconds at -0.1 V with stirring on a new mercury drop, a relaxing time of 8 seconds and a scan from -0.1 V to -0.8 V using sample DC mode at 24 mV.s^{-1} and 2.4 mV potential step at 10 Hz. A project is edited on GPES 3.4 for the titration to do 11 additions during all the day and the night. The project consists in 3 scans, followed by a delay period of 2 hours for the equilibration of the DHN with Fe^{III} , and 5 other scans. An Iron addition (few μL to add 1 nM for the first addition of the project and 2.5 nM for the 10 others) by the automatic burette is done and the project starts again by the 3 scans of the beginning. The titration end at a final Fe^{III} added concentration of 20 nM.

Determination of alfa FeDHN

To determine the stability constants of FeDHN_n , we performed a titration by EDTA at different concentration of DHN (1, 3, 10 μM) with 10nM of Fe added.

Review of the Obata article.

Obata and van den Berg have studied the behaviour of FeDHN in cyclic voltametry at different scan rate (with and without bromate) and during measurement of total labile Iron with different oxidant, deposit potentials, pH, DHN concentration, absorption time and in presence of numerous metals in excess. The DHN is stable several weeks in MeOH solution and there is no discoloration inside the cell during the measurement showing a relative stability in presence of BrO_3 . There is no interference with other metals tested (Cu, V, Pb, Sb, Co, Al, Cd, Mn, Mo, Ni and Zn). The optimal pH of Fe DHN detection should be around 7.9. KBrO_3 is better than H_2O_2 as a oxidant and greatly improved the sensitivity ($\times 290$), but contamination can happen due too the relative high volume of solution to add. The current is saturated for DHN between 5 and 40 μM . About the mechanism: the $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{DHN})_n]$ complex could be negatively charged and absorbed on the mercury drop in view of the decrease of the current peak when the depositing potential is more negative ($< -0.2 \text{ V}$); the peak current is controlled by the diffusion of KBrO_3 to the electrode at scans rate $< 50 \text{ mV.s}^{-1}$; the reduction of the complex is a irreversible reaction and the $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{DHN})_n]$ is desorption and keep away from the electrode but stay complexed ; the reoxidation by BrO_3 and the reabsorption on the electrode is rapid. The reduction happen around -0.6 V.

The scans we performed is exactly the same but the deposit time was shorter because the resolution was high enough. We use POPSO instead of HEPPS but it is a proper compounds to buffer the solution because it can buffer at pH 8 and does not interfere in the scan range.

Calibration of DHN

The reduction current during the EDTA titration of natural seawater (north Atlantic) with 3 different DHN concentration is shown **Figure 1a** and the complex structure (FeDHN_2) and the stability constant obtain from these titration is 18.2.

Determination of iron complexing ligands in seawater

Preliminary results of the conditional stability constant of the Fe-natural ligand complex ($K_{Fe'L}$) and the natural ligand concentration (L) by CSV-CLE method using DHN are obtain by using seawater from North Pacific. The current resulting from scans of the titration is shown **figure 1b** and reported in function of the total Fe concentration (**figure 2, blue dots**). $K_{Fe'L}$ and L are calculated from the intercept and slope of the Fe_{labile}/Fe_L versus Fe_{labile} plot (**figure 2, red lines**) as in Gledhill and van den Berg, 1994).

