



HAL
open science

**Cycle biologique et stratégies de développement chez les
coccolithophores (Prymnesiophyceae, Haptophyta).
Implications écologiques**

Aude Houdan

► **To cite this version:**

Aude Houdan. Cycle biologique et stratégies de développement chez les coccolithophores (Prymnesiophyceae, Haptophyta). Implications écologiques. Interactions entre organismes. Université de Caen, 2003. Français. NNT: . tel-00009000

HAL Id: tel-00009000

<https://theses.hal.science/tel-00009000>

Submitted on 12 Apr 2005

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 de Caen Basse-Normandie
Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée
Ecole Doctorale Chimie-Biologie Caen-Rouen

THESE
Présentée par
Melle Aude HOUDAN

Soutenue le 19 décembre 2003

En vue de l'obtention du
DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN
SPECIALITE : Physiologie, Biologie des organismes, Populations, Interactions.
(arrêté du 25 avril 2002)



**CYCLE BIOLOGIQUE ET STRATEGIES DE
DEVELOPPEMENT CHEZ LES COCCOLITHOPHORES
(PRYMNESIOPHYCEAE, HAPTOPHYTA).
IMPLICATIONS ECOLOGIQUES**

MEMBRES du JURY :

Mme Chantal Billard, Pr, Université de Caen *(directeur de thèse)*
Mr Daniel Vaultot, D.R. CNRS, UMR 7127, Roscoff *(rapporteur)*
Mr Jeremy R. Young, Dr., Natural History Museum, Londres *(rapporteur)*
Mme Marie-Josèphe Chrétiennot-Dinet, C.R. CNRS, UMR 7621 Banyuls/Mer
Mr Michel Matthieu, Pr, Université de Caen
Mr Christophe Destombe, M.C.F. H.D.R., UMR 7127, Paris VI



Et voilà, après trois, presque quatre ans, d'efforts, d'enthousiasme, de surprises bonnes ou mauvaises, la dernière étape est bien engagée !!! Tout au long de ces années plusieurs personnes ont eu une influence, un rôle majeur dans ce projet...et je tiens particulièrement à les remercier.

La première d'entre elle, le Professeur **Chantal Billard**, a accepté de me faire confiance depuis le début de mon DEA. Je la remercie de m'avoir intégrée à son équipe et d'avoir su, au cours des ans, me communiquer sa passion pour l'univers extraordinaire des microalgues ... et des coccolithophores, en particulier...

Evidemment, je ne peux pas oublier **Ian Probert**, qui m'a apporté ses idées, son soutien et son expérience, sur la culture et la systématique des coccolithophores. Je tiens également à le remercier de m'avoir « trimballée » de workshops en congrès, sans jamais trop s'énerver devant ma difficulté à assimiler sa langue maternelle...

Merci également aux différents membres du jury : le Professeur **Daniel Vaultot** et **Jeremy R. Young** qui ont accepté d'être les deux rapporteurs de ce travail. Merci aussi à **Marie Josèphe Chrétiennot-Dinet**, **Christophe Destombe** et **Michel Mathieu** d'être examinateurs de cette thèse.

Je tiens à remercier aussi l'Agence de l'Eau Seine-Normandie et le Conseil Régional de Basse-Normandie pour leur soutien financier.

Un grand merci également à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à ce projet : **Jacqueline Fresnel** pour ses conseils, **Didier Goux** pour la microscopie électronique, **Benoît Véron** pour ses avis et recommandations, **Fabrice Not** et **Dominique Marie** pour nous avoir accueilli et aidé avec la cytométrie en flux et la ploïdie, **Sébastien Lefebvre** pour son aide avec l'oxymétrie et sa ténacité devant des algues légèrement récalcitrantes... **Kees Van Lenning** pour son habileté à l'HPLC, **Céline Zatylny** pour ses judicieuses remarques et sa compétence notamment avec les bactéries !!! **Annabelle Bonnard** et **Swanny Fouchard** pour leur patience et dextérité à attraper les artémies !

Je crois que je dois des remerciements particuliers à **Line Legall**, **Laurence Challier**, **Brice Dubois**, **Marine Pomarede**, **Juliette Royer**, **Jean-Marc Poncet**, **Céline Rebours**, **Emeline Furon**, **Benoît Bernay** ...pour avoir supporté mes râleries constantes, mes coups de gueule et mes rebellions, mais aussi ma joie, voire mon exubérance devant des réussites, des surprises...Bref en trois mots, mon caractère impulsif !!!! Et merci aussi à eux pour leur bonne humeur, leur soutien et leur présence...

Difficile de ne pas oublier des gens devant la multitude de remerciements à faire : merci à **Franck**, **Christophe F.**, **Fabien J.**, **Fabien F.**, **Armelle**, **Estelle**,

Francis, Pascal, tous les thésards, ATER, stagiaires, étudiants de maîtrise avec qui j'ai partagé bureau, pause-café, repas...Et merci à tout le personnel du LBBM en général, aux conseils des « grands » souvent nécessaires dans le dédale administratif de la fin de thèse ! Merci également à tout le **CODENET Team** pour m'avoir accueillie, aidée, encouragée...Impossible de les citer tous mais à chacun d'entre eux j'adresse mes plus sincères remerciements...

Rien n'aurait été pareil sans le soutien omniprésent de **Marion, Gaby, Olivier, Marie-Hélène** et **Patrice, Emilie, Cécile, Pierre**, et de tous les amis de Caen et d'ailleurs. Je les remercie pour leur attention et pour m'avoir fait oublier de temps à autres le monde algal dans lequel je baigne quotidiennement. Merci aussi au groupe des p'tites crevettes avec qui j'ai partagé la joie et la tension de faire une thèse : **Caro, Dam's, Phil, Renaud, Fabrice**...

Si une personne m'a plus particulièrement soutenue durant ces dernières années, me permettant de relativiser et d'aborder le monde scientifique sous un autre jour, c'est certainement **Guillaume** (qui sera soulagé de voir le travail de rédaction terminé !!!)...Merci à toi pour ta patience et pour tout le reste (y compris les heures au laboratoire à passer des petites cuves dans le fluorimètre !)...

Les derniers remerciements, je les dois, sans hésitation possible, à ma famille, notamment mes parents, **Françoise** et **Dominique** qui ont accepté de me soutenir financièrement au début et à la fin de cette thèse et moralement tout du long, me demandant régulièrement des nouvelles de mes « bébés ». Ils ont partagé sans hésiter stress, travail le week-end, moments de découragement, et je pense sincèrement que sans eux ce travail n'aurait pas abouti. Merci aussi à ma petite sœur, **Julie**, qui a eu un rôle important en gérant un appartement parfois légèrement encombré et pour sa présence au jour le jour, pour notre complicité...

Les dernières lignes seront pour mon **Grand-père** qui nous a quitté durant la dernière ligne droite de cette thèse et qui n'en aura pas vu la finalité...

A toutes les « Cocco » du monde,
petites et grandes,
mobiles ou non,

A mon Grand-père et ma famille...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

1

I. Les haptophytes	6
II. Les coccolithophores	8
1. Généralités – historique	8
2. Ultrastructure	10
3. Les coccolithes	11
4. Le cycle biologique	14
5. Biogéographie et écologie	16
III. Objectifs de la thèse	20

LA CULTURE EN LABORATOIRE DES COCCOLITHOPHORES (Article 1)

I. Introduction	24
II. A Brief History of the Culture of Coccolithophores	25
III. Existing Cultures of Coccolithophores	30
IV. The Isolation and Culture of Coccolithophores	32
1. Collection and Transportation of Samples	34
2. Isolation techniques	35
3. Culture media	37
a) Seawater base	37
b) Medium supplements	38
c) Agar media	43
d) Sterilisation of Culture Media	43
4. Types of culture vessel	44
5. Pure, axenic cultures	44
6. Environmental parameters	45
a) Temperature	45
b) Light	45
c) Salinity	46
d) Mixing	46
7. Chemostat Cultures	47
8. Cryopreservation	47
V. Future exploitation of the existing culture resource	47
VI. Future prospects for culturing other coccolithophores	51

DESCRIPTION DU MATERIEL ETUDIE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

55

I. <i>Emiliania huxleyi</i> (Hay et Molher)	55
1. Classification et généralités	55
2. Cycle et morphologie	57
a) La phase calcifiée diploïde ou C-cells	57
b) La phase diploïde non-calcifiée ou N-cells	59
c) La phase haploïde non-calcifiée ou S-cells	60
3. Biogéographie	61
4. Origine de la souche utilisée	63
II. <i>Coccolithus pelagicus</i> (Wallich) Schiller et <i>Coccolithus braarudii</i> (Gaarder) Baumann, Cachao, Young and Geisen	65

1. Classification et généralités	65
2. Cycle et morphologie.	67
a) La phase calcifiée à hétérococcolithes	67
b) La phase calcifiée à holococcolithes	69
3. Ecotype, spéciation et biogéographie...	71
4. Origine de la souche utilisée	75
III. <i>Calcidiscus leptoporus</i> (Murray et Blackman) Loeblich et Tappan	75
1. Classification et généralités	75
2. Cycle et morphologie	77
a) La phase calcifiée à hétérococcolithes	77
b) La phase calcifiée à holococcolithes	78
3. Biogéographie	79
4. Origine et type de la souche utilisée	82
IV. <i>Coronosphaera mediterranea</i> (Lohmann) Gaarder	82
1. Classification et généralités	82
2. Cycle et morphologie	83
a) La phase calcifiée à hétérococcolithes	83
b) Les phase calcifiées à holococcolithes	85
3. Biogéographie	88
4. Souche utilisée	90
CYCLE DE DEVELOPPEMENT DES COCCOLITHOPHORES:	
HETEROCCOLITHOPHORES ET HOLOCCOLITHOPHORES (<i>Article 2</i>)	91
I. Introduction	92
II. Materials and methods	97
1. Cultures and standard culture conditions	97
2. Observations	97
3. Flow cytometry	98
4. 18S rDNA sequences	98
III. Results	99
1. Morphology of experimental species	99
2. 18S rDNA sequences	99
3. Flow cytometry	99
4. Observations of sexual reproduction in <i>Coccolithus pelagicus</i> and <i>Coronosphaera mediterranea</i>	101
5. Body scale ornamentation in <i>Coccolithus pelagicus</i>	105
IV. Discussion	105
INFLUENCE DE FACTEURS ABIOTIQUES (TEMPERATURE, TURBULENCE ET NUTRIMENTS) SUR LA BIOLOGIE ET L'ÉCOLOGIE DE QUELQUES COCCOLITHOPHORES	114
I. Introduction	114
II. Matériel et méthodes	119
1. Température	119
2. Sels nutritifs et milieux de culture	120
3. Hétérotrophie	122
a) Mixotrophie	122
b) Phagotrophie	122
3. Turbulence	124

III. Résultats	124
1. Température	124
a) <i>Coccolithus braarudii</i>	124
b) <i>Coronosphaera mediterranea</i>	124
c) <i>Emiliana huxleyi</i>	125
2. Nutrition et milieu de culture	125
a) Influence des différents types de milieux de culture	125
b) Influence des différentes quantités de sels nutritifs azotés et phosphatés	127
c) Hétérotrophie	132
3. Turbulence	132
IV. Discussion	136
IMPACT DE LA LUMIERE SUR LA BIOLOGIE ET L'ÉCOLOGIE DES COCCOLITHOPHORES	148
I. Introduction	148
II. Matériel et méthodes	151
1. Quantité de lumière	152
2. Phototactisme	152
3. Qualité de la lumière	153
3. Etude qualitative et quantitative des pigments	154
a) <i>Emiliana huxleyi</i>	154
b) <i>Coccolithus braarudii</i>	155
III. Résultats	155
1. Influence de l'intensité lumineuse	156
a) <i>Coccolithus braarudii</i>	156
b) <i>Calcidiscus leptoporus</i>	157
c) <i>Emiliana huxleyi</i>	157
2. Phototactisme	158
3. Influence de la qualité de la lumière	159
a) <i>Coccolithus braarudii</i>	159
b) <i>Emiliana huxleyi</i>	159
4. Composition pigmentaire	160
a) <i>Coccolithus braarudii</i>	160
b) <i>Emiliana huxleyi</i>	161
IV. Discussion	166
PHOTOSYNTHESE ET CYCLE BIOLOGIQUE CHEZ <i>EMILIANA HUXLEYI</i> (Article 3)	172
I. Introduction	173
II. Methods	174
a) Strain and culture conditions.	174
b) Measurements of photosynthetic parameters	175
c) Determination of pigment content	175
d) Calculation of photosynthetic parameters	175
e) Statistical analyses	176
III. Results	176
IV. Discussion	181
V. Conclusions	185

TOXICITÉ DES COCCOLITHOPHORES (Article 4)**187**

I. Introduction	189
II. Material and methods	191
1. Cultures and culture conditions	191
2. Toxicity bioassay	193
3. Allelopathy test	193
4. Statistical analyses and DL50	195
III. Results	195
1. Toxicity	195
2. Effect of culture age	197
3. Effect of algal cell concentration	197
4. Effect of exposure time	197
5. Allelopathy	198
IV. Discussion	198

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES **203****BIBLIOGRAPHIE** **210****LISTE DES FIGURES** **236****LISTE DES TABLEAUX** **238****LISTE DES COLLOQUES ET PUBLICATIONS** **239****ANNEXES** **240**

Chapitre I :



INTRODUCTION GENERALE

Photo: M.Geisen

Introduction générale

Les microalgues, organismes photosynthétiques unicellulaires, constituent un des compartiments majeurs de l'écosystème Terre, en étant notamment à la base de nombreuses chaînes alimentaires (producteurs primaires). Un certain nombre d'entre elles, comme les coccolithophores, les dinoflagellés, les diatomées, influe également de façon importante sur les conditions environnementales et sur l'équilibre de cet écosystème. Un facteur relativement récent constitué par des perturbations d'origine anthropique (eutrophisation, pollutions par les hydrocarbures...) vient déranger de manière nette cet équilibre précaire. De ce fait, depuis une vingtaine d'années, le développement durable est au cœur des préoccupations internationales. De nombreuses commissions internationales ont été créées, dont la Commission Mondiale pour l'Environnement et le Développement, afin de répondre aux interrogations de la société civile devant les bouleversements des équilibres naturels (pluie acide, effet de serre...). La notion de développement durable a été précisée par cette commission en 1987 comme étant « *un développement qui répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs* ». Dans le but de définir une nouvelle politique internationale qui suivrait ce principe, une conférence mondiale a été organisée, la Conférence des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement en 1992 à Rio de Janeiro (Sommet de la Terre). Trois grands textes, visant notamment à prévenir les changements climatiques à l'échelle mondiale et la disparition d'espèces biologiquement diverses, ont été alors adoptés par 150 nations sur 172 présentes.

La notion de biodiversité fut largement abordée ainsi que la nécessité d'approfondir les connaissances sur les organismes vivants et les écosystèmes (notamment sur les liens existants entre les deux) afin de préserver la diversité biologique (*Chapitre 15* du rapport de la Conférence de Rio de Janeiro). Or, l'un des biotopes les moins connus actuellement reste le domaine marin (71% de la surface de la planète), qui n'est réellement exploré que depuis la seconde moitié du vingtième siècle.

De plus, la nécessité de développer la recherche océanographique est considérablement accentuée par le rôle non négligeable joué par le milieu marin dans la régulation des changements climatiques. Le rapport émis lors du Sommet de la Terre

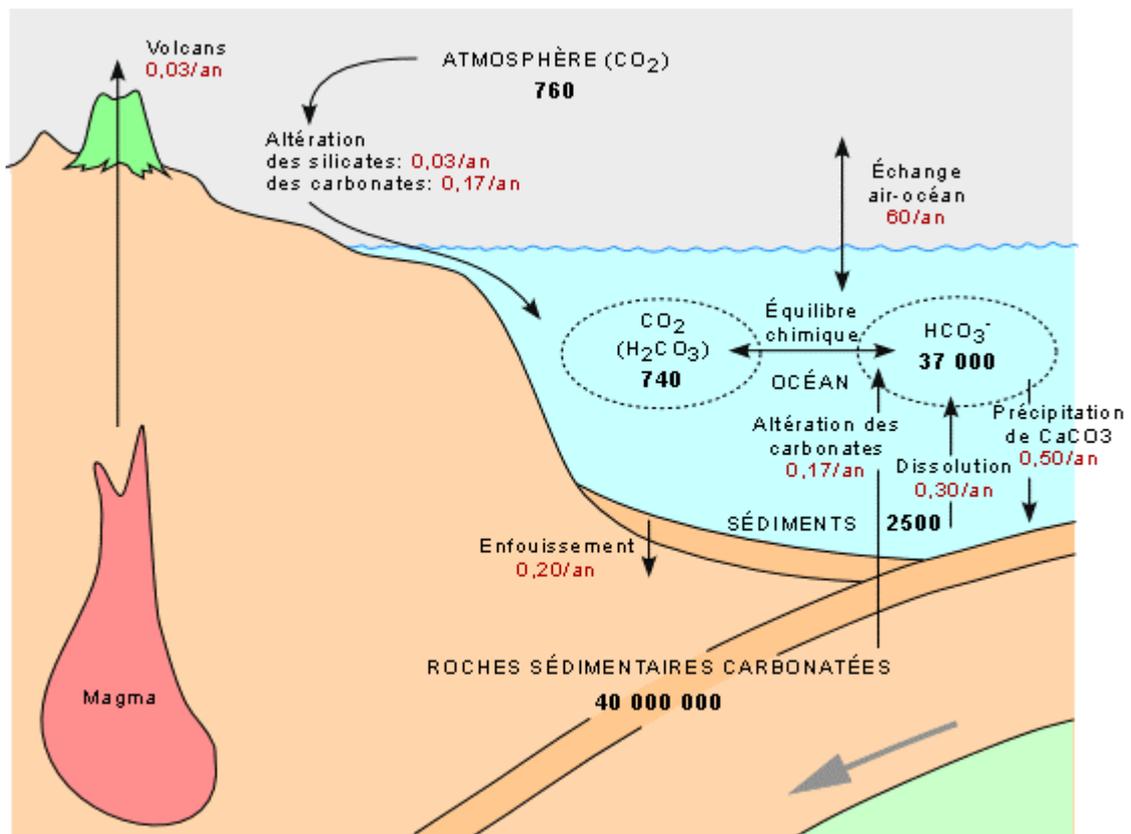


Figure I-1 : Cycle du carbone inorganique, valeurs en Gt C (gigatonnes de carbone) selon Kump *et al.* (1999).

préconise notamment de développer les connaissances quant au rôle des océans en tant que puits de carbone (*Chapitre 17* du rapport de la Conférence de Rio de Janeiro).

Le milieu aquatique présente en effet une forte capacité à absorber sous différentes formes le dioxyde de carbone atmosphérique. Les producteurs primaires, notamment le phytoplancton, consomment beaucoup de carbone pour la photosynthèse (CO_2 dissous ou bicarbonate HCO_3^-). Certains organismes utilisent aussi le carbone du milieu pour la réalisation de tests calcaires (CaCO_3), tant au sein de la macrofaune et de la macroflore que du plancton (zoo- et phytoplancton). Le carbone utilisé est partiellement réinjecté dans le cycle du carbone (Figure I-1) par le biais de la respiration et de la re-dissolution des carbonates. Néanmoins, une partie de ce CO_2 atmosphérique dissous est consommée sous diverses formes par les organismes restant piégés dans les sédiments. En effet, lors de la mort des micro-organismes calcaires, leurs tests sédimentent (seuls ou dans des pelotes fécales) entraînant ainsi le stockage du carbone au fond des océans du carbone (notamment par le biais de la formation de roches sédimentaires comme la craie). Les océans peuvent de ce fait pomper une partie du CO_2 de l'atmosphère pour compenser le carbone piégé, influant alors sur la quantité de ce gaz présente dans ce compartiment (problème écologique majeur lié aux activités industrielles fortement productrice de CO_2).

Parmi ces micro-organismes « piègeurs » de CO_2 , un groupe particulier et important du phytoplancton, les **coccolithophores** ou haptophytes calcifiées, est largement représenté dans le milieu marin. Par ailleurs, quelques espèces de ce groupe pourraient jouer un rôle non négligeable dans le cycle du soufre par leur production de diméthylsulfure (DMS). Ce composé rejeté dans l'atmosphère serait en partie responsable des pluies acides ; l'utilisation de marqueurs isotopiques a permis de démontrer que le DMS produit par une efflorescence d'haptophytes (avec des **coccolithophores** dominantes) en Mer du Nord aurait engendré des pluies acides dans tout le nord ouest de l'Europe (McArdle, 1993). Le DMS favoriserait aussi la nucléation des nuages, aboutissant à une augmentation de l'albédo (Figure I-2).

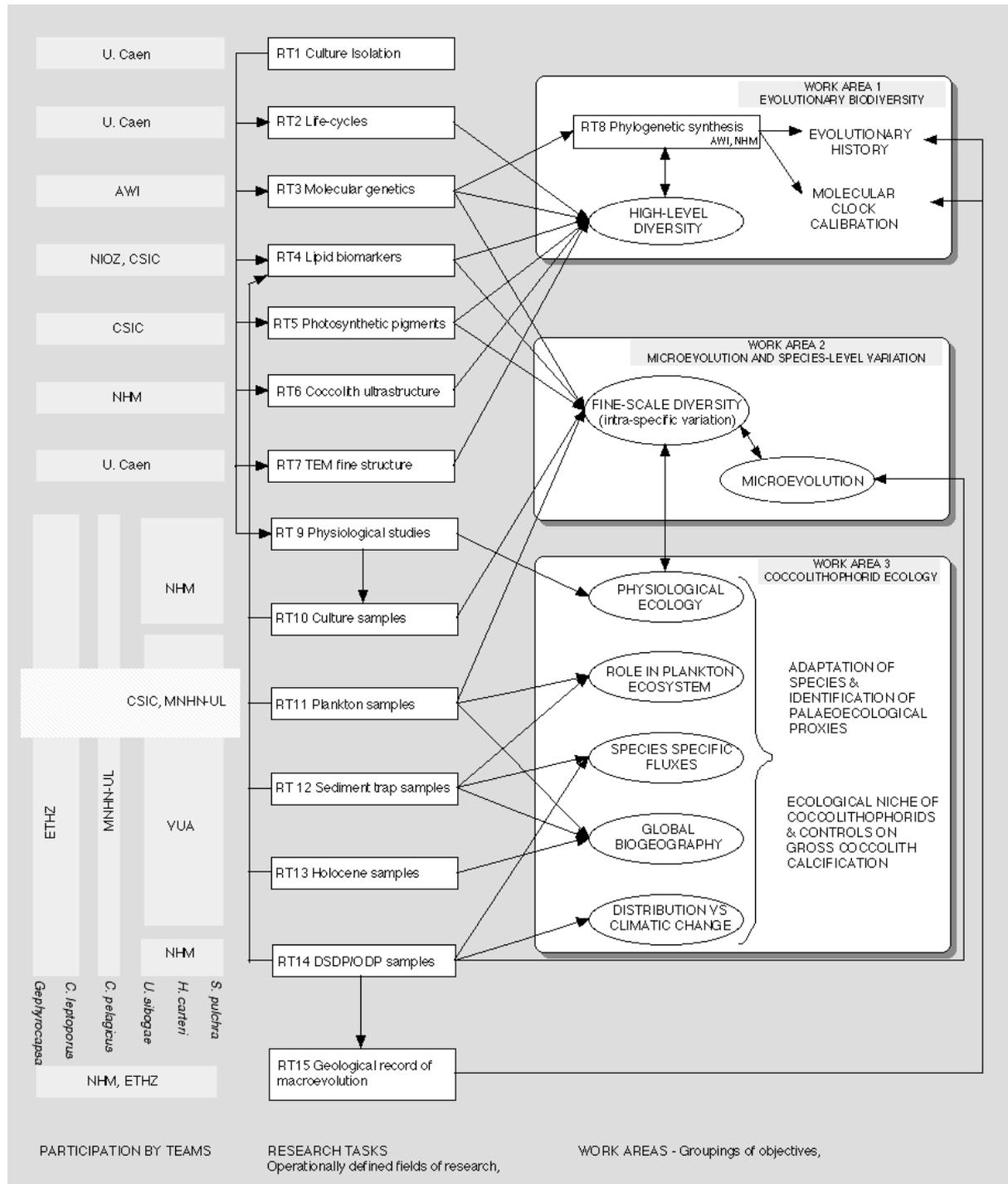


Figure I-3: Représentation schématique des différents axes de recherche du projet CODENET. **NHM** - The Natural History Museum, Londres ; **ETHZ** - Eidgenössische Technische Hochschule, Zurich - Geological Institute ; **VUA** - Vrije Universiteit Amsterdam - Earth Sciences Faculty ; **U. Caen** - Université de Caen Basse-Normandie – Laboratoire de Biologie et de Biotechnologies Marines ; **AWI** - Alfred-Wegener-Institute for Polar & Marine Research, Bremerhaven ; **CSIC** - Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Instituto de Ciencias del Mar, Barcelone ; **MNHN-UL** - Museu Nacional de Historia Natural da Universidade de Lisboa, Lisbonne ; **NIOZ** - Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee.

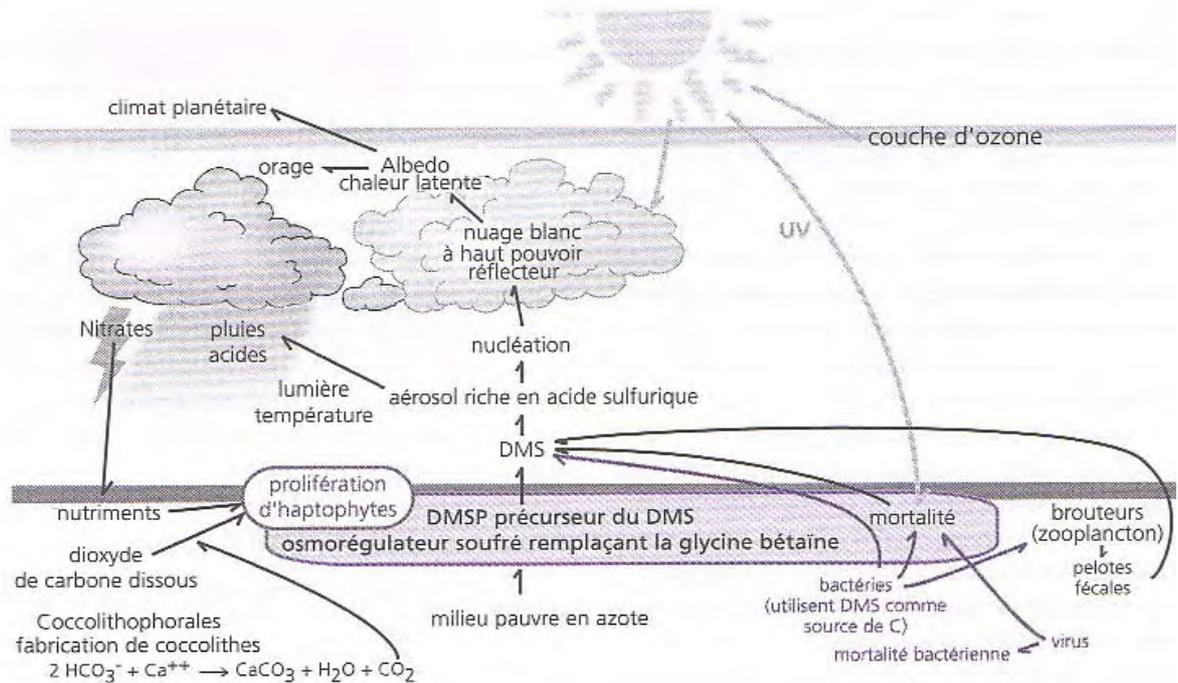


Figure I-2: Rôle des haptophytes dans le cycle du soufre d'après de Reviers (2003)

Les haptophytes, et en particulier les **coccolithophores**, apparaissent donc comme des organismes intéressants du point de vue de la compréhension des changements globaux avec leur participation, pour certains d'entre eux, à deux cycles biogéochimiques fondamentaux, ceux du carbone et du soufre. Malgré tout, ce groupe phytoplanctonique majeur reste peu connu du fait du manque d'espèces cultivées et de données biologiques. A partir de ces différentes constatations et dans la lignée de la politique initiée par le Sommet de la Terre, plusieurs programmes de recherche internationaux ont vu le jour, particulièrement en Europe, sur les haptophytes. Les efforts de recherche se sont notamment focalisés sur leur biologie et leur écologie dans les trois programmes internationaux : le projet GEM (*Global Emiliania Modelling Initiative a model study for the investigation of geosphere - biosphere interactions*), les projets européens EHUX basé sur *Emiliania huxleyi*, et enfin CODENET (*Coccolithophorid Evolutionary Biodiversity and Ecology Network*).

Le travail présenté ici s'inscrit dans la continuité du projet CODENET (1998-2001). Le but de ce réseau de chercheurs était de mieux appréhender, en intégrant plusieurs disciplines, la biodiversité, les processus de micro-évolution, d'adaptation écologique et l'impact global des **coccolithophores** en milieu marin (Figure I-3).

Chaque équipe sur les huit participants (Figure I-4) s'est vu confier un ou plusieurs axes de recherche. Le Laboratoire de Biologie et de Biotechnologies Marines de l'Université de Caen Basse-Normandie (participants : Pr Chantal Billard, Dr Jacqueline Fresnel, Dr Ian Probert, post-doctorant) s'est plus particulièrement focalisé sur l'isolement et le maintien en culture des souches de **coccolithophores**, sur leur cycle de vie et les études ultrastructurales, en raison des travaux précédents de cette équipe sur la biologie et la culture des coccolithophores côtières.

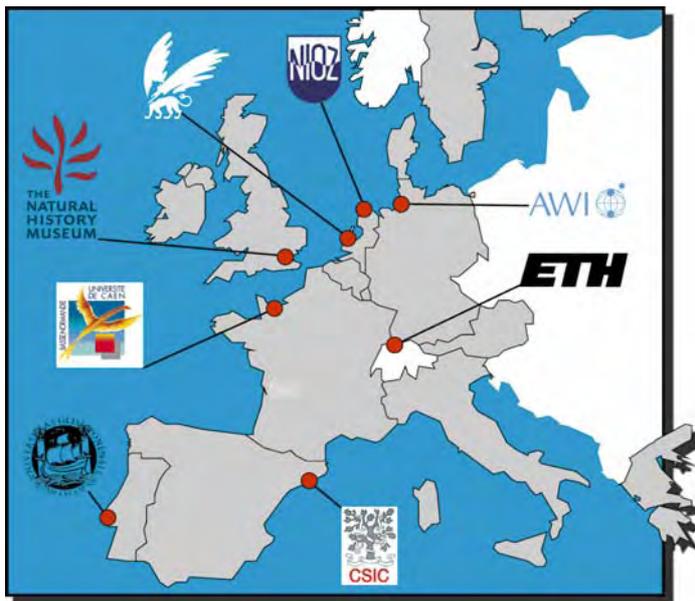


Figure I-4 : Répartition spatiale des huit équipes participant au réseau CODENET : **NHM** - The Natural History Museum, Londres ; **ETHZ** - Eidgenössische Technische Hochschule, Zurich - Geological Institute ; **VUA** - Vrije Universiteit Amsterdam - Earth Sciences Faculty ; **U. Caen** - Université de Caen Basse-Normandie – Laboratoire de Biologie et de Biotechnologies Marines ; **AWI** - Alfred-Wegener-Institute for Polar & Marine Research, Bremerhaven ; **CSIC** - Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Instituto de Ciencias del Mar, Barcelone ; **MNHN-UL** - Museu Nacional de Historia Natural da Universidade de Lisboa, Lisbonne ; **NIOZ** - Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee.

Intégré dans cette dynamique, ce travail de recherche a eu pour but général d'améliorer les connaissances sur les cycles de développement des **coccolithophores** et de mieux comprendre les implications écologiques de ces cycles.

I. LES HAPTOPHYTES

Les **coccolithophores** appartiennent à l'embranchement des Haptophyta qui constitue, avec ceux des Dinophyta et des Ochrophyta (renfermant, entre autres, les diatomées), un des trois grands groupes de producteurs primaires du milieu marin. Ses représentants sont surtout rencontrés dans les milieux océaniques oligotrophes mais sont susceptibles de coloniser tous les types de milieux aquatiques dans des proportions plus ou moins importantes (y compris des espèces d'eau douce comme la coccolithophore *Hymenomonas roseola*). Les haptophytes

sont unicellulaires et appartiennent majoritairement au nanoplancton et plus rarement au picoplancton, avec une seule exception, les colonies de *Phaeocystis* qui peuvent atteindre des tailles de l'ordre du millimètre.

Cet embranchement compte environ 80 genres et près de 300 espèces rassemblées dans deux classes : les Pavlovophyceae et les Prymnesiophyceae. Toutes les espèces de ce groupe sont caractérisées par la présence à un moment donné de leur cycle de vie d'un appendice particulier, l'haptonème. Celui-ci est filiforme et plus ou moins long par rapport à la cellule, réduit à quelques microtubules dans certains cas (haptonème vestigial) ; il n'est que très rarement absent. Au niveau ultrastructural, il diffère d'un flagelle notamment par le nombre de microtubules qui le constituent (6 à 7 disposés en croissant, entourés d'une extension de réticulum endoplasmique recouverte de plasmalemme). Situé entre les deux flagelles, il a essentiellement un rôle dans l'attache au substrat, et parfois dans la préhension des proies et dans la détection de l'environnement extérieur (Inouye et Kawawchi, 1994).

La classe des Pavlovophyceae récemment validée (voir Edvardsen *et al.*, 2000) est basée sur l'ordre des Pavlovales (avec une seule famille, les Pavlovaceae). Tous les organismes de cette classe sont flagellés et nettement anisokontés, avec des flagelles insérés subapicalement ou dans une position médiane par rapport à la face concave de la cellule. La mitose est particulière, avec une enveloppe nucléaire plus ou moins persistante jusqu'à la métaphase. Les cellules des Pavlovophyceae sont « nues » et la sexualité est inconnue contrairement à la deuxième classe des Haptophyta.

La classe des Prymnesiophyceae décrite par Hibberd (1976) contient quatre ordres différents. Les organismes appartenant à cette classe sont tous flagellés à un moment donné de leur cycle et possèdent alors deux flagelles lisses, insérés apicalement, égaux ou sub-égaux. La mitose, ouverte, diffère de celle des Pavlovophyceae. Un certain nombre de critères morphologiques ou physiologiques supplémentaires permettent de différencier les deux classes (Tableau I-1).

Tableau I-1: Principales différences biologiques entre les deux classes composant les Haptophyta.

	Pavlovophyceae	Prymnesiophyceae
flagelles	anisokontés	isokontés
racine flagellaire	simples	complexes
mitose	fermée	ouverte
chloroplaste	1	2, le plus souvent
Stigma	+	-
écailles périphériques	-	+
sexualité	inconnue	connue dans quelques familles

Sauf exception, les cellules de Prymnesiophyceae sont recouvertes d'écailles organiques. Pour un grand nombre de cas, sur certaines de ces écailles un dépôt calcaire est présent constituant des structures particulières, les coccolithes. L'ensemble des organismes dont une phase du cycle biologique présente ce type d'écailles calcaires constitue le groupe des coccolithophores (= coccolithophoridées). Il est réparti au sein de deux ordres, les Isochrysidales et les Coccolithales.

II. LES COCCOLITHOPHORES

1. Généralités – historique

La première mention d'organismes appartenant à l'ensemble des coccolithophores date de 1836, lorsque Ehrenberg nota l'existence de cristaux de calcite de type coccolithe. Huxley (1858) remarqua à son tour la présence de coccolithes dans les sédiments au fond des océans. A la même époque, Sorby (1861) répertoria ces éléments comme étant constitutifs de la craie. Toutefois ce ne fut qu'en 1861 que Wallich démontra que ces coccolithes étaient réunis en une sphère qu'il définit sous le terme de « coccosphère ». Toutefois, l'hypothèse que ces coccosphères seraient d'origine phytoplanctonique ne fut émise que plus tard, hypothèse confirmée par la suite par Murray et Blackmann (1898). De nombreux auteurs entreprirent alors de décrire les différentes espèces de coccolithophores et la première classification de ce groupe revient à Lohmann (1902). En 1954, Bramlette et Rieder démontrèrent l'importance de ces organismes dans la paléocéanographie pour la datation des différentes strates. Depuis, de nombreux progrès (avènement de la microscopie électronique, utilisation des techniques culturales et enfin développement de la biologie moléculaire) ont

permis des avancées significatives dans la taxonomie et la classification de ces espèces qui reste, toutefois, en constante évolution (voir Edvardsen *et al.*, 2000 ; Saez *et al.*, 2003).

2. Ultrastructure

Les coccolithophores sont le plus souvent mobiles, au moins pendant une partie de leur cycle de vie. Elles possèdent généralement, comme toutes les Prymnesiophyceae, deux flagelles égaux à subégaux, lisses. Toutefois il y a peu d'études sur l'appareil flagellaire des coccolithophores, études surtout focalisées sur les membres des familles Pleurochrysidaceae et Hymenomonadaceae (coccolithophores côtiers). L'appareil flagellaire des coccolithophores est le plus complexe parmi tous les haptophytes étudiés (voir les revues de Green et Hori, 1994 ; Inouye et Kawachi, 1994 ; Billard et Inouye, sous presse), avec quatre racines flagellaires microtubulaires (R1, R2, R3 et R4) associées aux corpuscules basilaires flagellaires (R1 et R2 avec celui de gauche, R3 et R4 avec celui de droite). L'haptonème est situé entre les deux flagelles, sa base étant proche du corpuscule basilaire flagellaire gauche.

Les membres de ce groupe possèdent généralement une enveloppe extracellulaire constituée d'une ou plusieurs couches d'écailles organiques situées immédiatement à l'extérieur du plasmalemme. Certaines sont entièrement organiques tandis que d'autres comme les coccolithes sont constituées d'une matrice organique associée à des composés inorganiques (Figure I-5). La matrice organique est constituée d'un ensemble de protéines (37%) et de carbohydrates dont beaucoup de glucose (63%) (Pienaar, 1994). Les écailles non minéralisées sont trop petites pour être observées au microscope photonique et nécessitent l'utilisation de la microscopie électronique à transmission (MET). Elles sont caractérisées par des motifs distincts entre les surfaces proximales et distales. Chez certains genres comme *Pleurochrysis*, des écailles plus petites sont présentes autour du pôle flagellaire et sur l'haptonème.

Juste sous la membrane plasmique, les Prymnesiophyceae présentent du reticulum endoplasmique (RE) périphérique, qui s'étend à l'intérieur de l'haptonème.

Sous cette couche de RE, deux plastes bruns-dorés sont généralement présents qui contiennent de la chlorophylle *a* et *c* (Figure I-5). Ils sont dépourvus de lamelle périphérique. Quelques espèces ont uniquement un chloroplaste comme quelques « holococcolithophores »

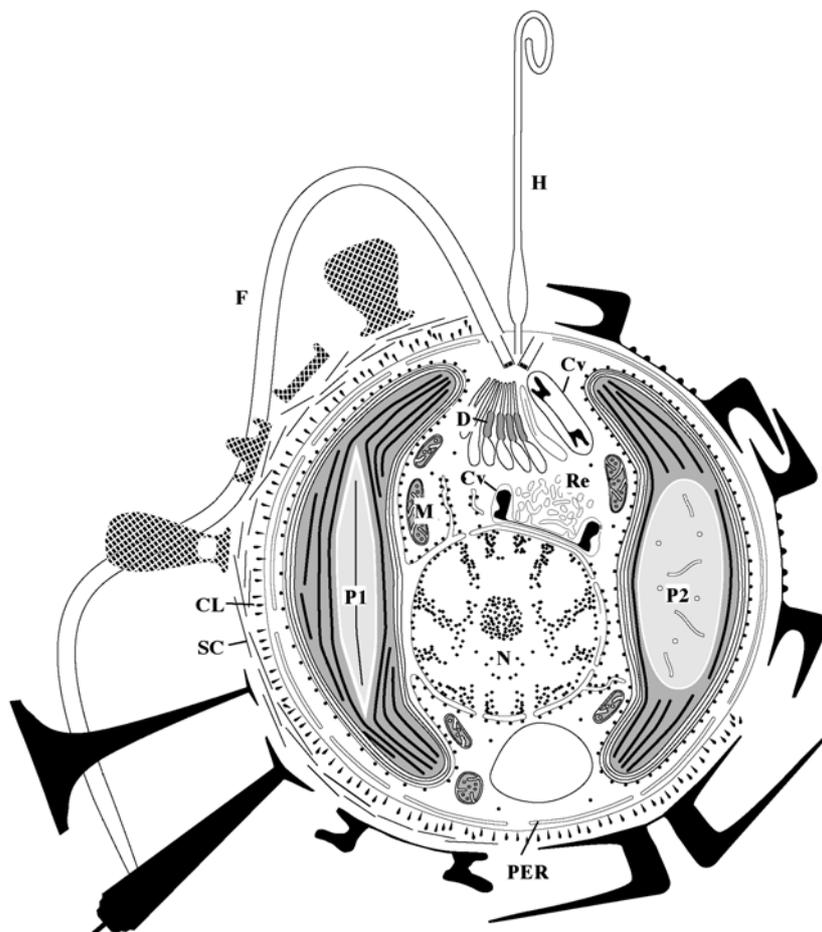


Figure I-5: Représentation schématique de la cytotogie des coccolithophores d'après Billard et Inouye (sous presse). Les caractéristiques morphologiques observées chez diverses coccolithophores sont combinées dans une seule et même figure. Les différentes sortes de coccolithes sont représentées par leurs silhouettes. Les deux types de vésicules de formation des coccolithes connues chez *Pleurochrysis* (au dessus) et chez *Emiliana* (au dessous) sont illustrées. Le pyrénoïde de type (P1) est caractéristique de la majorité des coccolithophores et le type (P2) est observé chez *Emiliana* et *Gephyrocapsa*. Les hétérococcolithes sont figurés en noir et les holococcolithes par un motif quadrillé.

Abréviations: CL; matériel colonnaire, Cv: vésicule de formation des coccolithes, D: dilatation particulière de l'appareil de Golgi, F: flagelle, H: haptone, M: profil mitochondrial, N: noyau, P1: pyrénoïde traversé par des thylakoïdes, P2: pyrénoïde traversé par des structures tubulaires, PER: reticulum endoplasmique périphérique, Re: corps réticulé, SC: écaille organique non minéralisée.

(confirmés par des coupes en MET) mais surtout comme les Pavlovophyceae et quelques Prymnesiophyceae non calcifiées (*Isochrysis* et *Chrysotila*). Les plastes sont entourés de quatre membranes dont deux correspondent à du RE chloroplastique (plaste résultant d'une endosymbiose secondaire). Le RE chloroplastique est en continuité avec l'enveloppe nucléaire, formant le complexe nucléoplastidial. Un pyrénoloïde est présent, inclus sauf pour les familles Pleurochrysidaceae et Hymenomonodaceae chez lesquelles il est protubérant. La photosynthèse aboutit à la production d'un composé de réserve, la chrysolaminarine (β 1-3 glucane) comme les autres Prymnesiophyceae.

La grande majorité des coccolithophores est photosynthétique mais quelques représentants polaires, comme les espèces faiblement calcifiées appartenant à la famille des Papposphaeraceae, sont hétérotrophes avec un haptonème très développé et sans chloroplaste (Marchant et Thomsen, 1994 ; Thomsen *et al*, 1995). Chez les Prymnesiophyceae non calcifiées, des capacités de phagotrophie ont été mises en évidence, comme chez *Chrysochromulina* (Kawachi *et al*, 1991) ou *Prymnesium* (Tillman, 1998). Pour les coccolithophores, une seule espèce a été montrée comme pouvant ingérer des particules de carbone, le stade flagellé de *Coccolithus pelagicus* (Parke et Adams, 1960). Toutefois des recherches complémentaires sont nécessaires pour vérifier l'existence de mixotrophie ou d'hétérotrophie chez les coccolithophores.

Les coccolithophores présentent un appareil de Golgi particulièrement développé (Figure I-5), avec un unique dictyosome associé à des vésicules de RE. Il est impliqué dans la synthèse des écailles organiques et des coccolithes. Les coccolithophores ne possèdent pas de stigma et aucune donnée n'existe quant à un potentiel phototactique.

3. Les coccolithes

Les coccolithes correspondent à une écaille organique (écaille basale) associée à un dépôt de calcite. Il existe deux catégories principales de coccolithes qui se distinguent par la complexité de l'assemblage des cristaux de calcite : les **hétérococcolithes** formés d'unités de cristaux de différentes tailles et de différentes formes, arrangés de façon cyclique avec une symétrie radiale et les **holococcolithes** formés d'unités de cristaux $<0,1 \mu\text{m}$ de taille et forme constantes.

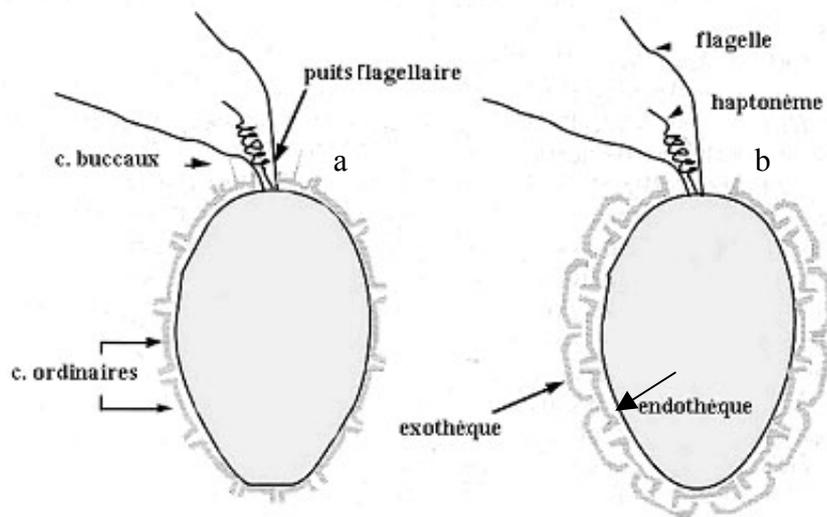


Figure I-6 : Représentation schématique de coccosphères dimorphes à monothèque (a) et à dithèque (b), d'après Young *et al.* (1997).

Au sein de ces deux catégories, des sous-groupes de coccolithes ont été définis, basés sur des caractères morphologiques. Les principaux types décrits pour les coccolithophores actuelles sont présentés (Tableau I-2 ; pour plus de détails voir Young *et al.*, 1997, 2003).

Tableau I-2 : Les principaux types de coccolithes avec exemples de genres possédant ces coccolithes.

Hétérococcolithes	Genres (exemple)	Holococcolithes	Genres (exemple)
Canéolithes	<i>Syracosphaera</i>	Calicalithes	<i>Calicasphaera</i>
Cricolithes	<i>Pleurochrysis</i>	Crystallolithes	<i>Crystallolithus</i>
Cyrtolithes	<i>Algirosphaera</i>	Calyptrolithes	<i>Calyptosphaera</i>
Discolithes	<i>Pontosphaera</i>	Flosculolithes	<i>Flosculosphaera</i>
Hélicolithes	<i>Helicosphaera</i>	Fragariolithes	<i>Anthosphaera</i>
Lopadolithes	<i>Scyphosphaera</i>	Gliscolithes	<i>Gliscolithus</i>
Ostéolithes	<i>Ophiaster</i>	Helladolithes	<i>Helladosphaera</i>
Pappolithes	<i>Papposphaera</i>	Laminolithes	<i>Syracolithus</i>
Placolithes	<i>Emiliana</i>	Zygoolithes	<i>Zygosphaera</i>
Planolithes	<i>Syracosphaera</i>		
Rhabdolithes	<i>Rhabdosphaera</i>		
Rhombolithes	<i>Calciosolenia</i>		
Scapholithes			
Trémolithes	<i>Ochrosphaera</i>		

L'ensemble composé de coccolithes entourant la cellule est appelé **coccosphère**. Elle présente parfois une zone ouverte au pôle apical où s'insèrent les flagelles, la zone buccale ou puits flagellaire (Figure I-6). Cette coccosphère peut être **monomorphe** (constituée d'un seul type de coccolithes), **dimorphe** (composée de deux types de coccolithes, le plus souvent de coccolithes ordinaires constituant la majorité des coccolithes de la cellule et des coccolithes buccaux entourant le puits flagellaire, Figure I-6) et parfois **polymorphe** (quand il y a plus de deux types de coccolithes). Dans certains cas, plusieurs couches de coccolithes sont présentes autour de la cellule, tous identiques (l'espèce *Emiliana huxleyi* est un exemple de coccosphère à multicouches constituée d'un seul et même type de coccolithes) ou différents suivant les strates. Pour cette dernière possibilité, il s'agit le plus souvent d'une double couche de coccolithes, avec la couche interne différant de la couche externe comme pour le genre *Syracosphaera* (le terme de **monothèque** est employé dans le cas d'une seule couche de coccolithe ou de plusieurs couches d'un seul type de coccolithes, celui de **dithèque** dans le cas de plusieurs couches de coccolithes différents, Figure I-6).

Différents rôles putatifs ont été attribués aux coccolithes par différents auteurs dont Young (1994) qui a réalisé une synthèse des principales théories en vigueur. Les coccolithes

pourraient avoir d'abord un rôle dans la protection de la cellule, par le biais de la coccosphère massive qui tendrait à réduire le broutage, par celui d'épines qui augmentent le diamètre cellulaire et préviennent la prédation par le petit zooplancton (réduisant aussi la valeur nutritive de la cellule). La couverture complète de la cellule pourrait également limiter des dommages physiques pour le plasmalemme mais aussi la pénétration des bactéries. Par ailleurs, la coccosphère peut créer une zone tampon qui permettrait d'aider le plasmalemme dans certaines de ses fonctions de régulation. Un autre rôle leur a été attribué, au niveau des réactions biochimiques. En effet, la calcification produit de l' HCO_3 qui serait ensuite utilisé pour la photosynthèse. D'autre part, les coccolithes pourraient intervenir dans les phénomènes de flottaison. Une des premières hypothèses avancées réside dans le fait que la lourde coccosphère accélérant la sédimentation, le captage des nutriments serait plus rapide. De plus, en variant son nombre de coccolithes, l'organisme influencerait sur sa flottabilité et donc sur sa vitesse de sédimentation. Dans certains cas, la coccosphère présente des formes tout à fait particulières, non sphériques, avec des épines qui tendraient à réduire cette vitesse de sédimentation ou à la faire varier suivant la position de la cellule dans la colonne d'eau.

La régulation de la lumière pourrait, elle aussi, être liée à l'existence, la forme et le nombre de coccolithes. Ceux-ci sont soupçonnés de refléter les ultraviolets vers l'extérieur de la cellule, permettant une vie plus proche de la surface. D'autre part, les coccolithes pourraient suivant leur forme réfracter la lumière vers l'intérieur de la cellule permettant une vie en eau plus profonde.

Parmi tous ces rôles potentiels des coccolithes quelques uns ont été étudiés plus en détails ces dernières années, notamment grâce à l'existence de clones de certaines espèces sans coccolithes. La seule certitude porte sur l'absence d'influence des coccolithes vis-à-vis de la protection contre les fortes intensités lumineuses (Nanninga et Tyrrel, 1996).

4. Le cycle biologique

Les coccolithophores se reproduisent le plus souvent de façon asexuée par division binaire. Juste après cette mitose, les coccolithes sont soit redistribués entre les deux cellules-filles, soit l'une des cellules conserve la coccosphère de la cellule-mère et la deuxième se dégage et se construit sa propre enveloppe de coccolithes, comme chez *Ochrosphaera neapolitana* (Fresnel et Probert, sous presse).

Depuis quelques années, le cycle de vie des coccolithophores intrigue les scientifiques du fait que certaines espèces semblent avoir un cycle hétéromorphe avec une alternance de générations très dissemblables. Le premier cas de cycle de ce type a été mis en évidence en 1960 chez *Coccolithus pelagicus*. Cette espèce présenterait en fait une alternance de générations entre une phase à hétérococcolithes et une phase à holococcolithes (Parke et Adams, 1960). Par la suite, d'autres exemples de cycles hétéromorphes furent démontrés : chez *Pleurochrysis* (Gayral et Fresnel, 1983) *Emiliana huxleyi* (Green *et al*, 1996), *Ochrosphaera neapolitana* (Fresnel, 1989)... mais chacun avec des caractéristiques propres.

Billard en 1994 puis plus récemment (Billard et Inouye, sous presse) a synthétisé de manière claire les différents types de cycles rencontrés chez les coccolithophores. Ceux-ci sont schématisés dans la Figure I-7 avec des exemples :

- Alternance entre hétérococcolithophore et holococcolithophore (Figure I-7a)
- Alternance entre hétérococcolithophore et un stade non-calcifé (benthique ou mobile) (Figure I-7b)
- Alternance entre hétérococcolithophore et cellule à nanolithes (Figure I-7c) cycle connu uniquement chez *Ceratolithus cristatus*
- Alternance entre hétérococcolithophore et cellule à coccolithes en aragonite (Figure I-7d)

Dans l'article de 1994, Billard a suggéré que la phase à hétérococcolithes pourrait être diploïde tandis que celle à holococcolithes serait haploïde, en se basant sur les motifs des écailles chez les cycles dont la ploïdie est connue (*Pleurochrysis* sp.) mais pour le moment aucune confirmation n'a été apportée quant à ces hypothèses.

5. Biogéographie et écologie

Le groupe des coccolithophores est le plus souvent considéré comme un groupe d'espèces océaniques et même oligotrophiques, et ce malgré l'existence de quelques espèces côtières et d'espèces très ubiquistes, retrouvées tant dans le milieu littoral que dans le domaine océanique. Ce groupe est présent à travers le monde, rencontré dans la plupart des océans et des mers du globe, avec toutefois une diversité nettement plus élevée en région tempérée et sub-tropicale (Okada et McIntyre, 1979). Toutefois, un certain nombre de coccolithophores est nettement caractéristique des régions polaires ou tropicales.

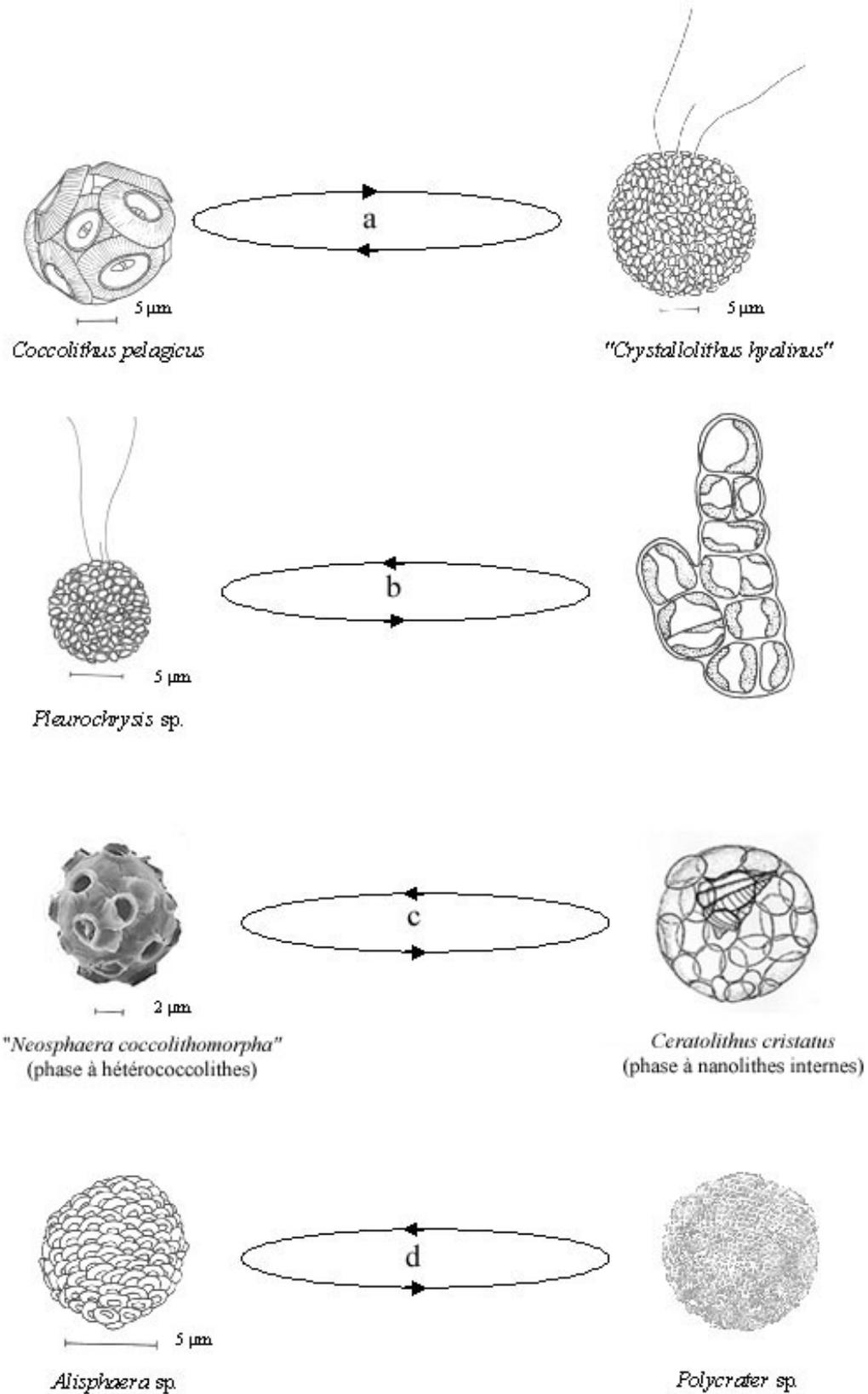


Figure I-7 : Représentation schématique des différents types de cycles hétéromorphes répertoriés chez les coccolithophores. a- alternance entre hétérococcolithophore et holococcolithophore, b- alternance entre un stade calcifié à hétérococcolithes et un stade non calcifié, c- alternance entre cellules à hétérococcolithes et à nanolithes, d- alternance entre des cellules à hétérococcolithes et à coccolithes en aragonite. Schémas d'après Norris (1965), Heimdal (1993), Alcober et Jordan (1997) et Cros & Fortuño (2003).

Les premières études majeures sur la diversité et la biogéographie des coccolithophores datent des années 1970-1980 et sont particulièrement basées sur les océans Atlantique et Pacifique. Ces différents travaux ont mis en évidence une zonation nette dans ces deux parties du monde étudiées (Figure I-8).

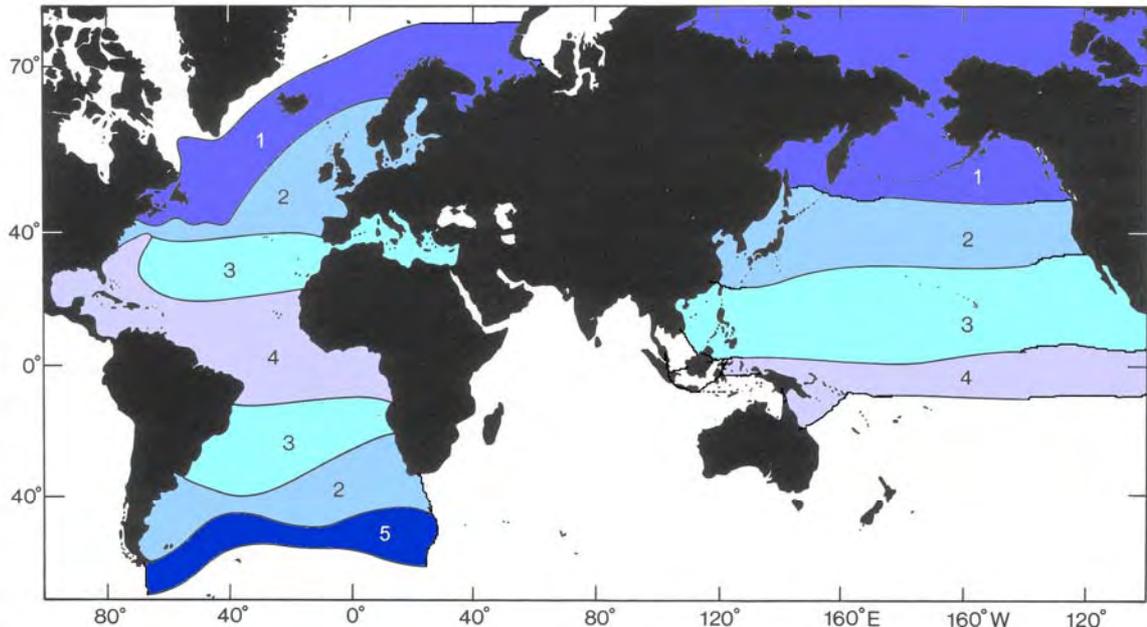


Figure I-8 : Les différentes zones biogéographiques de coccolithophores dans l'Océan Atlantique et dans l'Océan Pacifique, d'après Winter *et al.* (1994). 1 = zone subarctique, 2 = zone tempérée ou transitionnelle, 3 = zone subtropicale ou centrale, 4 = zone tropicale ou équatoriale et 5 = zone subantarctique.

La zone 1 ou subarctique est nettement dominée par les espèces de la famille des Papposphaeraceae (coccolithophores faiblement calcifiées) dans les zones côtières ; le domaine océanique est, quant à lui, caractérisé par *Coccolithus pelagicus*, *Calciopappus caudatus*. Dans les eaux atlantiques arctiques, *Emiliania huxleyi* et *Algirosphaera robusta* sont les espèces les plus communes. Dans la zone 2 ou tempérée, qui correspond aussi aux zones d'upwellings, deux espèces sont couramment rencontrées, *E. huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* ainsi que diverses autres espèces à placolithes. Dans la zone 3, dite subtropicale, la diversité des coccolithophores augmente (zone correspondant aux tourbillons océaniques). Elle est notamment caractérisée par des holococcolithophores ainsi que par *Discosphaera tubifera*, *Rhabdosphaera clavigera*, *Umbellosphaera* spp., *Florisphaera profunda* et *Syracosphaera* spp. La zone tropicale ou zone 4 est dominée par des espèces à placolithes comme *E. huxleyi*, *Calcidiscus leptoporus* et *Gephyrocapsa oceanica*. Deux espèces présentes dans la zone précédente se rencontrent aussi dans cette zone, *Umbellosphaera* spp. et

Florisphaera profunda. Une espèce n'est présente que dans cette zone précise des océans, *Reticulofenestra sessilis*. Dans la dernière zone, la zone 5 ou subantarctique (Atlantique Sud), la famille des Papposphaeraceae semble dominante avec d'autres familles d'espèces faiblement calcifiées et *Emiliana huxleyi*.

Dans certaines zones, une stratification verticale des coccolithophores a été mise en évidence par Jordan (dans Winter *et al.*, 1994), comme dans la zone subtropicale où elle est commune (Figure I-9).

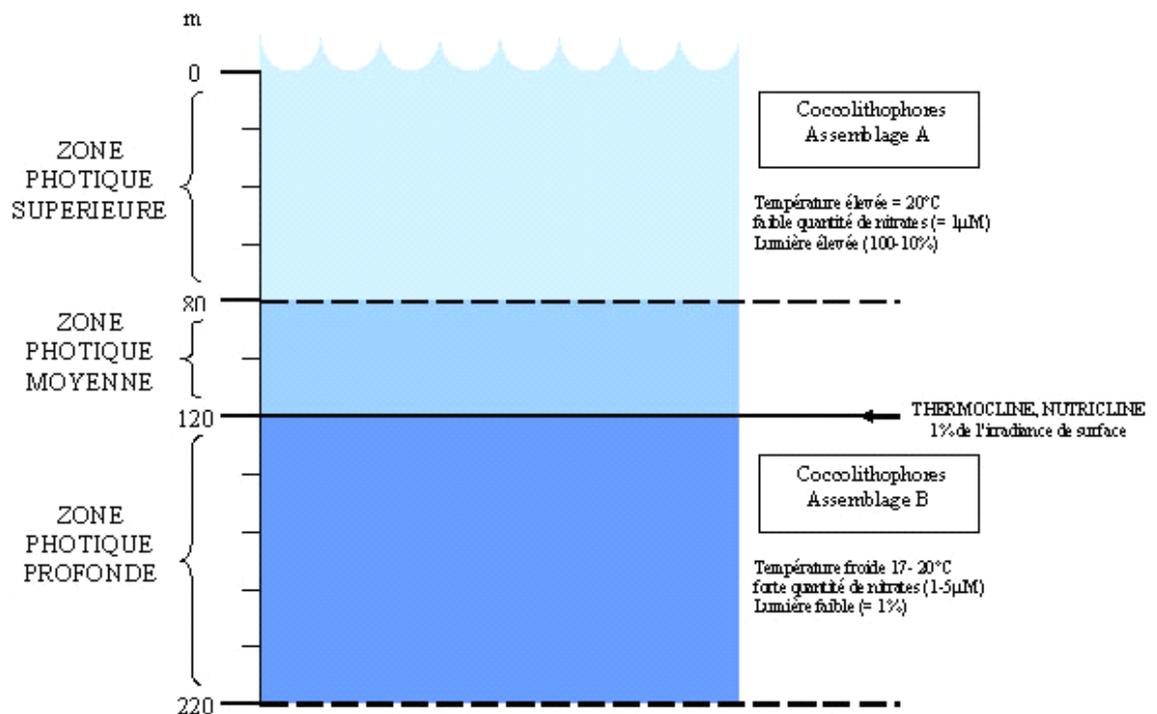


Figure I-9 : Schéma de la zonation verticale des coccolithophores dans la zone subtropicale, d'après Jordan (résultats non publiés) dans Winter *et al.* (1994).

La colonne d'eau est divisée en trois parties : la zone photique supérieure entre 0-80m, la zone photique moyenne, entre 80-120m, et la zone photique profonde entre 120-220m. Dans la première, un assemblage particulier de coccolithophores est principalement rencontré. Il est caractérisé par la présence des holococcolithophores, de *R. clavigera*, *Discosphaera tubifera*, *Umbellosphaera* spp, *Acanthoica quattrosipina* et *Ceratolithus cristatus* sous ses deux phases (assemblage A). Dans la zone suivante, entre 80-120 m, les espèces rencontrées sont caractéristiques des deux autres zones, c'est une zone de transition, avec notamment *Umbellosphaera tenuis* et *Syracosphaera* spp. ainsi que de nombreuses autres espèces à placolithes. Dans la zone photique plus profonde, des espèces typiques comme *Florisphaera*

profunda, *Hayaster perplexus*, *Algirosphaera quadricornu*, *Turrilithus latericioides* et *Syracosphaera anthos* domine les assemblages de coccolithophores (assemblage B).

Malgré tout, de nombreuses zones océaniques sont encore mal connues quant à la répartition des coccolithophores. De plus, les facteurs régissant cette distribution sont eux aussi encore très flous. Toutefois, les assemblages de coccolithophores sont le plus souvent associés à des masses d'eau et à leurs mouvements, ce qui correspond à la notion de zonation dynamique.

Cette distribution est fortement liée au mode de stratégie de survie des différentes espèces. Dans leur ensemble les coccolithophores sont plutôt considérées comme des organismes à stratégie de type K (espèces spécialistes qui augmentent leur efficacité et leur spécificité par rapport aux autres espèces) au contraire des espèces de type r qui ont un très fort taux de croissance et sont opportunistes (Tableau I-3 d'après Young, 1994). Toutefois certaines espèces de coccolithophores s'approchent d'un comportement de type r, comme *Emiliania huxleyi*. Ces stratégies écologiques ont été définies pour certaines coccolithophores mais sans tenir compte le plus souvent de leur cycle biologique potentiel ou connu.

III. OBJECTIFS DE LA THESE

Depuis environ 40 ans, des cycles de développement complexes ont donc été progressivement mis en évidence chez des haptophytes, et notamment chez les coccolithophores. Néanmoins, aucune étude n'a été jusqu'à présent entreprise afin de déterminer l'influence de ces cycles sur l'écologie et la biogéographie de ces organismes. Ce travail de thèse fut donc orienté vers une meilleure compréhension de la biologie des coccolithophores en intégrant le phénomène de reproduction sexuée (cycle hétéromorphe) dans des expériences d'écophysiologie, dans le but notamment d'apporter des pistes complémentaires pour la compréhension de leur écologie.

Dans un premier temps, un bilan des connaissances actuelles sur la culture des coccolithophores dans le monde fut nécessaire. Ces microalgues sont en effet réputées comme étant difficiles à cultiver et il apparaissait intéressant d'optimiser au mieux les méthodes de cultures employées au sein du laboratoire avant toute étude écophysiologique. Cette étude bibliographique, rassemblant également des observations personnelles, a fait l'objet d'un

Tableau I-3 : Assemblages phytoplanctoniques et leurs stratégies écologiques, d'après Young (1994).

STAGES (Margalef 1967)	I	II/III	IV
Turbulence	High	→	low
Stability	Low	→	high
Nutrients - Nitrate	≥10 μM	→	≤1 μM
Typical environments	eutrophic early bloom estuarine upwelling core	mesotrophic later bloom coastal upwelling fringes	oligotrophic post blooms open ocean open ocean
Production (carbon/day)	>50-5g/m ²	5-0.5g/m ²	0.5-0.05g/m ²
GENERAL CHARACTER OF ALGAE			
Abundance (cells/litre)	10 ⁵ -10 ⁷	10 ⁴ -10 ⁶	≤10 ³
Diversity	low	moderate → high	high → low
Division rate	≥1/day	→	≤1/week
Chlorophyll content	high	→	low
Motile forms	rare	→	common
Symbiosis & heterotrophy	rare	→	common
Complex test forms	rare	→	common
Ease of culturing	easy	→	very hard
DIATOMS			
Relative importance	=====+++++		
Size	small - medium	medium - large	medium - very large
Typical genera	<i>Thalassiostra</i>	<i>Chaetoceros</i>	<i>Hemiaulus</i>
DINOFLAGELLATES			
Relative importance	-----+++++		
Typical genera		<i>Ceratium</i>	<i>Ornithocercus</i>
COCCOLITHOPHORES			
Relative importance	-----+++++		
Typical genera		<i>Emiliania</i>	<i>Discosphaera</i>
ECOLOGICAL STRATEGY			
	r / opportunist (growth rate maximizing)	→	K / specialist (efficiency maximizing)
COCCOLITHOPHORE TYPES			
Placolith bearing	-----+++++		
Miscellaneous group	-----+++++		
Umbelliform	-----+++++		
Florifera	n/a		

Based on schemes in standard references (Margalef, 1958, 1967, 1978; Kilham and Kilham, 1988) except as noted below.
 Production – my figures, mesotrophic and oligotrophic figures based on annual production estimates, hypertrophic figure based on biomass present in blooms.

Relative importance of phytoplankton groups – my synthesis of less explicit discussions (typical genera from Margalef, 1978).

Relative importance of coccolithophore types – my interpretation.

Relative importance symbols:

===== Dominant component of assemblage.

+++++ Significant component of assemblage.

----- Minor component of assemblage.

chapitre au sein de l'ouvrage « *Coccolithophores - From molecular processes to global impact* » et correspond au chapitre II de ce manuscrit.

à Suite à cette analyse des techniques de cultures, les différentes espèces de coccolithophores sélectionnées comme modèle d'étude sont présentées, tant d'un point de vue systématique et biologique qu'écologique. Les informations existantes sur les quatre espèces choisies, *Emiliana huxleyi*, *Coccolithus pelagicus*, *Calcidiscus leptoporus* et *Coronosphaera mediterranea* sont rassemblées dans le chapitre III.

Un travail plus approfondi sur les cycles des espèces étudiées a ensuite été réalisé par le biais d'observations en microscopie photonique et par celui de la cytométrie en flux en collaboration avec l'équipe UMR 7127 CNRS-UMPC du Dr Daniel Vaultot (département Adaptation et Diversité en Milieu Marin, équipe Phytoplancton de la Station Biologique de Roscoff) afin de vérifier l'existence du cycle digénétique hétéromorphe et de prouver son caractère haplo-diploïde. Cette partie a été soumise et acceptée dans la revue *Systematics and Biodiversity* et correspond au chapitre IV de ce manuscrit.

Subséquentement, des expériences d'écophysiologie ont été mises en place. Les espèces sélectionnées ont été soumises à différentes conditions de cultures sous leurs deux phases afin d'observer le comportement intraspécifique (entre les deux phases du cycle d'une espèce) et interspécifique (entre espèces) face à ces variations. L'ensemble des expériences réalisées est décomposé dans trois chapitres distincts. Les résultats obtenus concernant la nutrition de ces espèces et leur comportement vis à vis de deux facteurs abiotiques, la température et la turbulence sont présentés dans le chapitre V. Les chapitres VI et VII sont consacrés à un seul facteur abiotique, majeur pour les organismes photosynthétiques, la lumière. La partie VII est particulièrement focalisée sur le comportement photosynthétique d'*Emiliana huxleyi* et correspond à un article soumis à *Marine Ecology Progress Series* en novembre 2003.

L'étude bibliographique, menée tout au long de ce travail sur les Prymnesiophyceae, révèle que la production de toxines est un phénomène commun à de nombreuses espèces appartenant à ce groupe. Aussi, l'idée de tester la toxicité de quelques espèces de coccolithophores, parmi celles cultivées au laboratoire est apparue comme potentiellement intéressante et les résultats obtenus sont synthétisés dans le chapitre VIII. Il fait l'objet d'un article soumis à *Journal of Plankton Research* en août 2003.

Dans le chapitre IX, une synthèse des résultats obtenus au cours de cette thèse est présentée sous forme de conclusion générale, ainsi que les perspectives qui se dégagent des travaux menés au cours de cette thèse.

Chapitre II :



LA CULTURE EN LABORATOIRE DES COCCOLITHOPHORES

Photo: A.Houdan

La culture en laboratoire des coccolithophores

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un chapitre d'ouvrage, avec comité de lecture international, actuellement sous presse :

Ian Probert et Aude Houdan. « The Laboratory Culture of Coccolithophores ». In: "Coccolithophores - From molecular processes to global impact", Thierstein H.R. et Young J.R. (eds). SpringerVerlag, Germany (sous presse).

Résumé :

Les coccolithophores sont des microalgues cultivées depuis maintenant près de 75 ans. Durant cette période de nombreux progrès ont été réalisés concernant les techniques de cultures et le nombre d'espèces cultivées a lui aussi progressivement augmenté. A certains égards, notre connaissance de la biologie des coccolithophores est aussi avancée que celle d'autres groupes mais cela est ceci tient surtout au fait qu'un grand nombre d'expérimentations se sont focalisées sur deux espèces faciles à cultiver, *Emiliana huxleyi* et *Pleurochrysis carterae*. On peut d'ailleurs prédire que *E. huxleyi* continuera à servir d'espèce modèle dans la cadre d'études expérimentales liées aux problèmes de changements climatiques globaux. On constate cependant un manque considérable de données comparatives concernant les autres espèces de coccolithophores, et de ce fait notre compréhension de la biodiversité au sein de ce groupe reste encore assez limitée. Un potentiel considérable existe toutefois pour remédier à ce manque de connaissance et ce en exploitant mieux les souches existantes d'autres espèces de coccolithophores conservées dans les collections de par le monde.

Bien que les coccolithophores se semblent apparemment pas plus difficiles à maintenir en culture que d'autres groupes phytoplanctoniques, il n'en demeurent pas moins que la majorité d'entre elles ne sont pas encore cultivées de façon courante et aisée. Il s'avère que l'habitat et la phylogénie influencent fortement les collections actuelles de coccolithophores : jusqu'ici, les techniques utilisées semblent plus adaptées à aptes à faire pousser des espèces de stratégie r, provenant de milieux eutrophiques ou intermédiaires, que des espèces à stratégie K

rencontres dans les habitats océaniques oligotrophiques. Ceci peut être dû au fait que personne n'a jusqu'à présent essayé de les cultiver, mais il est probable aussi que cette absence d'espèces oligotrophiques en culture est liée à des limitations inhérentes aux techniques de cultures actuelles et aux milieux de culture utilisés. Le milieu K est semble-t-il le plus adapté pour cultiver les espèces de coccolithophores océaniques, mais d'autres avancées, notamment dans la réduction des concentrations des macro- et des micro-nutriments et l'utilisation potentielle de nutriments d'origine organique, seraient également nécessaires.

Abstract :

Coccolithophores have now been cultured for over 75 years. This period has witnessed progressive improvements in culturing techniques and a steady increase in the number of coccolithophores which have been brought into culture. In certain respects our knowledge of the biology of coccolithophores is as advanced as that in any other group of microalgae and this is due in large part to culture experiments which have focussed on two easily cultured species, *E. huxleyi* and *P. carterae*. A continued emphasis on *E. huxleyi* in culture investigations linked to global change issues is to be expected. There is, however, a definite lack of comparative culture data for other coccolithophore species and hence our comprehension of the biodiversity within this group is currently rather limited. There is considerable potential for addressing this situation by further exploiting existing cultures of other coccolithophore species currently maintained in collections around the world. While coccolithophores do not appear to be intrinsically more difficult to culture than other microalgal groups, the fact remains that the majority of coccolithophores have not yet been successfully cultured. There is a strong habitat and phylogenetic bias in our present culture collections: to date, culture techniques have been quite successful in culturing the more *r*-selected species from eutrophic and intermediate habitats, but there are few cultures of *K*-selected species from oceanic oligotrophic habitats. This may be because no-one has ever tried to culture these species, but is probably also related to limitations inherent with current culturing techniques and culture media. K medium is perhaps the best available option for successful culturing of oceanic coccolithophores, but further advances, including the reduction in concentration of macro- and micro-nutrients, and the possible use of organic nutrients, should also be considered.

I. INTRODUCTION

Unicellular planktonic algae form the basis of the marine food chain and due to the huge size of the world ocean and hence their sheer number, they are responsible for an important part of global primary production and influence biogeochemical cycles on a global scale. The key to explaining present and past phytoplankton biodiversity and distributions, and thus also predicting future responses to global change, is information on the basic biology of individual species (e.g. morphological, ultrastructural, genetic, biochemical, physiological, behavioural and life history characteristics) and understanding of how these biological features interact with environmental conditions to promote the selection of one species over another. The extraordinary diversity and minute size of phytoplankton, together with the relative inaccessibility of their habitats, mean that the amount of information on individual species that can be obtained by *in situ* studies is restricted. Developing techniques for the automated sorting of phytoplankton cells or for molecular analysis of bulk samples promise an increasing emphasis on species-specific studies in the natural environment, but these techniques have certain inherent limitations, not the least of which is the requirement for *ex situ* calibration. The principal source of much of the species-specific basic biological information has been up until the present time, and is likely to remain for the foreseeable future, observations and experimentation on microalgae maintained *ex situ* in laboratory cultures. In a broad sense, culturing refers simply to *ex situ* growth, but the modern concept of microalgal culturing can be defined as the perpetual *ex situ* maintenance of monoalgal populations. In this context, the use of clonal cultures (i.e. cultures originating from the isolation of a single cell) has the particular advantage of permitting the non-simultaneous investigation of multiple aspects of the biology of the species, with the theoretical assurance that all studies are conducted on the same biological entity.

In terms of abundance, the coccolithophores are considered to be one of the three main marine phytoplankton groups (along with the diatoms and the dinoflagellates). This group of calcifying haptophytes includes two phylogenetically distant species, *Emiliana huxleyi* and *Pleurochrysis carterae*, which are among the most extensively studied of all microalgal species in culture experiments. Paradoxically perhaps, it is often stated that coccolithophores are difficult to culture. It is a fact that of the approximately 200 extant species of coccolithophore only a small fraction have ever been successfully cultured, and this has introduced a strong bias in our actual knowledge of the biology of this group. The first aim of this chapter is to review the history of the laboratory culture of coccolithophores and of the

utilisation of this resource, and in this context cultured strains of coccolithophore species currently being maintained in the main service collections around the world are listed. Secondly, on a practical level, an overview of the methods involved in culturing microalgae is presented with special reference to examples from the literature and from our own experiences of how these methods have been applied to the isolation and culture of coccolithophores. Finally, perspectives for the future exploitation of the existing culture resource are assessed, and prospects for increasing the taxonomic range of coccolithophores maintained in culture are discussed.

II. A BRIEF HISTORY OF THE CULTURE OF COCCOLITHOPHORES

The early history of microalgal culturing was reviewed by Allen and Nelson (1910). The first reported culture of marine phytoplankton was in 1890 by P. Miquel. Early efforts were successful in the culture of inshore coastal species, mainly diatoms and chrysophytes, all of which have high environmental tolerances. This was in part due to limitations of the culture media, but also due to focus on the easily accessible coastal environment for sampling. Coccolithophores were first correctly identified as unicellular algae in the 1870s and the early twentieth century saw intensive systematic work on extant (most often fixed, but sometimes living) and to a lesser extent fossil material (see review by Siesser 1994). Aspects of the cytology of coccolithophores were described for living coccolithophores and Klebs (1893) even reported division of cells of the freshwater coccolithophore *Hymenomonas roseola*. This could arguably be considered to have been the first coccolithophore culture (i.e. *ex situ* growth), but these unenriched mixed samples were not maintained past this division stage. Several decades passed before coccolithophores were first maintained for extended periods of time in monoalgal laboratory cultures. Non-clonal strains of both *Ochrosphaera neapolitana* (Schussnig 1930; Schwarz 1932) and *Hymenomonas roseola* (Schiller 1930) were obtained by serial sub-culture of enriched mixed samples. Schiller (1926) also studied *Pontosphaera* (= *Emiliana*) *huxleyi* (although from the illustrations this designation is doubtful), *Syracosphaera pulchra*, *Syracosphaera* (= *Coronosphaera*) *mediterranea* and the holococcolithophore *Calyptrorphaera oblonga* from enriched mixed samples, but long-term cultures of these species were not established. (N.B. current taxonomic nomenclature is substituted for outdated terminology hereafter). Schiller (1930) and Kamptner (1941) both stressed the importance of being able to study coccolithophores in culture, and the latter author remarked that experiments to culture coccolithophores had not been very successful up

until that time and consequently little was known about conditions and rules of the different reproduction processes. The first monoalgal cultures of *E. huxleyi*, which were attained by the serial dilution method, were reported by Braarud (1945), while the first clonal coccolithophore cultures were reported shortly afterwards by Braarud and Fagerland (1946) who used capillary tubes to isolate *Pleurochrysis carterae* cells into culture.

In the period between 1925 and 1950, light microscope investigations of live samples and cultured coccolithophores thus contributed to the taxonomic cataloguing and notably to the cytological characterisation of species and resulted in the first investigations into the physiology and life cycles of this group. In the early 1950s the development of powerful new microscope techniques, including cross-polarised and phase contrast illumination for the light microscope and transmission electron microscopy (TEM), vastly improved the capability to observe microalgae. During the 1950s and 1960s the Norwegian group led by T. Braarud as well as M. Parke and colleagues in England were at the forefront of investigations into numerous aspects of the morphology and fine structure of haptophytes, but whereas several non-calcifying haptophytes were brought into culture for the first time during this period, most investigations on cultured coccolithophores were conducted on species for which cultures already existed. The initial focus was on taxonomic revision based on detailed observation of the structure of the coccoliths of several species, including most of those previously cultured (e.g. *E. huxleyi* and *P. carterae*, Braarud et al. 1952; *H. roseola*, Braarud 1954). At around the same time, details of the life history of two newly cultured species, *Pleurochrysis scherffellii* (Pringsheim 1955) and *Coccolithus braarudii* (both hetero- and holococcolith bearing life cycle phases) (Parke and Adams 1960) were reported (N.B. *C. braarudii* is the large temperate form of *C. pelagicus*, recently elevated to species level by Sáez et al. 2003). The latter study was the first report of a holococcolith-bearing stage being maintained in culture, albeit that the strain had initially been isolated in the heterococcolith-bearing stage, a subsequent phase change leading to the presence of both stages in cultures. Parke and Adams (1960) stressed the importance of the study of cultures for gaining valuable information on the behaviour and life history of these organisms. As an example, the characterisation in cultures of the peculiar third appendage observed in motile coccolithophores as a haptonema (Parke et al. 1955; von Stosch 1958; Parke and Adams 1960) led to the removal of the coccolithophores from the Chrysophyceae and their placement in a new class, termed the Haptophyceae (Christensen 1962), where they joined other haptonema-bearing (but non-calcifying) genera, notably *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. The English and Norwegian groups were among the first to conduct detailed TEM

ultrastructural investigations of coccolithophores, initially using existing cultures (*C. braarudii* holococcolith-bearing phase, Manton and Leedale 1963; *C. braarudii* heterococcolith-bearing phase and *P. carterae*, Manton and Leedale 1969; *H. roseola* and *P. carterae*, Manton and Peterfi 1969; *E. huxleyi*, Klaveness 1972).

Up until the 1960s the majority of the research effort had been directed at taxonomic description and cytological characterisation of marine algae, but around this time an increasing emphasis was placed on attempting to understand species distributions and seasonal population successions. Interest in different aspects of the physiology of cultured marine algae stimulated improved analytical techniques (nutrient assays for example) and more rigorous culture methods, most notably the development of new culture media in which soil extract was replaced by specific elements (e.g. Provasoli et al. 1957; Guillard, 1975), and also standardisation of the use of clonal cultures. The large body of experimental work on the physiological ecology of coccolithophores, initiated in the 1960s notably by E. Paasche and colleagues in Norway, has been summarised in the excellent reviews of Brand (1994) and Paasche (2002) and here only the main themes and the introduction of newly cultured species will be highlighted. Early autecological experiments on nutrient, light and temperature preferences generally adopted a comparative approach using a selection of microalgal species from different classes, with the heterococcolith-bearing stages of *E. huxleyi* and *P. carterae* most often representing the coccolithophores. Through the 1970s and 1980s much interest was shown in understanding the process of coccolith formation. In this context, experimental work also centred around *E. huxleyi* (Klaveness 1972; Klaveness and Paasche 1979; Borman et al. 1982; Westbroek et al. 1984, 1986, 1989) and *Pleurochrysis* (Outka and Williams 1971; Pienaar 1971, 1976; van der Wal et al. 1983a, 1983b, 1987, Westbroek et al. 1986). Rowson et al. (1986) also investigated coccolith production in cultures of the holococcolith-bearing phase of *C. braarudii* and (unknowingly) commented on cultures of *C. pelagicus* from the Plymouth culture collection which had been isolated some years earlier. In the early 1980s, L. Brand and colleagues isolated several previously uncultured coccolithophore species, namely *Gephyrocapsa oceanica*, *Calcidiscus leptoporus*, *Umblicosphaera hulburtiana* and *U. sibogae*, and introduced them into their eco-physiological research (Brand and Guillard 1981; Brand 1981; Brand 1982; Brand et al. 1983; Brand 1984). Brand (1994) also mentioned unpublished results on cultures of *Syracosphaera pulchra*, *Reticulofenestra sessilis* and *Scyphosphaera apsteinii*.

The 1970s and 1980s saw a steady increase in the body of ultrastructural information, notably through the work of I. Inouye, R. Pienaar and co-workers in Japan and South Africa

respectively, and P. Gayral and J. Fresnel in France. Certain of these investigations were conducted on previously cultured species: *O. neapolitana* (Gayral and Fresnel-Morange 1971), *P. carterae* (Beech and Wetherbee 1988), *Pleurochrysis* sp. (Inouye and Pienaar 1985). This line of research also proved, however, the stimulus for the isolation of several previously uncultured (and in some cases previously undescribed) species: *Calyptrosphaera sphaeroidea* (the first holococcolithophore to be isolated in this phase and maintained in pure culture; Klaveness 1973), *Hymenomonas coronata* (Mills 1975), *H. lacuna* (Pienaar 1976), *Hymenomonas globosa* and *Pleurochrysis roscoffensis* (Gayral and Fresnel 1976), *Jomonolithus littoralis* (Inouye and Chihara 1983), *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* (Gayral and Fresnel 1983), *Umbilicosphaera foliosa* (Inouye and Pienaar 1984), *Cruciplacolithus neohelis* (Fresnel 1986, Kawachi and Inouye 1994), *Syracosphaera pulchra* (Inouye & Pienaar 1988), and *Pleurochrysis placolithoides* (Fresnel and Billard 1991). During these two decades the microanatomy of many cultured non-calcifying haptophytes was also being characterised, often by the same workers, and much key information for the understanding of the biology and ecology of the haptophytes as a whole was forthcoming. Phylogenetic trends in the structure of features such as the flagellar root system, Golgi-related scale formation and pyrenoid structure were (in most cases tentatively) suggested (see reviews by Green and Hori 1994; Leadbeater 1994; Pienaar 1994). Since the early 1990s, however, studies involving ultrastructural characterisation of coccolithophores (and indeed microalgae as a whole) have been less common, with only one species that had not previously been examined, the newly discovered holococcolithophore *Calyptrosphaera radiata*, being described from culture material by Sym and Kawachi (2000). It is perhaps no coincidence that this period has seen the rise in prominence of genetic methods for determination of relationships between taxa. Since it has not yet proved possible to extract DNA from single coccolithophore cells, cultures have been a prerequisite for molecular genetic studies. The molecular phylogeny of the Haptophyta published by Edvardsen et al. (2000) included several previously cultured coccolithophores, members of the families Noelhaerabdaceae, Pleurochrysidaceae and Coccolithaceae, while that of Fujiwara et al. (2001) included notably one species which had not previously been reported in culture, *Helicosphaera carteri*.

In the early 1990s, the European-based EHUX project (1992-1995) was among the forerunners of an exponential increase in the number of multidisciplinary studies focusing on the ubiquitous bloom forming species *E. huxleyi*. Much of this research was culture based, and culture experiments ever more complex in design and scope have resulted in key advances in our understanding of the biology of this species, including aspects such as the

Table II-1. List of all previously cultured coccolithophore species (taxonomy from Jordan and Green 1994, with some modifications according to recent findings, notably those of Sáez *et al.* 2003). N.B. Asterisks denote those species for which both life cycle phases have been cultured.

Tableau II-1: liste des toutes les espèces de coccolithophores jusqu'à présent cultivées (taxonomie selon Jordan et Green, 1994, avec modifications récentes, basées notamment sur celles de Sáez *et al.* 2003). N.B. Les astérisques marquent les espèces pour lesquelles les deux phases du cycle ont été cultivées.

Family	Species cultured
Noelaerhabdaceae	<i>Emiliana huxleyi</i> * (types A, B, C and R) <i>Gephyrocapsa oceanica</i> * <i>Reticulosphaera sessilis</i>
Pleurochrysidaceae	<i>Pleurochrysis carterae</i> *, <i>P. dentata</i> *, <i>P. elongata</i> , <i>P. gayraliae</i> *, <i>P. placolithoides</i> *, <i>P. roscoffensis</i> *, <i>P. scherffellii</i> *
Hymenomonadaceae	<i>Ochrosphaera neapolitana</i> * <i>Hymenomonas globosa</i> , <i>H. lacuna</i> *, <i>H. coronata</i> *, <i>H. roseola</i> <i>Jomonlithus littoralis</i>
Coccolithaceae	<i>Calcidiscus leptoporus</i> *, <i>C. quadriperforatus</i> <i>Umbilicosphaera foliosa</i> , <i>U. sibogae</i> , <i>U. hulburtiana</i> <i>Oolithotus fragilis</i> <i>Coccolithus pelagicus</i> , <i>C. braarudii</i> * <i>Cruciplacolithus neohelis</i>
Syracosphaeraceae	<i>Syracosphaera pulchra</i> * <i>Coronosphaera mediterranea</i> *
Rhabdosphaeraceae	<i>Algirosphaera robusta</i>
Pontosphaeraceae	<i>Scyposphaera apsteinii</i>
Helicosphaeraceae	<i>Helicosphaera carteri</i> , <i>H. hyalina</i> , <i>H. walichii</i>
Calyptosphaeraceae	<i>Calyptosphaera sphaeroidea</i> , <i>C. radiata</i> <i>Helladosphaera sp.</i>

relationship between photosynthesis and calcification, nutrient and trace metal physiology, pigment composition, DMS production, alkenone carbon-bond saturation and carbon isotope composition (see for example reviews by Simó 2001; Laws et al. 2001; Paasche 2002). This period has seen the first concerted application of chemostat (continuous culture) techniques and also the first mesocosm experiments involving a coccolithophore. The latter typically involve measurements of *in situ* natural mixed assemblages in semi-controlled conditions, and as such are not considered further here.

During the CODENET (Coccolithophore Evolutionary Biodiversity and Ecology Network) project (1998-2001) a targeted collection and isolation programme led to the initiation of multiple strains of six keystone genera (*Gephyrocapsa*, *Coccolithus*, *Calcidiscus*, *Syracosphaera*, *Umbilicosphaera* and *Helicosphaera*) which had been selected for integrated biological (mainly culture-based) and palaeontological research. Isolation is an intrinsically serendipitous activity, and cultures of several other species were also isolated as and when seen in samples, some of which had previously been cultured on at least one occasion (*E. huxleyi*, *Jomonolithus littoralis*, *Scyphosphaera apsteinii*) and others which were successfully cultured for the first time (*Oolithotus fragilis*, *Coronosphaera mediterranea*, *Algirosphaera robusta*, *Helicosphaera hyalina*). As a result of phase changes in some culture strains, pure cultures of the haploid (non-calcifying or holococcolith-bearing) phase of several species were also initiated, many for the first time (e.g. Geisen et al. 2002).

This brief review provides some idea of the major contribution that observation and experimentation on cultured coccolithophores has made towards attaining our current state of knowledge of the taxonomy and biology of this group. By means of a summary of the history of the laboratory culture of coccolithophores, all species which have been successfully cultured on at least one occasion since the first reported culture of *Ochrosphaera neapolitana* by Schussnig (1930) are listed in Table II-1.

III. EXISTING CULTURES OF COCCOLITHOPHORES

Table II-2 summarises all species which are currently being maintained in those culture collections world-wide for which recently updated information is available either in the form of a WWW site or a published catalogue (information correct as of June 2003). The CODENET collection has been integrated into the ALGOBANK collection at the University of Caen, France. Strains in the collections listed are available generally for a small fee which

Table II-2. Coccolithophore cultures currently maintained in the main service culture collections world-wide (list annexe 1) .**Tableau II-2:** Les cultures de coccolithophores actuellement maintenues dans les principales collections de microalgues à travers le monde (liste en Annexe 1).

Species	No. strains	CCMP	CCAP	CCCM	UTEX	PLY	CAEN	RCC	MBIC	NIES	CSIRO	SAG	Others
<i>Algirosphaera robusta</i>	1						1						
<i>Calcidiscus leptoporus</i>	22						20			2			
<i>C. quadriperforatus</i>	14						14						
<i>Calyptrosphaera sp.</i>	3						1		1				
<i>C. sphaeroidea</i>	6				1		1			4			
<i>C. radiata</i>	3						1			1		1	
<i>Coccolithus braarudii</i>	7					1	6						
<i>Coronosphaera mediterranea</i>	1						1						
<i>Cruciplacolithus neohelis</i>	9	1		1	1		2		2	1			1
<i>Emiliana huxleyi</i>	305	17	9	6	1	209	33	4	3	5	3		14
<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	86	2				3	74	1	2	3			2
<i>Gephyrocapsa sp.</i>	2								2				
<i>Helicosphaera carteri</i>	9						9						
<i>H. hyalina</i>	1						1						
<i>Helladosphaera sp.</i>	2						1		1				
<i>Hymenomonas coronata</i>	3						2			1			
<i>H. globosa</i>	1					1	1						
<i>Jomonolithus littoralis</i>	1						1						
<i>Ochrosphaera neapolitana</i>	21	6	3		1	3	3				1		5
<i>Ochrosphaera sp.</i>	3					3			3	2			
<i>O. verrucosa</i>	7	1	1		1		1						1
<i>Oolithotus fragilis</i>	21						18				3		
<i>Pleurochrysis carterae</i>	22	5	1	1	2	6	1				1	1	4
<i>P. dentata</i>	1						1						
<i>P. elongata</i>	6		1	1		1	2						1
<i>P. gayraliae</i>	6		1		1		2				1		1
<i>P. placolithoides</i>	4	1		1			1						1
<i>P. roscoffensis</i>	7	1					4						1
<i>P. scherffelii</i>	3	1	1				1						
<i>Pleurochrysis sp.</i>	18	3	1	2		8			2				2
<i>Scyphosphaera apsteinii</i>	3						3						
<i>Syracosphaera pulchra</i>	13						13						
<i>Umbilicosphaera hulburtiana</i>	1						1						
<i>U. foliosa</i>	2						1			1			
<i>U. sibogae</i>	6						3			3			
Total	620	38	18	12	8	235	224	5	16	23	6	2	33

contributes to the operational costs of these systematically under-funded collections, and hence to the continued maintenance of this important resource. A current theme of discussion among the main service collections is collation of strain information in integrated data bases, and such information may become available in the near future.

Workers conducting culture experiments using strains procured from culture collections should always take personal responsibility for (a) verifying the taxonomic identity and purity of the culture (or having this done by an expert), and (b) ensuring that current taxonomic nomenclature is applied. The mis-identification of culture strains is at best confusing and in reality usually invalidates the interpretation of results. To our knowledge, the vast majority of the coccolithophore strains listed in Table 2 were given the correct taxonomic designation at the time of identification. It is very difficult, however, for culture collection curators to keep up to date with taxonomic revisions in all microalgal classes and hence outdated nomenclature is in some cases used. The fact that coccolithophores exhibit dimorphic haplo-diploid life cycles with each stage historically having been given a different taxonomic designation, as well as the recent realisation that cryptic or pseudo-cryptic speciation may be a common phenomenon in the coccolithophores (see contributions to this volume by Geisen et al., Quinn et al. and de Vargas et al.) may complicate matters further. Examples exist in the literature of studies which have drawn conclusions based on the results of culture experiments using strains which we believe (following subsequent acquisition) to have been mis-identified, and also of the use of names invalidated decades prior to the actual studies.

IV. THE ISOLATION AND CULTURE OF COCCOLITHOPHORES

The isolation of any microalgal species into clonal laboratory culture provides the key resource which potentially enables an exponential increase in our understanding of the evolution, the biology and ecology, and the interactions of the species with the environment. Coccolithophores are generally held to be particularly difficult to culture, a scenario which could restrict the development of knowledge of this group in the future, but is this really the case?

A comparison can be made between the number of species that have been cultured and the total number of (known) species, providing an indicative value of 'success rate' for culturing. According to our estimations: 30 out of a total of 149 heterococcolithophores

(20.8%) have been cultured (since heterococcolithophores and holococcolithophores are linked in a haplo-diploid life cycle, the total number of heterococcolithophores may be the most accurate indicator of specific diversity available); 38 out of a total of 156 species (24.4%) have been cultured if members of the Isochrysidaceae, which can be considered to be coccolithophores which have lost the ability to calcify (see Sáez et al., this volume), are included; 43 out of a total of 229 (18.8%) known life cycle stages (heterococcolithophores, holococcolithophores and known non-calcifying stages) have been cultured. These calculations are obviously influenced by our current understanding of the biological species concept in coccolithophores and if, as seems increasingly likely, cryptic or pseudo-cryptic speciation is a phenomenon common across the coccolithophores (see de Vargas et al., this volume), the approximate figure of four out of every five coccolithophores which remain to be cultured may be considerably underestimated.

By contrast, the majority (>90%) of known non-coccolithophore haptophytes have been cultured. Taxonomic descriptions of microalgae which do not have a mineralised or resistant organic cell covering are, to a large extent, only possible with cultured material. Of the non-calcifying haptophytes, only certain distinctive members of the genus *Chrysochromulina* have been described without ever having been cultured. In contrast to the situation in the coccolithophores, it is likely that many non-calcifying haptophyte morpho-species remain to be described (for example, the OLI clades in the phylogenetic tree presented by Sáez et al., this volume). For the known haptophytes as a whole, the success rate of culturing is therefore currently around 40% (98 of 236 species).

These figures for coccolithophores and haptophytes as a whole compare favourably with the success rates of culturing in the other two main marine phytoplankton groups, the diatoms and the dinoflagellates. The main international culture collections listed in Table 2 hold approximately 200 species of marine diatoms and 180 species of marine dinoflagellates. According to the estimations of Sournia (1995), there are approximately 1300 described species of marine diatoms and 1700 described species of marine dinoflagellates, and the culturing success rates for these groups can thus be estimated at 15.4% for the diatoms and 10.6% for the dinoflagellates. The actual total number of cultured species in these groups is, of course, likely to be significantly higher since numerous smaller, specialised culture collections exist in laboratories worldwide, but on the other hand species diversity in these groups is also suggested to be seriously underestimated (Andersen 1992).

In relative terms, coccolithophores do not appear, therefore, to be substantially more difficult to culture than other groups of microalgae. This conclusion, although in some

respects potentially misleading, does serve to make the point that coccolithophores should not be automatically considered as especially difficult to bring into culture, a view which would be likely to discourage future attempts to isolate previously uncultured species. The fundamental point which should be retained from this analysis, however, is that the vast majority of species in most taxonomic groups of microalgae, including the coccolithophores, have never been successfully cultured. This fact has critical consequences for our understanding of microalgal biodiversity and marine ecosystem functioning, and the need to address this issue is one of the key challenges in marine biology today, although the difficulty in funding such specific research (and in funding culture collections in general) reflects the general lack of awareness of this problem among policy makers.

Over the years several excellent reviews of microalgal culturing techniques have been published (e.g. Provasoli et al. 1957; Provasoli and Pintner 1960; Stein 1973; Guillard 1975; Guillard and Keller 1984; Brand 1990). In general, the methods that have been used for culturing coccolithophores do not differ greatly from those typically used for other microalgae. We do not, therefore, intend to provide an exhaustive methodological guide (for which readers should refer to these previous reviews and the references therein), but rather a general overview of the principles and methods involved together with specific examples from the literature and from our own experience of how these have been applied to the culture of coccolithophores. The examples from the literature and the statistics given are drawn from a review of over 100 publications involving diverse aspects of the study of cultured coccolithophores. This list is clearly not inclusive, but the trends observed are believed to be representative and are certainly interesting and informative. For example, of all of the culture manipulations in this survey (involving 29 species in total), over three quarters employ one of three species: 53% involve *E. huxleyi*, 15% *P. carterae* and 8% *G. oceanica* (an exhaustive literature review would very probably accentuate the dominance of these species in culture studies).