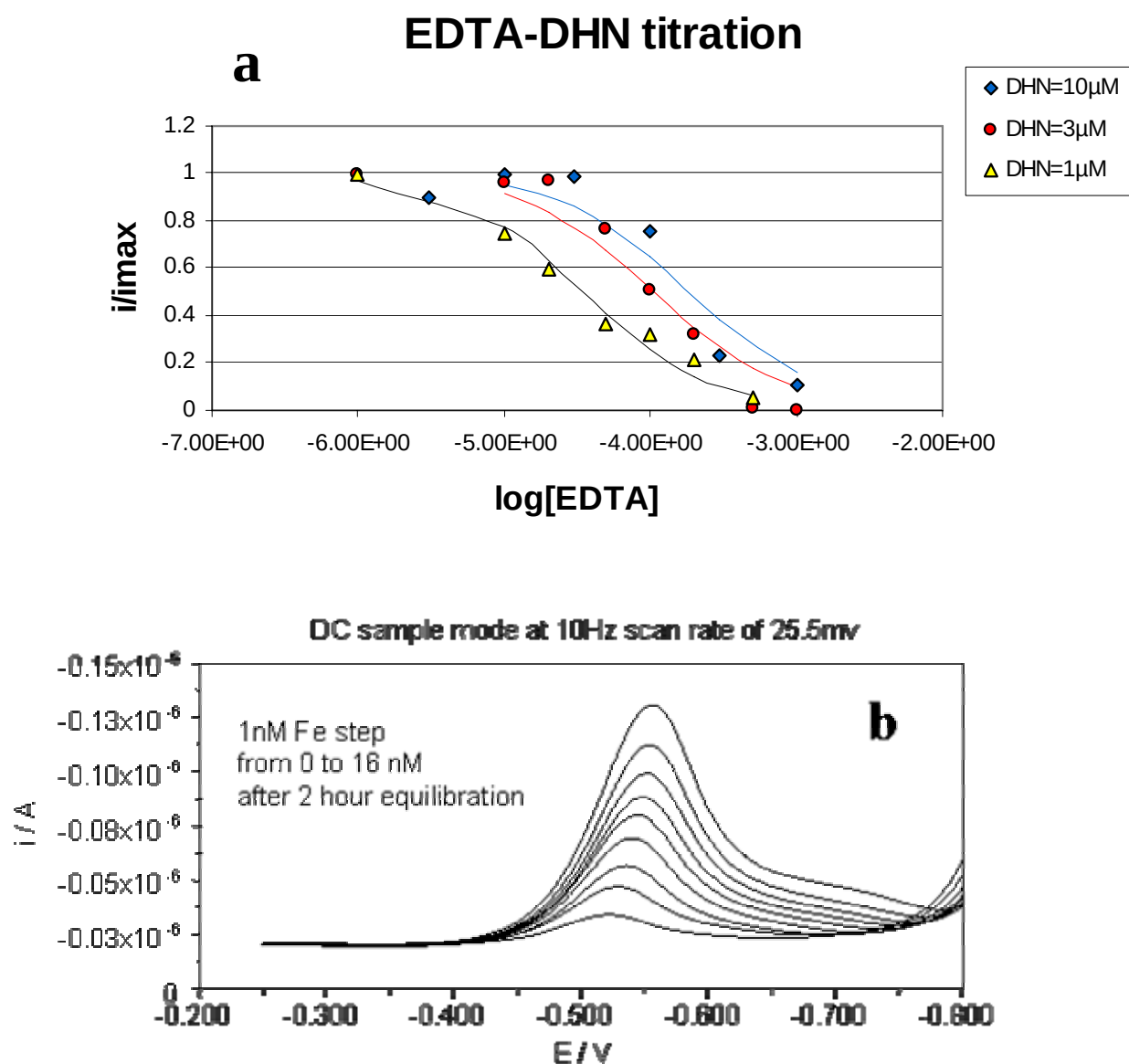


Figure 1: (a) EDTA titration with 3 different concentration of DHN which permit to calculate a $\log (Fe^{3+}DHN)$ of 18.2. (b) shape of the peak intensity at after successive 2 nM addition after 2 hours equilibration