1. Collection and Transportation of Samples

Finding microalgae is not hard...(Brand 1990). A rigorous enough search will reveal coccolithophores (at least cells of *E. huxleyi*) in a litre of water sampled just about anywhere in the surface waters of the world oceans. A wide variety of techniques can be used for the initial collection of microalgal samples, and these can be broadly categorised into collection of unconcentrated or concentrated samples. Unconcentrated samples can be collected simply by dipping a clean PVC bottle or bucket into surface water (this, along with scraping of rocks,

is the only practical method for collection of the littoral coccolithophore species), or can be collected at different depths using more sophisticated devices such as Niskin bottles. Shipboard pumps can also be used, but in our experience only the most robust species survive this collection method. Following sampling, ideally the microalgae in the samples should be exposed to as little stress as possible, but for practical purposes it is most often necessary to concentrate the microalgal cells in these samples prior to isolation. This can be achieved by filtration, either through membrane filters followed by resuspension in a small volume of seawater (all but the gentlest filtration is likely to damage the more fragile coccolithophores), or through Nitex sieves of 5 or 10 μm pore size for the larger species. Alternatively, non-motile coccolithophores can be concentrated by sedimentation, and at least some motile species / stages by application of a concentrated light source to one part of the sample container (the majority of motile coccolithophores currently maintained in culture are positively phototactic). The use of Nitex plankton nets allows the *in situ* processing of larger volumes of seawater and hence the collection of pre-concentrated samples. Again, however, the smaller and more delicate coccolithophore species are not likely to be present or intact in net samples. Following collection and concentration it is often advisable to filter the sample through a 50-100 μm metal sieve in order to remove the larger zooplankton grazer species, particularly if isolations cannot be conducted immediately.

In general it is very important to transport samples at or below the temperature of collection (usually a cool-box is necessary). During prolonged transportation (during scientific cruises for example) the sample bottles should receive some light, but not direct sunlight. For transport from port to laboratory or postage from laboratory to laboratory, sample bottles should be completely filled in order to minimise turbulent mixing. In our experience, customs officials around the world rarely understand the meaning of the term phytoplankton and even less so coccolithophore, and hence in order to avoid critical delays it is perhaps advisable, when possible, not to volunteer information about samples or at least to remain vague when questioned about their contents. Correct procedures for the disposal of algae in the laboratory should, of course, at all times be followed in order to prevent the introduction of 'alien' species to local waters.

2. Isolation techniques

...but growing them may be (Brand 1990). In general, the objective is the establishment of a genetically uniform (clonal) strain by the isolation of a single cell. There are several ways of isolating a single cell into culture (see reviews cited above for detailed

descriptions of these methods). Micropipette isolation has proved the most successful method for isolating heterococcolithophores. This method is best conducted using either an inverted or a binocular dissecting microscope. The higher magnification of the former has certain advantages (the isolator is more likely to be able to distinguish between algal cells, and smaller cells are more easily observed), but using a dissecting microscope generally allows a greater number of isolations in a shorter time. Since many coccolithophore species are susceptible to temperature fluctuations, we advocate the latter method, following the principle of isolating anything which vaguely resembles a coccolithophore and identifying and selecting those which subsequently grow. Alternatively, an ice block can be placed under the microwell plate in order to minimise overheating of the isolation medium during prolonged isolation sessions. Under the dissecting microscope coccolithophores can be distinguished by the (usually dark) halo which surrounds the cell (corresponding to the coccosphere) and for motile species / stages by their characteristically slow, gently rotating swimming motion. For reference purposes, higher magnification light microscope images of a number of coccolithophore species are available on the CODENET website (http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/ina/CODENET). Since different coccolithophore species have different medium preferences (see below), it is advisable to use a variety of media and a range of medium concentrations (including unenriched) when isolating, where possible using sterilised seawater from the sampling location as the medium base.

The preferred method is to isolate single cells from the sample before any enrichment, thus avoiding the problem of selecting preferentially for those species or genotypes that grow most rapidly under the prolonged sampling or enrichment procedure used (Brand 1990). Even when this is possible, it may prove useful to enrich a series of sub-samples with a variety of (improvised) medium enrichments, with and without germanic dioxide (an inhibitor of diatom growth); often species which were at very low abundance or were undetected in the original sample become more abundant, increasing the chance of successful isolation.

Of the other methods which have been successfully employed for coccolithophores (either in the literature or from our experience), serial-dilution culture may be particularly suitable for smaller and more delicate species, but this method is very time-consuming, produces cultures primarily of the dominant species which can usually be isolated by standard methods, and the clonality of the cultures cannot be guaranteed. Isolation from streaked agar plates has been used for the inshore / littoral coccolithophores (see below), which, however, are generally not difficult to isolate by micropipette.

With a little innovation, it is entirely possible to reduce the volume of equipment needed for the isolation and culture of phytoplankton to a portable size and to conduct isolations on-board scientific vessels or in other non-laboratory locations.

3. Culture media

Media for the culture of marine phytoplankton consist of a seawater base (natural or artificial) typically supplemented by various nutrients essential for microalgal growth.

a) Seawater base

The quality of water used in media preparation is very important. Natural seawater can be collected near-shore, but its salinity and quality is often variable and unpredictable (due for example to anthropogenic pollution or toxic metabolites released by algal blooms in coastal waters). The quality of coastal water may be improved by ageing for a few months (allowing bacterial degradation of inhibitory substances), by autoclaving (heat may denature inhibitory substances), or by filtering through acid-washed charcoal (which absorbs toxic organic compounds). Most coastal waters contain significant quantities of inorganic and organic particulate matter, and therefore must be filtered before use (e.g. Whatman no. 1 filter paper). The low biomass and continual depletion of many trace elements from the surface waters of the open ocean by biogeochemical processes makes this water much cleaner, and therefore preferable for culturing purposes, but it is often difficult and expensive to procure. All coccolithophore species in the CODENET collection are maintained in aged, filter-sterilised seawater collected in the Baie de Seine off the Normandy coast, and are thus clearly able to grow in what must be considered low quality seawater. The coccolithophores cultured to date are for the most part those found in eutrophic waters, and oligotrophic adapted species are likely to be much more sensitive to water quality. In all cases certain precautions should be taken, such as the collection of seawater in clean polyethylene carboys from the front of the boat (or pump from subsurface), in order to minimise the risk of contaminating the seawater base.

The literature survey reveals that 94% of culture manipulations of coccolithophores have been conducted in media with a natural seawater base. The alternative, artificial seawater made by mixing various salts with deionised water, has the advantage of being well-defined from the chemical point of view, but they are very laborious to prepare and often do not support satisfactory algal growth. Trace contaminants in the salts used are at rather high concentrations in artificial seawater because so much salt must be added to achieve the

salinity of full strength seawater, and hence it is essential to utilise reagent grade chemicals (see Berges et al. 2001). Among the more successful artificial seawater media that have been developed are the ESAW medium of Harrison et al. (1980) with modifications outlined by Berges et al. (2001), and the AK medium of Keller et al. (1987). In the literature only 3 coccolithophore species, *E. huxleyi*, *G. oceanica* and *P. carterae*, have been cultured in artificial seawater media. A wide variety of artificial seawater recipes have, however, reportedly been used. In our trials (unpublished results), the diploid heterococcolith-bearing stages of several of the coastal coccolithophore species (Pleurochrysidaceae and Hymenomonadaceae) as well as members of the Noelhaerhabdaceae and the Coccolithaceae which are maintained in the CODENET collection showed acceptable growth in artificial seawater (at best equivalent to growth in natural seawater media), ESAW proving the most suitable and aquarium salt mixes the least suitable of the recipes tested. The non-calcifying flagellate phase of *E. huxleyi* was the only motile coccolithophore other than the coastal species which was able to grow in ESAW medium, albeit at a reduced rate relative to natural seawater medium. Artificial seawater media are particularly useful (and in some cases essential) for investigations of the nutrient physiology of microalgae, but further manipulations of the available recipes are clearly required before studies of this kind can be conducted on a representative selection from across the phylogenetic diversity of cultured coccolithophores.

b) Medium supplements

Since the first simple culture medium recipes of the early nineteenth century, there has been a general trend towards the use of lower nutrient concentrations and more well-defined (often synonymous with more complex) and reproducible culture media as the specific nutrients needed became known (Brand 1990). As a result, a wide range of culture medium recipes can be found in the literature, and in addition many workers have tended to make minor adjustments to these recipes to suit the requirements of their algae of interest or sometimes according to a personal whim. In our survey, three medium recipes (or dilutions thereof) accounted for nearly two thirds of culture manipulations with coccolithophores. The most commonly employed medium supplement (40%) is f/2 (Guillard 1975), followed by K (Keller et al. 1987) with 17% and Erdschreiber with 6%. The latter is the only one of the three to include soil extract and, for reasons outlined below, this medium recipe has rarely been employed in recent times. In practise, dilutions of f/2 and K medium (e.g. 10%, equivalent to f/20 or K/10) are sufficient to maintain good growth of the majority of coccolithophores

cultured to date. The recipes of these and a variety of alternative marine culture media are available on the WWW pages of the major culture collections (see Table 2 for URL addresses).

It was first discovered that soil extracts were beneficial to the growth of many marine phytoplankton in the 1920s. It is now known that soil extract provides various trace elements and vitamins essential for algal growth, metal complexing organic compounds that sequester potentially toxic metals, and organic compounds which keep iron in solution and allow for its photoreduction. The disadvantage of using soil extract lies in its unquantified and highly variable composition. As the functions of different components of soil extract have been identified, it has been replaced by specific compounds. In our experience the addition of soil extract to the culture medium is beneficial to the growth of all haploid (motile non-calcifying or holococcolith-bearing) stages of coccolithophore species in the CODENET collection, as well as to the diploid heterococcolith-bearing stages of the two members of the Syracosphaeraceae, *S. pulchra* and *C. mediterranea*, that are in culture. Soil extract is routinely filtered through 1µm filter paper and autoclaved, but when an additional filter-sterilisation step is employed using 0.2µm membrane filters its beneficial effects to the growth of these species / stages are reduced (Houdan, unpublished data)¹. It seems likely that the retention of particulate organic matter and possibly dissolved organic molecules on the membrane filter is responsible for this difference; phagotrophy has been reported in several non-calcifying haptophytes as well as the haploid stage of *C. braarudii* (Parke and Adams 1960), and some coccolithophores may be capable of utilising dissolved organic molecules (see Brand 1994). For diploid stages of the coastal coccolithophores the addition of soil extract is neutral, whereas for the diploid stages of all other species maintained it has a negative impact on growth (Houdan and Probert, unpublished results²). While sometimes useful for isolation and routine maintenance purposes, soil extract should only be used on a non-experimental basis.

Most coccolithophores that have been cultured are autotrophic (or more accurately auxotrophic) and can utilise inorganic forms of macronutrients. Nitrate is the nitrogen source most often used in culture media, but may be toxic to oceanic species, potentially even at a fraction of the high concentrations used in most culture media. Ammonium is the energetically preferential form of nitrogen for many algae since it does not have to be reduced prior to amino acid synthesis, the point of primary intracellular nitrogen assimilation into the

¹ Voir Chapitre V pour plus de détails

² Voir Chapitre V pour plus de détails

organic linkage. For cultured *E. huxleyi*, several recent studies (Flynn et al. 1999; Page et al. 1999; Varela and Harrison 1999) have shown a 50% depression of nitrate uptake rates by ammonium concentrations in the region of 0.2-0.5 μ M. It is well known that ammonia can be toxic at high concentrations because of its high permeability through the cell membrane, and Brand (1986) recommended the use of 10 μ M or less, concentrations which can generate easily detectable biomass levels, in attempting to culture oceanic phytoplankton.

Organic nitrogen compounds that can be used by at least some *E. huxleyi* clones include a few amino acids (Ietswaart et al. 1994) and low molecular weight amides and, in the presence of nickel ions, also urea and purines such as hypoxanthine (Palenik and Henson 1997). Many microalgae are also capable of using a variety of dissolved organic carbon compounds (Droop 1974), among these coccolithophores in the littoral genus *Pleurochrysis* (see Paasche 1968). Another group of organic compounds known to be required by many phytoplankton is the vitamins. Roughly half of all microalgal species tested have been shown to have a requirement for vitamin B12, which appears to be important in transferring methyl groups and methylating toxic elements such as arsenic, mercury, tin, thallium, platinum, gold, and tellurium, around 20% need thiamine, and less than 5% need biotin, while no other vitamins have ever been demonstrated to be required by any photosynthetic microalgae (Brand 1986). *E. huxleyi* requires thiamine, but not vitamin B12 (Carlucci and Bowes 1970), but with the lack of comparative data for other coccolithophores it is probably prudent to systematically add these three vitamins to culture media.

The main problem with the use of dissolved organic compounds in culture media is that bacteria, with a high surface area to volume ratio relative to microphytoplankton, are superior competitors when low concentrations of these substances are employed. This would suggest the need to take steps to axenicise the cultures, which may be problematic for delicate oceanic species. It is also known, however, that the growth of some microalgae is stimulated by the presence of bacteria, possibly due to the secretion by bacteria of substances, for example photosensitive vitamins (Brand 1986), which are needed by the phytoplankton but not present in the media. In addition, inobligate phagotrophy is probably widespread in the haptophytes (see Billard and Inouye, this volume) and bacteria may thus represent a potential food source. Until more is known about the potential role of organic nutrients in coccolithophore nutrition, it is advisable to try out different compounds and methods simultaneously when isolating new coccolithophores.

Inorganic (ortho) phosphate, the phosphorus form preferentially used by microalgae, is most often added to culture media, but organic (glycero) phosphate is sometimes used,

particularly when precipitation of phosphate is anticipated (when nutrients are autoclaved in the culture media rather than separately, for example). In culture experiments, *E. huxleyi* has been demonstrated to have an extraordinarily high affinity for orthophosphate, and phosphorus-limited cells subjected to an external phosphate pulse were shown to accumulate surplus phosphate in amounts up to seven times greater than the steady state phosphorus cell quota (Riegman et al. 2000). Furthermore, the presence of cell surface constitutive as well as inducible alkaline phosphatases enables *E. huxleyi* to use organic phosphate esters at the nanomolar concentration level (Riegman et al. 2000). There is no comparative data for phosphate uptake and storage in other coccolithophores, but the use of inorganic phosphate should theoretically be suitable for the culture of oceanic species.

The trace metals which are essential for microalgal growth are incorporated into essential organic molecules, particularly a variety of coenzyme factors which enter into photosynthetic reactions, and hence they exert important controls on growth limitation by the major algal resources - light, inorganic carbon and nitrogen (see review by Sunda 2000). Of these metals, the free ionic concentrations of iron, zinc, manganese, cobalt, copper, cadmium, selenium and possibly certain other elements in natural waters may influence microalgal growth, either as nutrients or as toxins. The relationships between chemical speciation of metals and biological availability are complex. Chelators act as trace metal buffers, maintaining constant concentrations of free ionic metal. Without proper chelation some metals (such as copper) are often present at toxic concentrations, and others (such as iron) tend to precipitate and become unavailable to phytoplankton. In natural seawater, dissolved organic molecules (generally present at concentrations of 1-10mg l⁻¹) act as chelators. The most widely used chelator in culture media additions is ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), which must be present at high concentrations since most complexes with Ca and Mg, present in large amounts in seawater. High concentrations have, however, occasionally been reported to be toxic to microalgae. As an alternative the organic chelator citrate is sometimes utilised, having the advantage of being less influenced by Ca and Mg. The molar ratio of chelator: metal in culture media ranges from 1:1 in f/2 to 10:1 in K medium. High ratios may result in metal deficiencies for coastal phytoplankton (i.e. too much metal is complexed), but are suitable for oceanic species for reasons outlined below. The inorganic complexation (and hence the free ionic concentrations) of trace metals in culture media can be calculated through the use of thermodynamic models (see Twiss et al. 2001).

Algal species isolated from oceanic environments, where trace metal concentrations are very low, are able to grow at much lower concentrations of ionic iron, zinc and manganese

than species isolated from coastal environments. Both the iron (Brand 1991; Muggli and Harrison 1996, 1997) and zinc (Sunda and Huntsman 1992, 1995) requirements of *E. huxleyi* are low relative to coastal diatoms. The coccolithophores *E. huxleyi*, *G. oceanica*, *C. leptoporus*, *U. hurburtiana* and *U. sibogae* are all able to grow at much lower concentrations of iron, zinc and manganese than the coastal species *P. carterae* (Brand et al. 1983). *E. huxleyi* produces iron-binding ligands (Boye and van den Berg 2000) that may ensure availability of this metal in the natural environment. Cellular metabolic requirements for limiting metals can also be decreased by altering metabolic pathways or by changing the metalloenzyme content of key pathways; *E. huxleyi* has a primary requirement for zinc that can partially be replaced by cobalt (Sunda and Huntsman (1995). It is not known whether other coccolithophores have such adaptations, but in any case the lower growth rate of oceanic species partially solves the problem: low growth rates mean an increase in cellular concentrations at a given uptake rate (uptake rates in oceanic phytoplankton are thought to have already evolved to near their chemical and physical limits), decreasing the metabolic demand for metalloenzymes (Sunda 2000).

Using standard natural seawater-based culture medium recipes, trace metal limitation is therefore likely to be less of an issue than trace metal toxicity for the culture of oceanic species. The provision of manganese, zinc and cobalt in culture medium should not be problematical since even fairly high concentrations are not thought to be toxic to algae. High concentrations of iron could potentially inhibit phytoplankton growth (Brand 1986), although there is little experimental data to support this. Oceanic phytoplankton may be particularly sensitive to copper toxicity. *E. huxleyi* produces copper-complexing ligands (Leal et al. 1999) and is adapted to tolerate much higher concentrations of copper than other species (Brand et al. 1983). Most algae either do not need copper, or need so little that free ionic copper concentrations of 10^{-19} M are sufficient to maintain maximum growth rates (Brand 1986). Cadmium is known to interfere with calcification and it has been found that coccolithophores are more sensitive to cadmium toxicity than other phytoplankton (Brand et al. 1983). A reasonable approach to developing culture media for the culture of oceanic coccolithophores would therefore be to lower concentrations of trace metals (particularly copper and cadmium) relative to standard media and also to minimise concentrations of chelators by calculating the exact amount necessary to maintain the desired free ionic metal concentrations. In order to avoid unwanted trace metal contamination, oceanic seawater (or ultra-clean bi-distilled water for artificial media) and highest quality reagent grade chemicals are also highly recommended.

c) Agar media

Some marine microalgae grow well on solid agar substrate. Of the coccolithophores, the inshore coastal species (Pleurochrysidaceae, Hymenomonadaceae and *Cruciplacolithus neohelis*) are particularly suited to this method of culture, which is effective for long-term maintenance of these species. In our experience, certain of the non-motile placolith-bearing coccolithophores may be maintained for short periods on agar medium and this may be useful for cleaning cultures infected with bacteria (clean colonies being isolated from the plate into fresh liquid medium).

d) Sterilisation of Culture Media

Certain coccolithophore species / life cycle stages (particularly those which are motile and possess a haptonema) do not grow well in autoclaved media due to one or a combination of a number of potential factors. The high temperature and pressure during autoclaving result in significant chemical changes to seawater including pH increases (as CO₂ is driven out of solution), the formation of precipitates and the denaturation of organic compounds. Certain measures can be taken to alleviate or minimise the first two of these factors (lowering of pH by addition of HCl prior to autoclaving, the addition of buffers such as bicarbonate or TRIS, rapid cooling after autoclaving, the use of Teflon bottles during autoclaving, separately autoclaving the seawater base and medium enrichments), but in our experience these species show poor growth even when these precautions are taken. Motile microalgae are known to be particularly sensitive to precipitates in the medium (e.g. Keller et al. 1987), and as discussed above many of the motile coccolithophores may be mixotrophic and hence benefit from the presence of dissolved organic molecules in the medium, two possible reasons to account for inhibition of growth in autoclaved media. These problems can be avoided if media are filter-sterilised using 0.2µm membrane filters, but it must be remembered that viruses will pass through such filters unaffected and that given filter pore sizes are an average, not an absolute value, and therefore that some pores in these filters may be substantially larger than 0.2µm. For the routine maintenance of the CODENET collection a compromise is employed: a combination of tyndallisation (heating of the seawater to 75°C which should kill most organisms which pass through the pre-filtration, but should limit chemical changes to the seawater) followed by filter-sterilisation. For experimental purposes, the use of artificial or autoclaved natural seawater base media is often preferable.

4. *Types of culture vessel*

Culture vessels should have the following properties: non toxic (chemically inert); reasonably transparent to light, easily cleaned and sterilised, provide a large surface to volume ratio. Coccolithophores can be cultured in Erlenmeyer flasks or tubes (glass or polycarbonate) of various sizes with cotton, glass, polypropylene, or metal covers, or in polystyrene tissue culture flasks, purchased as single-use sterile units (e.g. Iwaki, Nunc, Corning). The latter have the advantage of allowing rapid observation of the state of the culture under a binocular microscope without opening the culture vessel, and although expensive, do not require technician time for cleaning / sterilisation. An anecdotal observation is that coccolithophore cultures tend to grow more slowly and reach higher cell densities in glass Erlenmeyer flasks, making these suitable for long-term routine maintenance, particularly of robust species.

5. *Pure, axenic cultures*

If biological contaminants of eukaryotic nature appear in a culture, the best solution is to reisolate a single cell from the culture with a micropipette, and try to establish a new, clean clonal culture. For some coccolithophore species, the culture can be streaked on an agar plate in the hope of attaining a colony free of contaminants. These methods are useful for minimising bacterial contaminants, but a truly axenic culture cannot be ensured. To achieve this, antibiotics must be used. The treatment of an actively growing culture with a mixture of penicillin, streptomycin and gentamycin (each at concentrations of 50-500 mg/l) for around 24 hours followed by micropipette isolation or agar streaking is generally recommended. Other antibiotics that can be used include chloramphenicol and tetracyclin. Other than for strains of the diploid phase of *E. huxleyi* and *G. oceanica* (e.g. Nanninga and Tyrell 1996, Danbara and Shiraiwa 1999), axenic coccolithophore cultures have only rarely been reported (e.g. *Helladosphaera* sp., Danbara and Shiraiwa 1999). We suspect that axenicisation of most coccolithophore species maintained in culture and particularly of motile stages will prove problematic since these may have obligate relationships with bacteria. It should also be remembered that in reality there is no way of demonstrating that a microalgal culture is completely axenic. In practise, therefore, axenic usually means ‘without demonstrable unwanted prokaryotes or eukaryotes’.

6. *Environmental parameters*

a) **Temperature**

The temperature at which cultures are isolated and initially maintained should ideally be as close as possible to the temperature at which the organisms were collected. All microalgae have an optimum temperature for growth, above which growth rates typically rapidly decline with small temperature increments; temperatures lower than the optimum for a species are better supported and should be used for routine culture maintenance. The temperature tolerances of cultured coccolithophores are reflected in their biogeographic ranges. Brand (1994) reported that of cultured coccolithophores, the coastal species *P. carterae* has the widest temperature tolerance, followed by the cosmopolitan species *E. huxleyi* and then by the warm water species *G. oceanica*, *C. leptoporus*, *U. sibogae*, *S. pulchra*, the tropical oceanic species *Scyphosphaera apsteinii* having the narrowest temperature tolerance. We have recorded a similar trend, and of note is the fact that haploid stages typically have slightly higher temperature optima for growth than their diploid counterparts (Houdan and Probert³, unpublished data). For all species maintained in the CODENET collection, a compromise temperature of 17°C is employed for routine maintenance. The literature review reveals that the majority of coccolithophore culture manipulations have been conducted at a temperature between 15 and 20°C (62%), with only 14% conducted above 20°C.

b) **Light**

Haptophytes have a photosynthetic pigment composition basically similar to that of diatoms and chrysophytes (see van Lenning et al., this volume). The levels of light required to keep coccolithophores alive and to saturate growth and photosynthetic rates do not appear to be significantly different from those of other eukaryotic phytoplankton, while species living in eutrophic waters appear to need more light than those living in oligotrophic waters (Brand and Guillard 1981). Light intensities between 0.2-50% of full daylight (1660 $\mu\text{E}/\text{s}/\text{m}^2$) can be used for microalgal cultures, with 5-10% (c. 80-160 $\mu\text{E}/\text{s}/\text{m}^2$) most often employed. Diploid stage cells of *E. huxleyi* do not show photoinhibition even at light intensities around 1000 $\mu\text{E}/\text{s}/\text{m}^2$ (Nanninga and Tyrell 1996). For the same species, culture in green and particularly blue light cause significant changes in pigment ratios relative to full spectrum

³ Voir Chapitre V pour plus de détails

light (Schlüter et al. 2000), but it is unclear whether this affects growth rates. Brand and Guillard (1981) demonstrated that the growth of oceanic coccolithophores (represented by *C. leptoporus*) is inhibited by long light photoperiods. *E. huxleyi*, *G. oceanica* and the coastal species can be grown in continuous light with little or no growth inhibition. In our survey of culture manipulations, 31% were conducted with a photoperiod of 12L:12D, 29% at 14L:10D, 20% at 16L:8D, 10% in continuous light and 10% in natural light (where photoperiod depends on location and season).

c) Salinity

A few species of coccolithophore live in freshwater or low salinity intertidal pools, but most are marine. Brand (1984) reported that, as expected, oceanic species tolerate only a narrow range of salinities and estuarine species can tolerate a much wider range. The CODENET collection, many strains of which were isolated from, and initially cultured in, high salinity Mediterranean waters (36- 37.5ppt), is maintained in relatively low salinity (32-33ppt) English Channel water, seemingly with no adverse effects.

d) Mixing

Most small volume (up to 1 litre) coccolithophore cultures grow well without mixing, particularly when not too concentrated, but when possible daily gentle manual swirling is recommended. Mixing of microalgal cultures may be necessary under certain circumstances, such as when using chemostat techniques or in concentrated cultures to prevent nutrient limitation effects due to stacking of cells and to increase gas diffusion. Mixing can be achieved by the use of a plankton wheel or roller table (about 1 rpm), by magnetic stirring or by bubbling with air. As for most microalgae, generally only the more robust (non-motile) coccolithophores are able to support physical disturbance; flagellate cells tend to aggregate into clumps and die, with the notable exception of the haploid stages of *E. huxleyi* and *G. oceanica* which grow well with air bubbling. The problem of CO₂ depletion in dense microalgal cultures may be reduced by having a large surface area of media exposed to the atmosphere relative to the volume of the culture, or by bubbling with either air (CO₂ concentration c.0.03%) or air with increased CO₂ concentrations (0.5 to 5%). The latter is generally not recommended for coccolithophores since it may lead to pH decreases and hence decalcification.

7. Chemostat Cultures

Continuous culture techniques are particularly useful for physiological studies of microalgae. *E. huxleyi* and *G. oceanica* (in the diploid stages) are the only coccolithophore species which have been used in chemostat experiments. In practice, real continuous culture methods have rarely been applied, semi-continuous cultures, in which a volume of culture is replaced by fresh medium once per day, being the preferred technique. All other cultured coccolithophore species should theoretically be amenable to semi-continuous culture, but the relatively intense mixing that is required to maintain homogeneous cell density in continuous cultures is likely to limit the application of this technique to all but the most robust of non-motile stages.

8. Cryopreservation

Cryopreservation, the maintenance of living organisms in a frozen state, is a developing technique with enormous potential for the perpetual conservation of cultured cells without the continual turn-over of generations inherent to long-term culture maintenance using standard methods, and hence the avoidance of the problem of genetic drift. Historically, cryopreservation methods were developed principally for the conservation of bacteria, fungi, human and other animal tissues, but in recent years many of the main microalgal culture collections have initiated cryopreservation programmes. The CCMP (Bigelow, USA) reports the successful cryopreservation of strains of several coccolithophore species (*E. huxleyi*, *G. oceanica*, *P. carterae*, *P. roscoffensis*, *P. scherffellii*, *O. neapolitana* and *C. neohelis*) using 5-10% dimethyl sulphoxide (DMSO) as cryoprotectant, although apparently not all strains of each of these species have been successfully cryopreserved. Recent reviews of methods for the cryopreservation of algae include those of Bodas et al. (1995) and Taylor and Fletcher (1999) Trials for the cryopreservation of these and other coccolithophore species in the CODENET collection are in progress.

V. FUTURE EXPLOITATION OF THE EXISTING CULTURE RESOURCE

A recurrent theme through the review of the history of research involving cultured coccolithophores was the focus on two species, *E. huxleyi* and *P. carterae*. The latter species has become a model for studies of the calcification process partly by chance, although the fact

that it is easy to culture has certainly been a contributing factor. The reasons for the focus on *E. huxleyi* are clear when satellite images of enormous white water blooms, generally considered to be dominated by this species, are seen. The relatively recent explosion in the volume of culture studies on *E. huxleyi* was triggered by such enhanced observational capacities which have served to highlight the abundance and biogeographic ubiquity of this species, together with increasing emphasis on global change studies and interest in the role of calcifying microorganisms and DMS producers in global biogeochemical cycles. Intensive culture investigations on *E. huxleyi* in the last decade mean that this coccolithophore must now rank among the best studied of all microalgal taxa, along with model diatom species such as *Skeletonema costatum*, and the freshwater chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*. Despite outstanding progress, we are far from having a full understanding of the physiological and biochemical processes that contribute to the ecology and global impact of *E. huxleyi*, and a continued focus on this species in coming years is to be expected. The extraordinary environmental tolerances and robustness of this species mean that complex culture experiments can be planned with confidence.

Through the application of molecular DNA-based RAPD 'fingerprinting' techniques, Medlin et al. (1996) revealed considerable intraspecific genetic diversity within *E. huxleyi*, even between clones isolated from the same bloom. Different *E. huxleyi* culture clones have been shown to differ in a number of physiological and biochemical traits, heterogeneity which has implications for all planning and interpretation of experimental work on *E. huxleyi* (Paasche 2002). The conclusion of Paasche (2002) that confusion in the literature can only be avoided if clone designation and origin is specified cannot be stressed too highly, and this of course applies not only to culture work on *E. huxleyi*, but to that on all coccolithophores.

The fact that the life cycle of *E. huxleyi* involves the alternation of a heterococcolith-bearing non-motile (C cell) phase and a non-calcifying flagellate (S cell) phase was first reported 30 years ago by Klaveness (1972). This author provided preliminary evidence that this cycle was haplo-diploid in nature, and this was later confirmed by Green et al. (1996) who quantified the DNA content of each phase using flow cytometry. Despite the possibility that the non-calcifying haploid S cell phase plays a critical role in the ecology of this species (Green et al. 1996), it has largely been ignored in both field and culture studies. In field studies, this is mainly due to the technical difficulties of observing and correctly identifying the S cells, but in culture studies the reasons are less clear; pure cultures of this phase have been available for some time, and, like the C cell phase, it is easy to culture. Despite the wealth of ecophysiological information available for the C cell and N cell phases (the latter

being diploid, non calcifying, non-scale bearing, non-motile cells which are presumed to be C cells which have lost the capacity to calcify) in the life cycle of *E. huxleyi* (see Paasche, 2002), there is very little comparative data for the S cell phase. The possession of flagella implies a different ecology for the S cell phase, and this may well be accompanied by physiological differentiation. In other words, there is as yet insufficient information to be able to generalise experimental results to different life cycle stages within a clone, let alone to different clones of a species. Awaiting experimental comparison of the ecophysiology of different life cycle stages, it is highly recommended that culture studies on *E. huxleyi* and on other coccolithophores for which life cycle associations are known should clearly specify which life cycle stage was employed.

The increasing body of knowledge on *E. huxleyi* has undoubtedly raised awareness of the global impact of coccolithophores, but has also fostered false perceptions. The terms *E. huxleyi* and coccolithophore are often used interchangeably by the non-specialist, insinuating either that *E. huxleyi* is the only important coccolithophore species in ecological terms, or that it can be taken as typical of all coccolithophores. In reality, of course, neither is the case. *E. huxleyi* is the most abundant and ubiquitous coccolithophore living in the contemporary ocean, often occurring at a relative abundance of 60-80%, but many other coccolithophore species may dominate communities in particular environments (see review of the biogeography of living coccolithophores by Winter et al. 1994). From the limited amount of comparative ecophysiological data available (see review by Brand 1994), as from analysis of the ecological distribution of coccolithophores (Young 1994), it is clear that *E. huxleyi* along with *P. carterae* are located at the upper (*r*-selected) limit of the *r*-*K* ecological gradient of coccolithophores, with ecophysiological adaptations geared towards maximising growth rate. The majority of coccolithophore species, however, are likely to be located nearer the extreme lower (*K*-selected) limit of this gradient, implying very different physiological adaptations honed for optimising the efficient use of limiting resources. In many respects *E. huxleyi* clearly cannot be considered as a typical coccolithophore, a view first put forward over half a century ago by Braarud and Fagerlund (1946), who predicted that "the behaviour of *E. huxleyi* in culture may not prove to be characteristic of the coccolithophores as a whole".

Comparative culture studies involving a range of coccolithophore species should therefore be encouraged. Of the coccolithophores currently maintained in culture, several belong to placolith-bearing taxa which may dominate oceanic coccolithophore assemblages (*Gephyrocapsa*, *Coccolithus*, *Calcidiscus*, *Oolithotus*, *Umbilicosphaera*) and hence may be considered important in a global context. Of these species, only *G. oceanica* has been

exploited in culture experiments on anything more than a sporadic basis, but being closely related to *E. huxleyi*, physiological and biochemical differences are likely to be the least pronounced. The heterococcolith-bearing stages of all of these coccolithophore species are amenable to laboratory culture using standard methods and culture media including artificial seawater-based media, and there are therefore no obvious major technical barriers to the application of the type of experimental design previously used for *E. huxleyi* to these species. Axenicisation of cultures of these and other coccolithophore species is one obvious priority which would significantly broaden the scope for their incorporation in physiological and biochemical studies.

The prospects for including the motile oceanic coccolithophores currently in culture (including *S. pulchra*, *C. mediterranea*, *H. carteri*, *A. robusta* and the holococcolithophores) in laboratory experiments are currently somewhat limited since they tend to be less resistant to mechanical stress and do not grow well in currently available artificial seawater-based culture media. The former problem means that it is unlikely that continuous culture techniques will be applicable to these coccolithophores. Carefully designed semi-continuous culture experiments should, however, prove possible (see, for example, the methods designed for the semi-continuous culture of dinoflagellates by McIntyre et al. 1997). Artificial seawater media are particularly useful for investigations into nutrient physiology since they are almost completely defined from a chemical point of view. At present the best compromise solution for such studies on these motile coccolithophores is the use of clean oceanic seawater as the base for culture media. The eventual refinement of existing natural seawater- and artificial seawater-based culture media is essential for increasing the scope of culture experiments using all coccolithophores currently in culture. Such research is potentially very time consuming and outwardly in attractive in the sense that it in general it will not provide any quick answers to the current key questions in coccolithophore research. There is, however, a fundamental need to develop our understanding of the biodiversity of this group which in the long term can only be achieved by increasing the range of coccolithophores brought into culture (a key issue expanded on in the following discussion), but in the immediate future would be greatly enhanced by a more complete exploitation of the culture resource which already exists.

VI. FUTURE PROSPECTS FOR CULTURING OTHER COCCOLITHOPHORES

A breakdown of the taxonomic affiliations of the 36 coccolithophores cultured to date is given in Table 3. Of the species which have never been cultured, the heterococcolith-bearing stages of members of the Noelaerhabdaceae and the Coccolithaceae, together perhaps with members of the Pontosphaeraceae, can be considered to be the most likely to be cultured in the future using standard culture methods. These coccolithophores are relatively robust (bearing placoliths or discoliths), probably non-motile, mostly have a wide biogeographic range (Winter et al. 1994) and tend to be more important in intermediate environments between extreme eutrophic and oligotrophic conditions (Young 1994). It can therefore be predicted that they should be able to tolerate the abnormal environment and elevated nutrient levels which are implicit with standard culture techniques. In the genus *Gephyrocapsa*, most members of which can be abundant in certain environments, only *G. oceanica* has been cultured. The other species in this genus are typically of such an extremely small size (<3µm) that it is probably a technical limit of isolation methods rather than the culture conditions themselves that has prevented their having been brought into culture until now.

The three families Syracosphaeraceae, Rhabdosphaeraceae and Calyptosphaeraceae (holococcolithophores) contain the majority of the remaining coccolithophores which have never been cultured. These species (or life cycle stages) rarely dominate assemblages and hence do not have clearly definable biogeographic distributions, being found in upper and middle photic zone layers typically in oligotrophic, but also in intermediate environments. Of the other families, the Papposphaeraceae, which were until recently thought to be present only in polar waters (e.g. Thomsen et al. 1991) but have recently also been described from the Mediterranean sea (Cros and Fortuño 2002) contains the most species. Certain of the species *incertae sedis* are globally distributed in particular environments: the umbelliform coccolithophores *Umbellosphaera tenuis* and *U. irregularis* (along with the Rhabdosphaeraceae *Discosphaera tubifera*) may dominate extreme oligotrophic assemblages, and the floriform coccolithophores *Florisphaera profunda* and *Thorosphaera flabellata* are the characteristic species of deep photic zone (150-200m) assemblages in low to mid latitudes (Young 1994).

Table II-3. Family-level taxonomic distribution of previously cultured coccolithophores (taxonomy from Jordan and Green 1994).

Tableau II-3: Répartition des différentes espèces de coccolithophores cultivées jusqu'à présent au sein des différentes familles de ce groupe (taxonomie selon Jordan et Green, 1994).

Coccolithophore Family	Species cultured / Total species diversity
Pleurochrysidaceae	7 / 7
Hymenomonadaceae	6 / 6
Noelaerhabdaceae	3 / 12
Coccolithaceae	9 / 17
Syracosphaeraceae	1 / 43
Rhabdosphaeraceae	1 / 18
Pontosphaeraceae	1 / 7
Helicosphaeraceae	2 / 4
Braarudosphaeraceae	0 / 2
Calciosoleniaceae	0 / 3
Ceratolithaceae	0 / 2
Papposphaeraceae	0 / 14
Calyptriosphaeraceae	6 / 55
Species incertae sedis	0 / 14

Although this group of coccolithophores has diverse ecologies, they all tend to be found most often in oceanic waters. This implies that they lie towards the *K*-selected end of the *r-K* ecological gradient (Brand 1994; Young 1994), and this is the factor most often stated to be responsible for the fact that they have not been cultured, for reasons associated with potential limitations of isolation and culture methods discussed below. Oceanic waters are also, however, relatively inaccessible, and this raises the possibility (or even probability) that no-one has actually ever tried to isolate and culture the majority of these coccolithophores. This is of course difficult to assess with any certainty since unsuccessful isolations are rarely reported, but a logical first step would be to attempt to isolate and culture these species using current methods. K medium (or dilutions and derivations thereof), which was specifically designed for the culture of oceanic ultraphytoplankton, is perhaps the best available option for potentially culturing these oceanic coccolithophores, although a variety of medium recipes should be tried.

The oceanic environment is typically more stable (and therefore more predictable) than the eutrophic coastal environment, and in adapting to their environment oceanic species have evolved narrow environmental tolerances (Brand 1994). Physical environmental parameters (temperature, light, salinity) can be tightly controlled in culture, and with special care also during the collection and isolation stages. The physical disturbance to cells which is inevitable during collection and isolation may be a problem for the most delicate coccolithophores (for example *Michaelsarsia* and *Calciopappus* which have long leg-like appendages consisting of joined coccoliths) and here also some innovation will clearly be

required. Problems with restraining and recreating the physical environment may be particularly important for culturing the deep photic-zone species; since the nutricline and thermocline usually coincide these species should be relatively insensitive to high nutrient levels, but adaptation to this unique environment may mean that they are particularly sensitive to increased light intensity (even to extremely low levels which would make collection and isolation problematic) and possibly also to decreased pressure. Until isolation of these species is attempted, these questions will remain unanswered.

For the majority of uncultured coccolithophores, however, considerations of the physical environment are likely to be secondary to the need to develop a chemical environment which is suitable for the growth of these oceanic species. Much work will probably be necessary to refine existing culture medium recipes (and to develop innovative new media) to meet the exacting requirements of oceanic coccolithophores. One factor that these coccolithophore species have in common is that they are never very abundant. Even the umbelliform coccolithophores which may dominate oligotrophic environments rarely exceed 10^4 cells/l, whereas placolith-dominated assemblages in eutrophic conditions may regularly attain 10^7 cells/l (Young 1994). These oceanic species apparently have slow growth rates and do not respond rapidly to nutrient enrichment (e.g. Hulburt and Corwin 1969), but rather survive (and occasionally dominate) by virtue of their competitive abilities. There are two main factors relative to the nutritional requirements of these oceanic species which must be taken into account in order to develop more suitable culture media. Firstly, it is possible that the high concentrations of inorganic nutrients usually added to culture media will actually be toxic to oligotrophic adapted species. Brand (1986) argued that since oceanic phytoplankton rarely, if ever, experience elevated nutrient levels, there are obvious evolutionary grounds to suggest that they may not have evolved (or have lost) adequate feedback mechanisms for tolerating extremely high substrate concentrations. In this context, a particular problem is that single isolated cells are susceptible to the preferential partitioning into the cell's protoplasm of various toxic substances present in the relatively large volume of culture media. Eutrophic-adapted species are more likely than oceanic species to possess the metabolic mechanisms required to cope with such a large and sudden influx of toxic substances. Secondly, it has been hypothesised that the utilisation of organic nutrients becomes more important in oceanic waters (e.g. Jackson and Williams 1985; Amon and Benner 1994). The problem with developing new culture media, as pointed out by Brand (1986), is that in order to culture a species we need to know its environmental requirements, but in order to develop a clear idea of its environmental requirements we need to study it in culture. Most of the coccolithophores

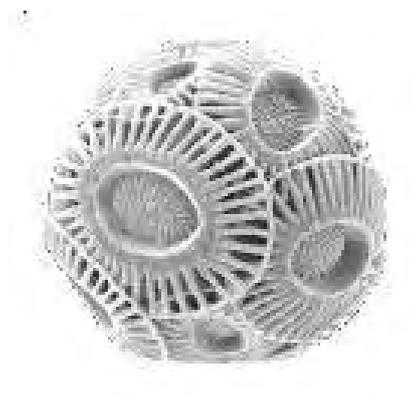
that are in culture have thus far been under-exploited in terms of autecological and physiological investigations, and awaiting such data, the information available for *E. huxleyi* (summarised above) provides the main basis from which extrapolations, bearing in mind the two factors indicated above, must be made.

Finally, it is worth highlighting that, in theory at least, there is no such thing as an unculturable microalga: if a species has not yet been cultivated it is either because no-one has tried, or because current methods and technologies are not suitable for its culture. Improvements to current techniques can and will be made, although it is difficult to predict at what rate this will occur. It must be remembered that in culturing in general there are (within limits) no right and wrong methods; culture methods have only been developed by culturers using trial and error (usually based on theoretical considerations), and hence innovation is actively encouraged. If concerted efforts were to be made, taking into account the potential solutions to the (potential) problems of culturing oceanic species suggested and discussed above, we suggest that the majority of coccolithophore species could be successfully cultured within the next decade.

Acknowledgements

We are extremely grateful to all of those who assisted in the development of the CODENET culture collection, notably Markus Geisen, Kees van Lenning, Christine Klaas and Claire NS Findlay. This contribution was financially supported by the CODENET project, the Agence de l'Eau Seine- Normandie and the Conseil Régional de Basse-Normandie.

Chapitre III :



DESCRIPTION DU MATERIEL ETUDIE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE.

Photo: J.R. Young

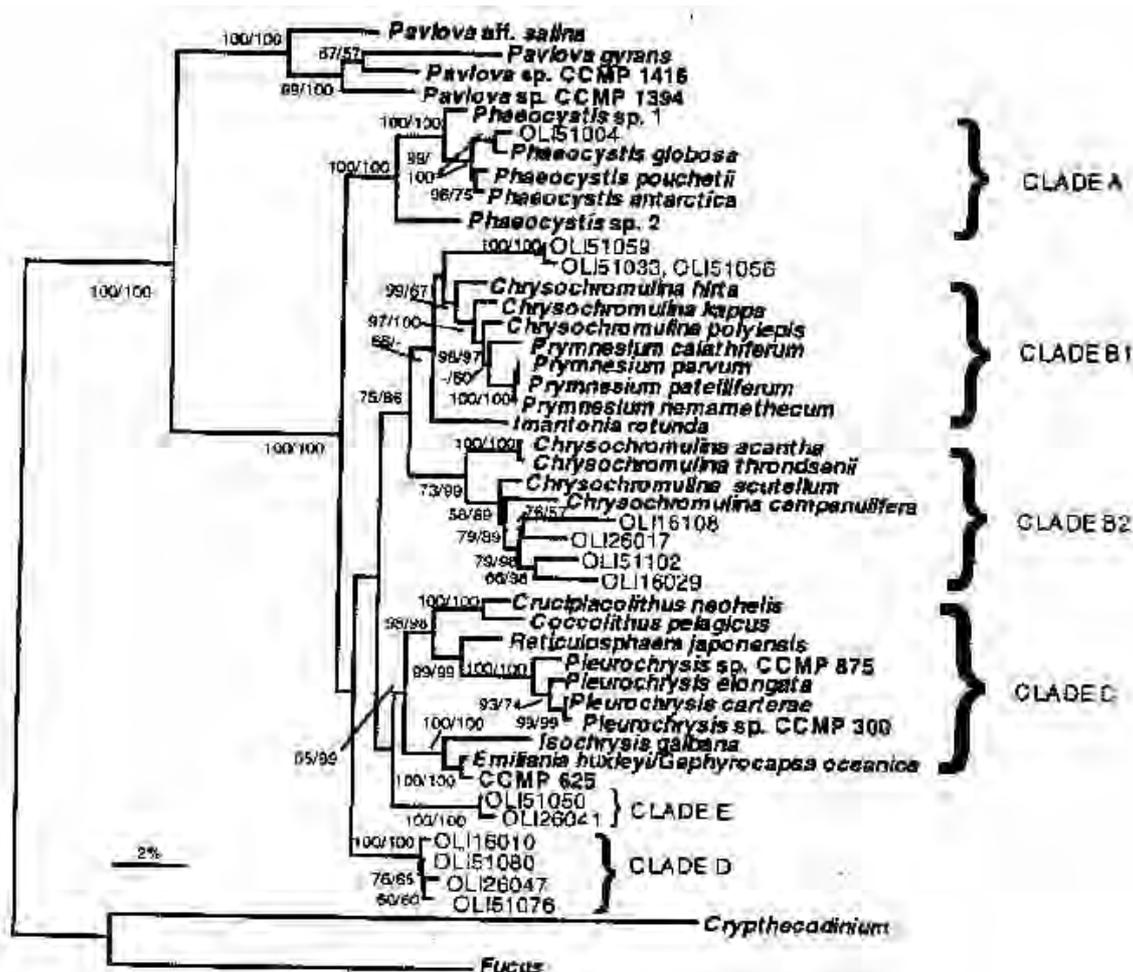


Figure III-1 : Arbre phylogénétique des haptophytes basé sur la séquence du gène ADNr 18S, (in Edvardsen *et al.*, 2000).

Tableau III-1 : Classification des quatre coccolithophores étudiées d'après Edvardsen *et al.* (2000).

Classe	Ordre	Famille	Espèce
Prymnesiophyceae	Isochrysidales	Noëlaerhabdaceae	<i>Emiliana huxleyi</i> (Lohmann) Hay et Mohler
	Coccolithales	Coccolithaceae	<i>Coccolithus pelagicus</i> (Wallich) Schiller
		Calcidiscaceae	<i>Calcidiscus leptoporus</i> (Murray et Blackman) Loeblich et Tappan
		Syracosphaeraceae	<i>Coronosphaera mediterranea</i> (Lohmann) Gaarder

DESCRIPTION DU MATERIEL ETUDIE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE.

I. EMILIANIA HUXLEYI (LOHMANN) HAY ET MOHLER

1. Classification

Le genre *Emiliana* Hay et Mohler appartient à l'ordre des Isochrysidales et à la famille des Noelaerhabdaceae (Tableau III-1). L'espèce *Emiliana huxleyi* a été décrite en 1902 par Lohmann comme étant *Pontosphaera huxleyi* ; Kamptner (1943) la transféra dans le genre *Coccolithus* puis Hay et Molher en 1967 définirent un nouveau genre *Emiliana* qui contient l'ex-*Coccolithus huxleyi* devenu *Emiliana huxleyi*.

C'est une des rares espèces calcifiées appartenant à l'ordre des Isochrysidales, où se trouvent des espèces non minéralisées comme *Isochrysis galbana* Parke emend. Green *et al.* dont *E. huxleyi* est très proche génétiquement (Edwardsen *et al.*, 2000 ; Fujiwara *et al.*, 2001). Un autre genre de coccolithophores, proche lui aussi d'*E. huxleyi* tant du point de vue génétique (Figure III-1) que morphologique, appartient à la famille des Noelaerhabdaceae, le genre *Gephyrocapsa* Kamptner : celui-ci aurait divergé du genre *Emiliana* depuis environ 270 000 ans (Thierstein *et al.*, 1977). Le genre *Emiliana* a donc connu les deux dernières glaciations et est devenu nettement dominant dans la communauté des coccolithophores depuis 70 000 ans. D'un point de vue densité, *E. huxleyi* est actuellement la coccolithophore la plus importante dans les communautés phytoplanctoniques.

Cette branche des coccolithophores, contenant *Emiliana huxleyi* et le genre *Gephyrocapsa*, est nettement séparée des autres coccolithophores d'un point de vue génétique (gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 18S, Edwardsen *et al.*, 2000 ; gène codant pour la grande sous-unité de la Rubisco, Fujiwara *et al.*, 2001) mais aussi par des propriétés biochimiques (production d'alkénones à longues chaînes, Eglinton *et al.*, 2001) et ultrastructurales (Fujiwara *et al.*, 2001). Leur cycle de vie est lui aussi tout à fait particulier (Billard, 1994 ; Green *et al.*, 1996).

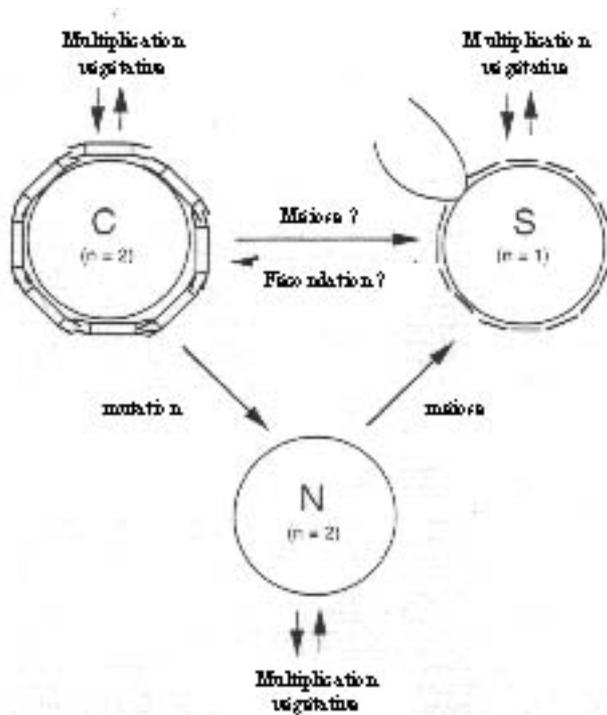


Figure III-2 : Cycle de vie d' *Emiliana huxleyi* d'après Green *et al.* (1996).

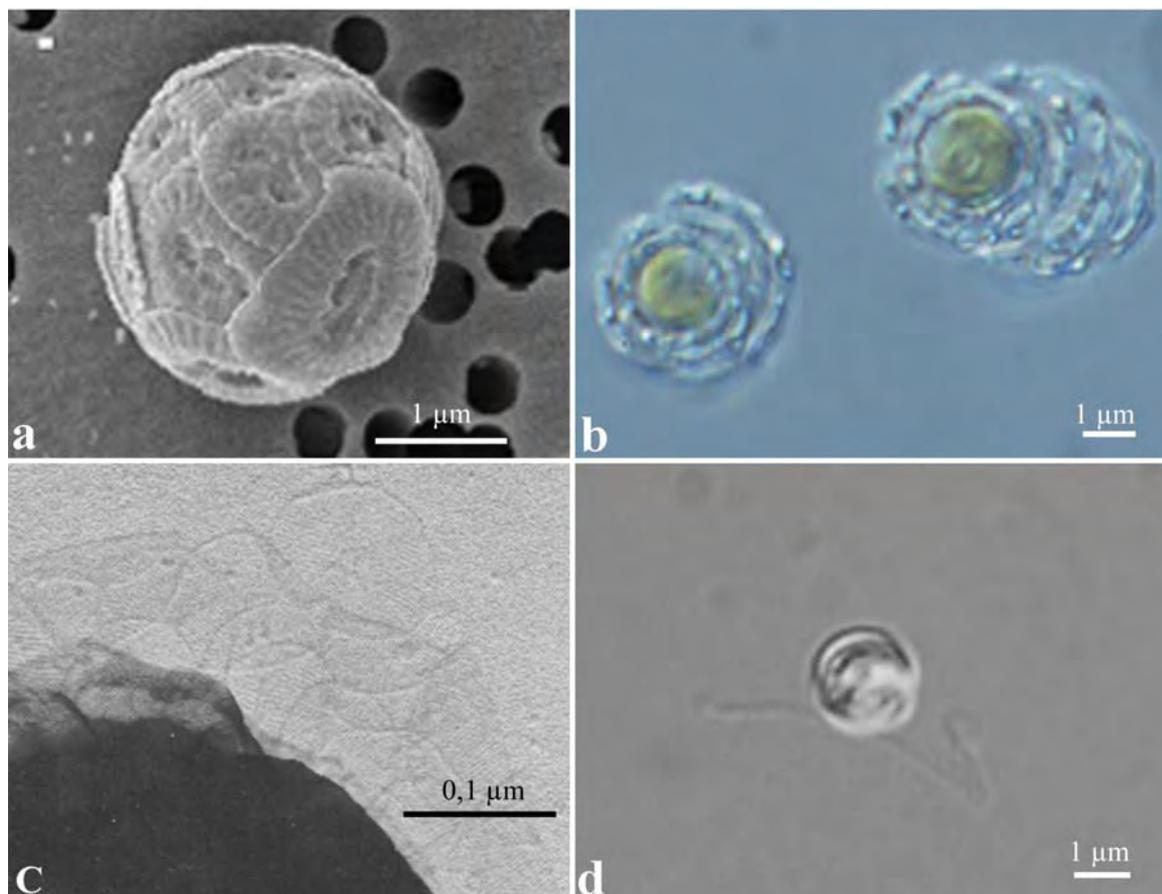


Figure III-3 : *Emiliana huxleyi*, phase C à hétérococcolithes (diploïde) et phase S sans coccolithes (haploïde). (a) phase à hétérococcolithes en MEB souche TQ 26 ; (b) phase à hétérococcolithes en microscopie photonique, à multicouches de coccolithes, écotype A ; (c) écailles des phases sans coccolithes en MET (photographie I. Inouye) ; (d) phase à écailles en microscopie photonique souche TQ 26.

2. Cycle et morphologie

Suite à des travaux réalisés par Klaveness (1972) et Green *et al* (1996) sur cette espèce, il est apparu que sous la désignation d'*Emiliana huxleyi*, trois formes différentes de cellules peuvent être observées : la première, correspondant à la description originelle de *E. huxleyi*, possède des coccolithes et est dénommée cellule de type C (C-cells) , la deuxième correspond à des cellules nues, non mobiles dites de type N (N-cells, N pour *naked*) et la troisième à des cellules flagellées, recouvertes d'écailles organiques mais non-calcifiées, dites de type S (S-cells S pour *scaled*). Les deux premiers types de cellules sont diploïdes (Green *et al*, 1996 ; Houdan *et al*, sous presse) tandis que le troisième est haploïde. *Emiliana huxleyi* est donc une espèce avec un cycle digénétique haplo-diploïde hétéromorphe (Figure III-2).

a) La phase calcifiée diploïde ou C-cells

La phase à coccolithes ou C-cells est non mobile, sans haptonème et sans racines flagellaires (cette absence étant peu fréquente les autres coccolithophores). Elle ne présente pas d'écailles organiques à la surface de la cellule et est recouverte de coccolithes de type placolithe (Figure III-3a). La coccosphère ou l'ensemble des coccolithes recouvrant la cellule, est à multi-couches (Figure III-3b), monomorphique (avec un seul type de coccolithe). Les placolithes d'*E. huxleyi* peuvent montrer une grande diversité de structure, ce qui a permis de mettre en évidence plusieurs morphotypes en fonction de la morphologie des coccolithes.

Le premier type défini est le type A qui diffère du type B (*Emiliana huxleyi* var. *pujosae*, Medlin *et al.*, 1996) par la taille (respectivement 2,5-3,5 μ M et 3,5- 4,5 μ M) et par la structure de l'aire centrale du coccolithe (Young et Westbroek, 1991). Ces différences se retrouvent à la fois dans les échantillons naturels et dans les cultures. Le troisième type, le type C (*Emiliana huxleyi* var. *kleijniae*, Medlin *et al.*, 1996), est plus petit que le B et l'aire centrale est ouverte ou couverte par une plaque calcaire. Un autre type a été récemment mis en évidence (e.g. Paasche, 2001), le type R (Figure III-3a) qui est hyper-calcifié, notamment au niveau de l'aire central, avec des coccolithes d'aspect proche d'une autre espèce de coccolithophores, *Reticulofenestra parvula* (Young *et al.*, 2003).

Les coccolithes sont formés à l'intérieur de la cellule, un par un, suivant un processus très étudié durant les dernières décennies (voir Paasche, 2001). Ils sont produits dans un

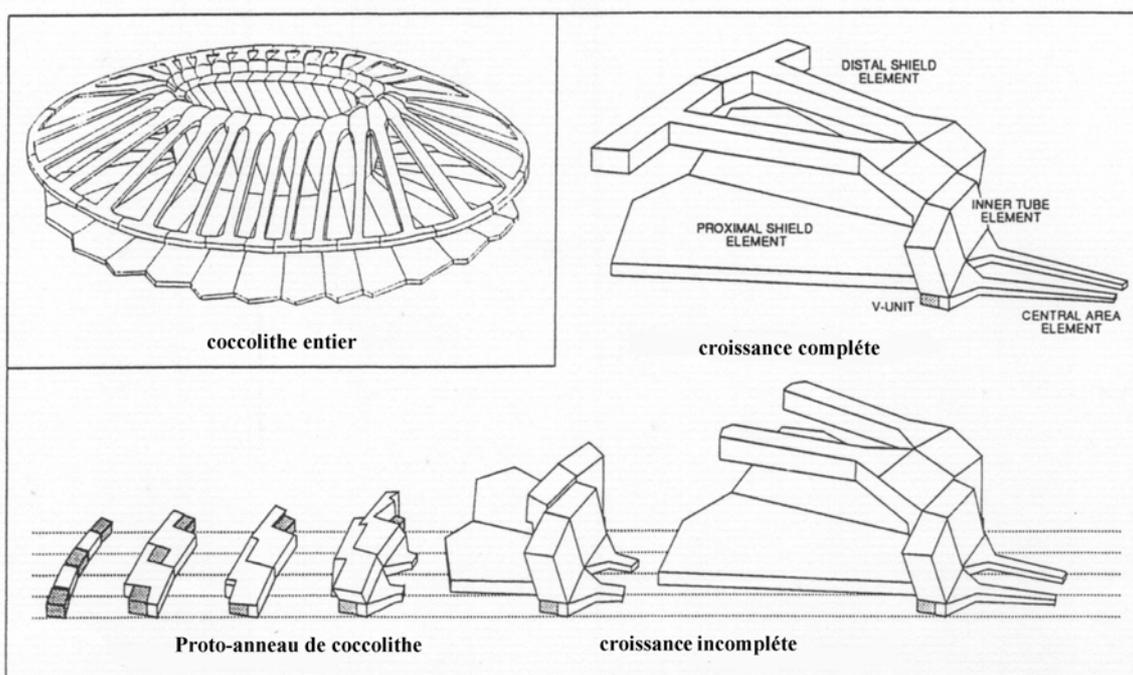


Figure III-4 : Croissance d'un coccolithe d' *Emiliana huxleyi* d'après Young *et al.* (1992).

compartiment cellulaire précis, la vésicule à coccolithes, qui correspond à la fusion de petites vésicules d'origine golgienne. Une structure particulière à *E. huxleyi* (et *Gephyrocapsa*) est rencontrée, associée à la face distale de la vésicule à coccolithes et communicant avec elle, « le corps réticulaire » (voir Figure I-5). La formation des coccolithes pour cette espèce diffère de celle des autres coccolithophores étudiées actuellement par la présence de ce corps réticulaire et par la fusion des petites vésicules golgiennes (les autres espèces voient la coccolithogénèse se réaliser directement dans une vésicule golgienne). Young *et al.* (1992) ont présenté une synthèse de la croissance d'un coccolithe d' *E. huxleyi*, résumée dans la Figure III-4.

Cette phase est capable de reproduction asexuée, par mitose. La cellule entreprend une division, à l'issue de laquelle une constriction apparaîtra au niveau de la moitié de la coccosphère pour aboutir à deux cellules-filles, chacune possédant sa propre coccosphère (en partageant les coccolithes de la cellule-mère).

b) Le stade diploïde non-calcifiée ou N-cells

Ces cellules diploïdes non calcifiées sont dépourvues de flagelle et d'haptonème et présentent les mêmes caractéristiques que les cellules C, mis à part les coccolithes qu'elles sont incapables de produire. Elles possèdent pourtant l'appareillage nécessaire à leur fabrication par le biais des vésicules à coccolithes et des « corps réticulaires ». Ces cellules ne sont pas considérées comme appartenant strictement au cycle de vie d'*Emiliana huxleyi* mais plutôt comme étant des mutants. En effet, ce genre de cellules est fréquemment rencontré dans les cultures âgées ou sénescents, de même qu'elles sont plus fréquentes en fin de bloom. Certaines souches sont conservées sous cette forme depuis des années, sans coccolithes, et proviennent généralement d'un clone calcifié ayant perdu cette capacité à synthétiser des coccolithes. La souche F61, par exemple, à l'origine constituée de cellules C, perdit après 15 ans de culture ses coccolithes. Toutefois, des expériences menées par Andersen (1981) et Paasche (1998) montrèrent qu'en imposant une carence en phosphore, la calcification pouvait de nouveau être mise en place. De plus, certains clones définis comme étant des N-cells gardent parfois une certaine capacité de production de coccolithes (un à quatre pendant la phase exponentielle de croissance ; Paasche, 2001).

Les études de Klaveness (1972) et Green *et al.* (1996) ont montré que cette forme était diploïde au même titre que les C-cells (respectivement par comptage des chromosomes et par cytométrie en flux).

Des études écophysiologicals ont été entreprises avec ce type de cellule sans coccolithe, notamment pour tout ce qui a trait à la calcification ou à l'utilisation de CO₂. En effet, un certain nombre d'auteurs ont, au cours des dix dernières années, étudié l'utilisation du bicarbonate et/ou du CO₂ par les coccolithophores, notamment chez *E. huxleyi*, modèle largement reconnu. Il apparaîtrait que certains clones de N-cells seraient incapables d'utiliser le bicarbonate dissous et utiliseraient directement le CO₂. Toutefois des études complémentaires sont nécessaires, du fait que, suivant les clones, les résultats divergent et qu'en conditions standard, avec un milieu non carencé, non enrichi en CO₂ ou bicarbonate, les cellules C et N présentent des taux de croissance très similaires (voir Paasche, 2001, pour une synthèse).

c) La phase haploïde non-calcifiée ou S-cells

La phase haploïde ou S-cells possède deux flagelles et apparaît nue au microscope optique, sans coccolithes (Figures III-2 et III-3d) ; l'haptonème n'est pas visible. Elle a été étudiée pour la première fois par Klaveness (1972) qui fit une étude complète de son ultrastructure, montrant ainsi la présence d'écailles organiques à la surface de la cellule, écailles qui diffèrent de celles classiquement rencontrées chez les autres coccolithophores (Figure III-3c), et qui sont absentes chez la phase C et le stade N-cells. Ce détail et la présence de flagelles permettent de distinguer les types de cellules S et N. En effet, ces cellules étant de petite taille, elles sont toutes deux sujettes aux mouvements browniens et sont parfois difficiles à distinguer. Par ailleurs, pour la phase S-cells, les flagelles sont souvent peu visibles après la pose d'une lamelle, l'utilisation de la microscopie électronique est alors nécessaire pour vérifier la présence d'écailles et ainsi identifier le stade de cette espèce. Actuellement, il est possible de différencier les stades N et S par le biais de la cytométrie en flux en mesurant leur quantité relative d'ADN (Green *et al.*, 1996)

Cette phase apparaît généralement dans les cultures sénescents de C-cells (de même que le stade N) et un repiquage régulier peut le plus souvent prévenir tout changement de phase (Paasche, 2001), de même que la culture en milieu carencé en azote ou phosphore (Lecourt *et al.*, 1996 ; Nanninga et Tyrrel, 1996). La phase S est capable, comme les deux autres de reproduction végétative mais des fusions pourraient intervenir, les cellules S se comportant alors comme des gamètes. Ainsi Wilbur et Watabe (1963) obtinrent à partir de cellules nues flagellées, décrites par la suite comme des S-cells par Klaveness et Paasche (1971), des cellules calcifiées, l'hypothèse alors avancée étant l'intervention d'une fécondation entre deux cellules S. Toutefois, aucune observation directe de phénomènes sexuels (fécondation,

méiose) n'a jusqu'à présent été faite chez cette espèce, mais des analyses en biologie moléculaire de clones d'origine naturelle a apporté une évidence indirecte de l'existence d'une reproduction sexuée (Barker *et al.*, 1994 ; Medlin *et al.*, 1996).

3. Biogéographie

On constate qu'un grand nombre de données existent concernant la phase calcifiée (C-cells) d'*Emiliana huxleyi* mais que quasiment aucune n'est disponible concernant les deux autres phases de son cycle. De nombreuses campagnes océanographiques depuis le début du XXème siècle ont permis une bonne connaissance des aires de répartition de cette phase en fonction du morphotype (A, B, C, R...). En compilant les données de nombreuses publications sur la biogéographie des coccolithophores, rassemblées sur une base de données ACCESS (en fonction de la latitude et de la longitude avec, quand elles existent, les températures, profondeurs, salinités...), il a été possible de définir parmi toutes les campagnes analysées celles qui ont rapporté cette espèce.

A partir de ces résultats, une carte géographique a été réalisée (Figure III-5c) en utilisant le logiciel ArcView 3.1. Les données associées ont permis d'établir des gammes de température, de salinité et de profondeur. Elles ne concernent toutefois que la phase C et les différents morphotypes ne sont pas pris en compte. Il est possible de reporter sur cette carte (Figure III-5a) les principales aires de répartitions de ces morphotypes résumées par différents auteurs comme Young et Westbrook (1991), Medlin *et al.* (1996), Paasche (2001). Le morphotype A est très ubiquiste et largement rencontré dans les prélèvements réalisés, il correspond à la variété d'eau chaude de McIntyre et Bé (1969) et à celle très calcifiée de Burns (1977). Le morphotype B est plus rare, trouvé dans la Mer du Nord notamment et dans l'Atlantique NE. Le morphotype C a été prélevé essentiellement dans l'Océan Indien et dans l'Atlantique.

A partir des données obtenues dans les différentes publications (cf Annexe 2 pour la liste des publications analysées) il a été possible de définir la gamme de température ainsi que les pourcentages pour chaque classe de température (Figure III-6a). Cette espèce est donc rencontrée entre -1°C et 35°C. Il n'y a pas de classe de température nette où *Emiliana huxleyi* est échantillonnée préférentiellement. Elle est présente de façon quasiment équivalente de 0 à 25°C et serait peut être légèrement plus courante entre 25 et 30°C. Cette espèce est donc d'un point de vue température très eurytherme, toutefois des morphotypes particuliers peuvent

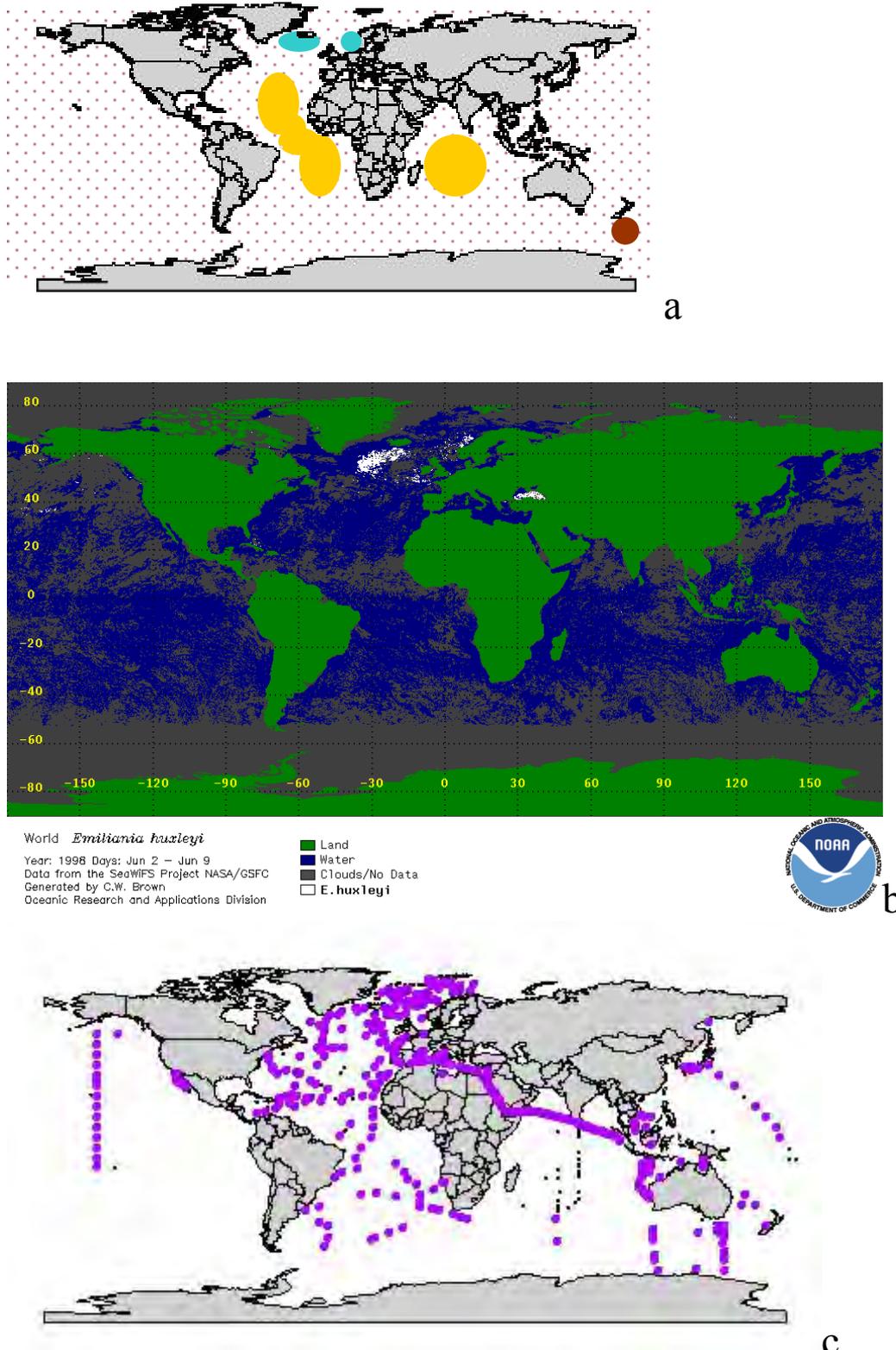


Figure III-5 : (a). Représentation cartographique des aires de répartition des différents morphotypes d'*Emiliana huxleyi* (••• *Emiliana huxleyi* morphotype A ; • *Emiliana huxleyi* morphotype B ; ■ *Emiliana huxleyi* morphotype C ; ■ *Emiliana huxleyi* morphotype R) d'après Young et Westbroek, 1991 ; Paasche, 2001 ; (b) photographie satellite d'une efflorescence à *Emiliana huxleyi* ; (c) représentation graphique des données biogéographiques contenues dans les publications analysées (liste en annexe 2), les points noirs correspondent à des zones de prélèvements où sont retrouvées des coccolithophores et les points violets à celles contenant *E. huxleyi*.

dominer suivant les températures, ce qui n'apparaît pas ici (peu de publications précisant le morphotype rencontré).

Concernant la profondeur (Figure III-6b), *Emiliana huxleyi* est rencontrée de 0 à 750 mètres avec plus de 50% des cas entre 0 et 25m et les trois quarts entre 0 et 100m. Cependant cela n'est pas forcément révélateur de la niche écologique de cette espèce, les campagnes d'échantillonnages phytoplanctoniques étant préférentiellement faites dans les 100, voire les 50 premiers mètres. De plus, il apparaît peu probable que pour les profondeurs de 500 m, et à fortiori de 750 m, les cellules soient encore vivantes, seule la coccosphère est présente.

Emiliana huxleyi apparaît comme une espèce très ubiquiste. Elle est largement rencontrée dans le milieu marin, parfois en forte densité lors d'efflorescences qui peuvent être de grande ampleur : jusqu'à 10 000 cellules par mL (Holligan *et al.*, 1993) et sur 100 000 km² (Brown et Yoder, 1994), mesurables par satellite (Figure III-5b, National Oceanic and Atmospheric Administration). Pour cette raison, elle a fait l'objet d'un grand nombre de travaux tant physiologiques que biogéographiques ou biochimiques... Elle a fait l'objet à elle seule de deux programmes de recherches européens (cf. Chapitre I) et d'un troisième avec d'autres espèces de coccolithophores. Elle est considérée comme un modèle d'étude international et des modèles sur sa biologie et sa calcification ont été proposés (e.g. Paasche, 2001).

Malgré tout, dans ces différentes études, seules la phase C diploïde à coccolithes a été étudiée, et très peu de données existent sur les deux autres phases. Le stade N dépourvu de coccolithe est considéré comme un mutant de la phase C et d'une importance moindre dans le milieu naturel (Paasche, 2001). Quant à la phase S, le stade flagellé diploïde, aucune hypothèse n'a été avancée concernant son importance dans le milieu marin et aucune donnée écophysologique n'existe actuellement.

4. Origine de la souche utilisée

Au cours des différents isollements et cultures d' *Emiliana huxleyi* réalisés pendant le projet CODENET, plusieurs souches ont été obtenues par Ian Probert. L'une d'entre elles, la souche **TQ 26** (originaires de la côte ouest de Nouvelle Zélande et isolée en février 1998), a, au cours de sa troisième année de culture, présenté un changement de phase. Cette souche, correspondant au morphotype R, a donc par la suite été cultivée sous ses deux phases

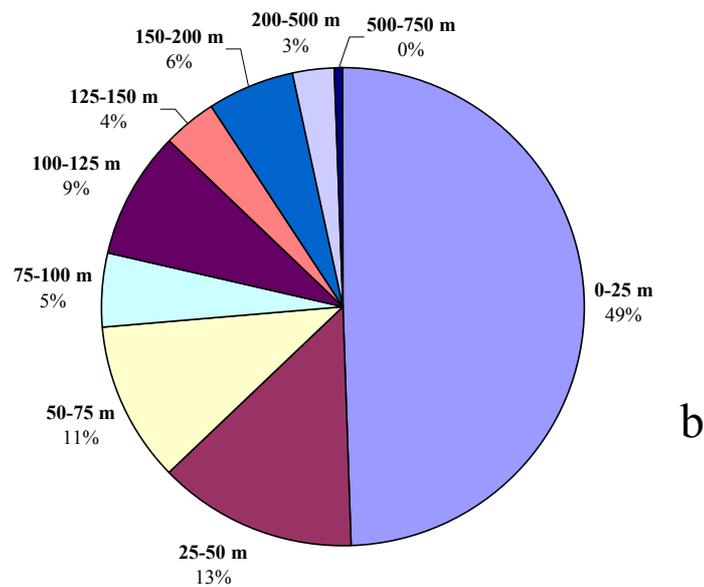
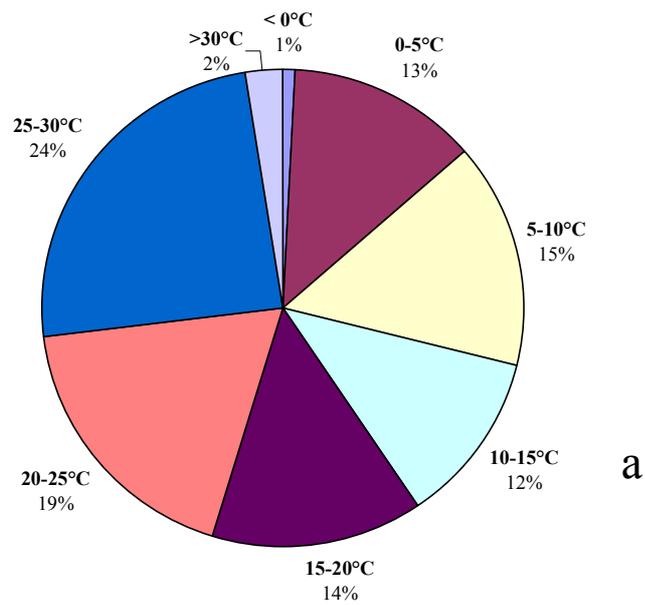


Figure III-6 : Répartition d' *Emiliana huxleyi* en fonction des données de température (a) et de profondeur (b) d'après les publications analysées (cf. annexe 2). (diploïde et haploïde) en culture pure au sein du laboratoire. C'est cette dernière qui a été choisie au cours de ce travail pour représenter l'espèce *Emiliana huxleyi*, choix motivé par le fait de sa rapide obtention des deux phases en cultures séparées.

I. COCCOLITHUS PELAGICUS (WALLICH) SCHILLER ET COCCOLITHUS BRAARUDII (GAARDER) BAUMANN, CACHAO, YOUNG ET GEISEN

1. Classification

Le genre *Coccolithus* Schwarz appartient à l'ordre des Coccolithales et à la famille des Coccolithaceae (Tableau III-1). L'espèce *Coccolithus pelagicus* a été définie par Schiller (1930) et basée sur *Coccolithophora pelagica*, décrite par Wallich en 1877 lors de la campagne du *H.M.S Bulldog*.

Il a été choisi ici de présenter ensemble *Coccolithus pelagicus* et *Coccolithus braarudii* vu leur toute récente séparation. Ces deux espèces ayant, depuis les années 1870 et jusqu'à 2003, été confondues, les informations les concernant sont en grande partie les mêmes, notamment d'un point de vue biologique et biogéographique. Elles ont récemment été considérées comme deux écotypes d'une seule espèce, *Coccolithus pelagicus*, depuis la publication de Geisen *et al.* (2002) puis maintenant comme deux espèces distinctes suite à l'étude de Sáez *et al.* (2003) qui les sépare en se basant sur des séquences ADNr 18S, tufA et ITSr. et leur confère le statut d'espèce à part entière.

Coccolithus pelagicus s.l. (par sens large est entendu comprenant les deux espèces récemment distinguées) a été relativement bien étudié dans les années 1960-1970 ce qui correspond à l'apparition des premières cultures de cette espèce. A partir de ce moment les connaissances sur sa biologie, sa morphologie et son cycle ont progressé notamment grâce aux études de Parke et Adams (1960), Manton et Leedale (1963,1969), Rowson *et al.* (1986)...Toutefois devant sa réputation d'algue difficile à cultiver, et comme pour beaucoup de coccolithophores, peu d'études furent entreprises durant les vingt années suivantes. C'est à la fin des années 1990 que le programme de recherche CODENET (1998-2001) relança les études sur un certain nombre d'espèces de coccolithophores dont *C. pelagicus*. Malgré cela, peu de données sont disponibles dans la littérature sur cette espèce.

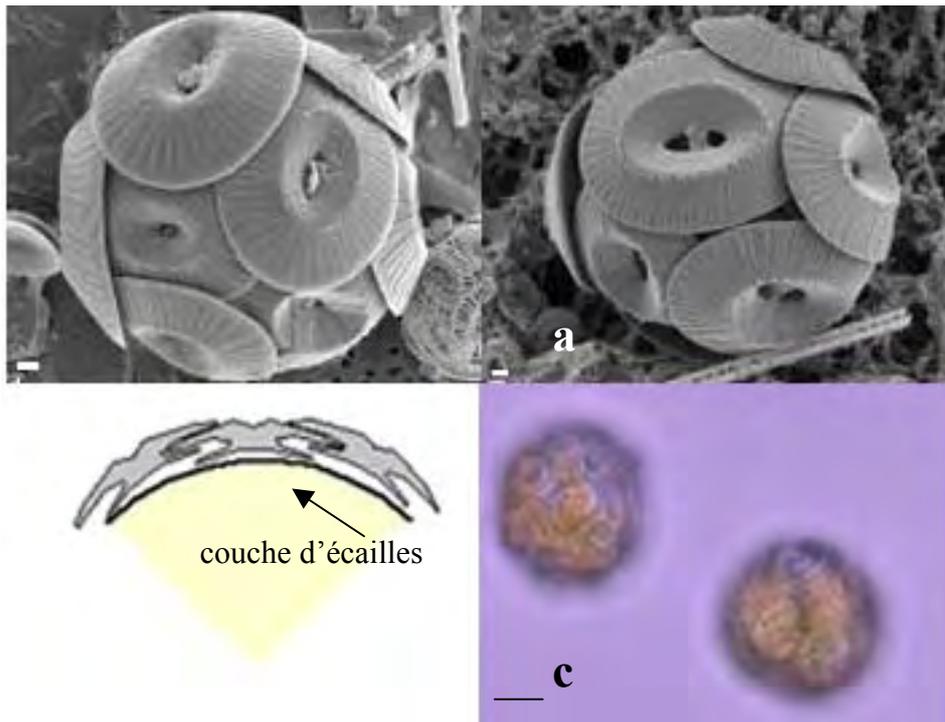


Figure III-7 : *Coccolithus pelagicus s. l.*, phase à hétérococcolithes. (a) *C. pelagicus s. s.* en MEB ; (b) *Coccolithus braarudii* en MEB ; (c) emboîtement des coccolithes ; (d) *Coccolithus braarudii* en microscopie optique, objectif x 100. Pour (a) et (b) barre d'échelle = 1 μ m et pour (d) barre d'échelle = 5 μ m. (a) et (b) : photos M. Geisen

Elle est à l'instar de *E. huxleyi*, capable d'efflorescences assez importantes mais exclusivement océaniques comme dans l'Atlantique (Tarran *et al.*, 2001).

2. Cycle et morphologie.

Une des premières études marquantes sur *Coccolithus pelagicus* date des années 1960. Réalisée par Parke et Adams (1960), elle apporta des éléments déterminants pour la compréhension de la biologie de cette espèce. Jusqu'à cette date, *Coccolithus pelagicus s.l.* était considéré comme une espèce appartenant au groupe à hétérococcolithes. Lors de la mise en culture et d'expérimentations sur deux clones de cette espèce, un autre type de cellules apparut dans les cultures. Cette deuxième phase (une fois éliminée l'hypothèse de la contamination) se révéla être une autre coccolithophore, *Crystallolithus hyalinus* Gaarder et Markali, considérée jusqu'alors comme une espèce distincte appartenant au groupe des holococcolithophores. Parke et Adams (1960) suggérèrent alors que ces deux coccolithophores ne seraient qu'une seule et même espèce, *Coccolithus pelagicus* (nom de la première espèce décrite) avec un cycle de vie hétéromorphe.

a. La phase calcifiée à hétérococcolithes

Cette phase correspond à l'espèce décrite originellement comme *Coccolithus pelagicus*. C'est une microalgue robuste, de taille allant de 15 à 35 μM de diamètre, apparaissant très brune en microscopie optique. Elle est non flagellée et sans haptonème (Figure III-7) mais possède des racines flagellaires situées entre les deux chloroplastes, près du plasmalemme.

Elle est recouverte de coccolithes de type hétérococcolithe, des placolithes d'ornementations différentes de celles d' *E. huxleyi*. Ils sont constitués de deux boucliers de 40 à 80 éléments imbriqués dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (vus depuis la face distale) et formant deux plaques elliptiques connectées par un tube central. Ils peuvent dans certains cas présenter un pont qui surmonte l'aire centrale dans l'axe le plus court du coccolithe (Figure III-7 b). Comme pour *E. huxleyi*, les placolithes sont formés un à un à l'intérieur de la cellule (Manton et Leedale, 1969) au sein d'une vésicule golgienne proche de l'enveloppe nucléaire. Une écaille organique basale est formée à l'intérieur de cette vésicule à coccolithe puis la minéralisation se réalise mais sans l'intervention du corps réticulaire.

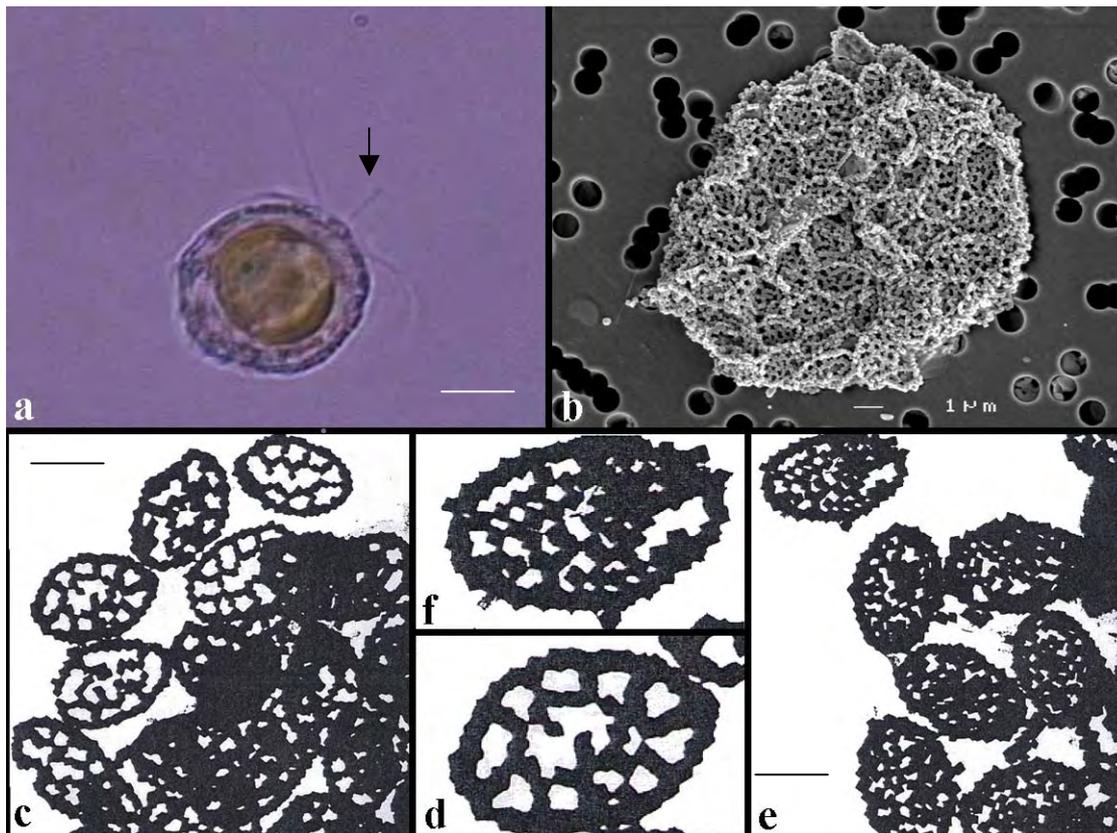


Figure III-8: *Coccolithus pelagicus s. l.*, phase à holococcolithes. (a) aspect en microscopie photonique de *Coccolithus braarudii*, phase « *Crystallolithus braarudii* » (barre d'échelle = 5µm), la flèche correspondant à l'haptonème, (b) photographie en MEB de *Coccolithus braarudii*, phase « *Crystallolithus braarudii* » (barre d'échelle = 1µm) ; (c) et (d) détails en MET de coccolithes de *Coccolithus braarudii*, phase « *Crystallolithus braarudii* », (f) et (e) détails en MET de coccolithes de *Coccolithus pelagicus s.s.*, phase « *Crystallolithus hyalinus* ». Barres d'échelles pour (c) et (e) = 1µm. (c)-(e) : photos in Rowson (1986).

L'ensemble de ces coccolithes (entre 12 et 15, Rowson, 1986) forme la coccosphère de *C. pelagicus*, qui est monomorphique et monostratifiée.

C'est à partir de la taille de ces coccolithes que sont différenciées les deux espèces (Baumann *et al.*, 2000; Cachao & Moita, 2000, Sáez *et al.*, 2003), *C. pelagicus* et *C. braarudii*, la première présentant des coccolithes de **10 à 16 μm** de long et la seconde de **6 à 11 μm** (Figure III-7 a et b). Les deux espèces présentent toutefois une morphologie très voisine et seul ce caractère « taille des coccolithes » permet de les distinguer dans la phase à hétérococcolithes.

Sous cette coccosphère et à l'extérieur du plasmalemme, une couche d'écailles assez grandes (1,7 μm de long) est présente notamment dans les zones où les coccolithes sont emboîtés (Figure III-7). En effet, ces écailles « de corps » (*body scales*) ne sont pas distribuées uniformément, mais concentrées en plusieurs couches d'épaisseur au niveau des bords des écailles basales des coccolithes (Rowson, 1986). Entre les écailles et le plasmalemme, il y a présence d'un dépôt « columnar material », constitué de matériel fibrillaire.

Comme chez *Emiliana huxleyi*, la phase à hétérococcolithes (de *C. pelagicus s.s.* ou de *C. braarudii*) est capable de multiplication végétative, chaque cellule-fille se partageant les coccolithes de la cellule-mère.

b. La phase calcifiée à holococcolithes

Cette phase a été décrite à l'origine comme une espèce différente de *C. pelagicus*, *Crystallolithus hyalinus* (Figure III-8 a et b) et considérée comme appartenant au groupe des holococcolithophores. Parke et Adams (1960) mirent en évidence qu'elle constituait en fait une phase du cycle de *Coccolithus pelagicus* (au sens large à cette époque). En 1986, Rowson montra qu'une autre « espèce » de *Crystallolithus*, *Crystallolithus braarudii*, décrite par Gaarder (1962), alternait elle aussi avec *Coccolithus pelagicus s.l.*. Ces deux types d'holococcolithophores, *Cr. hyalinus* et *Cr. braarudii*, sont en fait les phases respectives des deux écotypes et donc par extension des deux espèces de *Coccolithus* (Geisen *et al.*, 2002 ; Sáez *et al.*, 2003). Étant la première espèce décrite, *Coccolithus pelagicus* qui alterne avec *Cr. hyalinus* garde le nom d'origine, tandis que pour l'espèce de *Coccolithus* qui alterne avec *Cr. braarudii*, c'est le nom d'espèce *braarudi* qui est conservé, donnant *Coccolithus braarudii*.

Dans les deux cas, les deux phases à holococcolithes sont très semblables et diffèrent uniquement par des détails de la structure des coccolithes, comme pour les phases à

hétérococolithes. Les informations données ci-dessous sont valables pour les deux types, sauf exception qui seront précisées.

Les cellules alternant avec la phase à hétérococolithes sont plus ou moins sphériques, (10-15 μm de diamètre), mobiles avec deux flagelles égaux ou sub-égaux insérés au niveau du pôle antérieur. Un haptonème est présent entre les deux flagelles (Figure II-8a, flèche) : il mesure entre $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{3}$ de leur longueur et peut être parfois rétracté à l'intérieur de la cellule ou enroulé sur lui-même.

Les cellules présentent l'organisation cytologique classique des haptophytes. Au delà du plasmalemme, les cellules de la phase mobile de *Coccolithus* arborent plusieurs strates de matériel. La première juste à l'extérieur du plasmalemme est constituée d'un dépôt de matériel fibrillaire dont les éléments sont de petite taille (0,15 x 0,013 μm). Il y a présence ensuite d'une ou plusieurs couches d'écailles organiques (*body scales*) avec deux catégories de taille : les plus grandes, elliptiques et plates distribuées uniformément autour de la cellule, et les plus petites, rondes à elliptiques groupées à proximité du pôle flagellaire. Les deux catégories d'écailles présentent l'ornementation classique des Prymnesiophyceae avec sur la face proximale des microfibrilles radiales arrangées en quadrants et sur la face distale des motifs plus ou moins concentriques ou spiralés.

Une ou plusieurs épaisseurs d'holococcolithes (de type *crystallolithes*) succèdent ensuite à cette couche d'écailles. Ils sont constitués d'une écaille organique plate surmontée de cristaux rhomboédriques de calcite. Ces écailles basales des holococcolithes présentent sur leur face proximale les mêmes motifs que ceux des écailles précédentes. Le bord de ces écailles basales présente une double couche de cristaux tandis que le centre de l'écaille est couvert de cristaux en monocouche disposés plus ou moins régulièrement. La différence morphologique entre les formes *hyalinus* et *braarudii* est essentiellement basée sur l'arrangement des cristaux au centre de l'écaille basale, la forme *braarudii* ayant un motif caractéristique avec des bandes radiales de *crystallolithes* (Figure III-8 c à e). La calcification des *crystallolithes* semblent prendre place à l'extérieur de la cellule (contrairement à la calcification des *placolithes*), les premières étapes montrant des *coccolithes* identiques pour les deux espèces puis après deux ou trois *coccolithes* produits, le schéma caractéristique observé pour *braarudii* apparaît.

Autour des ces holococcolithes une enveloppe recouvre l'ensemble des éléments extérieurs au plasmalemme.

De même que la phase non mobile, cette phase nageuse *Crystallolithus* est capable de reproduction végétative. Elle duplique d'abord son appareil flagellaire et l'haptonème puis se

divise en deux cellules-filles plus ou moins égales, chacune conservant la moitié des coccolithes le plus souvent, mais parfois deux cellules filles sans coccolithes quittent la coccosphère-mère et refont chacune une enveloppe de coccolithes.

Au final, l'espèce *Coccolithus pelagicus* s.s. alterne avec la forme *Crystallolithus hyalinus*, tandis que *Coccolithus braarudii* alterne avec *Crystallolithus braarudii*. Les deux espèces étant très proches morphologiquement, une étude approfondie en microscopie électronique s'avère nécessaire pour les distinguer. De temps à autres, des formes particulières, considérées comme étant intermédiaires dans le cycle de vie, peuvent être rencontrées, les mixtes (*combination cells*). Elles présentent les deux types de coccolithes associés sur une même coccosphère. Quelques cas ont été observés dans la nature pour l'espèce *C. pelagicus* (Samtleben et Dickert, 1990 ; Samtleben et Schröder, 1992 ; Baumann *et al.*, 1997 ; Geisen *et al.*, 2002) mais aucune pour *C. braarudii*.

3. *Ecotypes, spéciation et biogéographie*

L'étude des deux espèces, rassemblées sous la désignation *Coccolithus pelagicus* il y a encore peu, est largement compliquée par le fait que la plupart des données existantes concernent aléatoirement l'une ou l'autre des nouvelles espèces désignées par Sáez *et al.* (2003).

Geisen *et al.* (2002) apportent des précisions sur les espèces étudiées dans les publications majeures parues ces dernières années, sachant qu'ils considéraient alors que *Coccolithus pelagicus* comportaient deux écotypes, la forme *pelagicus* et la forme *braarudii*. Ces deux écotypes (comme les deux espèces) se différencient par la taille de leurs coccolithes (et ce pour les deux phases de leur cycle) et sont considérés comme ayant des aires de répartition en grande partie superposables. Ainsi, la première publication sur le cycle de *Coccolithus pelagicus* (Parke et Adams, 1960) concernerait en fait l'espèce *Coccolithus braarudii*, de même que l'étude de Rowson *et al.* (1986). Toutefois, la thèse de Rowson, (1986), serait basée sur les deux espèces *C. pelagicus* et *C. braarudii*, les expériences de physiologie étant faites sur la première.

Malgré tout, la variation de taille entre les coccolithes des deux espèces pour les phases à placolithes étant peu marquée, la distinction entre les deux espèces au stade *Coccolithus* peut s'avérer impossible. La thèse de Rowson (1986) en est un bon exemple ; son étude des coccolithes de 25 coccosphères de plusieurs souches différentes (182i, M77S, M77i,

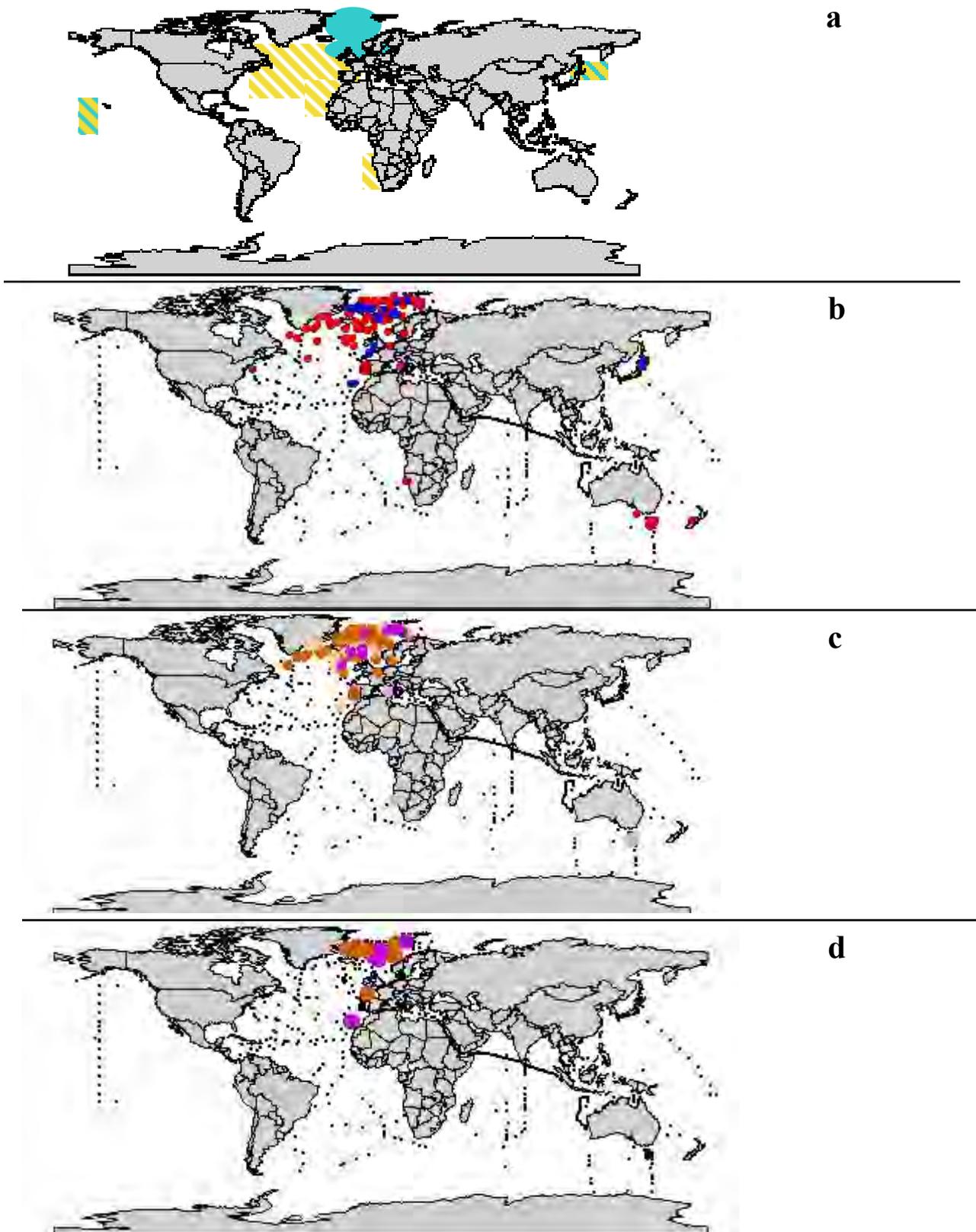


Figure III-9 : Répartition géographique de *Coccolithus pelagicus* s.l., (a)- aire de répartition des deux espèces de *Coccolithus* (*Coccolithus braarudii* phase à hétérococcolithes, *Coccolithus pelagicus* phase à hétérococcolithes, *Coccolithus pelagicus* s.l. phase à hétérococcolithes), (b)- aire de répartition de *Coccolithus pelagicus* s.l. phase à hétérococcolithes (●) et à holococcolithes (●) à partir des données des publications définies en annexe 2, (c) aire de répartition de *Coccolithus pelagicus* s.l. phase à hétérococcolithes en fonction des saisons (● janvier à mars, ● avril à juin, ● juillet à septembre ● octobre à décembre) et (d) aire de répartition de *Coccolithus pelagicus* s.l. phase à holococcolithes en fonction des saisons (● janvier à mars, ● avril à juin, ● juillet à septembre ● octobre à décembre). Les points noirs correspondent à des zones de prélèvements où sont retrouvées des coccolithophores. Répartitions à partir des données des publications fournies en annexe 2.

M77N et M77Na, toutes provenant de la collection de Plymouth) et les moyennes obtenues pour la longueur des coccolithes sont dans la plupart des cas comprises entre 10 et 12 μ m à \pm 1,5. Il est donc impossible à partir du seul caractère taille des placolithes de définir l'appartenance d'une coccosphère à une espèce de *Coccolithus* plutôt qu'à une autre. Le seul caractère qui permet alors de les distinguer est la phase alternante à holococcolithes où le caractère marquant est plus clairement établi que pour les phases à placolithes.

Il est évident que ceci compliquera beaucoup à l'avenir la distinction entre les deux espèces et qu'en règle générale, en cas de difficultés de distinction, une désignation de *Coccolithus pelagicus s.l.* regroupant les deux taxons pourra s'avérer nécessaire.

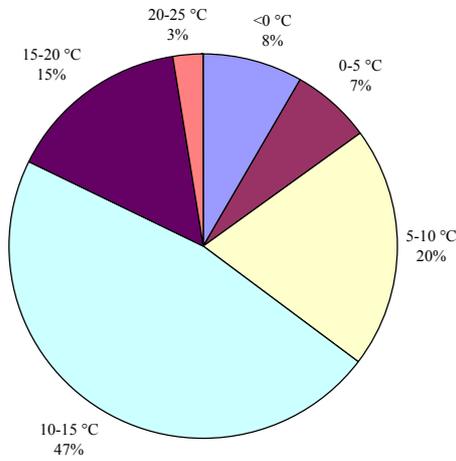
En se basant sur les données récentes, notamment les travaux réalisés par Baumann, Samtleben et leurs collaborateurs pour la Mer du Nord et l'Atlantique Nord ainsi que par Cachão pour l'Atlantique Nord Est (Portugal), des aires de répartition ont été évaluées pour les deux espèces.