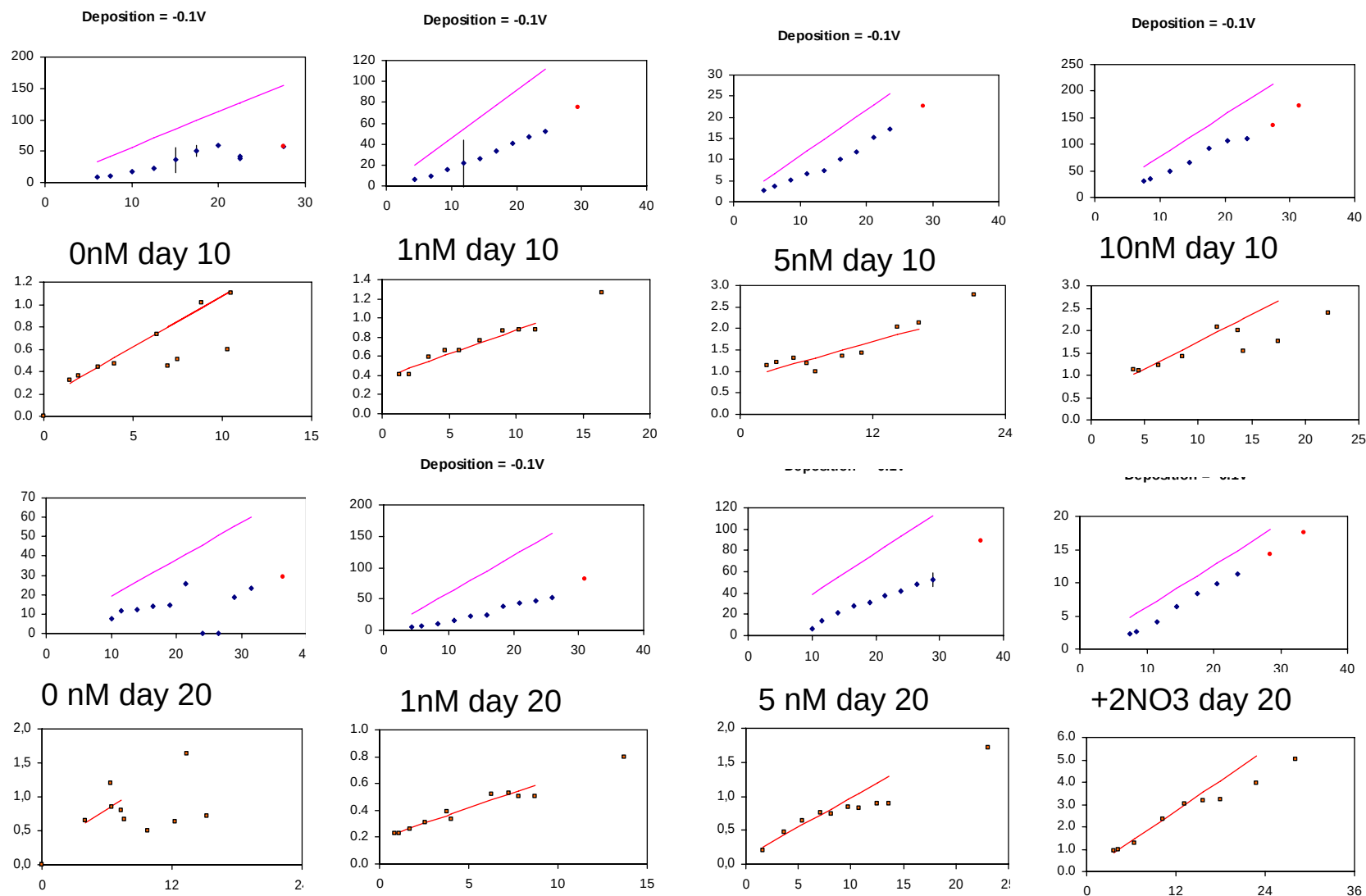


Figure 2 : peaks height of the titration (blue dots) in relation with the Fed during the titration and just below (red line) : the linearisation for the samples as following : 0 (no addition) to +10 nM (high) of Iron added at the beginning of the culture (cf. Chp. 2, Tab. 2.1, to see the L and pKFeL result).

Reference

- Amat-Guerri F., M. Carrascoso, M. Luiz, A.T. Soltermann, A. Biasutti and N.A. Garcia. 1998. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 113, p. 221.
- van den Berg C.M.G. and Z.Q. Huang. 1984. *J. Electroanal. Chem.* 177, p.269
- van den Berg C.M.G., M. Nimmo, O. Abollino and E. Mentasti. 1991. *Electroanalysis* 3, p.477.
- Croot P.L. and M. Johansson. 2000. *Electroanalysis* 12(8), p.565.
- Hudson R.J.M., Covault D.M. and Morel F.M.M. 1992. *Marine Chemistry* 38, p.209.
- Jagner D., L. Renman and S.H. Stefansdottir. 1993. *Anal. Chim. Acta* 281, p. 305.
- Kuma K., J. Nishioka and K.Matsunaga. 1996. *Limnol. Oceanogr.* 41, p. 396.
- Lu J., J. Wang and C. Yarmizky. 1995. *Electroanalysis* 7, p.79.
- Millero F.J., S. Sotolongo and M. Izaguirre. 1987. *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, p.793.
- Obata H. and C.M.G. van den Berg. 2001. *Anal. Chem.* 73, p.2522.
- Rue E.L. and K.W. Bruland. 1995. *Marine Chemistry* 50, p.117.
- Wang L., C. Ma, X. Zhang and J. Wang. 1994. *Anal. Lett.* 27, p.1165.
- Witter A.E., D.A. Hutchins, A. Butler, G.W. Luther III. 2000. *Marine Chemistry* 69, p. 117.