L'espèce *C. pelagicus* semble plutôt nordique, confinée aux zones Atlantique Nord et Atlantique Nord Est, tandis que *C. braarudii* serait une espèce tempérée, associée notamment aux zones d'upwelling et à l'Atlantique NE (Figure III-9 a). Les quelques données existantes pour le Pacifique sont difficiles à attribuer à une espèce plutôt qu'à une autre, de même que pour les zones situés autour du Japon et de l'Australie.

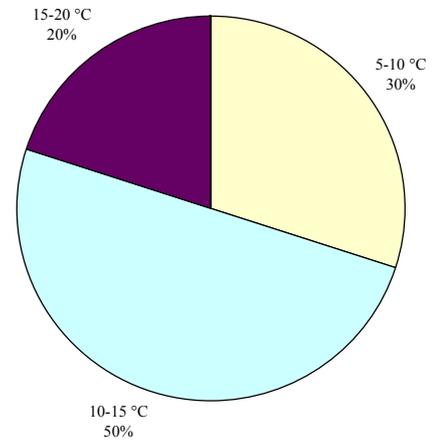
Les zones de répartition de *Coccolithus pelagicus s.l.* en fonction des phases sont sensiblement les mêmes, malgré le net manque de données pour les phases à holococcolithes (Figure III-9 b). Cette absence est explicable d'une part par la petite taille de ces cellules mais aussi par leur extrême fragilité (il est difficile de garder intacte la coccosphère qui s'écrase sur le support lors de la filtration or c'est la technique la plus couramment employée pour l'identification des coccolithophores, la microscopie électronique étant de rigueur). Des données complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre la biogéographie de ces espèces.

Toutefois à partir des données disponibles dans la littérature, il est possible de définir les saisons, les températures et les profondeurs auxquelles ces espèces sont rencontrées. La phase à hétérococcolithes de *Coccolithus pelagicus s.l.* se retrouve entre -1,5 et 25 °C et la phase à holococcolithes entre 5 et 20°C (Figure III-10 a et b). Les deux phases sont présentes dans toute la colonne d'eau avec une prépondérance forte entre 0 et 25 m (Figure III-10 c et d). Dans les deux cas (profondeur et température), il faut nuancer les résultats obtenus du fait que les données sont fortement liées et limitées par les campagnes, majoritairement réalisées

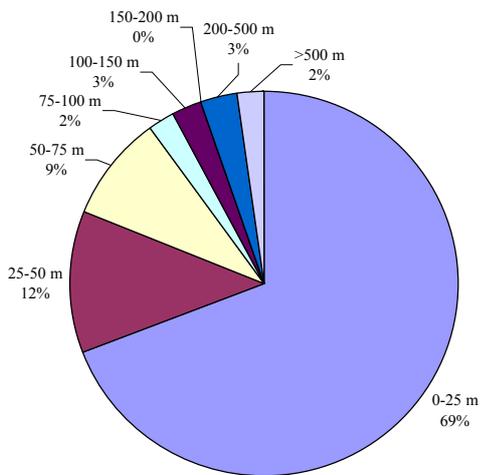
a- Phase *Coccolithus*



b- Phase *Crystallolithus*



c- Phase *Coccolithus*



d- Phase *Crystallolithus*

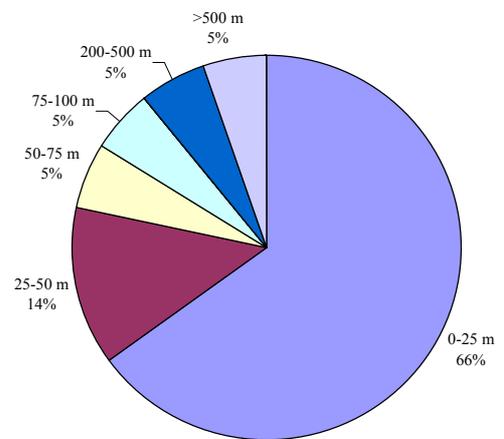


Figure III-10 : Répartition de *Coccolithus pelagicus s. l.* en fonction des données de température et de profondeur d’après les publications analysées (cf. annexe 2). (a) selon la température en °C pour la phase à hétérococcolithes et (b) selon la température en °C pour la phase à holococcolithes ; (c) selon la profondeur en m pour la phase à hétérococcolithes et (d) pour la phase à holococcolithes.

lors de conditions météorologiques favorables (limitant ainsi les campagnes en hiver) ce qui est illustré en Figure III-9 c et d. De plus, il apparaît peu probable que pour les profondeurs de supérieures à 500 m, les cellules soient encore vivantes, comme pour *Emiliana huxleyi* seule la coccosphère serait présente.

4. Origine de la souche utilisée

Comme pour *Emiliana huxleyi*, différents clones de *Coccolithus pelagicus s.l.* ont été isolés au cours de ces dernières années par Ian Probert et à l'origine sous leur forme à hétérococcolithes. Par la suite, la souche **LK1** (originnaire d' Arcachon, Atlantique, France, isolée en février 1999) a changé de phase (en 1999), avec présence dans la culture de cellules de la forme à holococcolithes « *Crystallolithus braarudii* ». Les deux phases ont par la suite été isolées et cultivées séparément. Cette souche de *Coccolithus pelagicus s. l.* (à cette époque, une seule espèce était reconnue) étant la première à avoir changé de phase, elle fut logiquement sélectionnée pour les expérimentations portant sur le cycle des coccolithophores.

II. CALCIDISCUS LEPTOPORUS (MURRAY ET BLACKMAN) LOEBLICH ET TAPPAN

1. Classification

Le genre *Calcidiscus* Kamptner appartient à l'ordre des Coccolithales et à la famille des Calcidiscaceae instaurée par Young et Bown en 1997 (Tableau III-1). L'espèce *C. leptoporus* est basée sur *Coccosphaera leptopora* Murray et Blackman 1898. L'histoire complexe de ce taxon et des nombreux synonymes du genre *Calcidiscus* a été rapportée par Loeblich et Tappan (1978).

Comme pour *Coccolithus pelagicus*, des travaux récents ont mis en évidence que *C. leptoporus* renfermerait en fait deux espèces distinctes : *Calcidiscus leptoporus s.s.* et *C. quadriperforatus* (Sáez *et al.*, 2003). Là aussi, la plupart des données bibliographiques

lors de conditions météorologiques favorables (limitant ainsi les campagnes en hiver) ce qui est illustré en Figure III-9 c et d. De plus, il apparaît peu probable que pour les profondeurs de supérieures à 500 m, les cellules soient encore vivantes, comme pour *Emiliana huxleyi* seule la coccosphère serait présente.

1. Origine de la souche utilisée

Comme pour *Emiliana huxleyi*, différents clones de *Coccolithus pelagicus s.l.* ont été isolés au cours de ces dernières années par Ian Probert et à l'origine sous leur forme à hétérococcolithes. Par la suite, la souche **LK1** (originnaire d' Arcachon, Atlantique, France, isolée en février 1999) a changé de phase (en 1999), avec présence dans la culture de cellules de la forme à holococcolithes « *Crystallolithus braarudii* ». Les deux phases ont par la suite été isolées et cultivées séparément. Cette souche de *Coccolithus pelagicus s. l.* (à cette époque, une seule espèce était reconnue) étant la première à avoir changé de phase, elle fut logiquement sélectionnée pour les expérimentations portant sur le cycle des coccolithophores.

I. CALCIDISCUS LEPTOPORUS (MURRAY ET BLACKMAN) LOEBLICH ET TAPPAN

1. Classification

Le genre *Calcidiscus* Kamptner appartient à l'ordre des Coccolithales et à la famille des Calcidiscaceae instaurée par Young et Bown en 1997 (Tableau III-1). L'espèce *C. leptoporus* est basée sur *Coccosphaera leptopora* Murray et Blackman 1898. L'histoire complexe de ce taxon et des nombreux synonymes du genre *Calcidiscus* a été rapportée par Loeblich et Tappan (1978).

Comme pour *Coccolithus pelagicus*, des travaux récents ont mis en évidence que *C. leptoporus* renfermerait en fait deux espèces distinctes : *Calcidiscus leptoporus s.s.* et *C. quadriperforatus* (Sáez *et al.*, 2003). Là aussi, la plupart des données bibliographiques

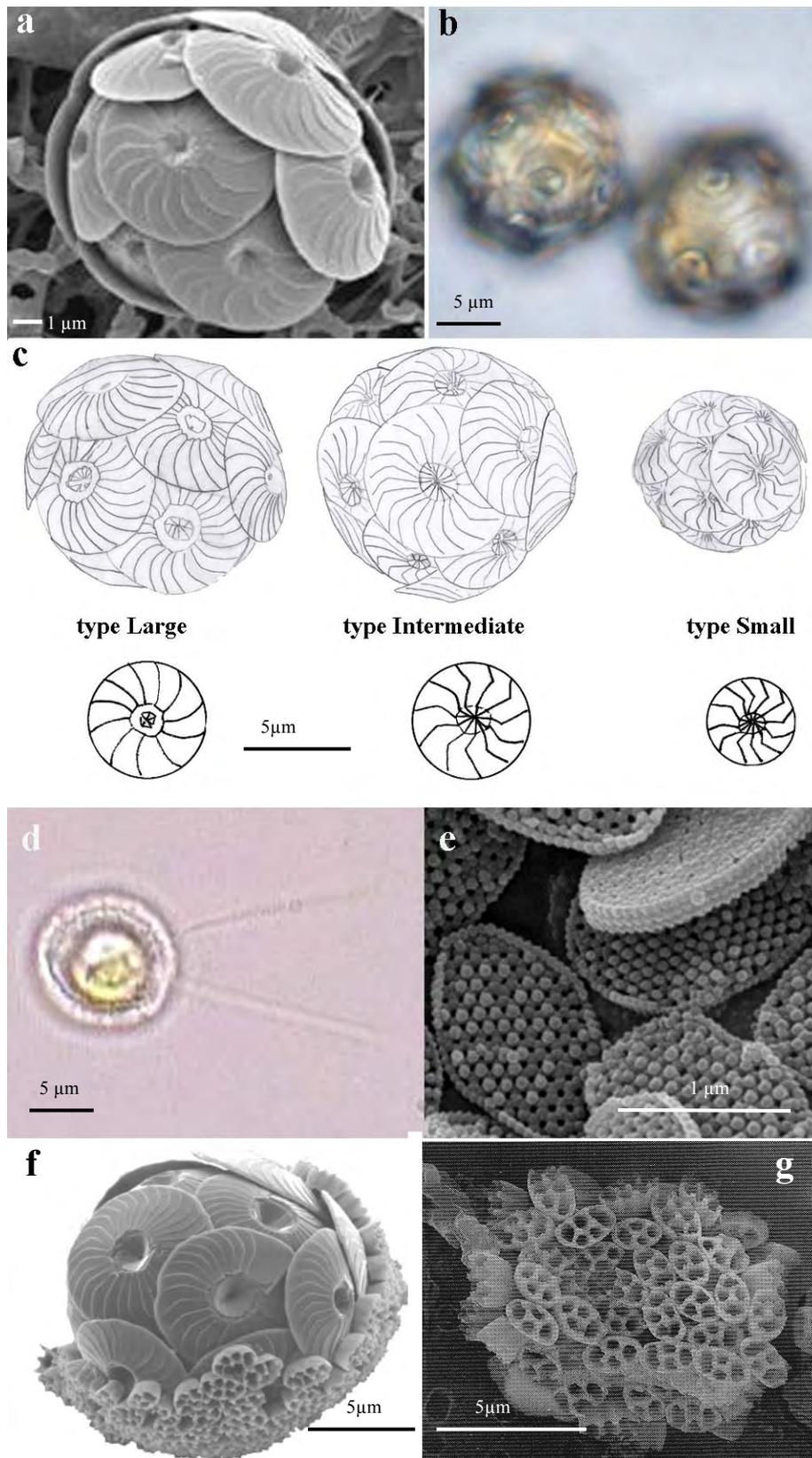


Figure III-11 : *Calcidiscus leptoporus*, phases à hétérococcolithes et holococcolithes. (a) phase à hétérococcolithes en MEB ; (b) phase à hétérococcolithes en microscopie photonique, objectif x100 ; (c) les trois écotypes de *Calcidiscus leptoporus* : Large, Intermediate et Small, (d) phase à holococcolithes en microscopie photonique, objectif x100, (e) détails des holococcolithes en MEB ; (f) coccosphère mixte *C. leptoporus* / *Syracolithus quadriperforatus* en MEB ; (g) *S. quadriperforatus* en MEB. (a), (e) et (f) : photos M. Geisen; (g): photos A. Kleijne.

concernent *Calcidiscus leptoporus* au sens large, dénommé ci-après comme *Calcidiscus s. l.*. Des précisions sur les espèces récemment délimitées seront apportées dans la suite du texte.

La plupart des données sur *Calcidiscus leptoporus s.l.* concernent des prélèvements naturels, les cultures de cette espèce étant rares. Il s'agit malgré tout d'une coccolithophore couramment rencontrée dans certains biotopes où elle peut être modérément abondante. De plus, sa résistance à la dissolution lui confère une place importante dans les assemblages de coccolithes des sédiments (McIntyre et Bé, 1970). C'est en partie pour ces raisons qu'elle a été sélectionnée comme modèle d'étude dans le programme CODENET.

2. Cycle et morphologie

Cette espèce est plus couramment rencontrée sous la forme d'une cellule à hétérococcolithes. Toutefois, lors de différentes campagnes océanographiques, des coccosphères mixtes combinant cette « espèce » à hétérococcolithes et une « espèce » à holococcolithes ont été observées (Kleijne, 1991 ; Cortes 2000 ; Cros *et al.*, 2000 ; Geisen *et al.*, 2002). A partir de ces observations les différents auteurs ci-dessus ont conclu à l'existence chez *Calcidiscus* d'un cycle hétéromorphe du même type que celui de *Coccolithus pelagicus*, entre une forme à holococcolithes et une à hétérococcolithes.

a. La phase calcifiée à hétérococcolithes

Cette phase, la première décrite, et qui donne donc son nom à l'espèce, est constituée de cellules non mobiles, présentant des bases flagellaires (Ian Probert, com. pers.). La coccosphère est massive, sphérique à sub-sphérique, recouverte de placolithes épais (Figure III-11 a et b). Ces derniers sont caractéristiques, avec une large face distale à sutures courbes et lévogyre. Ils sont sub-circulaires avec une zone centrale fermée ou étroite, et sont étroitement imbriqués pour recouvrir entièrement la cellule selon le même principe que *Coccolithus pelagicus*.

De nombreuses études récentes sur les coccolithophores, des sédiments notamment, ont apporté des informations complémentaires sur la morphologie de cette phase. Ainsi Kleijne (1991), Knappertsbusch *et al.* (1997) et Renaud et Klaas (2002) définissent trois morphotypes différents selon l'aspect des placolithes (Figure III-11 c) :

- Le morphotype **petit** (S pour *small* ou type A de Kleijne, 1991) dont les coccolithes circulaires mesurent de 3-5 μm de diamètre avec 10 à 20 éléments,

les sutures de la face distale étant plus anguleuses et serrées. Ils possèdent une aire centrale en forme de cratère.

- Le morphotype **large** (L ou type B de Kleijne, 1991), grand et robuste avec des coccolithes de 7-11 μm constitués de 20 à 35 éléments pour la face distale dont les sutures sont légèrement courbes par rapport au type S. L'aire centrale diffère elle aussi, avec une séparation beaucoup plus nette entre les éléments de la face distale et ceux du tube, les sutures de la première formant une crête au dessus des éléments du tube qui convergent vers le centre de celui-ci.
- Le morphotype **intermédiaire** (I ou C pour Kleijne, 1991) avec des coccolithes de 5-8 μm de diamètre avec 15 à 30 éléments, présente des caractéristiques des deux autres morphotypes, l'aire centrale étant toutefois plus proche de la forme S que de la L.

Calcidiscus leptoporus n'a pas fait l'objet d'une étude ultrastructurale détaillée et les rares données existantes (I. Probert, com. pers.) ne montrent pas de différences majeures avec les Coccolithaceae.

b. La phase calcifiée à holococcolithes

Comme pour *Coccolithus pelagicus*, la phase alternante dans le cycle de vie de *Calcidiscus leptoporus* fut à l'origine décrite comme une espèce à part entière, *Crystallolithus rigidus* Gaarder (Figure III-11 d et e). C'est grâce à l'observation de coccosphères mixtes que Kleijne (1991) a formulé l'hypothèse d'un cycle de vie hétéromorphe reliant ces deux organismes. L'espèce conserve le nom du taxon le plus ancien, soit *Calcidiscus leptoporus*. D'autres coccosphères mixtes furent observées par la suite et par différents auteurs (Cortés, 2000 ; Renaud et Klaas, 2001), ainsi que des changements de phase en culture (Geisen *et al.*, 2002) renforçant donc l'hypothèse de l'existence d'une seule et même espèce *C. leptoporus* à deux phases morphologiquement distinctes.

La phase *Crystallolithus rigidus* (Figure III-11 d et e) est très proche de *C. hyalinus*, mobile avec deux flagelles et un haptonème. La coccosphère est monomorphe d'environ 13 μm de diamètre, entourée de crystallolithes plats et elliptiques. Ceux-ci sont constitués de deux couches de cristaux sauf au niveau du bord qui en comporte trois, les cristaux montrent une disposition hexagonale avec des perforations (Figure III-11, e). Des variations existent au niveau de l'aire centrale, avec des cristaux pouvant être bien individualisés ou plus ou moins soudés entre eux (voir Kleijne, 1991).

Lors d'études récentes, Geisen *et al.* (2002) mirent à leur tour en évidence une autre alternance entre *C. leptoporus s.l.* et une holococcolithophore différente de *Crystallolithus rigidus*, *Syracolithus quadriperforatus* Kamptner (Gaarder) (Figure III-11 g). Une seule et unique coccosphère mixte a été trouvée pour ce cycle mais qui ne laisse place à aucune ambiguïté. Les deux holococcolithophores diffèrent nettement par l'aspect de leurs coccolithes, *S. quadriperforatus* étant pourvu de coccolithes plus épais que ceux de *Cr. rigidus*, avec un tube assez haut, lui-même percé de 4 à 6 trous. Malgré leurs différences apparentes, ces deux types de crystallolithes présentent la même crystallographie. *Cr. Rigidus* et *S. quadriperforatus* sont toutes les deux des formes flagellées.

En synthétisant les éléments existants, Geisen *et al.* (2002) ont mis en évidence que ces deux holococcolithophores alterneraient en fait avec deux morphotypes distincts de *Calcidiscus*, *Cr. rigidus* avec le morphotype I à hétérococcolithes intermédiaires et *S. quadriperforatus* avec le morphotype L large. Ils préconisent alors de redéfinir ces morphotypes en sous-espèces avec *Calcidiscus leptoporus* subsp. *leptoporus* pour l'intermédiaire alternant avec *C. rigidus* et *Calcidiscus leptoporus* subsp. *quadriperforatus* pour le grand morphotype. Concernant le type morphologique S, l'absence de phase alternante ne permet pas de définir un nouveau nom et ils prônent de conserver l'appellation Small pour le moment.

Toutefois une récente publication fait état de différences génétiques (basées sur la séquence du gène chloroplastique TufA), suffisamment importantes pour pouvoir distinguer les deux sous-espèces précédemment définies par Geisen *et al.* (2002). Celles-ci sont élevées au rang d'espèce, *Calcidiscus leptoporus* et *Calcidiscus quadriperforatus* (Sáez *et al.*, 2003). Les deux espèces de *Calcidiscus* définies récemment semblent avoir divergé l'une de l'autre il y a environ 10 Ma (Knappertsbusch, 2000 ; Sáez *et al.*, 2003). Ces auteurs n'apportent pas d'information supplémentaire concernant le petit morphotype de *Calcidiscus*, faute de matériel à analyser.

3. Biogéographie

Calcidiscus leptoporus s.l. a été trouvé dans le Pacifique central, dans l'Atlantique Nord et central, dans l'Océan Indien, dans la mer des Caraïbes et au sud de l'Australie (Figure III-12 a). *Calcidiscus* est rencontré tout au long de l'année dans l'Atlantique, majoritairement d'octobre à mars dans l'hémisphère Sud et d'avril à septembre dans l'Océan Indien (Figure

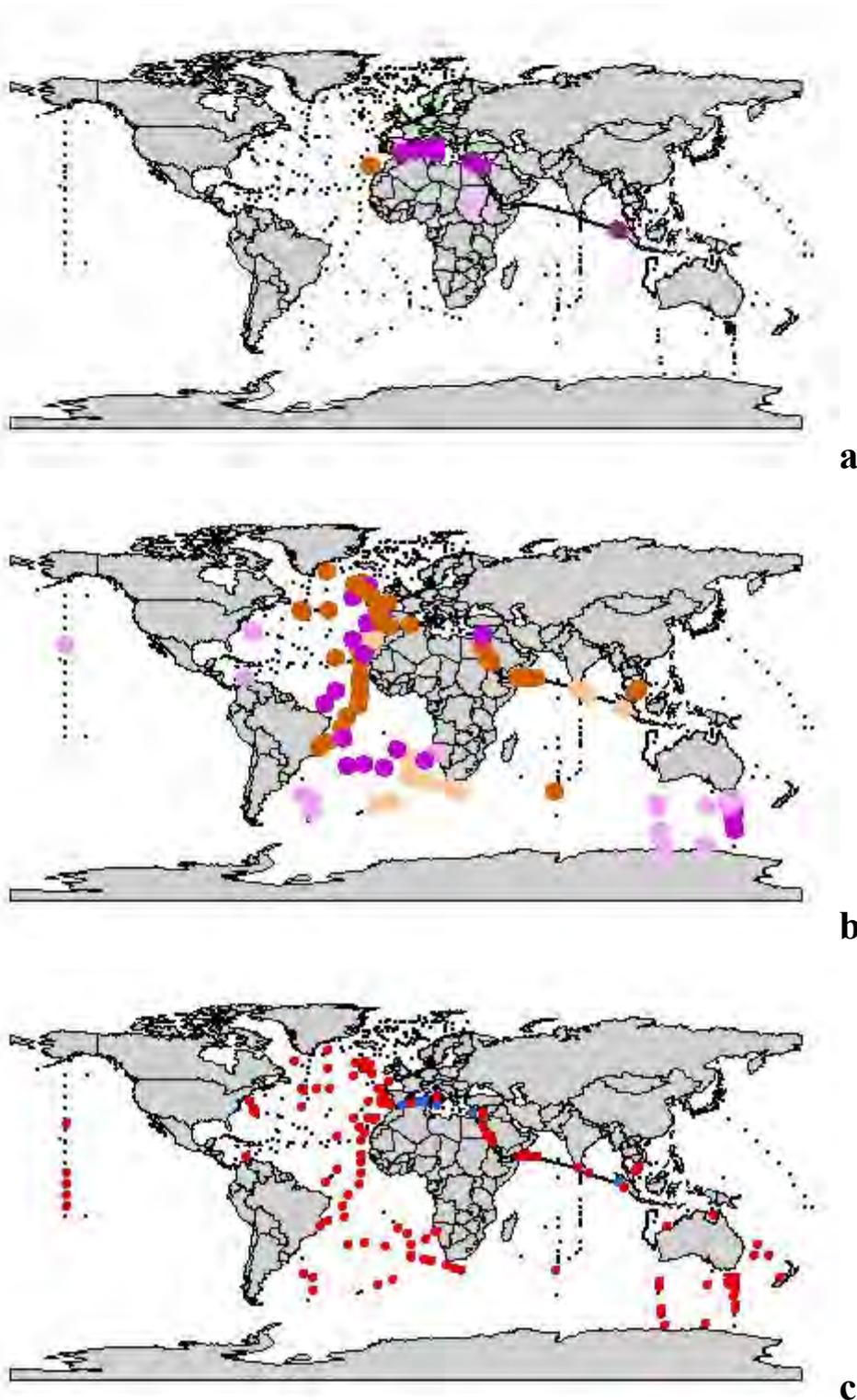


Figure III-12 : Répartition géographique de *Calcidiscus leptoporus* s.l.. (a) aire de répartition de *Calcidiscus quadriperforatus*, phase à holococcolithes (●) et *Calcidiscus leptoporus*, phase à holococcolithes (●) à partir des données des publications définies en annexe 1 ; (b) aire de répartition de *Calcidiscus leptoporus* s.l. phase à hétérococcolithes en fonction des saisons (● janvier à mars, ● avril à juin, ● juillet à septembre ● octobre à décembre), et (c) aire de répartition de *Calcidiscus leptoporus* s.l. phase à hétérococcolithes (●) et à holococcolithes (●) à partir des données des publications définies en annexe 2. Les points noirs correspondent aux zones de prélèvements contenant des coccolithophores.

III-12 b), les répartitions temporelles étant souvent biaisées par les fréquences des campagnes d'échantillonnages comme pour l'espèce précédente. Comme pour *C. pelagicus*, les données concernant les phases à holococcolithes sont peu fréquentes (Figure III-12 c), ce fait étant là encore lié à leur faible résistance au filtrage et à la dissolution ainsi qu'à leur petite taille. Les différents morphotypes ou espèces mis en évidence au cours des dernières années présentent des aires de répartition peu différentes, souvent très recouvrantes. D'après Kleijne (1993), les morphotypes L et S (L correspondant à l'espèce *Calcidiscus quadriperforatus*) sont rencontrés dans les mêmes zones, à fortes températures, de l'Océan Indien et de la Mer Rouge, tandis que dans les zones plus tempérées la forme I = *Calcidiscus leptoporus s.s.* domine plus nettement.

Les données de température et de profondeur pour *Calcidiscus leptoporus s. l.* sont peu représentatives, du fait de l'absence d'information sur les morphotypes concernés. Ainsi, elle est particulièrement rencontrée dans les 75 premiers mètres (Figure III-13 a) mais elle est présente jusqu'à des profondeurs de 500 m (à ces profondeurs, comme pour *Coccolithus pelagicus* ou *Emiliania huxleyi*, ces coccosphères peuvent être vides, sans cellule, d'où une réserve concernant ces données de profondeur). Quant aux informations sur les températures, elles sont peu précises et nous indiquent juste que des formes de *Calcidiscus leptoporus* sont présentes dans une gamme assez large allant de températures négatives à plus de 30°C (Figure II-13 b).

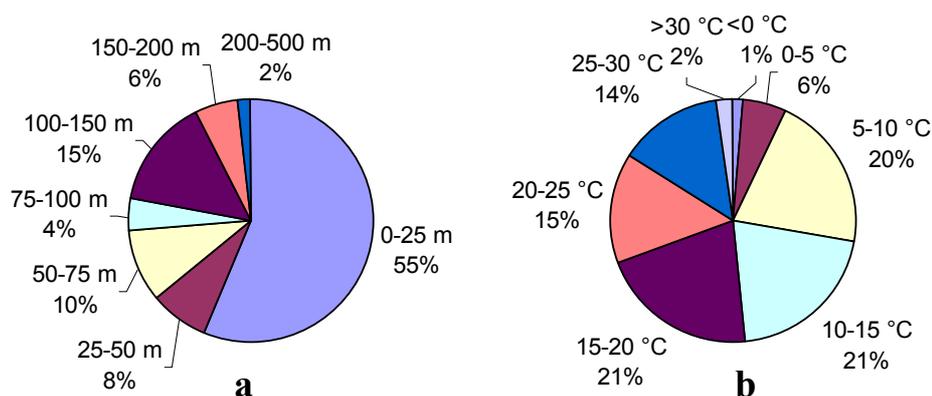


Figure III-13 : Répartition de *Calcidiscus leptoporus s.l.*, phase à hétérococcolithes, en fonction de la profondeur (a) et de la température (b) à partir des données des publications fournies en Annexe 2.

4. *Origine et type de la souche utilisée*

Une des premières souches de *Calcidiscus leptoporus* cultivée au laboratoire (isolée en tant que *C. leptoporus s.l.*, à cette époque, une seule espèce étant décrite) est originaire des eaux d'Afrique du Sud. Cette souche, **NS 10_2**, a été isolée en septembre 2000 par Ian Probert et a présenté un changement de phase en 2001, les deux phases ayant par la suite été cultivées séparément avec succès. Il s'agit de la forme intermédiaire du complexe *Calcidiscus leptoporus s.l.*, ce qui correspond à *Calcidiscus leptoporus* selon Sáez *et al.* (2003).

II. CORONOSPHERA MEDITERRANEA (LOHMANN) GAARDER

1. *Classification*

La famille des Syracosphaeraceae est une des familles les plus diversifiées au sein du groupe des coccolithophores (Jordan et Kleijne, 1994) avec une grande variété d'espèces, notamment celles appartenant au genre *Syracosphaera* Lohmann (voir Cros (2000) pour une revue du genre). Le genre *Coronosphaera* Gaarder a été rattaché à cette famille et ce malgré certaines différences morphologiques importantes entre les deux genres.

Le genre *Coronosphaera* a été défini par Gaarder in Gaarder et Heimdal (1977) et résulte de la séparation du genre *Syracosphaera* en deux genres différents (le troisième genre proposé, *Caneosphaera*, a été depuis abandonné) : *Syracosphaera* (qui présente deux strates de coccolithes différents = une coccosphère dithèque) et *Coronosphaera* (qui ne présente qu'une seule strate de coccolithes = une coccosphère monothèque). L'espèce type de ce dernier genre est *Coronosphaera mediterranea* (Lohmann) Gaarder, décrite à l'origine sous le nom de *Syracosphaera mediterranea* (Lohmann, 1902). Il s'agit de l'une des espèces de coccolithophores les plus couramment rencontrées selon Gaarder et Heimdal (1977)

Peu d'études sont actuellement disponibles pour cette espèce qui n'a que rarement été cultivée avec succès. Les seules données existantes concernent donc sa distribution géographique ou encore son cycle avec la mise en évidence de coccosphères mixtes dans les échantillons naturels.

1. Origine et type de la souche utilisée

Une des premières souches de *Calcidiscus leptoporus* cultivée au laboratoire (isolée en tant que *C. leptoporus s.l.*, à cette époque, une seule espèce étant décrite) est originaire des eaux d'Afrique du Sud. Cette souche, **NS 10_2**, a été isolée en septembre 2000 par Ian Probert et a présenté un changement de phase en 2001, les deux phases ayant par la suite été cultivées séparément avec succès. Il s'agit de la forme intermédiaire du complexe *Calcidiscus leptoporus s.l.*, ce qui correspond à *Calcidiscus leptoporus* selon Sáez *et al.* (2003).

I. CORONOSPHERA MEDITERRANEA (LOHMANN) GAARDER

1. Classification

La famille des Syracosphaeraceae est une des familles les plus diversifiées au sein du groupe des coccolithophores (Jordan et Kleijne, 1994) avec une grande variété d'espèces, notamment celles appartenant au genre *Syracosphaera* Lohmann (voir Cros (2000) pour une revue du genre). Le genre *Coronosphaera* Gaarder a été rattaché à cette famille et ce malgré certaines différences morphologiques importantes entre les deux genres.

Le genre *Coronosphaera* a été défini par Gaarder in Gaarder et Heimdal (1977) et résulte de la séparation du genre *Syracosphaera* en deux genres différents (le troisième genre proposé, *Caneosphaera*, a été depuis abandonné) : *Syracosphaera* (qui présente deux strates de coccolithes différents = une coccosphère dithèque) et *Coronosphaera* (qui ne présente qu'une seule strate de coccolithes = une coccosphère monothèque). L'espèce type de ce dernier genre est *Coronosphaera mediterranea* (Lohmann) Gaarder, décrite à l'origine sous le nom de *Syracosphaera mediterranea* (Lohmann, 1902). Il s'agit de l'une des espèces de coccolithophores les plus couramment rencontrées selon Gaarder et Heimdal (1977)

Peu d'études sont actuellement disponibles pour cette espèce qui n'a que rarement été cultivée avec succès. Les seules données existantes concernent donc sa distribution géographique ou encore son cycle avec la mise en évidence de coccosphères mixtes dans les échantillons naturels.

2. Cycle et morphologie

En 1941, Kamptner illustra pour la première fois une coccosphère mixte combinant les hétérococcolithes de *Coronosphaera mediterranea* (Figure III-14 e) avec des coccolithes appartenant à une holococcolithophore, *Calyptrolithina wettsteinii* (Kamptner) Kleijne. Cros *et al.* (2000) mirent à leur tour en évidence des coccosphères mixtes de ces deux espèces (Figure III-14 f), renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle ces deux espèces n'en seraient qu'une seule, toutes deux liées dans un cycle hétéromorphe du type de celui de *Coccolithus pelagicus*. Depuis cet article, deux nouvelles découvertes viennent compliquer notablement cette hypothèse de cycle *Coronosphaera mediterranea* / *Calyptrolithina wettsteinii*. Tout d'abord, une observation faite par Cortés et Bollmann (2002), près de Hawaii, montrant une cellule présentant des coccolithes de *Coronosphaera mediterranea* et de *Calyptrolithophora hasleana* (Gaarder) Heimdal (Figure III-14 g), laissant à supposer que deux holococcolithophores seraient liés à *C. mediterranea* dans un même cycle. Par la suite, dans une culture *Coronosphaera mediterranea* au laboratoire de Caen, des cellules d'un type différent sont apparues, qui après observations en MEB se sont avérées être d'un troisième type d'holococcolithophore, *Zygosphaera hellenica* Kamptner (Geisen *et al.*, 2002). Actuellement, à une seule hétérococcolithophore semble donc correspondre trois holococcolithophores différentes, dans chacun des cas des coccosphères mixtes ayant été observées.

a. La phase calcifiée à hétérococcolithes

La phase à hétérococcolithes, connue sous le nom de *Coronosphaera mediterranea*, est aisément reconnaissable au microscope optique (Figure III-14 b). C'est une cellule ellipsoïde de 13 à 17 µm de long, avec une zone flagellaire clairement définie, entourée de coccolithes « épineux » (Figure III-15 a et b). Elle possède l'appareil flagellaire classique des Prymnesiophyceae, avec deux flagelles et un haptonème.

C'est un cas typique de coccosphère dimorphique, constituée de deux types de coccolithes clairement localisés.

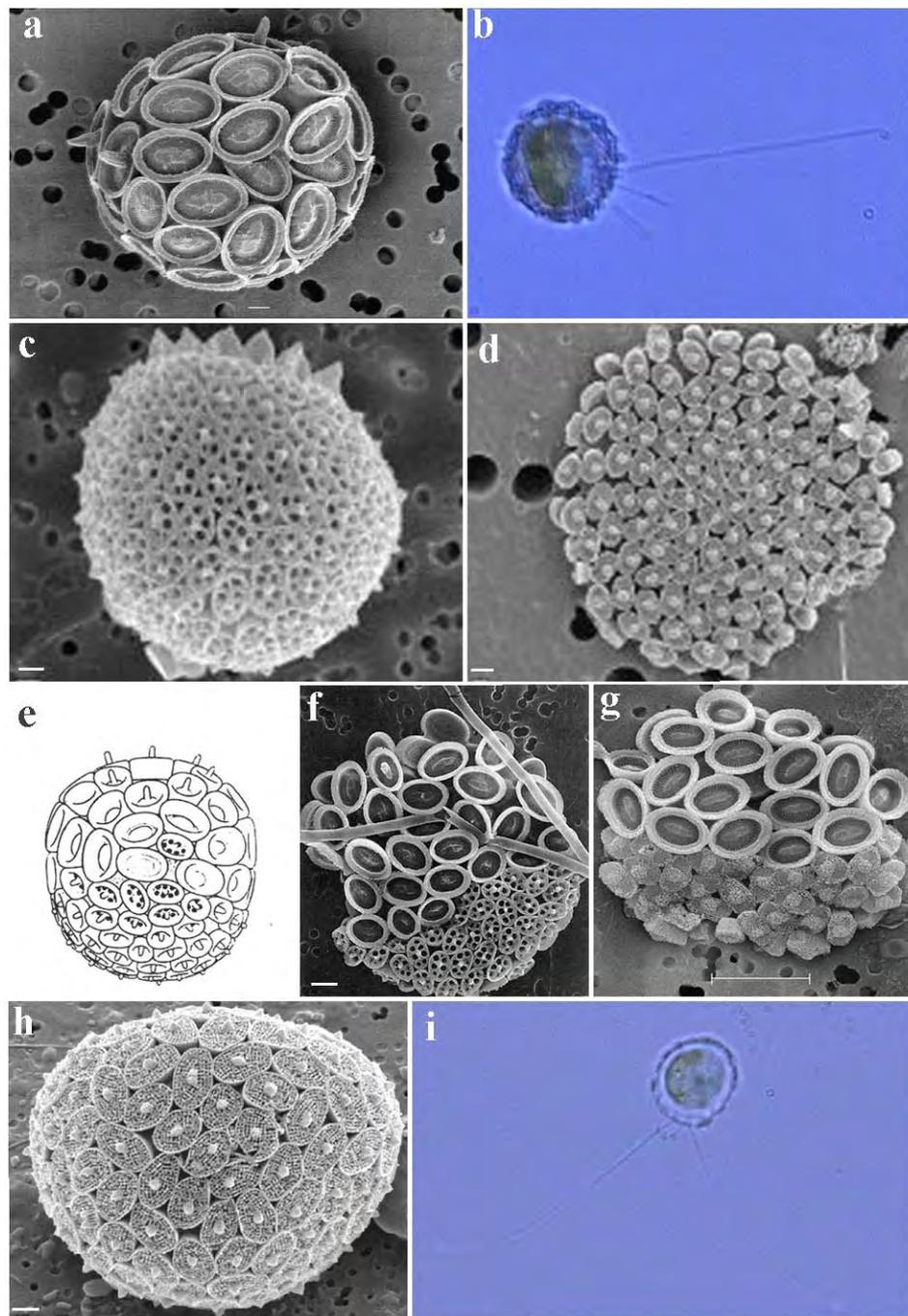


Figure III-14 : *Coronosphaera mediterranea*, phase à hétérococcolithes et phases à holococcolithes. (a) phase à hétérococcolithes e MEB ; (b) phase à hétérococcolithes *C. mediterranea* en microscopie photonique ; (c) *Calyptrolithina. wettsteinii* en MEB ; (d) *Calyptrolithophora hasleana* en MEB ; (e) et (f) cellule de combinaison *C. mediterranea* /*C. wettsteinii* en MEB d'après respectivement Kamptner (1941) et Cros *et al.* (2000), (g) coccosphère mixte *C. mediterranea*/*C. hasleana* en MEB (Cortés et Bollmann, 2002) ; (h) *Zygosphaera hellenica* en MEB et (i) phase à holococcolithes de type *Z. hellenica* en microscopie photonique.(a) photo I. Probert, (c) photo L. Cros, (d) et (h) photos M. Geisen (f) photo L. Cros, (g) photo M. Cortés.

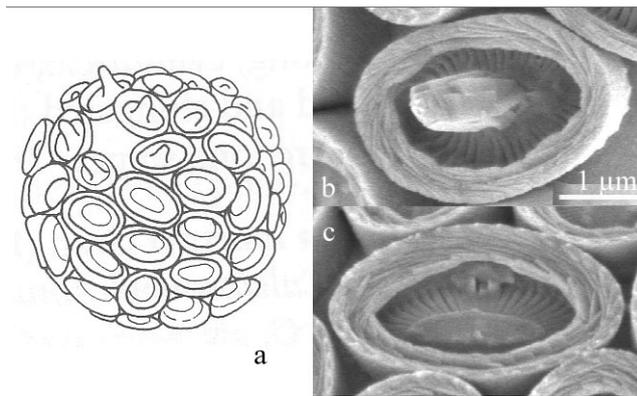


Figure III-15 : Schéma d'une coccosphère dimorphique de *Coronosphaera mediterranea* d'après Heimdal (1993) (a), constituée de canéolithes ordinaires (b) et de canéolithes avec épines autour du puits flagellaire (c) photos A. Houdan.

Les coccolithes majoritaires sont des canéolithes (Figure III-14 a et III-15 c), coccolithes elliptiques (3 - 4,2 µm) à bord étroit formé d'éléments imbriqués. Le fond de ces coccolithes est constitué de différentes lamelles, convergeant vers la partie centrale. Le centre de l'aire centrale est généralement peu structuré, mais légèrement surélevé chez les canéolithes ordinaires de *Coronosphaera mediterranea*. Le deuxième type de coccolithes présent autour de la zone flagellaire est en général bien visible au microscope optique. Il s'agit là encore de canéolithes mais présentant une épine de calcite au niveau de l'aire centrale, mesurant entre 1,2 et 2 µm de haut.

Comme pour *Calcidiscus leptopus*, il existe très peu de données biologiques sur cette espèce rarement cultivée. Son ultrastructure n'a jamais été étudiée, et les données sur son cycle de vie sont encore fragmentaires.

b. Les phases calcifiées à holococcolithes

○ *Calyptrolithina wettsteinii* (Kamptner) Kleijne

Il s'agit de la première des holococcolithophores trouvées impliquées dans le cycle de *C. mediterranea* (Kamptner, 1941 ; Cros *et al.*, 2000). Décrite pour la première fois par Kamptner (1937) sous le nom de *Zygosphaera wettsteinii*, elle fut ensuite transférée dans le genre *Homozygosphaera* (Halldal et Markali, 1955). Ce fut Kleijne (1991) qui la définit comme appartenant au genre *Calyptrolithina* Heimdal, créant ainsi une nouvelle combinaison, *Calyptrolithina wettsteinii* (Kamptner) Kleijne.

C'est une espèce flagellée avec un haptonème, de forme plutôt ellipsoïdale (10,7-11 x 12,5-15,8 μm) (Figure III-14 c). Elle possède une coccosphère dimorphique à holococcolithes elliptiques (Figure III-16 a). Les coccolithes du pôle flagellaire, de type zygotithe (Figure III-16 b), diffèrent des coccolithes ordinaires de type calyptrolithe qui composent le reste de la coccosphère (Figure III-16 c). Les calyptrolithes sont des holococcolithes en forme de cloche, avec ou sans ornements. Ceux de *Calyptrolithina wettsteinii* ont un sommet distal plat. Au milieu de ces pores, une épine épaisse et obtuse domine le coccolithe. En vue latérale, il s'agit de la seule structure visible dépassant du tube, la surface distale n'étant alors pas apparente.

Les coccolithes autour du pôle flagellaire ou coccolithes buccaux sont des zygotithes, ils ont la forme d'un anneau traversé par un arceau transversal qui peut être surmonté d'une protubérance pointue.

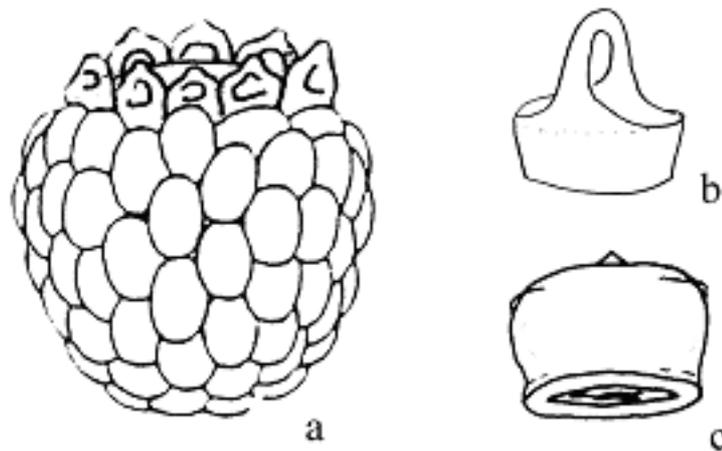


Figure III-16 : Schéma d'une coccosphère dimorphique de type *Calyptrolithina* (a) constituée de zygotithes (b) et de calyptrolithes (c) ; modifié d'après Kleijne (1991) et Chrétiennot-dinet (1990).

○ *Calyptrolithophora hasleana* (Gaarder) Heimdal

Cette holococcolithophore (Figure III-14 d et g), trouvée en association avec *C. mediterranea* par Cortés et Bollmann (2002), a été décrite sous le nom de *Corisphaera hasleana* (Gaarder, 1962). Cette espèce a été intégrée au genre *Calyptrolithophora* par Heimdal (Heimdal et Gaarder, 1980).

C'est une holococcolithophore flagellée, dimorphique (Figure III-17). Les coccolithes majoritaires recouvrant le corps de la cellule sont des calyptrolithes à bord droits et à marge distale développée. Ils ne présentent pas de pores mais un couvercle plat avec au centre une bosse nettement apparente. Les coccolithes de la zone flagellaire sont eux des calyptrolithes

zygomorphes, la bosse centrale étant modifiée pour former une arête perpendiculaire au grand axe du coccolithe.

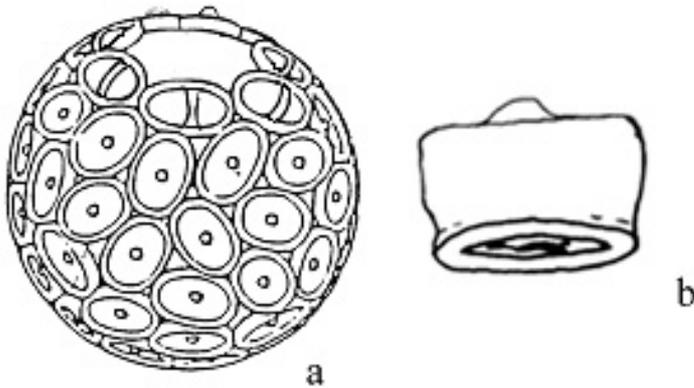


Figure III-17 : Schéma d'une coccosphère dimorphique de *Calyptrolithophora hasleana* (a) constituée de calyptrolithes (b) ; modifié d'après Chrétiennot-Dinet (1990).

○ *Zygosphaera hellenica* Kamptner

Lors d'un isolement et de la mise en culture de la phase à hétérococcolithe de *C. mediterranea* au sein du laboratoire, un changement de phase est intervenu et une holococcolithophore différente des deux précédentes a été identifiée comme étant *Zygosphaera hellenica* (Figure III-14 h). Cette coccolithophore est une espèce dimorphique (Figure III-18) à deux types de coccolithes, laminolithes (coccolithes ordinaires) et zygolithes (coccolithes de la zone flagellaire). Les laminolithes (Figure III-18 c) sont des coccolithes solides, non creux, en forme de disque laminaire elliptique, à surface plane, avec une bordure distale légèrement plus haute que la surface centrale ; celle-ci est ornée d'une bosse centrale. Les coccolithes de la zone flagellaire sont des laminolithes zygomorphes, la bosse centrale étant transformée en extension pétaloïde pointue.

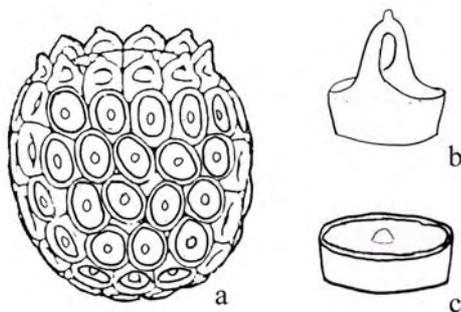


Figure III-18 : Schéma d'une coccosphère dimorphique de *Zygosphaera hellenica* (a) composée de laminolithes (c) et de zygolithes (b) modifié d'après Kleijne (1991) et Chrétiennot-Dinet (1990).

Les trois « espèces » d'holococcolithophores décrites ci-dessus semblent donc correspondre à des phases alternes de la forme à hétérococcolithophore connue sous le nom de *Coronosphaera mediterranea*. Elles sont toutes les trois dimorphiques et relativement proches du point de vue des coccolithes. Il est assez difficile d'interpréter cette multiplicité de formes d'holococcolithes pour une seule hétérococcolithophore (aucune différence apparente n'a pu être mise en évidence entre les hétérococcosphères de *C. mediterranea* alternant avec différentes holococcolithophores). Geisen *et al.* (2002) supposent que le cas de *Coronosphaera mediterranea* / *Calyptrolithina wettsteinii* / *Calyptrolithophora hasleana* / *Zygosphaera hellenica* serait un exemple de « spéciation cryptique », non soupçonné jusqu'à présent. En fait, cette espèce serait en cours de spéciation, phénomène uniquement reflété par la morphologie de la phase à holococcolithes. Une autre espèce de coccolithophore proche de *Coronosphaera mediterranea*, *Syracosphaera pulchra* Lohmann, semble elle aussi présenter le même phénomène de spéciation cryptique, avec présence de plusieurs holococcolithophores alternant avec une phase à hétérococcolithes. Toutefois dans ce cas, une analyse poussée des coccolithes de la phase *S. pulchra* (canéolithes) montre des différences de taille de ces canéolithes suivant la phase alternante (Geisen *et al.*, 2002).

En ce qui concerne la nomenclature, Geisen *et al.* (2002) préconisent l'utilisation de *Coronosphaera mediterranea* pour désigner l'espèce à hétérococcolithes et ce malgré le fait que le genre *Zygosphaera* soit plus ancien, utilisant comme argument le fait que le binôme *Coronosphaera mediterranea* est plus couramment utilisé. Ils proposent de désigner les différentes phases de la façon suivante :

Coronosphaera mediterranea HE \Leftrightarrow phase à hétérococcolithe connu sous le même nom

Coronosphaera mediterranea HO type *wettsteinii* \Leftrightarrow *Calyptrolithina wettsteinii*

Coronosphaera mediterranea HO type *hasleana* \Leftrightarrow *Calyptrolithophora hasleana*

Coronosphaera mediterranea HO type *hellenica* \Leftrightarrow *Zygosphaera hellenica*

3. Biogéographie

Coronosphaera mediterranea est une des espèces de coccolithophores les plus communes dans certaines parties du globe mais elle est peu représentée dans les sédiments et

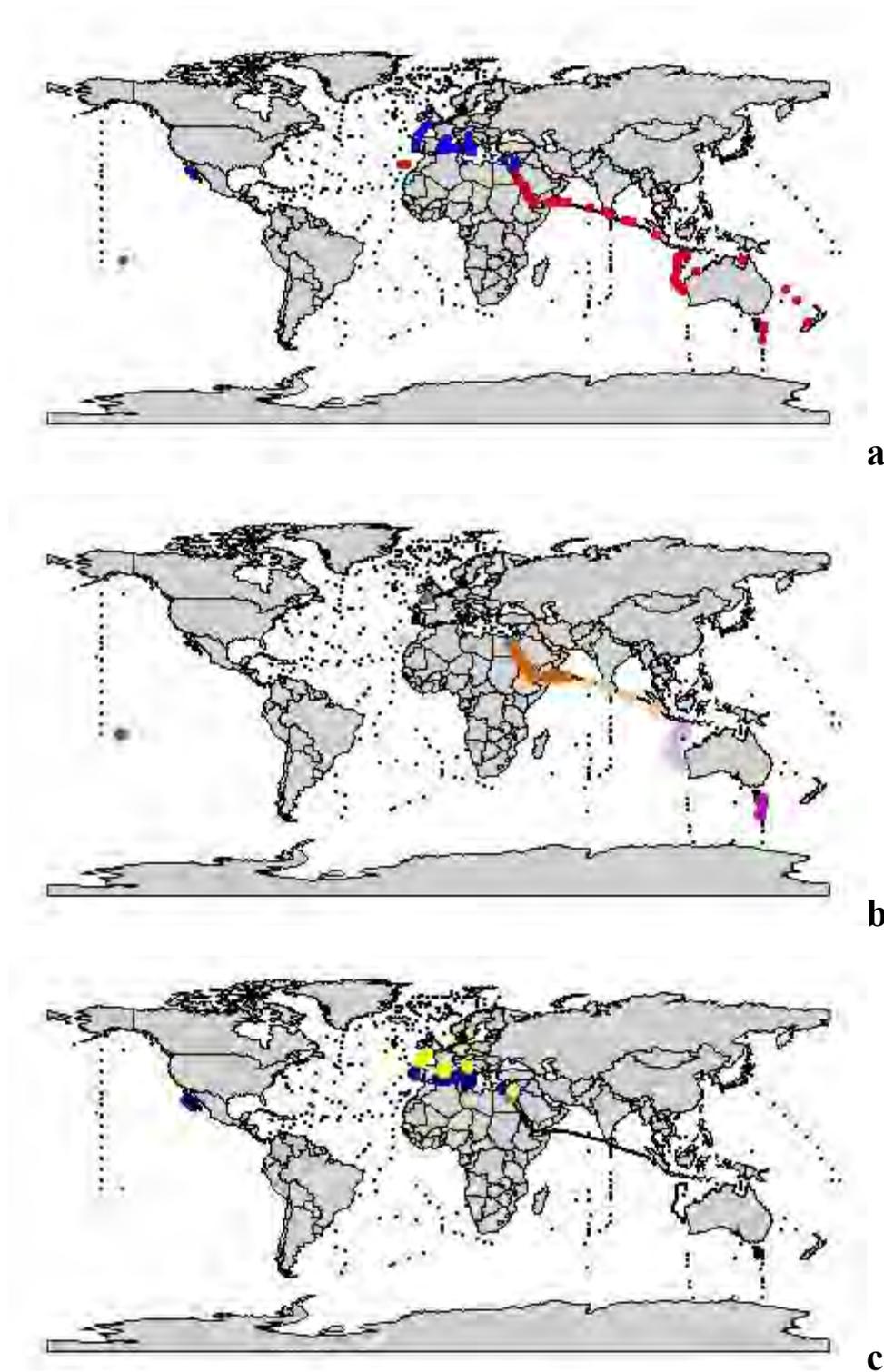


Figure III-19 : Répartition géographique de *Coronosphaera mediterranea*.(a) aire de répartition de *Coronosphaera mediterranea* phase à hétérococcolithes (●) et à holococcolithes (●) ; (b) aire de répartition de *Coronosphaera mediterranea* phase à hétérococcolithes en fonction des saisons (● janvier à mars, ● avril à juin, ● juillet à septembre ● octobre à décembre) et (c) aire de répartition des différents holococcolithophores alternant avec *Coronosphaera mediterranea*, *Calyptrolithina wettsteinii* (●), *Calyptrolithophora hasleana* (●), *Zygosphaera hellenica* (●). Les points noirs correspondent à des zones de prélèvements où sont retrouvées des coccolithophores. Répartitions à partir des données des publications fournies en annexe 2. au niveau des ensembles

fossiles (Perch-Nielsen, 1985), notamment du fait de sa relative mauvaise préservation à la dissolution.

Son aire de répartition est beaucoup plus limitée que les espèces précédemment citées. Elle est majoritairement rencontrée dans les zones tropicales tempérées et autour de l'Australie (Figure III-19 a). Les phases à holococcolithes sont beaucoup plus rarement signalées que la phase à hétérococcolithes (Figure III-19 b), d'où une carte très restreinte des trois types d'holococcolithophores (Figure III-19 c).

La plupart des prélèvements contenant *C. mediterranea* sont réalisés dans les 25 premiers mètres mais des spécimens sont rencontrés jusqu'à 200 m (Figure III-20 a). Malgré tout, on peut s'interroger, encore une fois, sur la viabilité des coccosphères rencontrées à cette grande profondeur. D'un point de vue température, dans 75% des cas où cette espèce est présente, l'eau de mer est à plus de 20°C, dont plus de 5% au dessus de 30°C (Figure III-20 b), ce qui fait de cette espèce une coccolithophore plutôt tropicale à subtropicale.

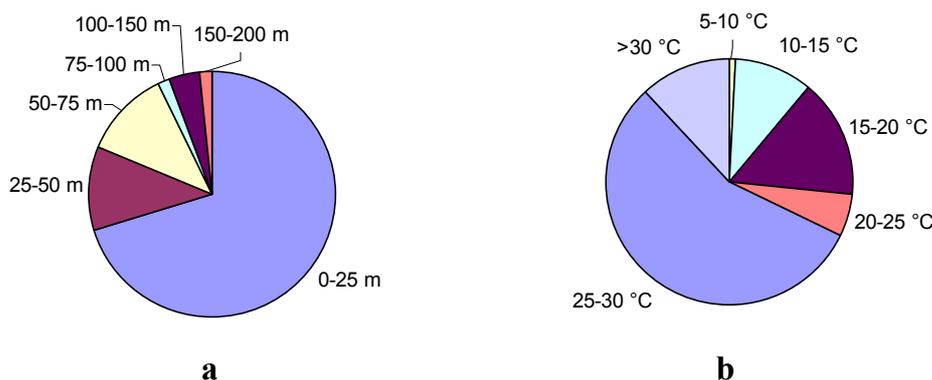


Figure III-20 : Répartition de *Coronosphaera mediterranea* en fonction de la profondeur (a) et de la température (b) à partir des données des publications fournies en Annexe 2.

4. Souche utilisée

La souche de *Coronosphaera mediterranea* utilisée dans cette étude, **NS 8-5**, a été isolée en septembre 2000 par Ian Probert. Elle est originaire des eaux d'Afrique du Sud, dans l'Atlantique Sud où elle n'avait pas encore été signalée. Elle a changé de phase en 2001, des cultures pures de chacune des deux phases, respectivement *Coronosphaera mediterranea* HE et *Coronosphaera mediterranea* HO type *hellenica*, ayant alors été réalisées.

Chapitre IV :



CYCLE DE DEVELOPPEMENT DES COCCOLITHOPHORES: HETEROCOCCOLITHOPHORES ET HOLOCOCCOLITHOPHORES

Photo: I. Probert

Cycle de développement des coccolithophores: hétérococcolithophores et holococcolithophores

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article, soumis et accepté dans *Systematics and Biodiversity* :

A. Houdan, C. Billard, D. Marie, F. Not, A. G. Sáez, J. R. Young & I. Probert. Holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles: flow cytometric analysis of relative ploidy levels. *Systematics and Biodiversity*

Résumé :

Plusieurs espèces de coccolithophores sont connues pour avoir un cycle de vie hétéromorphe. Chez certaines espèces, notamment *Emiliana huxleyi*, la phase à hétérococcolithes alterne avec une phase non calcifiée, tandis que chez d'autres elle alterne avec une phase à holococcolithes. Ce type de cycle avec une alternance entre hétérococcolithophores et holococcolithophores n'a été jusqu'à présent observé que chez une espèce en culture, mais il a été confirmé par la suite par un nombre croissant d'observations de coccosphères mixtes. Les séquences d'ADNr 18S, obtenues à partir de cultures monophasiques des deux stades, à hétérococcolithes et à holococcolithes de *Coccolithus pelagicus* sont identiques, apportant une indication complémentaire de leur appartenance au cycle de vie d'une seule et même espèce. Des analyses en cytométrie en flux ont été réalisées avec des noyaux, isolés et marqués au Sybr-Green, provenant de cultures monophasiques de quatre espèces de coccolithophores (*Coccolithus pelagicus*, *Calcidiscus leptoporus*, *Coronosphaera mediterranea* et *Emiliana huxleyi*), dans le but de déterminer leur contenu relatif en ADN. Les résultats confirment l'hypothèse que ce cycle avec une alternance entre holococcolithophore et heterococcolithophore est haplo-diploïde. Des observations en microscopie photonique des mécanismes de fécondation et de méiose sont également présentées pour deux des espèces étudiées. Les résultats sont discutés dans le contexte de l'évolution de la biominéralisation chez les coccolithophores mais également de la possible généralisation de l'haplo-diploïdie chez les haptophytes.

Abstract:

Several coccolithophore species are known to exhibit heteromorphic life cycles. In certain species, notably *Emiliana huxleyi*, the heterococcolith-bearing phase alternates with a non-calcifying stage, whereas in others the heterococcolith-bearing phase alternates with a holococcolith-bearing phase. Heterococcolithophore-holococcolithophore life cycles have previously been observed for only one species in culture, but have also been inferred from an increasing number of observations of combination coccospheres. 18S rDNA sequences from pure cultures of both the heterococcolith-bearing and holococcolith-bearing phases of *Coccolithus pelagicus* were identical, providing an additional indication of their identity as different life cycle stages of the same species. Flow cytometric analyses have been undertaken on SybrGreen-stained nuclei isolated from pure cultures of the two phases of four coccolithophore species (*Coccolithus pelagicus*, *Calcidiscus leptoporus*, *Coronosphaera mediterranea* and *Emiliana huxleyi*) in order to determine relative DNA content. Results confirm the hypothesis that holococcolithophore-heterococcolithophore life cycles are haplo-diploid in nature. Light microscope observations of the processes of sexual fusion and meiosis are reported for two of the experimental species. The results are discussed in the context of the evolution of biomineralization in the coccolithophores and the possible ubiquity of haplo-diploidy in the haptophytes.

I. INTRODUCTION

Marine phytoplankton are responsible for approximately 40% of global primary production and carbon fixation (Field *et al.*, 1998), but our knowledge of their ecology and natural history is remarkably imperfect. A prime example of this in the coccolithophores (division Haptophyta) is that life cycles have been documented from only very few species, resulting in considerable uncertainty as to the general pattern. Here we present critical new observations on a phylogenetically diverse set of coccolithophore species allowing definitive conclusions to be drawn.

Heteromorphic life histories have been documented in several members of the haptophyte class Prymnesiophyceae Hibberd, a group which includes both non-calcifying and calcifying members (the latter being the coccolithophores). These life histories include alternations between non-motile and flagellated stages, between colonial and single cell stages, and between benthic and planktonic stages. In eukaryotes, the extent of the vegetative

phase (the number of mitotic divisions) between the two events of sexual reproduction, meiosis and syngamy, defines three different kinds of life cycle: haploid, diploid and haplo-diploid with alternation of generations (Fig. 1). Reviewing the available data, Billard (1994) suggested that haptophyte life cycles typically include haploid and diploid phases, each capable of independent asexual reproduction (haplo-diploidy), with distinct patterns of scale ornamentation characteristic of each ploidy state (N.B. members of the class Prymnesiophyceae are typically covered by two layers of scales: an inner layer of organic 'body scales' and an outer layer of organic scales on which calcification occurs in the coccolithophores). This life cycle type would differ from that of the two other main marine phytoplankton groups, the diatoms and the dinoflagellates, which have diploid and haploid life cycles respectively.

In haptophyte life cycles the morphological difference between life stages may be minor, as is the case, for example, for *Chrysochromulina polylepis* Manton & Parke in which the two non-calcifying motile cell types are distinguished only by slight differences in the ornamentation of the organic scales covering the cells (Paasche *et al.*, 1990). In the coccolithophores, different life stages are typically more clearly differentiated. In some species cells bearing heterococcoliths, mineralized scales formed of a radial array of complex calcite crystal units of variable shape, have been shown to alternate with non-calcifying stages within their life cycle. In a few cases chromosome counting or DNA quantification by flow cytometry has confirmed the haplo-diploid nature of these cycles: *Pleurochrysis carterae* (Braarud & Fagerland) Christensen (Rayns, 1962), *Hymenomonas lacuna* Pienaar (Fresnel, 1994), *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay & Mohler (Green *et al.*, 1996). Culture studies by Parke & Adams (1960) on the heterococcolith-bearing stage of *Coccolithus pelagicus* (Wallich) Schiller demonstrated an alternation with *Crystallolithus hyalinus* Gaarder & Markali, a motile stage bearing holococcoliths, scales adorned with numerous regularly packed identical minute euhedral crystallites. Prior to this observation, heterococcolithophores and holococcolithophores had been considered as discrete groups of species. In recent years an increasing number of 'combination coccospheres' bearing both heterococcoliths and holococcoliths, interpreted as capturing the instant of a life cycle phase change, have been documented in field samples from various locations (Thomsen *et al.*, 1991; Kleijne, 1992; Alcober & Jordan, 1997; Young *et al.*, 1998; Cros *et al.*, 2000; Cortés & Bollmann, 2002; Geisen *et al.*, 2002, Cros & Fortuno, 2002). These observations indicate that life cycles with alternating heterococcolith-bearing and holococcolith-bearing stages span a large part of the biodiversity of coccolithophores. Relative ploidy state was never confirmed

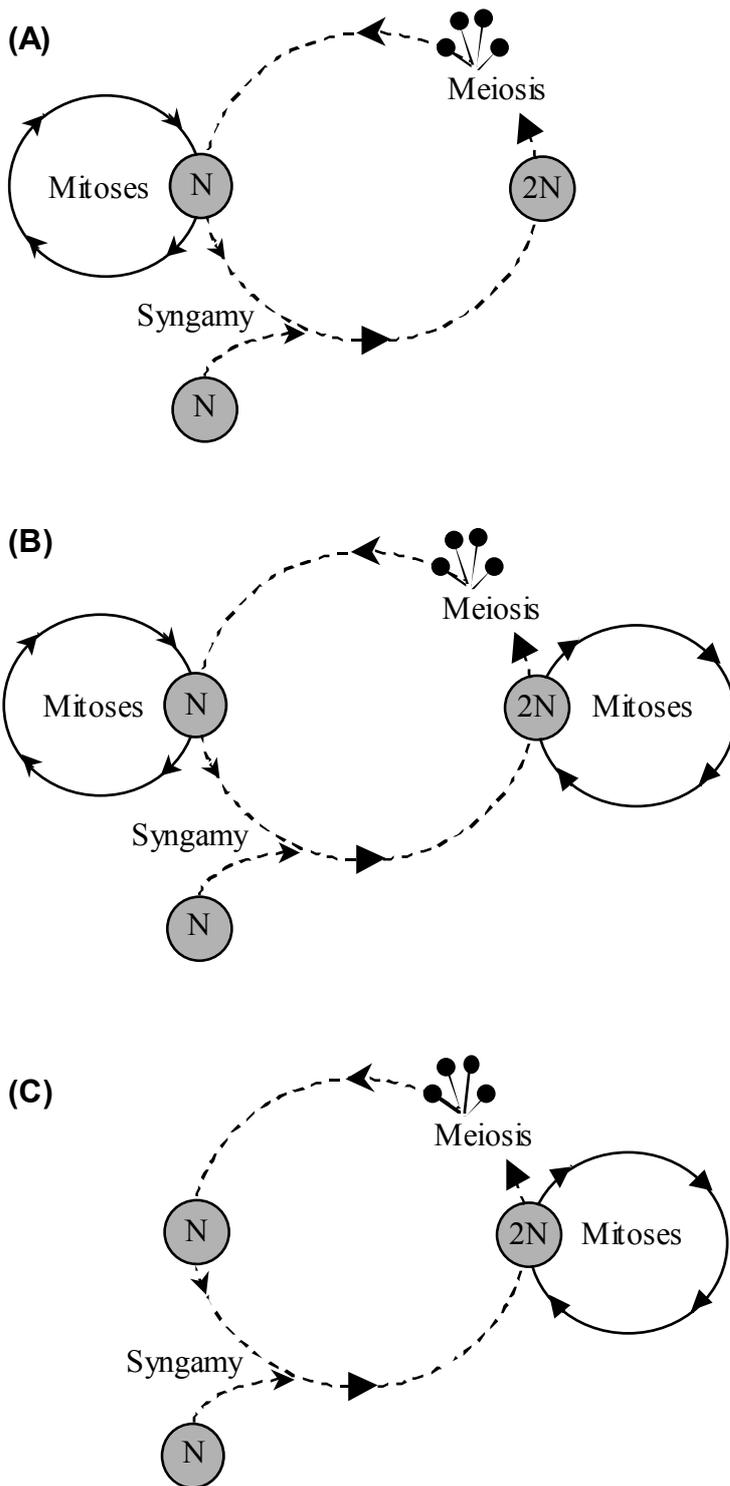


Figure IV-1: The three main life cycle types observed in eukaryotes, where N and 2N represent relative ploidy levels (after Valéro *et al.*, 1992).

Figure IV-1: Les trois principaux cycles de vie observés chez les eucaryotes, où N et 2N représentent le niveau de ploïdie relatif (d'après Valéro *et al.*, 1992).

for the two phases of *C. pelagicus* in culture, but Billard (1994) predicted that the heterococcolith-bearing phase may be diploid and the holococcolith-bearing phase haploid by likening the patterns of body scale ornamentation in the known haplo-diploid life cycles of species in the Pleurochrysidaceae and Hymenomonadaceae with those in the life cycle of *C. pelagicus* as illustrated by Manton & Leedale (1969). In this scheme, the body scales of the diploid heterococcolith-bearing cells have identical ornamentation on both sides, whereas those of the haploid stage have distinct patterns on the proximal and distal faces. A number of other coccolithophores for which body scales have been illustrated in one phase only fit this pattern, including the heterococcolithophores *Syracosphaera pulchra* Lohmann (Inouye & Pienaar, 1988), *Umbilicosphaera hulburtiana* Gaarder (Gaarder, 1970) and *Jomonolithus littoralis* Inouye & Chihara (Inouye & Chihara, 1983), and the holococcolithophores *Calyptrorphaera sphaeroidea* Schiller (Klaveness, 1973) and *Calyptrorphaera radiata* Sym & Kawachi (Sym & Kawachi, 2000). The hypothesis of Billard (1994) can therefore be extended to members of those coccolithophore families for which heterococcolithophore-holococcolithophore combinations have been observed or are suspected.

It should be noted that in haptophyte life cycles the existence and place of sexuality, if applicable, often remains unknown (Billard, 1994). In the coccolithophores, sexuality has been revealed by direct observation of syngamy in only two species, *Ochrosphaera neapolitana* Schussnig (Schwarz, 1932) and *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* Gayral & Fresnel (Gayral & Fresnel, 1983), both of which have a life cycle in which the heterococcolith-bearing phase alternates with a non-calcifying benthic phase.

Knowledge of the biology and biodiversity of coccolithophores has historically been limited by the relative paucity of laboratory cultures of members of this group. As part of the CODENET (Coccolithophore Evolutionary Diversity and Ecology Network) project (1998-2001), an extensive and phylogenetically diverse collection of cultures of coccolithophores was developed. Within this collection, the clonal cultures of a number of species, all initially isolated in the heterococcolith-bearing phase, have undergone life cycle phase changes. Several of these cases involve alternation with a holococcolith-bearing phase, including *Coccolithus pelagicus* and two species for which phase changes had never previously been reported in culture, *Calcidiscus leptoporus* (Murray & Blackman) Loeblich Jr & Tappan and *Coronosphaera mediterranea* (Lohmann) Gaarder. Subsequent isolation of each phase into pure culture allows a wide range of comparative studies to be undertaken. The utility of flow cytometry for the estimation of DNA content and determination of ploidy levels in algal cells has been repeatedly demonstrated (e.g. Green *et al.*, 1996; Edvardsen & Vaultot, 1996;

Table IV-1. Experimental cultures**Tableau IV-1 :** Cultures expérimentales.

Strain	Heterococcolithophore 'species'	Alternate stage	Sample location	Isolated by	Date of isolation	Date of phase change
LK1	<i>Coccolithus pelagicus</i> (ssp. <i>braarudii</i>) *	<i>Crystallolithus</i> <i>braarudii</i> **	Arcachon, Atlantic coast of France	I. Probert	February 1999	May 1999
KL2	<i>Coccolithus pelagicus</i> (ssp. <i>braarudii</i>)	-	Arcachon, Atlantic coast of France	I. Probert	December 1999	-
NS10-2	<i>Calcidiscus leptoporus</i> (ssp. <i>leptoporus</i>) *	<i>Crystallolithus</i> <i>rigidus</i> **	off South Africa, South Atlantic	I. Probert	September 2000	April 2001
NS8-5	<i>Coronosphaera</i> <i>mediterranea</i> *	<i>Zygosphaera</i> <i>hellenica</i> **	off South Africa, South Atlantic	I. Probert	September 2000	May 2001
TQ26	<i>Emiliania huxleyi</i>	Non calcifying 'S-cell' stage	Tasman Sea off New Zealand	I. Probert	November 1998	August 1999

* Parke & Adams (1960) identified the holococcolith bearing stage in their cultures of *Coccolithus pelagicus* as *Crystallolithus hyalinus*, but Geisen *et al.* (2002) pointed out that the correct designation is in fact *Crystallolithus braarudii*. *Coccolithus pelagicus* in reality includes two subspecies which can be differentiated on the basis of coccolith size (Baumann *et al.*, 2000; Cachao & Moita, 2000; Saez *et al.* in press). The cultures of Parke & Adams (1960) were of the 'large' temperate form (ssp. *braarudii*), and in fact it is the 'small' Arctic form (ssp. *pelagicus*) which alternates with *Crystallolithus hyalinus* (Geisen *et al.*, 2002). *Calcidiscus leptoporus* is a similar case to *Coccolithus pelagicus*, but this time with three subspecies differentiated in the heterococcolith-bearing phase on the basis of coccolith size and minor morphological differences (Kleijne, 1991; Knappertsbusch *et al.*, 1997). *Coronosphaera mediterranea* also includes more than one species, in this case truly cryptic, i.e. morphological differentiation is not possible in the heterococcolith-bearing stage (Geisen *et al.*, 2002). *Coronosphaera mediterranea* comporte elle aussi plus d'une espèce, mais cette fois il s'agit réellement d'une espèce dite cryptique, i.e. la différenciation morphologique n'est pas possible pour le stade à hétérococcolithes (Geisen *et al.*, 2002 : voir Chapitre III).

** The discovery that heterococcolithophores and holococcolithophores are part of a single species in different phases of the life cycle does not invalidate traditional coccolithophore taxonomy which was established using the morphological characters of the coccoliths, but it does lead to nomenclatural problems. Once such associations are established, a single scientific name should be adopted for all phases following the normal rules of botanical nomenclature, with informal terminology used to indicate the phase observed when appropriate. For clarity, here we give the original 'species' names for the relevant holococcolithophore phases.

Veldhuis *et al.*, 1997). Flow cytometric DNA analysis has therefore been applied to these cultures in order to assess the hypothesis that heterococcolithophore-holococcolithophore life cycles are haplo-diploid in nature.

II. MATERIALS AND METHODS

1. Cultures and standard culture conditions

Culture details are listed in Table 1. All original (non-axenic) cultures employed in this study were clonal, one cell in the heterococcolithophore stage being isolated from mixed samples with a micropipette. Following phase changes, one cell of each phase was isolated using the same method. The stock cultures were maintained in sterile single-use polystyrene culture flasks (Iwaki) in filter-sterilized enriched seawater K/5 medium (Keller *et al.*, 1987) at 17°C with daylight fluorescent tubes providing an irradiance level of 50-70 $\mu\text{E}^{-2}\text{s}^{-1}$ with a photoperiod of 16L:8D.

2. Observations

Light microscope observations were conducted with an Olympus BX50 microscope equipped with phase contrast and differential interference optics. For fluorescence microscopy, samples were concentrated by gentle centrifugation, fixed for one hour with paraformaldehyde (2%) in phosphate buffered saline (PBS) with 5% NaCl, rinsed in PBS and stained with DAPI (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Preparations were viewed with a Zeiss standard LAB 16 epi-fluorescence microscope. For scanning electron microscopy, drops of cell suspension concentrated on Isopore filters (Millipore) were coated with 20 nm of gold/palladium (95:5%) and viewed with a Philips XL30 Field Emission SEM. In order to observe the non-mineralized body scales of the two phases of *Coccolithus pelagicus*, a drop of cell suspension was micropipetted on to a formvar grid which was left to dry and then rinsed three times with distilled water. The grids were shadow coated with gold/palladium at an angle of 20 to 30°. These preparations were viewed with a Siemens 102 transmission electron microscope.

3. Flow cytometry

All cultures were checked by optical microscopy immediately prior to harvesting. Pure cultures of each phase were harvested at the same time in the photoperiod (6 h into the L phase) in the logarithmic stage of growth. Ploidy level was determined by flow cytometry on isolated nuclei which were released by diluting algal cell suspensions at least 10 fold in nuclei isolation buffer (NIB) with the following composition: 30 mM MgCl₂, 120 mM trisodium citrate, 120 mM sorbitol, 55 mM Hepes, 5 mM EDTA, Triton X-100 0.1% (ph 7.0). Sodium bisulfite was subsequently added at a final concentration of 5 mM. The NIB was prepared immediately prior to use. In order to calibrate the analyses, two relatively small microalgal species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae), were added as internal references (Marie *et al.*, 2000). Samples were stained with SybrGreen I (Molecular Probes, S-7567) at a final dilution of 1:5000, and incubated for 10 minutes at room temperature. Analyses were conducted using a FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, San José, California, USA) equipped with a 15 mW argon ion laser emitting at 488 nm and the standard filter set. Isolated nuclei were discriminated from cell debris on the Side Scatter versus SybrGreen fluorescence distribution.

Data were collected as listmode files and results were computed using the free software CytoWin (Vaulot, 1989). The stability of the flow cytometric analyses was monitored by calculating the ratio of the mean fluorescence of the two internal references, *I. galbana* (Ig) and *M. pusilla* (M). For standardization of the results from each of the experimental cultures, the mean of the distribution of fluorescence of the main peak of nuclei was compared to that of the internal reference Ig.

4. 18S rDNA sequences

Cells from pure cultures of the holococcolith-bearing and the heterococcolith-bearing forms of *Coccolithus pelagicus* (strains LK1 and KL2, respectively) were harvested during the logarithmic phase of growth by centrifugation for 5 minutes at 3000 rpm. The pellets were resuspended in 1 ml of 100 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl and 50 mM Na₂EDTA 2H₂O, immediately frozen by immersion in liquid nitrogen, and stored at -80°C until processing. DNA extraction, amplification and sequencing was as described by Sáez *et al.* (2003).

III. RESULTS

1. *Morphology of experimental species*

The morphology of the cell covering of both phases of the four experimental species is illustrated in Figure 2. The heterococcolith-bearing phases of *Coccolithus pelagicus*, *Calcidiscus leptoporus* and *Coronosphaera mediterranea* each alternate with a holococcolith-bearing phase, whereas in the life cycle of *Emiliana huxleyi* the heterococcolith-bearing phase alternates with a non-calcifying (organic scale-bearing) stage. Of these four species only *C. mediterranea* possesses flagella in the heterococcolith-bearing phase, whereas all alternate phases (holococcolith-bearing or non-calcifying) are motile. For taxonomic notes refer to Table 1.

2. *18S rDNA sequences*

The 18S rDNA sequence from strain LK1, a pure culture of *Crystallolithus braarudii* (the holococcolith-bearing phase of *Coccolithus pelagicus*, see taxonomic notes to Table 1) was identical to a published sequence of the same gene from the heterococcolith-bearing *C. pelagicus* strain PLY182g (Genbank Acc. No. AJ246261; Edvarsen *et al.* 2000), providing an indication that they belong to the same species. To confirm this result we also sequenced 18S rDNA from another heterococcolith-bearing strain of *C. pelagicus* (KL2), which had the exact same sequence with no ambiguities.

3. *Flow cytometry*

The ratio of the mean fluorescence of nuclei of *Emiliana huxleyi* (strain TQ26) cultures containing only the non-calcifying S-cell flagellate stage (Table 2, Fig. 3A) to the internal reference Ig was 1.88, while the ratio of the mean fluorescence of nuclei of the C-cell (calcifying) phase culture of the same species to the internal reference Ig was 3.41 (Table 2, Fig. 3B). Comparison of these standardized values yields a ratio of 1.81 (Table 2). For each of the other species, comparisons of the standardized values of mean fluorescence of the holococcolith-bearing phase cultures (Figs 3C, 3E and 3G) to the heterococcolith-bearing phase cultures (Figs 3D, 3F and 3H) yielded ratios between 2.03 and 2.16 (Table 2). For

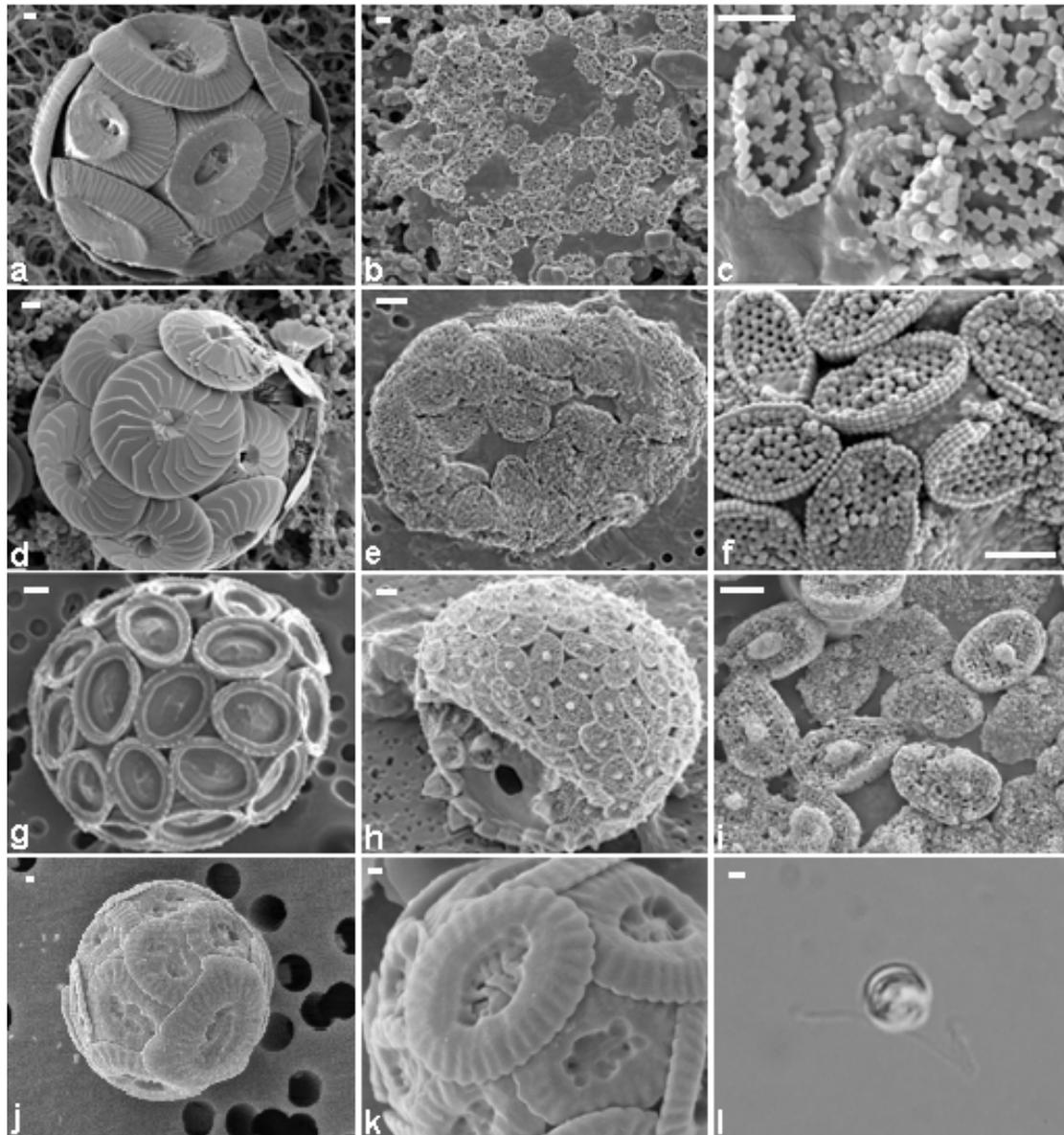


Figure IV-2: External morphology of the experimental species. (a-c) *Coccolithus pelagicus* strain LK1: (a) heterococcolith-bearing cell; (b) holococcolith-bearing cell (*Crystallolithus braarudii*); (c) detail of holococcoliths. (d-f) *Calcidiscus leptoporus* strain NS10-2: (d) heterococcolith-bearing cell; (e) holococcolith-bearing cell (*Crystallolithus rigidus*); (f) detail of holococcoliths. (g-i) *Coronosphaera mediterranea* strain NS8-5: (g) heterococcolith-bearing cell; (h) holococcolith-bearing cell (*Zygosphaera hellenica*); (i) detail of holococcoliths. (j-l) *Emiliana huxleyi* strain TQ26: (j) 'Type R' heterococcolith-bearing cell; (k) detail of heterococcolith-bearing cell; (l) non-calcifying motile phase. (Scale bars: a-i and l = 1 μ m, j-k = 0,1 μ m). (a-k) SEM, (l) LM. All specimens are from the cultures except (h) which is from a plankton sample from the W. Mediterranean; the holococcoliths produced in culture by *C mediterranea* are not well-formed (i), but are definitively comparable with those of '*Z hellenica*' (see also Geisen *et al.*, 2002).

Figure IV-2: Morphologie externe des espèces étudiées. (a-c) *Coccolithus pelagicus* souche LK1: (a) cellule à hétérococcolithes; (b) cellule à holococcolithes (*Crystallolithus braarudii*); (c) détail des holococcolithes. (d-f) *Calcidiscus leptoporus* souche NS10-2: (d) cellule à hétérococcolithes; (e) cellule à holococcolithes (*Crystallolithus rigidus*); (f) détail des holococcolithes. (g-i) *Coronosphaera mediterranea* souche NS8-5: (g) cellule à hétérococcolithes; (h) cellule à holococcolithes (*Zygosphaera hellenica*); (i) détail des holococcolithes. (j-l) *Emiliana huxleyi* souche TQ26: (j) cellule à hétérococcolithes de 'Type R'; (k) détail d'une cellule à hétérococcolithes; (l) phase mobile non calcifiée. (Barre d'échelle a-i and l = 1 μ m, j-k = 0,1 μ m). (a-k) MEB, (l) microscopie optique. Tous les spécimens sont issus de cultures sauf (h) qui provient d'un échantillon de plankton de l'ouest de la Méditerranée; les holococcolithes produits en cultures par *C mediterranea* ne sont pas bien formés (i), mais sont absolument comparables avec ceux de '*Z hellenica*' (voir aussi Geisen *et al.*, 2002).

Calcidiscus leptoporus heterococcolith-bearing phase (Fig. 3F), as well as for *Coronosphaera mediterranea* holococcolith- and heterococcolith-bearing phase (Figs 3G and 3H) an important secondary peak of nuclei with a higher DNA content was present.

Table IV-2: Relative DNA levels (arbitrary units) the experimental cultures determined by flow cytometry on isolated nuclei.

Tableau IV-2: Quantité relative d'ADN (unités arbitraires) des cultures expérimentales déterminées par cytométrie en flux sur des noyaux isolés.

Strain	Species	Relative DNA		Ratio heterococcolith stage/ alternate stage
		Alternate stage	Heterococcolith stage	
TQ 26	<i>Emiliana huxleyi</i>	1.88	3.41	1.81
LK1	<i>Coccolithus pelagicus</i>	16.24	35.05	2.16
NS 10-2	<i>Calcidiscus leptoporus</i>	5.24	10.94	2.09
NS 8-5	<i>Coronosphaera mediterranea</i>	10.09	20.47	2.03

Prior to flow cytometric analyses, DAPI staining of nuclei in each phase of *C. pelagicus* provided the first qualitative evidence for the presence of two ploidy levels (Figs 4A-D).

4. Observations of sexual reproduction in *Coccolithus pelagicus* and *Coronosphaera mediterranea*

The phase changes involved in the life cycles of coccolithophores in culture are spontaneous and short-lived processes and hence difficult to observe. Nevertheless, certain stages of the phase changes in both directions (heterococcolith- to holococcolith-bearing stage and *vice versa*) have been observed in *Coccolithus pelagicus*, as well as the heterococcolith- to holococcolith-bearing phase change in *Coronosphaera mediterranea*.

The fusion of two holococcolith-bearing cells of *Coccolithus pelagicus* was observed on only one occasion (Figs 4e-h). Fusion of the two cells had already commenced when the pair was first observed (Fig. 4e). The fusing cells were of similar size and one of the pair retained the flagella during the fusion process.

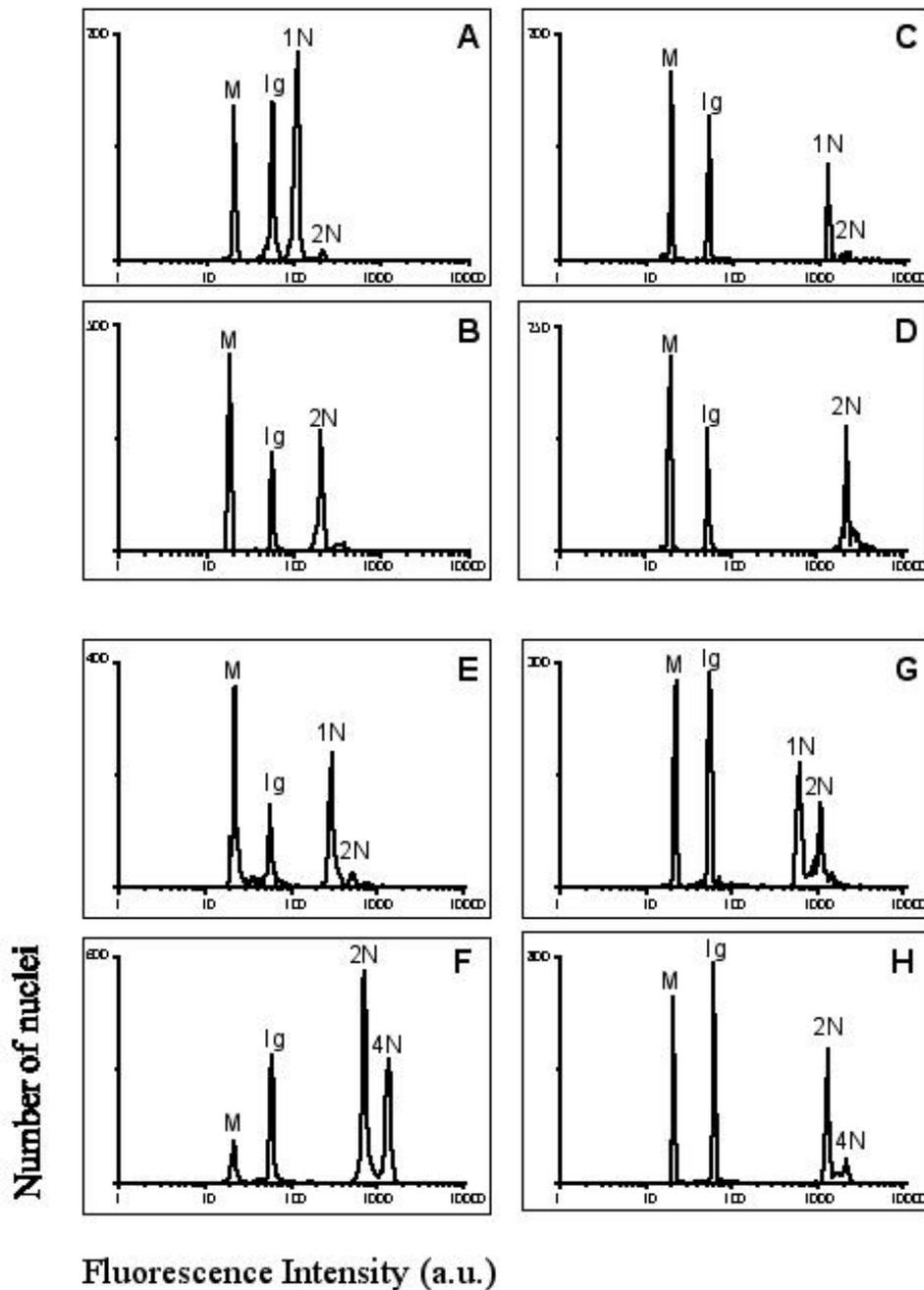


Figure IV-3: Relative DNA content of nuclei from alternate phases of the four experimental species and in presence of two internal standards *Micromonas pusilla* (M) and *Isochrysis galbana* (Ig). (A) *Emiliana huxleyi* non-calcifying stage; (B) *E. huxleyi* heterococcolith-bearing stage; (C) *Coccolithus pelagicus* holococcolith-bearing stage; (D) *C. pelagicus* heterococcolith-bearing stage. (E) *Calcidiscus leptoporus* holococcolith-bearing stage; (F) *C. leptoporus* heterococcolith-bearing stage; (G) *Coronosphaera mediterranea* holococcolith-bearing stage; (H) *C. mediterranea* heterococcolith-bearing stage. See Results for further explanations.

Figure IV-3: Quantité relative d'ADN contenu dans les noyaux des deux phases de chacune des quatre espèces étudiées et en présence de deux standards internes *Micromonas pusilla* (M) et *Isochrysis galbana* (Ig). (A) *Emiliana huxleyi* phase non calcifiée; (B) *E. huxleyi* phase à hétérococcolithes; (C) *Coccolithus pelagicus* phase à holococcolithes; (D) *C. pelagicus* phase à hétérococcolithes. (E) *Calcidiscus leptoporus* phase à holococcolithes; (F) *C. leptoporus* phase à hétérococcolithes; (G) *Coronosphaera mediterranea* phase à holococcolithes; (H) *C. mediterranea* phase à hétérococcolithes. Voir les Résultats pour plus d'explications.

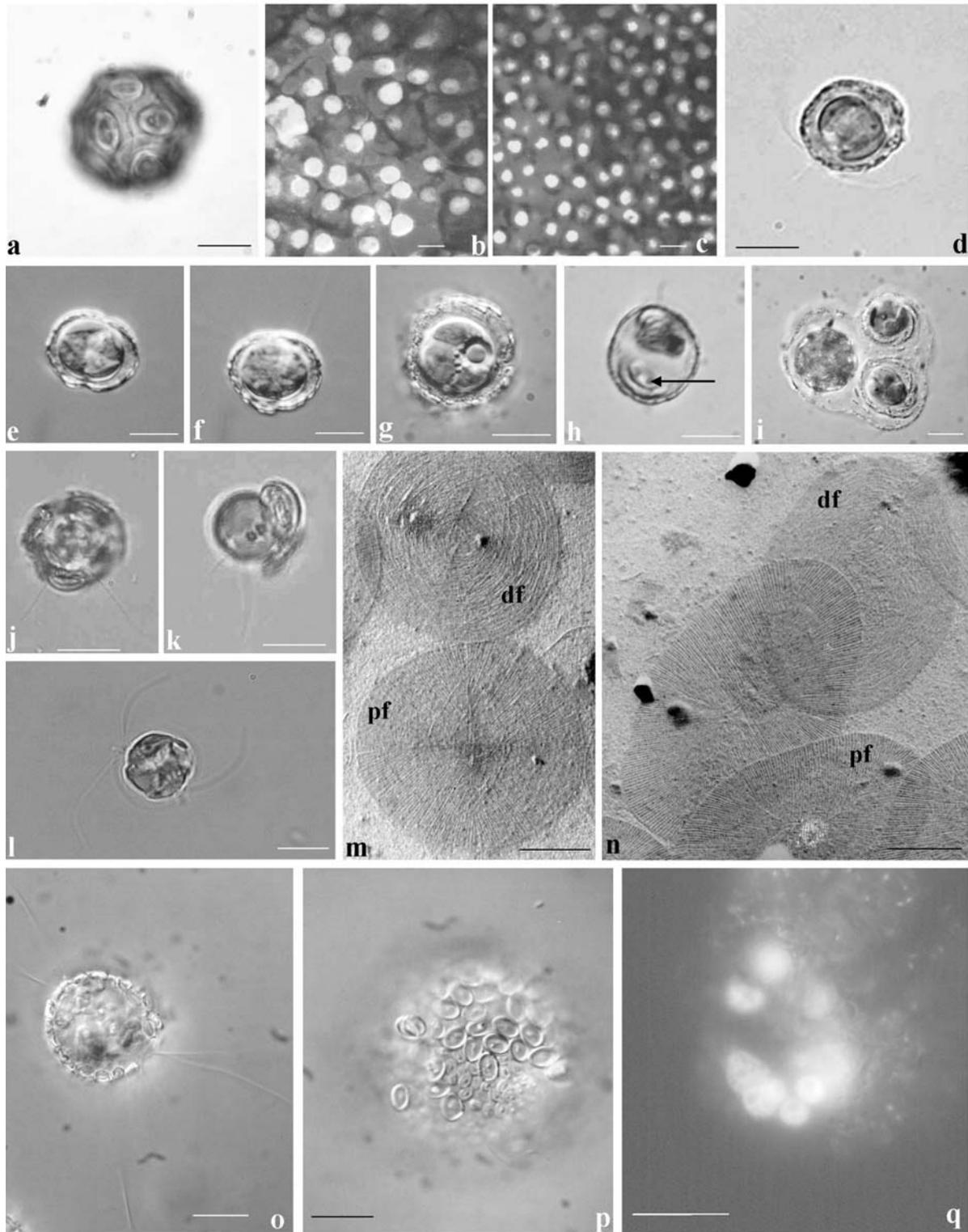


Figure IV-4: Observations of sexual reproduction in *Coccolithus pelagicus* and *Coronosphaera mediterranea*. (a-n) *C. pelagicus*: (a) heterococcolith-bearing cell; (b) DAPI stained nuclei of heterococcolith-bearing cells; (c) DAPI stained nuclei of holococcolith-bearing cells; (d) holococcolith-bearing cell; (e-h) sequential images of fusion of two holococcolith-bearing cells; (i) a heterococcolith-bearing cell (formed by the fusion of two holococcolith-bearing cells) within an envelope containing two holococcolith-bearing cells; (j-l) meiosis; (m) shadow-cast body scales of heterococcolith-bearing stage; (n) shadow-cast body scales of holococcolith-bearing stage. (o-q) *Coronosphaera mediterranea*: (o) giant heterococcosphere containing several flagellate holococcolith-bearing cells; (p) surface view of combination coccosphere; (q) DAPI stained giant heterococcosphere revealing the presence of 8 cells. (scale bars: a-l and o-p = 10 μm ; m-n = 1 μm)

The complete fusion of the two cells was completed in less than 10 minutes, the resultant non-motile zygote retaining a complete cover of holococcoliths formed by the fusion of the coccospheres of the gametes (Fig. 4g). The cell had died within approximately 30 minutes on the microscope slide, by which time a single heterococcolith had been formed within the cell (Fig. 4h, arrow). Fig. 4i illustrates a heterococcolith-bearing cell formed by the fusion of two holococcolith-bearing cells within an envelope which still contains two holococcolith-bearing cells. Such packets of two to four holococcolith-bearing cells surrounded by a common envelope are frequently observed in cultures of the holococcolith-bearing phase of *C. pelagicus*.

In *Coccolithus pelagicus*, the first outward sign that a non-motile heterococcolith-bearing cell is changing phase is the emergence of two flagella and a haptonema (Fig. 4j). Such cells are readily identified as they swim erratically among the remaining non-motile cells, often turning in tight circles and generally remaining near the bottom of the culture flask. Subsequently, the heterococcoliths are gradually shed as the cells swim (Fig. 4k), or more rarely the coccosphere of heterococcoliths breaks open to release the motile cell. At this stage the motile cell possesses neither holococcoliths nor the 'envelope' characteristic of the holococcolithophore stage of this species (Manton & Leedale, 1963; Rowson *et al.*, 1986). Individual cells remain viable for only a limited period of time on microscope slides and hence we were not able to observe exactly when the envelope and the holococcolith investment were formed, but the liberated flagellate cell apparently remains without a coccolith cover until at least after the first division (Fig. 4l). Motile cells with fully formed holococcospheres were observed in the mixed phase cultures within two days of initiation of the phase change. In the exclusively flagellate species *Coronosphaera mediterranea* the diploid to haploid phase change in culture involved the formation of several (between four and eight) holococcolith-bearing cells within a distended heterococcosphere (Figs 4o-q).

Figure IV-4: Observations concernant la reproduction sexuée chez *Coccolithus pelagicus* et *Coronosphaera mediterranea*. (a-n) *C. pelagicus*: (a) cellule à hétérococcolithes ; (b) noyau de cellules à hétérococcolithes marqués au DAPI; (c) noyau de cellules à holococcolithes marqués au DAPI; (d) cellule à holococcolithes; (e-h) images séquentielles de la fusion de deux cellules à holococcolithes; (i) cellule à hétérococcolithes (formée par la fusion de deux cellules à holococcolithes) dans une enveloppe contenant deux cellules à holococcolithes; (j-l) méiose; (m) ombrages d'écaillés de corps du stade à hétérococcolithes et (n) du stade à holococcolithes observés en MET, pf, face proximale et df, face distale ; (o-q) *Coronosphaera mediterranea*: (o) hétérococcosphère géante contenant plusieurs cellules à holococcolithes flagellées; (p) vue de la surface d'une coccosphère mixte; (q) hétérococcosphère géante marquée au DAPI révélant la présence de huit cellules (barres d'échelle: a-l et o-p = 10 µm; m-n = 1 µm).

Despite each haploid daughter cell possessing flagella, these large agglomerations of cells were observed to have much reduced motility and were always observed near the bottom of the culture vessel.

5. *Body scale ornamentation in Coccolithus pelagicus*

The purity of cultures of each phase of *Coccolithus pelagicus* was carefully verified under the light microscope before preparing grids for observation of the body scales. In the heterococcolith-bearing phase, the scales are rimless and more or less circular in shape (1.8 μm in diameter). A different pattern was observed on either side of the scales; the proximal face has radiating microfibrils arranged in quadrants, the distal face exhibits microfibrils forming dense irregular concentric rings (Fig. 4m). In many cases, however, the microfibrils of the distal face form an incomplete layer, revealing the more regular underlying radial microfibrils of the proximal face. The scales of the holococcolith-bearing phase are of two sizes, both rimless. The larger scales (Fig. 4n) are elliptical (2.0 x 1.3 μm), the smaller scales (not illustrated) circular to elliptical (0.8 x 0.5 μm). Both sizes of scale exhibit the usual haptophyte haploid cell patterning with radiating microfibrils in quadrants on the proximal side and dense irregular concentric rings on the distal face.

IV. DISCUSSION

In the life cycles of all four coccolithophore species analysed by flow cytometry in this study there are clearly two levels of ploidy, the heterococcolith-bearing phase being diploid relative to the haploid alternate phase. These data confirm the results of Green *et al.* (1996) concerning the haplo-diploid nature of the *Emiliania huxleyi* life cycle, and provide the first direct evidence to confirm the hypothesis of Billard (1994) that holococcoliths and heterococcoliths are produced on the alternate phases of a haplo-diploid life cycle, and so are indicative of ploidy level. This is a remarkable fact given the important differences in calcification mode between these two phases (see Young *et al.*, 1999, for a synthesis of recent advances in understanding of coccolith ultrastructure and biomineralization processes).

The lowest DNA level obtained by flow cytometry for each species (1N) is interpreted as corresponding to haploid cells in the G1 stage of the cell cycle in the holococcolith-bearing/non-calcifying phase, and the highest (4N) represents diploid (heterococcolith

bearing) cells in the G2+M stage. Both life cycle phases gave a 2N peak interpreted as representing haploid cells in the G2+M stage in the holococcolith-bearing/non-calcifying phase cultures (minor peaks), or diploid cells in the G1 phase in heterococcolith-bearing phase cultures.

The presence of two distinct cycles 1N/2N and 2N/4N in the same species is strongly indicative of sexual reproduction within the life cycle. Since other processes, albeit rarely reported in algae, which do not involve sexual reproduction can account for differing ploidy levels, an example of which is DNA diploidization without fertilization which has been suggested to occur in the Raphidophyceae (Yamaguchi & Imai, 1994), direct observation of sexual events are required to finally confirm this hypothesis. Our observations on *Coccolithus pelagicus* and *Coronosphaera mediterranea* go some way to providing this evidence.

The process of fusion of *Coccolithus pelagicus* gametes described here is similar to that reported for *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* by Gayral & Fresnel (1983). From this limited evidence, it appears that in coccolithophores fusing gametes are isogamous and are morphologically indistinguishable from vegetative haploid cells, and that fusion can occur within a clone (homothallism). Certain dinoflagellate species have been shown to exhibit a multiple mating-type system, in which both homothallism and heterothallism (differentiation of gamete recognition factors) can occur, the latter considered to be the dominant process in the production of fertile hypnozygotes under natural conditions (Anderson *et al.*, 1984; Destombe & Cembella, 1990). To our knowledge, crossing experiments between haploid coccolithophore strains have never been attempted. In coccolithophores, the mode of initial gamete attraction and contact is not known, but once initiated, syngamy can clearly be completed within a very short period of time. The rapid initiation of heterococcolith production in the zygote observed in *C. pelagicus* in this study and reported for *P. pseudoroscoffensis* by Gayral & Fresnel (1983) indicates that the two haploid nuclei must fuse immediately following cytoplasmic fusion. In *P. pseudoroscoffensis* a complete heterococcosphere was formed within 24 hours of the onset of fusion (Gayral & Fresnel, 1983).

Elucidation of the exact mode and timing of meiosis requires fine scale observations of the nucleus, but from our light microscope observations, together with those on *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* by Gayral & Fresnel (1983), certain general inferences can be made about the meiotic process in coccolithophore life cycles. In *Coccolithus pelagicus*, meiosis may have occurred within the heterococcosphere prior to production of the flagellar apparatus and subsequent liberation of the motile cell. Since only one viable cell emerges this

would imply the redundancy of the other haploid nuclei formed by the meiotic divisions. Meiosis in the chlorophyte *Spirogyra* (Harada & Yamagishi, 1984) is one of the best known examples of this pattern. Alternatively, the motile cell which emerges from the heterococcusphere may be still diploid, with nuclear reduction occurring in subsequent divisions. The observation that holococcolith production does not commence immediately after formation of the flagellar apparatus may be interpreted as providing support for this second hypothesis. In this respect it is noteworthy that, as yet, there are no definite observations of combination coccuspheres showing the phase change from the heterococcolith-bearing to the holococcolith-bearing phase in either the Coccolithaceae or the Calcidiscaceae, despite several documented examples of the phase change in the opposite direction (see Geisen *et al.*, 2002 for a synthesis of these observations). Details of the transformation from the diploid to the haploid phase evidently vary between coccolithophores. In *Coronosphaera mediterranea*, on several occasions we observed between four and eight flagellated and holococcolith-covered daughter cells within one giant heterococcusphere. The possibility that these packets of cells are an artefact of culture conditions cannot be ruled out, contact with the bottom of the culture vessel perhaps preventing the haploid cells from escaping the heterococcusphere after meiosis. Of the three reports of combination coccuspheres of this species, two are clearly transitions from the haploid to the diploid phase (Kamptner, 1941; Cros *et al.*, 2000) and the direction of the third (Cortés & Bollmann, 2002) is ambiguous. To our knowledge, giant cells of the heterococcolith-bearing phase of this species have never been reported in nature. In the life cycle of *P. pseudoroscoffensis*, four non-calcified motile haploid cells are formed within a heterococcusphere and following release these cells remain motile for a short time before settling and dividing asexually to initiate the haploid non-calcified pseudofilamentous stage (Gayral & Fresnel, 1983). Comparable ‘meiospores’ are formed in the life cycles of other members of the Pleurochrysidaceae (von Stosch, 1967; Leadbeater, 1971) and the Hymenomonadaceae (Fresnel, 1994). As more reports on sexual processes in coccolithophores become available it will be interesting to determine whether phylogenetic trends will be confirmed and/or whether any relationship can be identified between the exact mode of phase switches and the ecology of the species (i.e. littoral/coastal/oceanic habitats).

Studies on the mechanisms of sexual reproduction in coccolithophores are currently restricted, however, by the limited number of cultures available and, moreover, by the lack of clear indications as to the factor(s) responsible for the induction of life cycle phase changes in this group. A number of reports suggest that in the Pleurochrysidaceae factors such as

temperature and light (Leadbeater, 1970) and the addition of fresh medium (Inouye & Chihara, 1979; Gayral & Fresnel, 1983) may influence phase changes. Laguna *et al.* (2001) suggested that phase changes in *Emiliana huxleyi* could be induced by agar-plating (changing the viscosity of the medium). However, these authors do not provide reliable cytological evidence for the presence of S-cells (their figure 1B, for example, clearly resembles bacterial contaminants), and we therefore feel that these results should be considered with caution pending independent authentication. Following isolation, our cultures were routinely maintained with regular sub-culturing under identical conditions of temperature, light (both irradiance level and photoperiod), and culture medium supplements. In each of our cultures, the initial phase change (from the diploid to the haploid phase) occurred seemingly spontaneously after a variable period of time (between three and nine months after isolation) under these identical culture conditions. It is noteworthy, however, that in each case this initial phase change occurred in the spring of the first year following isolation of the cultures (bearing in mind that *Emiliana huxleyi* strain TQ26, isolated from a sample collected off the coast of New Zealand, first changed phase in August 1999, i.e. austral spring). The culture medium employed in routine culture maintenance was based on filter-sterilized local seawater, batches of which were collected approximately every three months. Seasonal variability in the concentrations of inorganic or organic trace elements in the medium may have played a role in phase change induction. Alternatively, it can be hypothesized that a biological clock may be involved in this process. As in many other living organisms, endogenous circannual rhythms have been found to control growth and/or reproduction in several macroalgal species (e.g. Lüning & Kadel, 1993) and a few microalgae (Costas & Varela, 1989; Costas & Lopez-Rodas, 1991). In many cases such rhythms have been shown to 'free-run', i.e. to be maintained for some time following initial exposure to controlled environmental conditions. Endogenous regulation of the timing of life cycle events may serve to limit energetically costly phase switches which might occur in response to temporarily aseasonal environmental conditions. Information on the environmental factor(s) which cause phase transitions in coccolithophores is essential for understanding the overall ecology of this group, but the possible involvement of a biological clock in this process would obviously complicate efforts to define such factors in laboratory cultures. The evidence presented here remains anecdotal, and it should be noted that for three of the experimental species (*E. huxleyi*, *Calcidiscus leptoporus* and *Coccolithus pelagicus*) multiple strains are maintained in the CODENET culture collection, and although in each case more than one strain has changed

phase, always in spring, the majority of cultures have remained in the phase in which they were originally isolated.

The haplo-diploid holococcolithophore-heterococcolithophore life cycles demonstrated here fall in three families: the Coccolithaceae (*Coccolithus pelagicus*), the Calcidiscaceae (*Calcidiscus leptoporus*) and the Syracosphaeraceae (*Coronosphaera mediterranea*). The coccoliths of the Coccolithaceae and Calcidiscaceae are structurally similar and biostratigraphic analyses suggest that they share a relatively recent ancestor (in the early Palaeogene, *c.* 50Ma); indeed these taxa were only recently separated at the family level (Young & Bown, 1997). However, these two families are relatively distantly related to the Syracosphaeraceae, divergence of these two lineages having probably occurred soon after the origin of the coccolithophores (in the Jurassic, >150Ma, Young *et al.*, 1999). Accepting the assumption that complex biomineralization modes such as those responsible for the production of both heterococcoliths and holococcoliths are overwhelmingly likely each to have been the result of a single evolutionary event (Young *et al.*, 1999), our results thus provide strong support for the prediction that all holococcolithophore-heterococcolithophore life cycles are haplo-diploid in nature. Billard (1994) made this prediction based on patterns of body scale ornamentation, but pointed out that certain exceptions to the scheme exist, notably species which lack body scales in the heterococcolith-bearing phase such as *Emiliania huxleyi* (Klaveness, 1973) and *Umblicosphaera sibogae* var. *foliosa* (Kamptner) Okada & McIntyre (Inouye & Pienaar, 1984). In addition, the body scales of the (presumably diploid) heterococcolithophore *Cruciplacolithus neohelis* (McIntyre & Bé) Reinhardt were shown by Fresnel (1986) to have different patterns on the distal and proximal faces (i.e. to show the pattern characteristic of haploid phases). Fresnel (1986) considered that Manton & Leedale (1969) had misinterpreted their images and had, in fact, illustrated a body scale ornamentation in the diploid phase of *C. pelagicus* identical to the seemingly anomalous pattern she had observed for *C. neohelis*. Our new observations confirm this, but the difficulties which may arise in interpreting scale patterning are highlighted by the observation of an *apparently* typical diploid phase ornamentation in *C. pelagicus* heterococcolith-bearing phase body scales in which the distal face of the scale is incompletely formed. The heterococcolith-bearing phases of both of these closely related members of the Coccolithaceae thus exhibit a pattern which does not fit the general scheme for haptophytes. Despite the morphology of coccolithophore body scales clearly showing a degree of evolutionary plasticity, we maintain that the working hypothesis of Billard (1994) that body scale ornamentation can be a useful indicator of ploidy state still holds true for the majority of haptophytes. Furthermore, the

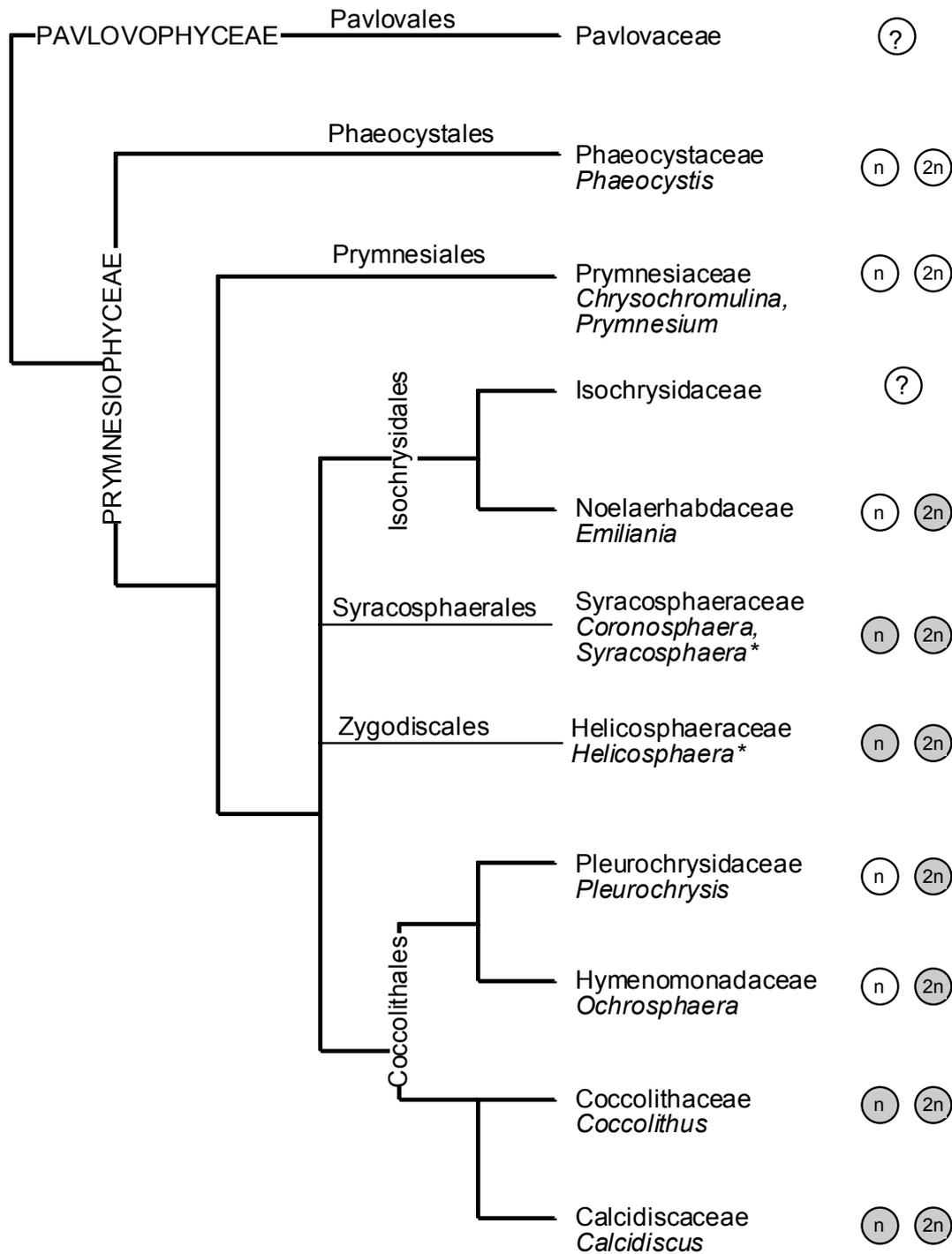


Figure IV-5: Taxa for which haplo-diploid life cycles have been demonstrated in culture or for which indirect evidence is available from combination coccospheres (marked with asterisk) plotted within a schematic composite tree of haptophyte relationships. Shaded symbols indicate phases which produce coccoliths. Although haplo-diploid life cycles have been demonstrated from only a few percent of the species of haptophytes it is clear from the phylogenetic distribution that this is the primitive state across the Prymnesiophyceae. NB. Molecular genetic data on haptophytes is being actively compiled but studies to date (Edwardsen *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2001, Sáez *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, in press) show a high degree of congruence between analyses based on different genes (18S, Rubisco, tufA) and between molecular and conventional taxonomy. So for the higher taxa which have been sampled a composite tree synthesizing the common aspects of the trees in these studies can be drawn. The relationships of the four orders included within the coccolithophore clade are unclear so these are represented by an unresolved polytomy. Various genera and families *incertae sedis* (e.g. Papposphaeraceae, *Umbellosphaera*) are not shown since there is no molecular data available. The classification follows Young & Bown (1997) and Edwardsen *et al.* (2000).

results of this study suggest that coccolith type may be a more accurate indicator of ploidy level in the coccolithophores (heterococcoliths = diploid phase, holococcoliths = haploid phase). As a proviso to this hypothesis, however, it must be stressed that Green *et al.* (1996) observed two clones of apparently diploid *E. huxleyi* S-cells (the scale-bearing, normally haploid, phase). In the non-calcifying haptophyte *Prymnesium parvum* Carter, Larsen & Edvardsen (1998) also reported a diploid stage in the life cycle with body scale ornamentation typical of the haploid phase. At present there is no evidence of such apparent anomalies in life cycles involving holococcolithophores.

The distribution of the haplo-diploid holococcolith-heterococcolith life cycles demonstrated here is plotted on a schematic composite tree of haptophyte relationships in Figure 5. Of the three families for which haplo-diploid life cycles in which the heterococcolith-bearing phase alternates with a non-calcifying stage have been demonstrated, the Pleurochrysidaceae and Hymenomonadaceae are indisputable sister taxa within the order Coccolithales, both separated by a considerable evolutionary distance from the Noelaerhabdaceae (Fig. 5). The Isochrysidales (Noelaerhabdaceae and Isochrysidaceae) diverged early in the evolutionary history of the coccolithophores, most likely before the advent of holococcolith biomineralisation in the haploid phase (species in the Isochrysidaceae have evidently secondarily lost the ability to produce heterococcoliths). By contrast, the Pleurochrysidaceae and Hymenomonadaceae are relatively recently evolved families which have secondarily lost holococcolith production in the haploid phase. The majority of higher taxonomic level coccolithophore taxa are represented in Figure 5 and there is thus very strong support for the conclusion that haplo-diploid life cycles are the autapomorphic state for the coccolithophores as a whole.

Figure IV-5: Taxons pour lesquels un cycle haplo-diploïde a été démontré en culture ou pour lesquels des indications indirectes sont disponibles à partir des coccosphères mixtes (marqués par des astérisques) portés sur un arbre composite schématique des relations entre les haptophytes. Les symboles en gris indiquent les phases produisant des coccolithes. Bien que des cycles haplo-diploïdes aient été démontrés uniquement pour une petite fraction des haptophytes, il est clair à travers la distribution phylogénétique qu'il s'agit d'un caractère ancestral des Prymnesiophyceae. NB. Les études de génétique moléculaire sur les haptophytes sont encore en cours mais les travaux déjà réalisés (Edvardsen *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2001; Sáez *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, in press) montrent un haut degré de congruence entre les analyses basées sur différents gènes (18S, Rubisco, tufA), et entre la taxonomie moléculaire et conventionnelle. De ce fait, pour les principaux taxons étudiés, un arbre composite a pu être réalisé, synthétisant les aspects communs des arbres précédemment publiés. Les relations entre les quatre ordres inclus au sein du clade des coccolithophores ne sont pas encore clairement établies, ils sont donc représentés par une polytomie irrésolue. Les genres et familles classés *incertae sedis* (e.g. Papposphaeraceae, *Umbellosphaera*) ne sont pas représentés puisqu'il n'y a pas de données moléculaires disponibles. La classification suit celles de Young & Bown (1997) et Edvardsen *et al.* (2000).

Alternation between generations of different ploidy levels are known to occur in certain members of each of the other two main clades within the Prymnesiophyceae defined by Edvardsen *et al.* (2000). In the Phaeocystales (clade A of Edvardsen *et al.*, 2000), Vaultot *et al.* (1994) identified an alternation between motile haploid flagellated cells, a non-motile diploid colonial stage and diploid flagellated cells in *Phaeocystis*. In clade B, which contains, among others, species of the genera *Prymnesium* and *Chrysochromulina*, *Prymnesium parvum* has been shown to be the diploid stage in a life cycle in which the haploid stage was originally described as a separate species, *P. patelliferum* Green, Hibberd & Pienaar (Larsen & Edvardsen, 1998) and *Chrysochromulina polylepis* has also been demonstrated to have a haplo-diploid cycle (Edvardsen & Vaultot, 1996).

Alternation of generations has, as yet, not been demonstrated in any members of the other haptophyte class, the Pavlovophyceae (Cavalier-Smith) Green & Medlin. The species within this distinctive clade do not possess the ornamented plate scales which have often proved indicative of ploidy state in the Prymnesiophyceae, and given the fact that different ploidy stages in many non-calcified members of the latter class can only be morphologically distinguished by this character, it is perhaps not surprising that the potential existence of haplo-diploid life cycles in the Pavlovophyceae has not been recognized. Transitions from non-motile to motile cells are common in the Pavlovophyceae (Billard, 1994), but to our knowledge comparative nuclear studies have never been conducted. Relative motility is not often a good indicator of ploidy state, but it must also be remembered that haplo-diploid life cycles can be isomorphic. We predict that haplo-diploidy will eventually be discovered in the Pavlovophyceae.

In ecological terms, a haplo-diploid life cycle is generally considered as an adaptation to an environment which is seasonally variable or that contains two different niches (see review by Valéro *et al.*, 1992). The maintenance of different life cycle stages of coccolithophores in culture will allow laboratory experimentation to assess the ecological significance of haplo-diploidy in this important group of planktonic marine algae. We also note that the existence of different calcification modes in the haploid and diploid phases of coccolithophores provides unique possibilities for functional genomic studies of biomineralization.

Acknowledgements

We would like to thank the many colleagues who assisted in the development of the CODENET culture collection by providing samples and assisting with isolations, notably Luisa Cros, Markus Geisen, Blair Steel and Claire Findlay. Thanks also to Hanno Kinkel and Marcel Veldhuis for providing access to the NIOZ flow cytometer for preliminary investigations, and to Daniel Vaultot for providing access to the facilities at the Roscoff marine biology station. Finally, we are very grateful to Jacqueline Fresnel for assistance with TEM work. This research was funded by the EU via the CODENET (Coccolithophorid Evolutionary Biodiversity and Ecology Network) project of the FP4 TMR activity, the Agence de l'Eau Seine- Normandie and the Conseil Régional de Basse-Normandie.

Chapitre V :



**INFLUENCE DE FACTEURS ABIOTIQUES
(TEMPERATURE, TURBULENCE ET
NUTRIMENTS) SUR LA BIOLOGIE ET
L'ÉCOLOGIE DE QUELQUES
COCCOLITHOPHORES**

Photo: M.Geisen

Influence de facteurs abiotiques (température, turbulence et nutriments) sur la biologie et l'écologie de quelques coccolithophores

I. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, un cycle digénétique haplodiplophasique hétéromorphe a été mis en évidence chez certaines coccolithophores par le biais de la cytométrie en flux et de la microscopie photonique notamment. Cette alternance de phases à différents niveaux de ploïdie a été démontrée chez quatre espèces différentes de coccolithophores appartenant chacune à une famille voire à un ordre différent parmi les Prymnesiophyceae, ce qui laisse à penser que ce type de cycle pourrait être généralisable à l'ensemble de cette classe. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée du fait que d'autres espèces appartenant à cette classe, sans être des coccolithophores, présentent elles aussi un cycle digénétique (discussion du Chapitre IV).

Ce type de cycle, digénétique haplodiplophasique hétéromorphe, a longtemps été supposé comme étant instable et considéré comme une étape entre l'haploïdie et la diploïdie. Cependant, les travaux de Richerd (1993) ont apporté de nouvelles données, notamment par l'introduction de la notion du « coût du sexe » : celui-ci serait diminué de moitié en cas de cycle haplo-diploïde et ce type de cycle amoindrirait l'impact de la consanguinité. Une des hypothèses de base pour le maintien du cycle digénétique et sur laquelle se sont appuyés les travaux de Richerd (1993), repose sur le principe de **sélection disruptive**. Le principe de cette théorie découle du fait qu'un cycle hétéromorphe peut présenter certains avantages dans un environnement spatialement ou temporellement variable (Stebbins et Hill, 1980 ; Willson, 1981), chaque génération pouvant occuper une niche écologique différente. Toutefois, la plupart des travaux sur les cycles chez les algues ont été réalisés chez les macroalgues, les rhodophytes notamment, avec leur cycle trigénétique, et il existe peu de données sur les algues planctoniques. Les coccolithophores, par leur cycle biologique singulier, apparaissent

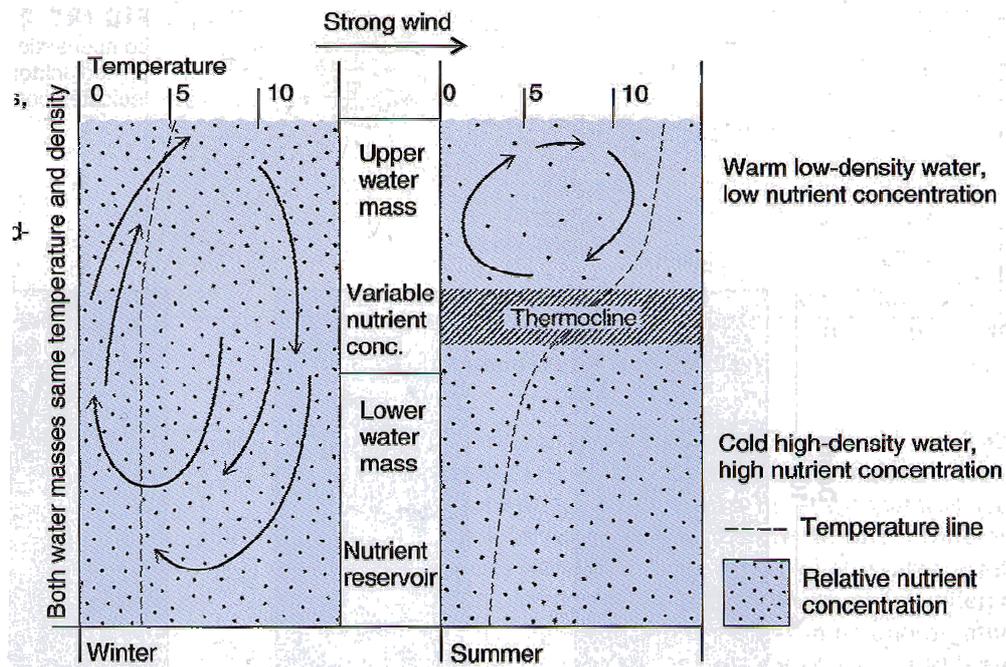


Figure V-1 : Structure théorique de la colonne d'eau d'un océan tempéré en hiver (winter) et au printemps (summer), notamment les relations entre les concentrations en nutriments, la température, la densité et le mélange dû au vent, in Nybakken, 2001.

donc comme un modèle d'étude particulièrement intéressant pour étayer ou infirmer ces théories.

De plus, en raison de leur impact écologique (fortes implications dans les cycles du carbone et du soufre), une meilleure connaissance de la biologie des coccolithophores est nécessaire. Dans ce but, l'étude de l'influence de différents facteurs environnementaux du milieu marin sur les deux phases de leur cycle apparaît comme étant une étape obligée et particulièrement intéressante. Cette analyse est d'autant plus à développer que très peu de données en milieu naturel existent sur les successions et/ou cohabitations pour une même espèce des deux phases du cycle.

L'existence au sein du laboratoire de nombreuses souches de coccolithophores a permis de pouvoir observer chez certaines espèces océaniques l'apparition de deux phases dans une culture jusqu'alors « pure », par ce terme étant entendu une culture à une seule phase. La première espèce à avoir changé de stade a été *Coccolithus braarudii*. Des cultures monophasiques de chacune de ses deux phases ont rapidement été obtenues après isolement et mise en culture d'une cellule de chaque type, permettant ainsi la mise en place d'études d'écophysiologie comparée. A partir de la morphologie respective de chacune de ces phases, une hypothèse de cycle « écologique » a été proposée (Houdan, DEA, 2000), en se basant sur le principe de sélection disruptive et des résultats obtenus par Richerd *et al.* (1993) chez *Gracilaria verrucosa* (les individus haploïdes bénéficieraient d'avantages par rapport aux individus diploïdes, dans un environnement appauvri en sels nutritifs).

Coccolithus braarudii étant une espèce essentiellement tempérée, ce cycle hypothétique a été construit à partir des connaissances de ce milieu et de ses variations au cours des saisons. La Figure V-1 résume les variations des principaux facteurs influençant le milieu marin océanique, avec des changements importants entre l'hiver et l'été. En hiver, la colonne d'eau n'est pas stratifiée, la température est uniforme, les contraintes physiques, telle la turbulence, fortes. La lumière est souvent limitée et la profondeur de la zone de mélange entraîne le phytoplancton dans des zones très faiblement éclairées. Toutefois, les sels nutritifs sont présents en abondance. En été, la situation est inversée, avec une colonne d'eau stratifiée, la présence d'une thermocline, d'une luminosité élevée et de sels nutritifs inégalement répartis dans la colonne d'eau (quantité faible en surface et beaucoup plus élevée en profondeur).

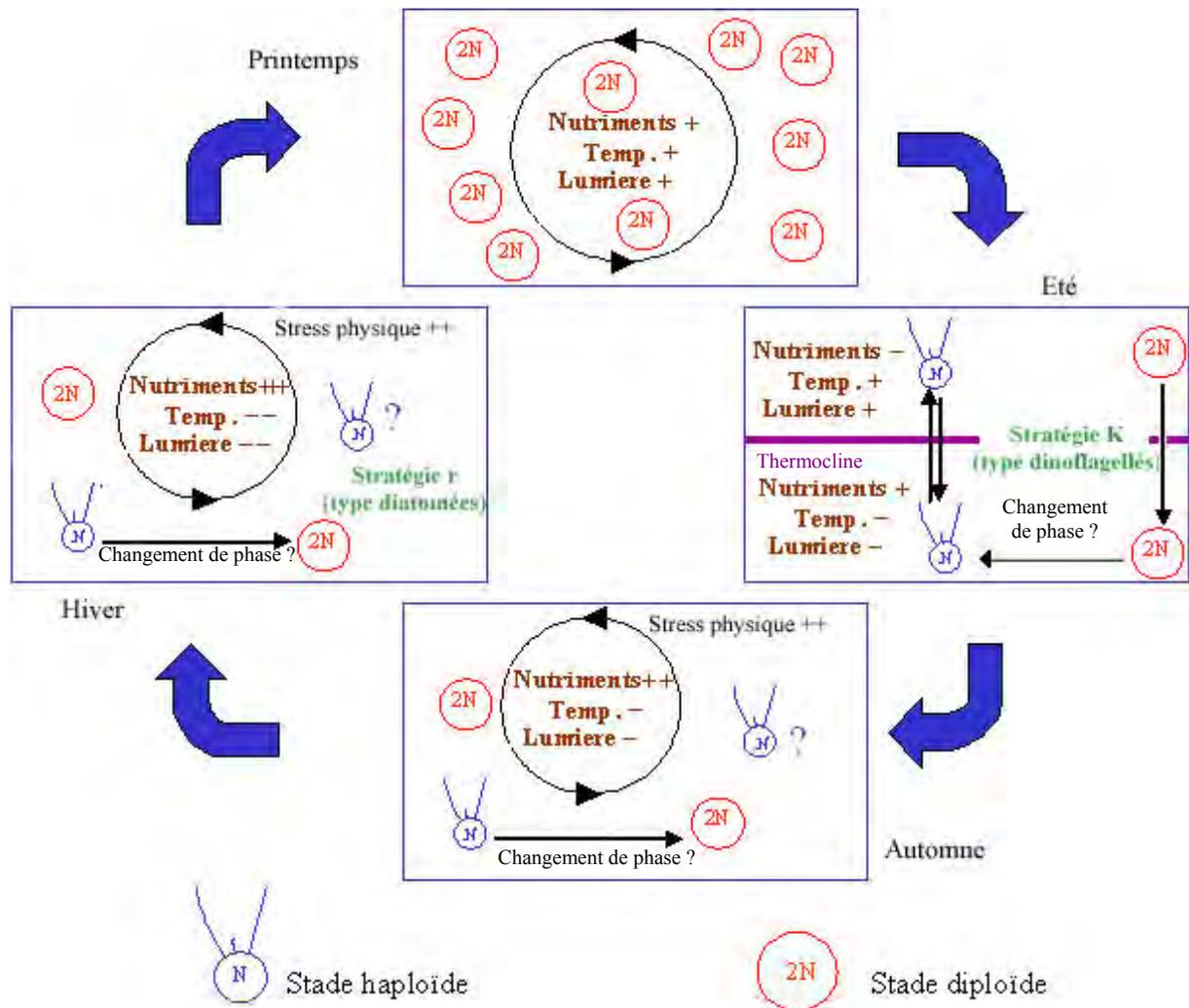


Figure V-2 : Cycle écologique hypothétique de *Cocolithus braarudii* en zone tempérée (d'après Houdan, 2000).

A partir de ces constatations, une réflexion portant sur les possibilités de survie de chacune des deux phases de *Coccolithus braarudii* en fonction des données morphologiques a été entamée et a abouti au cycle suivant (Figure V-2) :

- en **automne**, lorsque la masse d'eau perd sa stratification du fait de la dégradation des conditions météorologiques, les sels nutritifs sont disponibles dans la colonne d'eau par remise en suspension. L'augmentation des turbulences (stress physique), potentiellement néfastes aux cellules flagellées, désavantagerait la phase haploïde. Un changement de phase (haploïde vers diploïde) pourrait alors s'opérer par fusion de cellules haploïdes. La phase diploïde, plus massive et résistante serait plus présente dans le milieu. Il est difficile malgré tout d'établir avec précision à quel moment le changement de phase pourrait intervenir entre l'automne et l'hiver, les deux saisons étant propices à ce phénomène.

- En **période hivernale**, les cellules de *Coccolithus braarudii* phase diploïde se maintiendraient en vie ralentie en même temps que les diatomées.

- Au début du **printemps**, la température et la lumière augmentent ainsi que la quantité de sels nutritifs. De ce fait les premiers blooms d'organismes phytoplanctoniques opportunistes, de stratégie r comme les diatomées, vont entraîner une diminution des sels nutritifs en surface ou dans les premiers mètres de la colonne d'eau. La phase diploïde de *Coccolithus braarudii* proliférerait alors suite à l'efflorescence printanière phytoplanctonique.

- Au début de **l'été**, la colonne d'eau commence à se stratifier, la thermocline se met en place. Sous la thermocline, les sels nutritifs sont plus abondants mais la lumière et la température diminuent avec la profondeur. Devant l'absence de brassage particulier, les cellules de *Coccolithus braarudii* diploïdes et non mobiles vont éventuellement sédimenter et passer la thermocline. Le changement de phase interviendrait alors par méiose : Les cellules flagellées haploïdes pourraient remonter vers la surface où les conditions de lumière sont idéales pour réaliser la photosynthèse. De plus, leurs besoins nutritionnels étant potentiellement plus faibles, elles pourront se développer dans la zone « oligotrophique » au dessus de la thermocline où les conditions sont défavorables à la phase diploïde. Au cours de l'été, la stratification de la colonne d'eau s'accroît et la thermocline descend. Les sels nutritifs sont encore moins abondants en surface tandis que les conditions de température et de lumière se maintiennent. La phase haploïde va pouvoir alors développer deux stratégies : soit utiliser son hétérotrophie potentielle (voir Parke et Adams, 1960), soit réaliser des migrations verticales de part et d'autre de la thermocline comme les dinoflagellés qui seraient co-occurents de la phase flagellée.

-En **automne**, la rupture de la stratification correspondra à un nouveau cycle.

A partir de cette hypothèse écologique, différents facteurs environnementaux ont été sélectionnés vis-à-vis de leur importance potentielle dans ce cycle.

Dans ce chapitre, l'influence de la température, des sels nutritifs (les deux étant variables selon la saison ou selon le niveau dans la colonne d'eau) et de la turbulence (liée uniquement à la saison) ont été étudiées sur les deux phases de *Coccolithus braarudii*. D'autres coccolithophores ont présenté, elles aussi, un changement de phase ; l'isolement de chacune des phases en culture monophasique ayant réussi, elles ont également été soumises à des variations en culture de chacun de ces facteurs.

II. MATERIEL ET METHODES

Dans toutes les expériences suivantes, les différentes espèces de coccolithophores sont cultivées séparément sous leurs deux phases, haploïde et diploïde. Les cultures sont toutes réalisées en triplicats et les taux de croissance sont mesurés au jour 5 (milieu de la phase exponentielle de croissance) sauf pour les expériences de turbulence où ils sont mesurés au jour 3. Les taux de croissance sont calculés selon la formule suivante : $k = \ln(C/C_0)/t$ avec C = concentration cellulaire au jour choisi (3 ou 5), C_0 = concentration cellulaire au jour 0, t = temps écoulé entre les deux (3 ou 5 jours).

Pour chacune des conditions testées, les algues sont acclimatées pendant 3 à 4 repiquages (Brand, 1982) avant l'expérience proprement dite.

1) Température :

Les cultures sont réalisées dans le milieu K/2 (Tableau V-1 ; Keller *et al.*, 1987) avec une photopériode de 16 :8 et une intensité lumineuse de $35 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (néons de type lumière du jour). Les algues sont cultivées dans différentes conditions de température sur une table en aluminium qui présente un gradient de température allant de 8° à 28°C (Figure V-3). Cette table en aluminium est divisée en deux plaques (1 m x 1 m) percées de part en part dans le sens de la largeur à chaque extrémité. A travers ces perforations, un courant d'eau circule dans la table. Pour la partie froide, l'eau est à une température constante de 8°C à une extrémité et de 20°C à l'autre ; pour la partie chaude, elle est de 20°C à l'extrémité adjacente à la partie froide et de 28°C à l'autre, chaque circuit d'eau étant fermé.

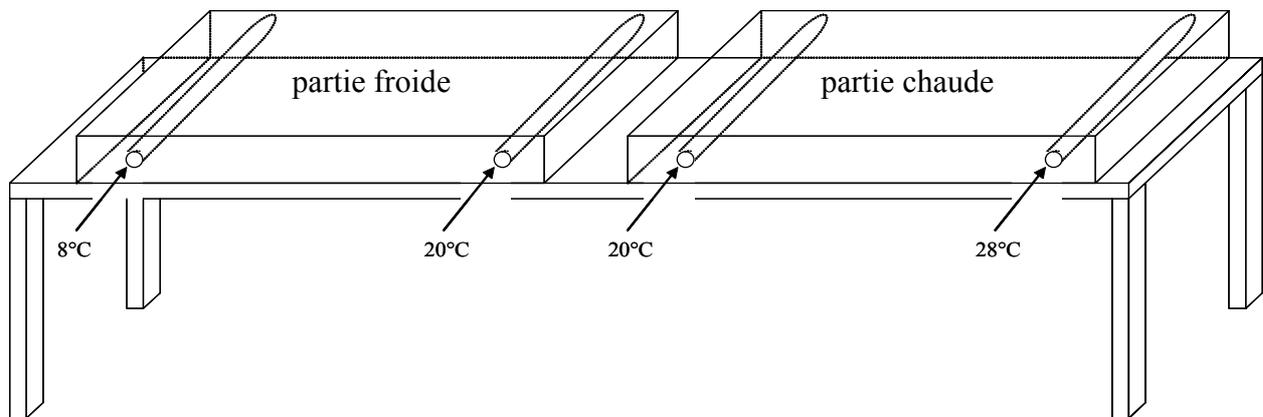


Figure V-3 : Schéma de la table à gradient de température.

Trois coccolithophores sont testées sur cette « table », *Emiliana huxleyi* (TQ 26), *Coccolithus braarudii* (LK1), *Coronosphaera mediterranea* (NS 8-5) dans des erlenmeyers de 100 mL. La densité des microalgues est évaluée régulièrement (tous les deux jours) pendant la période d'acclimatation, puis tous les jours durant l'expérience proprement dite. La concentration cellulaire est obtenue par mesure de la chlorophylle *a in vivo* par fluorimétrie (fluorimètre Turner Design 700), calibrée par le biais de comptages sur cellules de Malassez ou de Sedgwick-Rafter, suivant la taille des espèces. Les cultures sont observées tous les jours afin de noter tout changement de phase.

Les expériences ne sont pas réalisées exactement en triplicat dans le même temps (trois erlenmeyers ne tenant pas sur la table), mais trois fois de suite et les données sont comparées.

2) Sels nutritifs et milieux de culture

Dans cette série d'expériences, les coccolithophores étudiées ont toutes été cultivées dans les mêmes conditions d'éclairage : intensité lumineuse de $25 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dispensée par des néons de type lumière du jour avec une photopériode 16 :8. les expériences ont lieu à une température constante de 17°C , dans des armoires thermostatées.

Différents milieux ont été testés (Tableau V-1) : deux milieux à base d'eau de mer naturelle, le K/2 et le K/2 avec extrait de terre (ET), ainsi qu'un milieu artificiel, le ESAW (Annexe 3, Berges *et al.*, 2001). Le milieu K/2 est le milieu K de Keller *et al.* (1987) dilué deux fois, le K/2 avec extrait de terre (K/2 ET) est le même avec ajout d'extrait de terre selon les proportions recommandées par Cosson (1987). Les espèces étudiées (*Coccolithus braarudii*, *Emiliania huxleyi* et *Calcidiscus leptoporus*) sont maintenues dans des flacons Iwaki ou Nunc à usage unique, de 30 mL ou 25 cm² (flacon plat permettant une observation rapide à la loupe binoculaire).

Afin de travailler sur les sels nutritifs, les algues sélectionnées ont été cultivées dans cinq dilutions différentes du milieu K de Keller. Toutefois, seules les concentrations en azote et phosphate sont soumises à cette dilution, les autres éléments sont maintenus dans la concentration la plus élevée utilisée, à savoir en K/2 (Tableau V-1). Les quatre espèces étudiées (*E. huxleyi*, *C. braarudii*, *C. leptoporus* et *C. mediterranea*) sont cultivées dans des flacons Iwaki ou dans des erlenmeyers de 100mL.

Suite à ces expériences de dilution, d'autres manipulations ont consisté à supprimer l'un des éléments nutritifs du milieu artificiel ESAW : le NaNO₃, le NH₄Cl ou le KH₂PO₄. Dans un cas, toutes les sources azotées ont été supprimées, puis uniquement le nitrate (avec une concentration normale en NH₄Cl), l'ammonium (avec une concentration normale en NaNO₃) et enfin la source de phosphate.

Tableau V-1 : Proportions des différents constituants (en µM) du milieu K (Keller, 1987) et des dilutions utilisées au cours des expériences (en saumon les sels nutritifs dont les concentrations varient en fonction des milieux utilisés, en violet ceux dont les concentrations sont inchangées et équivalentes à celles du K/2)

	K	K/2	K/5	K/10	K/25	K/100	K0
NaNO ₃	1000	500	200	100	40	10	0
NH ₄ Cl	10	5	2	1	0,4	0,1	0
KH ₂ PO ₄	50	25	10	5	2	0,5	0
Na ₂ EDTA	100	50	20	50	50	50	50
NaFeEDTA	10	5	2	5	5	5	5
CuSO ₄	0,01	0,005	0,002	0,005	0,005	0,005	0,005
ZnSO ₄	0,1	0,05	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05
Na ₂ MoO ₄	0,01	0,005	0,002	0,005	0,005	0,005	0,005
CoCl ₂	0,01	0,005	0,002	0,005	0,005	0,005	0,005
H ₂ SeO ₃	0,01	0,005	0,002	0,005	0,005	0,005	0,005
Vit. B12	0,01	0,005	0,002	0,005	0,005	0,005	0,005
Biotine	0,001	0,0005	0,002	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
Thiamine	0,1	0,05	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05

3) Hétérotrophie

Afin de tester son hétérotrophie potentielle, *Coccolithus braarudii*, a été cultivé dans différentes conditions sous ses deux phases, toujours dans les mêmes conditions de température et de lumière que dans les expériences sur les sels nutritifs.

a) Mixotrophie

Dans un premier temps, de l'acétate de sodium est ajouté au milieu de culture K/5 (Tableau V-1), à deux concentrations différentes 100 et 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. En parallèle, un témoin en K/5 sans acétate est cultivé.

b) Phagotrophie

Pour tester cette capacité, les deux phases de *Coccolithus braarudii* ont été cultivées dans deux solutions différentes. Partant de deux cultures stationnaires mixtes, non axéniques, de *C. braarudii* (mélange des deux phases haploïde et diploïde), l'une est filtrée et stérilisée sur 0,22 μm (milieu filtré) tandis que l'autre est centrifugée à 3000 rpm pendant 15 mn pour culotter et éliminer les débris et algues restantes en conservant uniquement le surnageant (milieu centrifugé) ; les deux solutions sont enrichies en K/5. les deux phases haploïde et diploïde sont alors cultivées séparément dans chacun des deux milieux de culture obtenus.

Une autre expérience concernant *Coccolithus braarudii* et basée sur l'absorption de bactéries a été entreprise en collaboration avec Céline Zatylny. Ces bactéries ont été préalablement isolées sur gélose à partir de vieilles cultures de la phase haploïde de *C. braarudii* et cultivées à 37°C dans un milieu liquide de type eau de mer et peptone (un aliquot a été congelé à -80°C avec du glycérol 1v/1v afin de pouvoir les identifier ultérieurement). Une culture en phase exponentielle de ces bactéries est centrifugée à 3000g, le culot est rincé deux fois avec du PBS salin. Les bactéries sont ensuite marquées par le biais de FITC (isothiocyanate de fluoresceine, fluorochrome qui absorbe à 495 nm et qui fluoresce en vert autour de 520 nm) à concentration de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un tampon carbonate 0,1M, pH 9,5. Elles sont ensuite incubées pendant une heure à 4°C et sous agitation constante, puis rincées deux fois avec du tampon phosphate (PBS) salin pour évacuer le fluorochrome. Quelques microlitres de ces bactéries marquées sont ensuite ajoutées à une culture de la phase haploïde de *C. braarudii*, conservée à 17°C et à l'obscurité. Les algues sont ensuite observées avec un microscope photonique à épifluorescence (type : Zeiss standard LAB 16) toutes les heures puis après 24h .

4) *Turbulence*

Sur un plateau oscillant, quatre espèces de coccolithophores (*Coccolithus braarudii*, *Emiliana huxleyi*, *Calcidiscus leptoporus* et *Coronosphaera mediterranea*) sont cultivées en K/2. Parallèlement les mêmes espèces sont cultivées en dehors de toute turbulence, dans les mêmes conditions, comme témoins. La photopériode est de 16 :8 et la lumière est dispensée par des néons de type Lumière du Jour à une intensité lumineuse de $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ au sein de l'armoire thermostatée à 17°C . Les cultures sont réalisées dans des flacons Iwaki de 30 mL.

III. RESULTATS :

Dans tous les graphiques suivants, les données concernant la phase haploïde de chaque espèce (N) sont en bleu et ceux concernant la phase diploïde (2N) en rouge. La présence d'une astérisque signale les cultures où des changements de phase ont été observés.

1) *Température :*

a) *Coccolithus braarudii*

Les deux phases de *C. braarudii* ne présentent pas le même comportement vis à vis de la température (Figure V-4), avec une tolérance plus large pour la phase haploïde (11,5 - $22,5^\circ\text{C}$, pas de croissance en dessous de 10°C) que pour la diploïde (15 - $21,5^\circ\text{C}$). Toutefois, les deux phases présentent des optima proches, autour de 18°C pour la phase diploïde et autour de $19,5$ pour la phase haploïde.

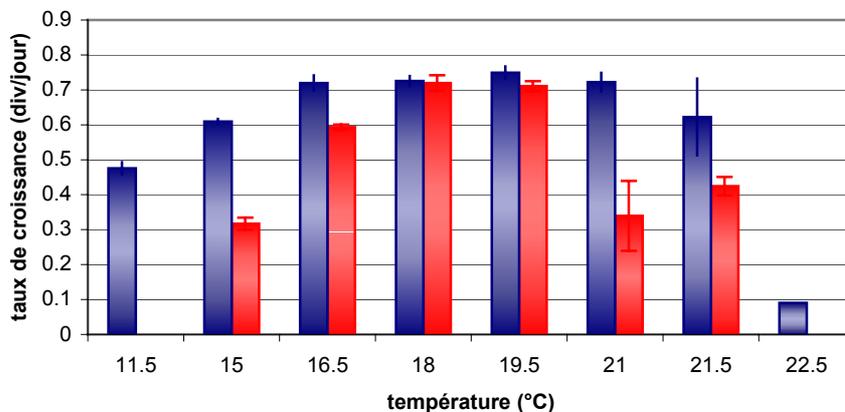


Figure V-4 : Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de la température, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

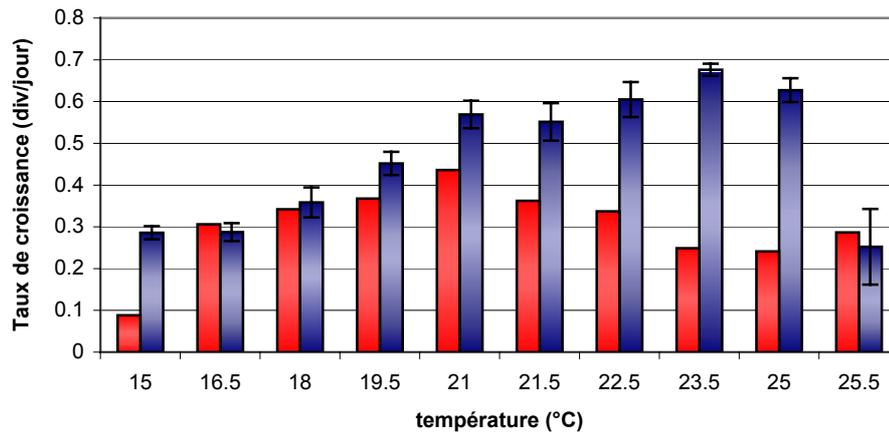
b) *Coronosphaera mediterranea*

Figure V-5 : Taux de croissance de *Coronosphaera mediterranea* en fonction de la température, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

Les taux de croissance des deux phases de *C. mediterranea* ont des évolutions très différentes suivant la température (Figure V-5). Les deux phases pouvant croître de 15 à 25,5°C, la phase diploïde présente un optimum vers 21°C, tandis que l'optimum de la phase haploïde se situe autour de 23,5°C avec des taux de croissance nettement plus élevés entre 21 et 25°C.

c) *Emiliana huxleyi*

Les phases haploïde et diploïde d'*E. huxleyi* présentent un même optimum de température (Figure V-6), autour de 22°C, la phase diploïde (11,5 - 25,5°C) semblant mieux supporter les basses températures que la phase haploïde (15 - 25,5°C). A l'inverse, le taux de croissance de la phase haploïde présente une tendance à être plus élevé à forte température (25,5°C).

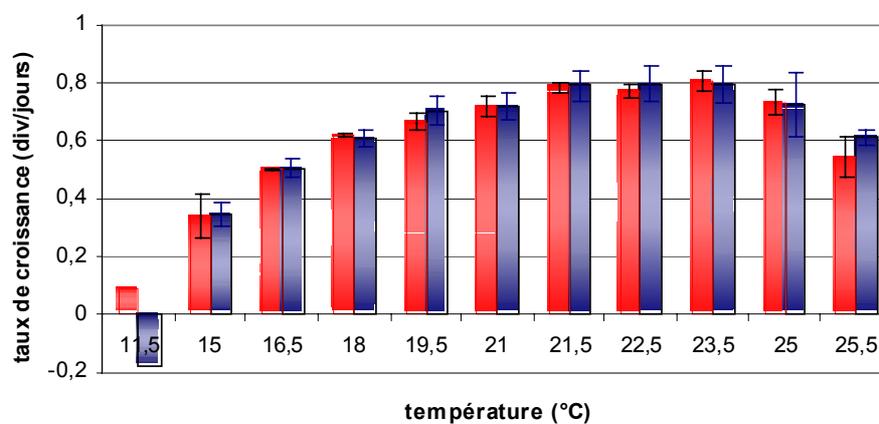


Figure V-6 : Taux de croissance de *Emiliana huxleyi* en fonction de la température, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

2) Nutrition et milieux de culture

a) Influence des différents types de milieu de culture

Coccolithus braarudii

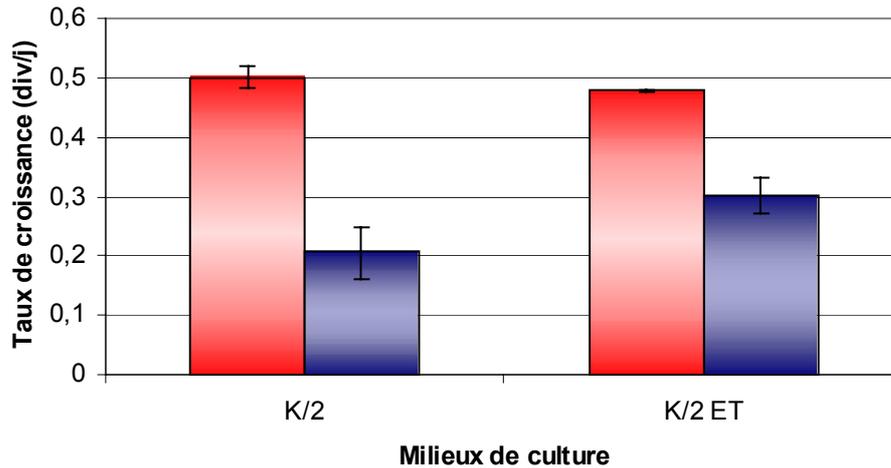


Figure V-7 : Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de différents milieux de culture, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

C. braarudii (Figure V-7) présente des taux de croissance variables, selon que la culture est haploïde ou diploïde. La phase diploïde a un taux de croissance supérieur à celui de la phase haploïde dans les deux milieux K/2 et K/2 ET. Toutefois, la présence d'extrait de terre inhibe légèrement la phase diploïde tandis qu'elle stimule la phase haploïde (taux de croissance supérieur de 30% par rapport au K/2). Les deux phases n'ont pas présenté de croissance en milieu artificiel ESAW, la phase haploïde n'ayant pas survécu au premier repiquage tandis que la phase diploïde n'est morte qu'à la dernière phase d'acclimatation.

Calcidiscus leptoporus

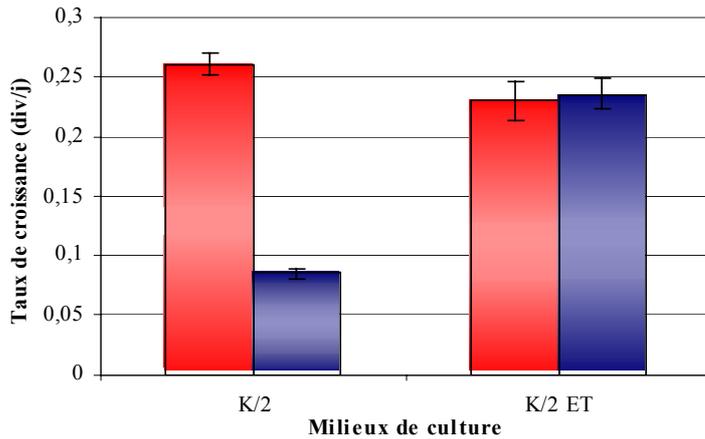


Figure V-8 : Taux de croissance de *Calcidiscus leptoporus* en fonction de différents milieux de culture, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

Le taux de croissance de la phase diploïde de *C. leptoporus* est plus important en K/2 qu'en K/2 ET (Figure V-8). La situation est complètement inversée pour la phase haploïde avec un taux de croissance beaucoup plus faible en K/2 qu'en K/2 ET. Dans ce dernier milieu les deux phases présentent des taux de croissance similaires. En milieu artificiel ESAW, aucune croissance n'est constatée pour les deux phases.

Emiliana huxleyi

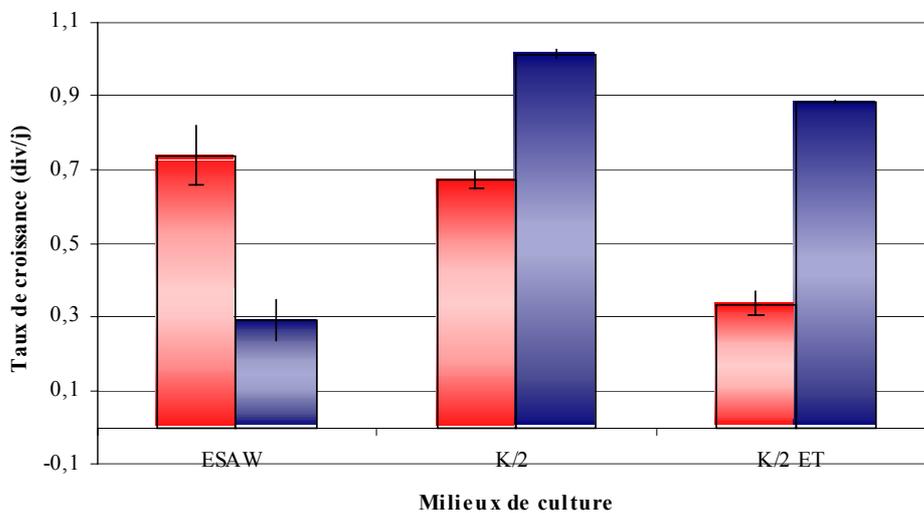


Figure V-9 : Taux de croissance d'*Emiliana huxleyi* en fonction de différents milieux de culture, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

E. huxleyi (Figure V-9) présente des taux de croissance différents selon les milieux et également selon la phase. Ainsi la phase diploïde a des taux de croissance similaires en K/2 et en milieu artificiel ESAW, tandis qu'en K/2 ET, ils sont nettement différents, avec une inhibition d'environ 50% en K/2 avec ET par rapport au K/2 (milieu de référence).

La phase haploïde présente un taux de croissance largement inférieur en milieu artificiel par rapport aux milieux à base d'eau de mer naturelle (K/2 et K/2 ET), respectivement 71 et 67% d'inhibition du taux de croissance. Entre le K/2 et le K/2 ET, l'inhibition est moins forte, avec un taux de croissance diminué de 12% environ.

Les taux de croissance de la phase haploïde sont supérieurs à ceux de la phase diploïde dans les milieux à base d'eau de mer naturelle mais nettement inférieurs en milieu artificiel.

b) Influence des différentes quantités de sels nutritifs azotés et phosphatés

Coccolithus braarudii

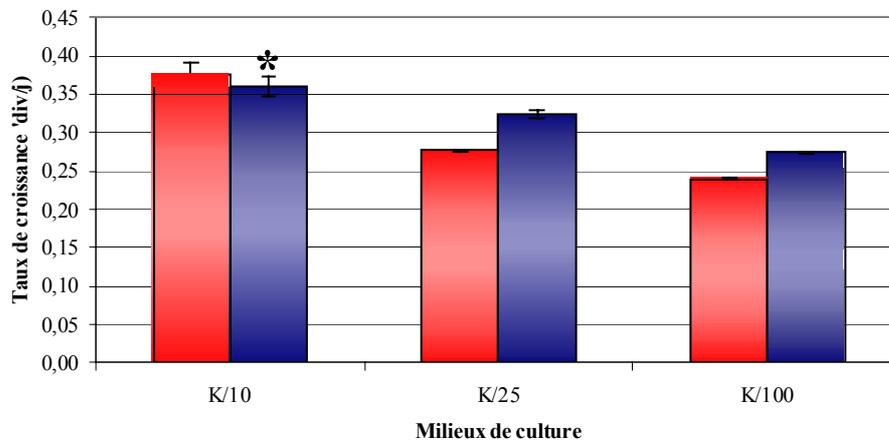


Figure V-10 : Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu K, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

Le taux de croissance des deux phases montrent une diminution en corrélation avec la quantité de sels nutritifs azotés et phosphatés présents dans le milieu K (Figure V-10). La gamme de dilution testée pour cette espèce va de K/10 à K/100 (K/2 n'ayant délibérément pas été réalisé faute de place au moment de l'expérience). Toutefois, la croissance de la phase diploïde présente une diminution plus marquée que celle de la phase haploïde dans les milieux pauvres en nutriments. De plus, des changements de la phase haploïde vers la diploïde ont été observés dans les milieux les plus riches (en K/2 dans les souches entretenues en routine et K/10 ici). Ces changements, non synchronisés, ne concernent qu'une faible partie des cultures. Il est difficile de les comptabiliser du fait que les cellules diploïdes résultantes se divisent elles-mêmes par la suite. Ce phénomène de changement de phase se rencontre beaucoup plus rarement dans les milieux pauvres.

Calcidiscus leptoporus

Les taux de croissance de la phase haploïde de *Calcidiscus leptoporus* (Figure V-11) présentent une nette diminution suivant la quantité de sels nutritifs présents (différence significative d'un point de vue statistique). Pour la phase diploïde, le taux de croissance est similaire d'un point de vue statistique dans les trois milieux les plus riches, il ne diminue qu'en K/100.

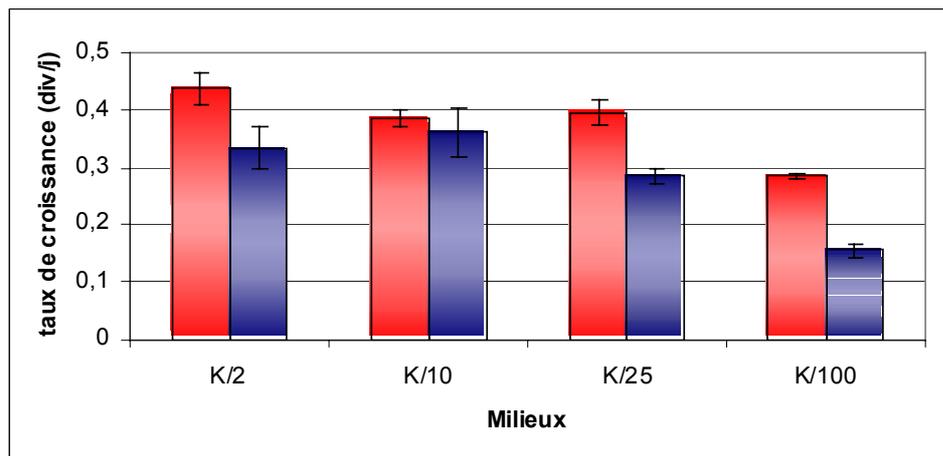


Figure V-11 : Taux de croissance de *Calcidiscus leptoporus* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu K, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

La phase haploïde présente un taux de croissance équivalent à celui de la phase diploïde en K/10. En K/25 et en K/100, la phase diploïde a un taux de croissance supérieur à celui de la phase haploïde. En K/2 (milieu le plus riche), le taux de croissance de la phase haploïde reste inférieur à celui de la phase diploïde.

Cependant, un phénomène intéressant a été observé chez la phase haploïde de *Calcidiscus leptoporus*, à savoir l'apparition de pseudo-colonies (Figures V-12 et V-13). Ces « colonies » de cellules flagellées sont majoritairement présentes en K/2 et leur proportion diminue jusqu'à être nulle en K/100. Elles sont constituées de plusieurs cellules (de 4 à plus de 16 cellules) qui conservent chacune leur appareil flagellaire et leur haptonème (figure V-13). Elles sont entourées par une enveloppe, sans coccolithes.

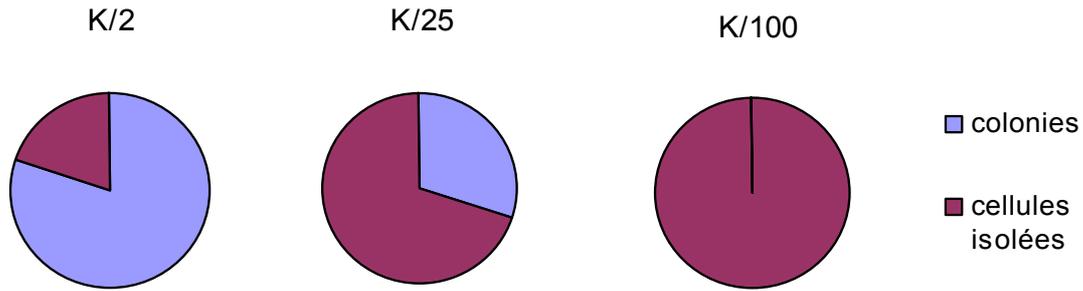


Figure V-12 : Proportions des pseudo-colonies de *Calcidiscus leptoporus* phase haploïde dans différents milieux de culture.

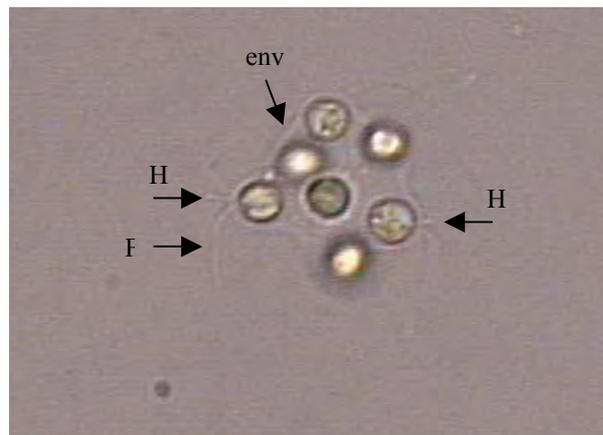


Figure V-13 : Aspect d'une pseudo-colonie de *Calcidiscus leptoporus* phase haploïde en K/2, objectif x100. H : haptonème ; F : flagelle ; env : enveloppe entourant la pseudo-colonie.

Emiliana huxleyi

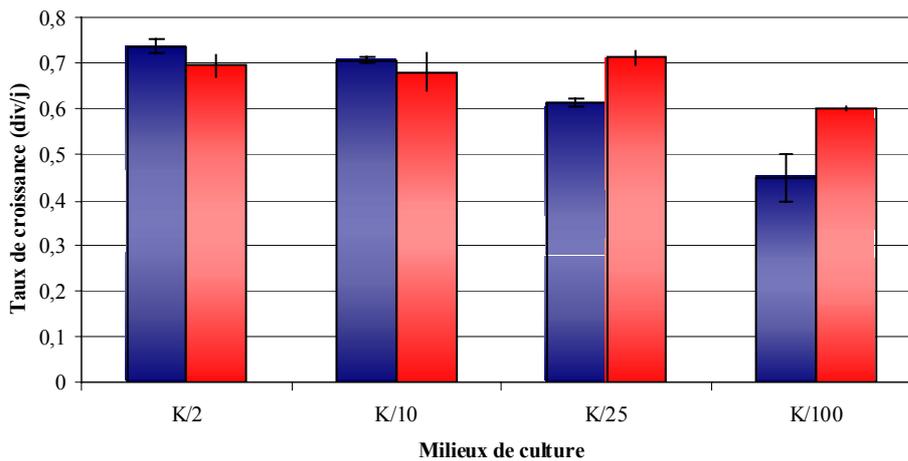


Figure V-14 : Taux de croissance d'*Emiliana huxleyi* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu K, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

Les taux de croissance de la phase haploïde de *E. huxleyi* présentent une nette diminution suivant la quantité de sels nutritifs (azotés et phosphatés) présents dans le milieu K (Figure V-14). Ainsi en K/2 (plus riche), le taux de croissance est de plus de $0,7 \text{ j}^{-1}$ tandis

qu'en K/100 (moins riche) il n'est que de $0,45 \text{ j}^{-1}$ (différence significative d'un point de vue statistique). Pour la phase diploïde, le taux de croissance est le même dans les trois milieux les plus riches, il ne diminue qu'en K/100.

La phase haploïde présente un taux de croissance supérieur ou équivalent à celui de la phase diploïde en K/2 et en K/10 tandis qu'en K/25 et en K/100, la phase diploïde a un taux de croissance supérieur.

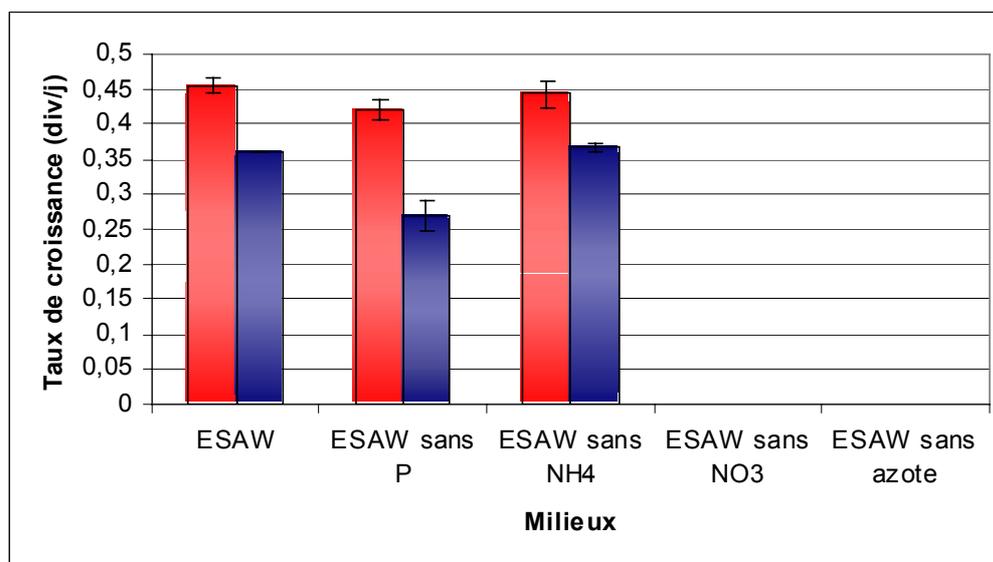


Figure V-15 : Taux de croissance d'*Emiliana huxleyi* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu artificiel ESAW, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

Concernant les taux de croissance en milieu artificiel, dans deux milieux, ESAW sans nitrate et ESAW sans azote (Figure V-15), aucune croissance n'est constatée suite à la période d'acclimatation (mort au bout de quelques repiquages). Dans les trois autres milieux, il y a croissance des deux phases, haploïde et diploïde. Les deux présentent des taux de croissance plus faibles en absence de phosphate, la phase haploïde étant plus clairement affectée (Tableau V-2) avec 25,5% d'inhibition.

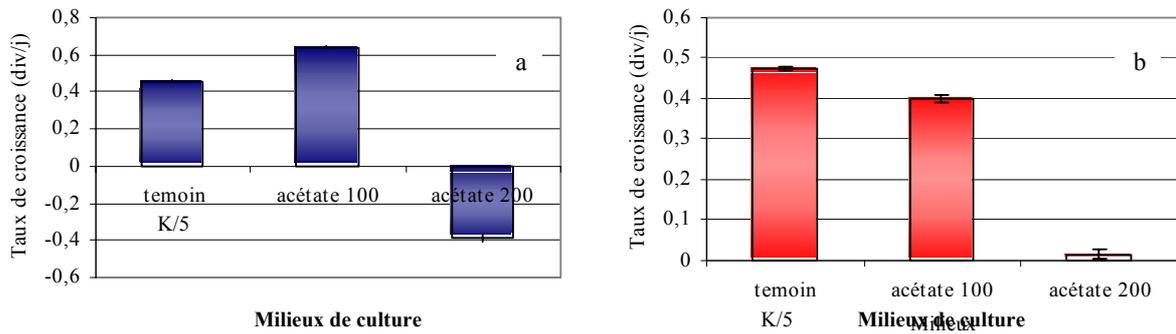


Figure V-16 : Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* cultivé en présence de différentes concentrations d'acétate de sodium ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) par rapport au témoin (K/5) sans acétate, phase haploïde en bleu (a) et phase diploïde en rouge (b).

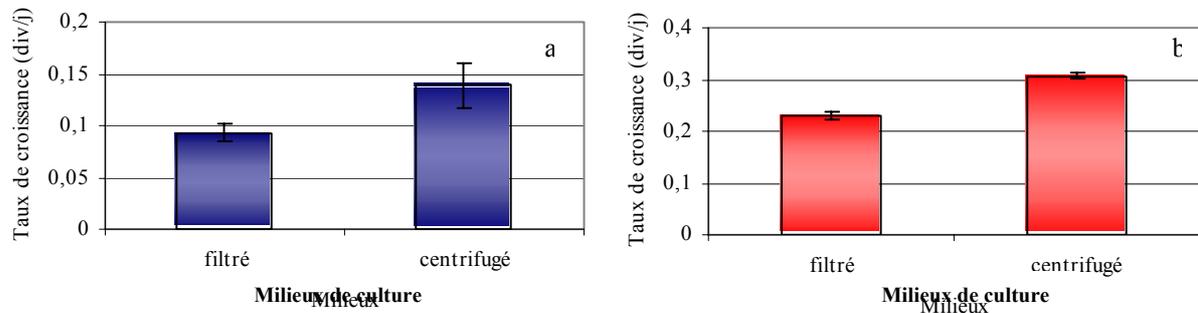


Figure V-17 : Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* cultivé dans un milieu à base de cultures stationnaires de la même espèce, phase haploïde en bleu (a) et phase diploïde en rouge (b).

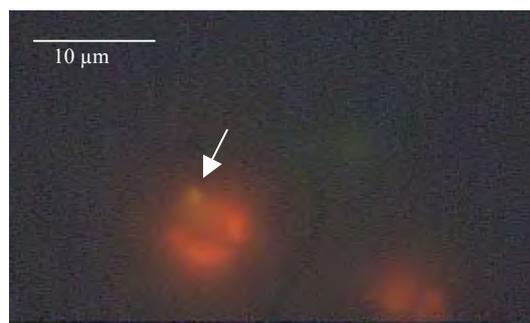


Figure V-18 : Phase haploïde de *Coccolithus braarudii* en présence de bactéries marquées par un fluorochrome; la flèche blanche désigne une vacuole à fluorescence verte (présence de FITC), la fluorescence rouge correspond à l'emplacement des plastides (autofluorescence de la chlorophylle).

c) Hétérotrophie

Mixotrophie

Les deux phases de *Coccolithus braarudii* présentent des réactions différentes en présence d'acétate. Par rapport au témoin (milieu K/5) la phase diploïde est inhibée (autour de 15% d'inhibition) tandis que la phase haploïde voit son taux de croissance stimulé (environ 40% de stimulation) par ce composé à la concentration $100\mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Figure V-16). Dans le cas de l'acétate à la concentration $200\mu\text{mol.mL}^{-1}$, la croissance des deux phases est très inhibée avec pour la phase diploïde un taux proche de 0 et pas de croissance pour la phase haploïde.

Phagotrophie

Concernant la croissance des deux phases de *Coccolithus braarudii* dans des solutions à base de cultures stationnaires de la même espèce, les résultats montrent que leurs taux de croissance sont plus élevés dans le milieu centrifugé que dans le milieu stérilisé par filtration (Figure V-17). La phase haploïde présente une inhibition de son taux de croissance de 33% dans le milieu filtré par rapport au milieu centrifugé, et la phase diploïde une inhibition de 25%.

L'expérience relative à la phagocytose de bactéries chez la phase flagellée de *Coccolithus braarudii* a montré qu'après 2 à 3 heures d'incubation à l'obscurité avec des bactéries marquées, des vacuoles avec une fluorescence verte apparaissent au pôle basal de la cellule (Figure V-18). Des observations à intervalles de temps réguliers montrent que la quantité de cellules présentant ce type de fluorescence augmente avec les temps d'incubation. Dans les cultures sans bactéries marquées, les vacuoles ne sont pas visibles par fluorescence.

3) *Turbulence*

Coccolithus braarudii

Le comportement des deux phases de *C. braarudii* (Figure V-19) est nettement différent en conditions de turbulence. Cultivée depuis plusieurs jours sur plateau oscillant, la phase haploïde voit son taux de croissance diminuer fortement jusqu'à être négatif (Tableau

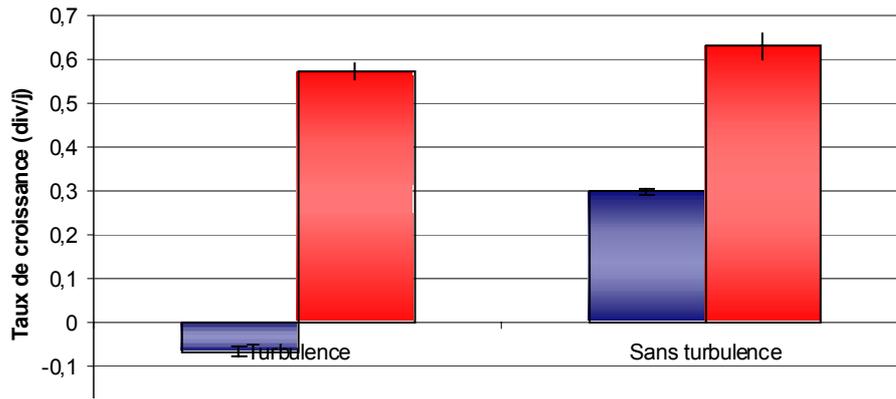


Figure V-19 : Taux de croissance des deux phases de *Coccothius braarudii* en fonction de la turbulence, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

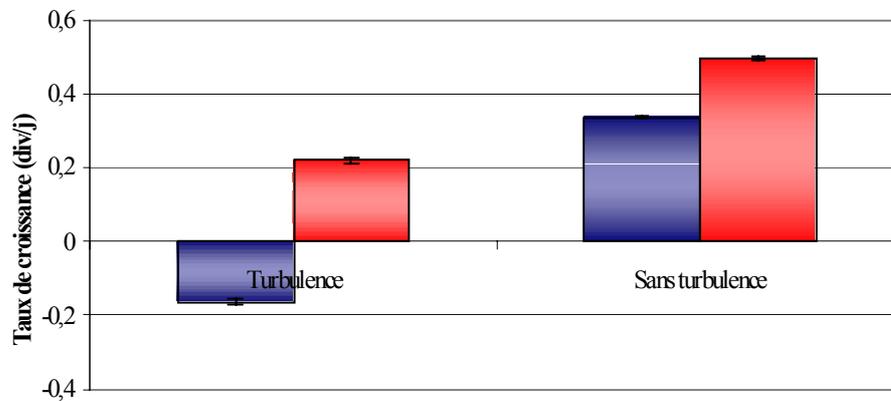


Figure V-20 : Taux de croissance des deux phases de *Calcidiscus leptoporus* en fonction de la turbulence, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

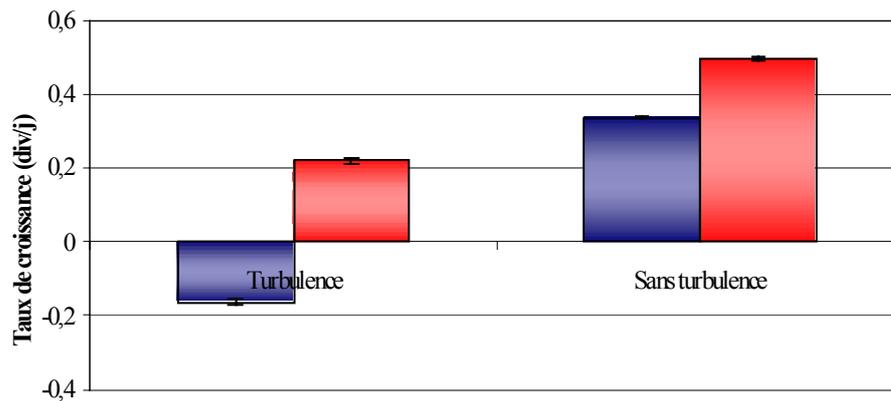


Figure V-21 : Taux de croissance des deux phases de *Emiliana huxleyi* en fonction de la turbulence, phase haploïde (en bleu) et phase diploïde (en rouge).

V-2). La phase diploïde est inhibée, elle aussi, mais conserve un taux de croissance positif (14,4% d'inhibition). De plus, dans les conditions de turbulence, la phase haploïde subit après quelques heures un changement de phase, passant à la phase diploïde. Encore une fois, il est difficile de quantifier ce phénomène, qui n'est pas synchronisé en général, et la propre croissance des cellules de la phase diploïde introduit un biais certain. Toutefois, il est arrivé, en juillet 2000, que toute une culture haploïde change de phase dans ces conditions sans que la culture témoin présente le même phénomène.

Calcidiscus leptoporus

Pour *C. leptoporus*, le taux de croissance des deux phases est modifié de façon différente avec la turbulence (Figure V-20). La phase haploïde est inhibée à 100% (Tableau V-2) par la turbulence avec un taux de croissance négatif, tandis que la phase diploïde est inhibée elle aussi mais conserve toujours un taux de croissance supérieur à 0.

Tableau V-2 : Pourcentage d'inhibition des différentes espèces de coccolithophores étudiées en fonction de la turbulence. * stade flagellé

% inhibition	Phase haploïde	Phase diploïde
<i>Emiliana huxleyi</i>	18,4*	7,1
<i>Coccolithus braarudii</i>	100*	14,4
<i>Calcidiscus leptoporus</i>	100*	55,9
<i>Coronosphaera mediterranea</i>	100*	100*

Coronosphaera mediterranea

Dans le cas de cette espèce, où, rappelons-le les deux phases haploïde et diploïde sont flagellées, celles-ci présentent une inhibition totale de leur croissance en conditions de turbulence (Tableau V-2).

Emiliana huxleyi

La phase haploïde flagellée de *E. huxleyi* montre une légère inhibition de croissance (18,4%) en présence de turbulences (Figure V-21 et Tableau V-2), de même pour la phase diploïde (7,1% d'inhibition). Les deux phases présentent malgré tout une croissance satisfaisante en condition de turbulence.

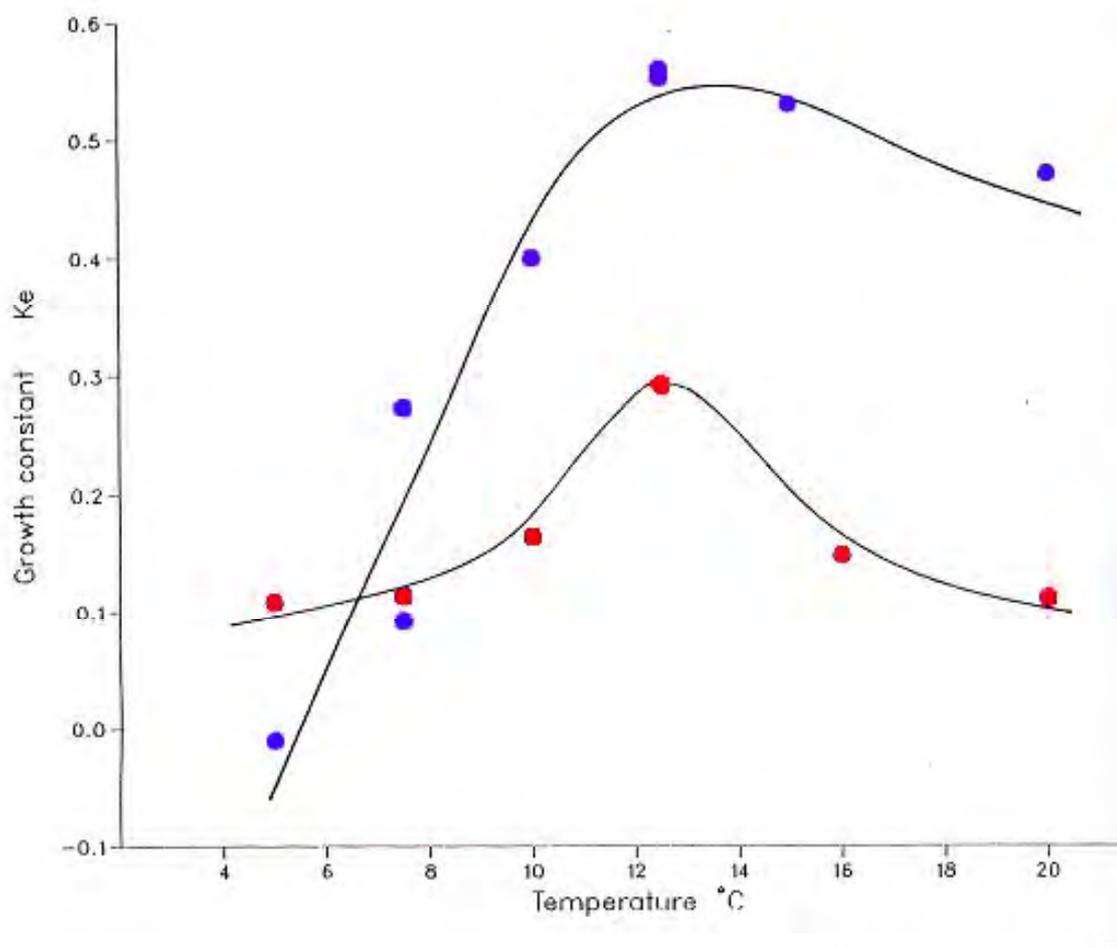


Figure V-22 : Taux de croissance de *Coccolithus pelagicus s.s.* en fonction de la température, en bleu la phase haploïde et en rouge la phase diploïde, d'après Rowson (1986).

IV. DISCUSSION

Les différentes expériences d'écophysiologie présentées dans ce chapitre portent sur deux des facteurs environnementaux majeurs en milieu marin : la température de l'eau et la turbulence. Le problème de la nutrition est également étudié par le biais de l'influence de la quantité de sels nutritifs et du type de milieu de culture, et enfin d'une potentielle hétérotrophie.

Parmi les quatre coccolithophores testées, *Coccolithus braarudii* a été sélectionné comme espèce modèle, du fait de son rapide changement de phase, le premier observé dans nos cultures, et un cycle écologique, présenté en introduction, a été proposé. A travers l'étude des différents facteurs présentés plus haut, nous avons tenté de confirmer ce cycle.

- ***Coccolithus braarudii*** (Coccolithales)

Cette espèce présente un optimum de **température** autour de 18°C pour la phase diploïde et de 19,5°C pour la phase haploïde, les deux ne présentant pas de croissance en dessous de 10°C. Par rapport aux données bibliographiques, qui concernent essentiellement *Coccolithus pelagicus s. l.*, les optima et la tolérance de température sont plus élevés ici. Ainsi selon Braarud (1979) cette espèce est rencontrée en dessous de 15°C, tandis que la souche de *C. braarudii* d'Arcachon (zone tempérée) que nous avons utilisée paraît croître essentiellement au dessus de cette température. Rowson (1986) s'est également focalisé sur les comportements respectifs des deux phases de *Coccolithus pelagicus s. s.* (souches 182 i et f avec *Crystallolithus hyalinus* comme holococcolithophore). Il est clair que cette espèce a une tolérance de température très inférieure à celle de *C. braarudii* (Figure V-22), ce qui peut contribuer à confirmer la séparation de *Coccolithus pelagicus s. l.* en deux espèces (ou au moins en deux écotypes distincts). La phase haploïde de *C. braarudii* présente un optimum de température plus élevé que la phase diploïde, elle croît aussi sur une gamme de température légèrement plus étendue. Rowson (1986) obtient des résultats très similaires pour *C. pelagicus*, même si les températures sont inférieures. Ainsi, nous avons montré que la phase haploïde de *C. braarudii* présente des taux de croissance élevés sur une large gamme de températures (entre 9 et 15°C, le taux de croissance est quasiment identique), tandis que la phase diploïde montre des taux de croissance élevés sur une gamme beaucoup plus restreinte. Toutefois contrairement à *C. pelagicus*, la phase haploïde de *C. braarudii* est celle qui pousse aux températures les plus froides.

Au travers de ces expériences, la phase haploïde apparaît comme étant plus compétitive que la phase diploïde pour les températures extrêmes de la gamme de tolérance de *Coccolithus braarudii*, phénomène bien marqué pour les températures les plus élevées.

En conditions de **turbulence**, la phase diploïde non mobile de *Coccolithus* est plus résistante que la phase haploïde. Son taux de croissance n'est que faiblement diminué tandis que celui de la phase flagellée est complètement inhibé. De plus, la culture de la phase haploïde, pure avant l'expérience, présente après quelques dizaines d'heures des cellules de la phase diploïde, phénomène dû très certainement à un changement de phase (voir les images de fusion, Chapitre IV, Figure IV-4). En effet, si dans le témoin quelques cellules diploïdes sont parfois présentes, c'est en quantité largement moindre. Il paraît clair qu'en conditions de turbulence la phase haploïde, flagellée, est largement affectée et que ses possibilités de survie sont diminuées. D'une façon générale, les phytoflagellés sont fortement désavantagés en conditions de forte turbulence, du fait de leur fragilité, et ils prolifèrent donc plutôt dans les masses d'eaux stratifiées (Taylor, 1987). La phase diploïde étant plus massive, avec des coccolithes plus épais (un de leurs rôles putatifs serait d'ailleurs de protéger la cellule contre les stress physiques, Young, 1994) elle serait plus résistante aux forces physiques. Dans un environnement stable ou stratifié, la présence de flagelles est un atout pour de nombreuses espèces qui, comme les dinoflagellés, réalisent des migrations verticales optimisant ainsi la présence de nutriments sous la thermocline et l'intensité lumineuse plus importante en surface. La phase haploïde mobile de *Coccolithus braarudii* a de fait un avantage certain dans ces conditions par rapport à la phase diploïde non flagellée.

Différents aspects de la **nutrition** ont été étudiés. Sur les trois types de milieux de culture testés, les deux phases de *Coccolithus braarudii* ne présentent aucune croissance en milieu artificiel (ESAW). La phase diploïde a toutefois survécu plus longtemps que la phase haploïde dans ce type de milieu. Ceci est peut être dû au fait que les cellules de cette phase sont d'une dimension supérieure à celle de la phase haploïde, avec potentiellement plus de réserves.

Le taux de croissance de la phase diploïde est plus important en milieu (riche) K/2 par rapport à celui de la phase haploïde. Néanmoins, en présence d'extrait de terre (milieu K/2 ET), cette phase est inhibée tandis que la phase haploïde est au contraire stimulée. L'inhibition pourrait être due à un plus fort développement de bactéries lié à la présence de composés organiques et celles-ci entreraient alors en concurrence directe avec les

coccolithophores. Pour la phase flagellée, l'extrait de terre paraît être un stimulant et une explication possible à ce phénomène consisterait en une mixotrophie. L'algue serait capable d'utiliser les composés organiques présents dans le milieu, l'extrait de terre étant particulièrement riche en macro-nutriments, mais aussi en micro-nutriments, chélateurs de métaux traces, vitamines.... L'existence d'une capacité phagotrophe pourrait également expliquer ce phénomène, la phase haploïde consommant les bactéries présentes dans le milieu. Cette hypothèse n'est pas à rejeter, Parke et Adams (1960), ayant noté des comportements phagotrophes (ingestion de particules de graphite) chez la phase flagellée de *Coccolithus braarudii*. Klaveness (1973) a mis en évidence le même phénomène chez une autre holococcolithophore, *Calyptrorphaera sphaeroidea*.

Toutefois, des expériences complémentaires ont été nécessaires pour confirmer ou infirmer ces hypothèses chez *Coccolithus braarudii*. Les coccolithophores ont alors été cultivées dans des solutions à base de cultures stationnaires stérilisées par filtration ou simplement centrifugées. Entre les deux solutions, le milieu filtré sera plus pauvre en composés organiques de grande taille et toutes les bactéries seront éliminées, au contraire du milieu centrifugé. Il apparaît alors que la phase haploïde est stimulée de façon plus importante que la phase diploïde dans le milieu centrifugé. Toutefois, cette dernière est également stimulée. Les deux phases de *Coccolithus braarudii* sont donc, à priori, toutes deux capables de mixotrophie. Pour la phase diploïde non mobile, la phagotrophie semble peu probable, étant liée chez les haptophytes à la présence de cellules flagellées avec haptonème (Jones *et al.*, 1994 ; Kawachi *et al.*, 1991). La structure et l'emboîtement des coccolithes sont également des facteurs influant la phagotrophie : celle-ci paraît ainsi plus plausible chez le stade flagellé, l'enveloppe d'holococcolithes étant beaucoup plus souple et déformable que celle du stade non mobile à hétérococcolithes. L'ajout de bactéries marquées par FITC, confirme le fait que la phagotrophie est possible pour la phase haploïde, mais il a été impossible de quantifier ce phénomène. Les deux phases apparaissent donc comme étant toutes deux potentiellement capables de mixotrophie, la phase haploïde de façon beaucoup plus nette, et seule cette dernière pourrait être phagotrophe dans certaines conditions.

Les expériences concernant la quantité de sels nutritifs apportés dans le milieu fournissent d'autres informations. La phase diploïde apparaît comme étant beaucoup plus compétitive en milieu riche que la phase haploïde qui dominerait plutôt en milieu pauvre. De plus en milieu K/2 et en K/10, des changements de phase de la phase haploïde vers la phase diploïde ont été observés dans chaque culture, phénomène jamais retrouvé ou presque dans les

milieux plus pauvres en sels nutritifs. D'autres expériences confirment le fait qu'en K/2 (milieu riche) la phase diploïde a un taux de croissance supérieur à celui de la phase haploïde. Ces expériences vont dans le même sens que celles réalisées par Richerd *et al.* (1993), montrant que, chez les rhodophytes, les individus haploïdes sont plus compétitifs en milieu appauvri.

Le maintien de l'haploïdie (plus faible quantité d'ADN nucléaire par rapport à la diploïdie) peut être expliqué par des avantages écologiques associés telle une stratégie démographique de type r (Cavalier-Smith, 1978). Pour cet auteur, une faible quantité d'ADN permettrait des divisions rapides et une forte croissance associée à une petite taille (la taille de la cellule étant directement corrélée avec la quantité d'ADN présente dans le noyau) soit une stratégie r. Pour formuler cette hypothèse Cavalier-Smith (1978) se base sur le fait que l'ADN est métaboliquement et écologiquement coûteux (taux de phosphate et azote élevés). Toutefois cette explication est difficile à retenir pour le phytoplancton. En effet, l'étude des successions saisonnières a montré que les diatomées (diploïdes) sont de stratégie r et les premières à se développer, tandis que les dinoflagellés (haploïdes), apparaissent les derniers et sont de stratégie K. La sélection naturelle agit sur le phytoplancton marin dans le sens d'une optimisation du stockage et de l'utilisation de N et de P d'où l'intérêt d'un faible besoin de ces composants (et donc par conséquent de l'haploïdie) dans des conditions oligotrophes. Ceci contredit l'hypothèse de Cavalier-Smith et se rapproche plus de celle de Lewis (1985) qui pense que les avantages de l'haploïdie résident plus dans la nutrition avec de plus faibles besoins en N et P et donc une meilleure capacité à se développer en milieu oligotrophe.

La théorie de Lewis (1985) pourrait s'appliquer aux coccolithophores, du moins à *Coccolithus braarudii*. Ce même auteur associe cependant autotrophie avec haploïdie (énergie et nutriments ne sont pas captés en même temps), et hétérotrophie avec diploïdie (énergie et nutriments sont captés en même temps), ce qui dans le cas de l'espèce étudiée ici ne correspond pas. Toutefois, il ne discute pas du cas des espèces à cycle haplo-diplophasique mais des avantages de l'haploïdie en général. Une autre hypothèse serait que cette phase pourrait avoir une plus forte spécificité pour certains des sels nutritifs.

Il est donc assez cohérent de supposer que la phase haploïde de *Coccolithus braarudii* serait plus adaptée à un milieu pauvre, du fait de ses taux de croissance plus élevés et de sa potentielle mixotrophie et/ou phagotrophie, tandis que la phase diploïde serait présente en milieu plus riche. Ceci est en partie corroboré par le fait que des cultures de la phase haploïde de *C. braarudii* ont pu être conservées vivantes pendant deux ans, sans ajout de milieu frais, alors que la phase diploïde périclute au bout de quelques semaines. Enfin, Kleijne (1993) a

noté que les holococcolithophores dans leur ensemble sont beaucoup plus présentes dans les zones oligotrophes, ce qui va tout à fait dans le sens des résultats obtenus ici.

Les facteurs déclenchant les changements de morphologie (passage d'un stade mobile à un stade non mobile et inversement), varient suivant les groupes phytoplanctoniques (le cas particulier des diatomées étant mis à part). Ainsi chez les dinoflagellés (à cycle monogénétique) le déclenchement de la reproduction sexuée aboutissant à la formation d'un kyste, durable dans les sédiments, semble directement liée aux concentrations en nutriments notamment aux déficiences en azote (Pfiester et Anderson, 1987 ; Probert, 2002). Chez les haptophytes à phase benthique, ainsi que chez les coccolithophores côtières *Pleurochrysis*, la phase haploïde cultivée sur milieu gélosé solide produit des cellules flagellées (à rôle ou non de gamètes) à l'occasion d'un repiquage en milieu liquide (Gayral et Fresnel, 1983 ; Fresnel et Billard, 1991). Chez *Coccolithus braarudii*, le changement de la phase mobile (haploïde) vers la phase non mobile (diploïde) a été le plus souvent constaté lorsque les cellules flagellées sont transférées dans un milieu riche (voir ci-dessus). D'autres conditions peuvent provoquer ce type de changement : repiquage des cellules haploïdes dans un flacon de 200 mL (« grande » contenance), transfert au froid (10°C) ou encore agitation des cultures. En général, les cellules diploïdes apparues ne se développent guère, sauf dans les cas de la mise en conditions de turbulence, où nous avons pu constater que la totalité d'une culture haploïde de *Coccolithus braarudii* pouvait changer de phase avec multiplication par la suite de cellules diploïdes. Au total, il semble que le facteur « stress » ait son importance dans le déclenchement des changements de morphologie et/ou de phase nucléaire chez les coccolithophores.

A propos de la répartition géographique des deux phases de *Coccolithus pelagicus* s. l., quelques données de terrain existent, notamment grâce aux campagnes réalisées en Mer de Norvège (Andruleit, 1997; Samtleben & Bickert, 1990; Samtleben & Schröder, 1992), en Arctique (Thomsen *et al.*, 1991) ou sur les upwellings africains et portugais (Giraudeau *et al.*, 1993, Cachão *et al.*, 2000) et en Atlantique (Okada et McIntyre, 1979) mais elles concernent à la fois la distribution actuelle et passée des coccolithophores. Ces données sont collectées en effet le plus souvent à partir de trappes à sédiment, ce qui pose un problème certain pour les holococcolithophores qui sont plus fragiles et plus facilement sujettes à la dissolution. Des prélèvements dans la colonne d'eau ont été réalisés par le passé mais de manière trop sporadique pour permettre une compréhension de l'écologie de cette espèce (Kleijne, 1991).

Malgré tout, il apparaît que la phase diploïde de *Coccolithus pelagicus s. l.* est présente plutôt en hiver ou au début du printemps et que sa phase haploïde se récolte en été (voir Okada et McIntyre, 1979).

Tous ces éléments confirment le cycle écologique hypothétique proposé dans l'introduction. La phase diploïde non mobile serait plus particulièrement liée aux eaux riches en nutriments et agitées, tandis que la phase haploïde flagellée se développerait mieux dans une colonne d'eau stratifiée, avec de faibles taux de sels nutritifs (forte affinité pour ces nutriments et capacité d'hétérotrophie). Ce scénario se vérifie aussi dans les conditions d'upwelling, la phase diploïde étant proche de la zone de résurgence des eaux riches et relativement froides, contrairement aux holococcolithophores récoltées au large de ce phénomène dans les eaux oligotrophes et plus chaudes (Cachão et Moita, 2000).

- *Calcidiscus leptoporus* (Coccolithales)

Cette espèce appartient à une famille proche de celle de *Coccolithus braarudii*. Comme chez cette dernière, sa phase diploïde non mobile à hétérococcolithes alterne avec une phase flagellée haploïde à holococcolithes (Chapitres III et IV).

Suite à des problèmes techniques, la détermination des optima de **température** n'a pu être faite pour *Calcidiscus leptoporus*. Toutefois, du point de vue de la **nutrition**, le comportement des deux phases est très semblable à celui des deux phases de *Coccolithus braarudii*. La phase haploïde de *Calcidiscus leptoporus* se trouve stimulée par la présence d'extrait de terre, tandis que la phase diploïde est inhibée. Dans ce cas, les mêmes explications que pour *C. braarudii* sont envisageables, la phase haploïde flagellée pouvant, là encore, être considérée comme étant partiellement hétérotrophe.

Les deux phases se trouvent inhibées lorsque la quantité de sels nutritifs diminue. Elles voient leur taux de croissance amoindri, presque de moitié, entre le milieu de culture le plus riche et le plus pauvre. Cependant, la phase haploïde présente un comportement inattendu dans les milieux les moins carencés. Ainsi, dans le K/2 et le K/25 apparaissent des « pseudo-colonies » de cellules sans coccolithes, proches d'aspect de celles de l'haptophyte coloniale *Phaeocystis*, avec comme différence morphologique majeure la persistance des appareils flagellaires chez *Calcidiscus leptoporus*. Le nombre de ces « colonies » est proportionnel à la quantité de sels nutritifs ajoutés dans le milieu. Ce phénomène peut être considéré comme un artefact de culture, toutefois la proportionnalité observée et l'absence de « pseudo-colonies » en milieu pauvre laissent supposer que cette espèce n'est pas adaptée à un milieu riche. En

effet, ces « colonies » présentent de nombreux désavantages, chaque cellule gardant sa mobilité et aucune nageant dans la même direction, ce qui entraîne des mouvements erratiques et impliquent une grande dépense d'énergie. Dans le milieu naturel, de telles « colonies » de *C. leptoporus* n'ont jamais été rencontrées tandis que le stade holococcolithophore normal est courant, surtout dans les zones oligotrophes ou stratifiées. L'hypothèse que la phase haploïde est plus compétitive dans un milieu pauvre de type oligotrophe peut, de ce fait, être avancée.

En conditions de **turbulence**, là encore le comportement de *Calcidiscus leptoporus* est très semblable à celui de *Coccolithus braarudii* avec une phase haploïde complètement inhibée alors que la phase diploïde résiste beaucoup mieux, avec un taux de croissance peu affecté.

Calcidiscus leptoporus présente donc de nombreuses analogies avec *Coccolithus braarudii*. Sa phase haploïde apparaît comme étant plutôt de type oligotrophe, se développant en conditions de colonne d'eau stratifiée. La pauvreté en sels nutritifs n'apparaît pas comme un facteur particulièrement limitant, les deux phases présentant toutes deux une capacité à se développer dans ces conditions (la phase haploïde étant toutefois moins compétitive dans les milieux riches).

- ***Coronosphaera mediterranea*** (Coccolithales)

Elle présente le même type de cycle digénétique que les deux espèces précédentes, sinon que les deux générations du cycle sont flagellées.

Concernant la **température**, la tendance est la même que chez *C. braarudii*, sinon que *Coronosphaera mediterranea* est une espèce d'eau chaude. Le stade diploïde présente un préférendum autour de 21 °C tandis que celui de la phase haploïde est plus élevé, vers 23,5°C. De même, les taux de croissance les plus importants de cette phase haploïde sont tous au delà de 21°C, et compris entre 18 et 22,5°C pour la phase diploïde. Le comportement vis-à-vis de la température de *C. mediterranea* est donc probablement similaire à celui de *Coccolithus braarudii* et de *Calcidiscus leptoporus*, avec une phase haploïde mieux adaptée à des températures plus élevées que le stade diploïde.

Coronosphaera mediterranea présente toutefois un comportement spécifique vis à vis de la **turbulence**, du fait que ses deux phases sont flagellées. Toutes deux sont complètement inhibées par des conditions de turbulence. Il se trouve que cette espèce est caractéristique des milieux plutôt oligotrophes ou stratifiés, de type méditerranéen ou tropical, et donc sans turbulence importante. Dans ces conditions, l'existence de deux générations flagellées apporte

donc un avantage certain, limitant le phénomène de sédimentation et permettant à la cellule de se maintenir dans la zone euphotique.

De plus, Cros et Fortuño (2003) signalent que *Coronosphaera mediterranea* se comporte comme *Helicosphaera carteri*, autre coccolithophore à cycle supposé haplo-diploïde (Cros *et al.*, 2000 ; Geisen *et al.*, 2002) et dont les deux phases, à hétérococcolithes (= *H. carteri*) et à holococcolithes (= *Syracolithus catilliferus*) sont flagellées. Les deux espèces présentent une répartition dans la colonne d'eau différente suivant la phase : celle à holococcolithes étant plutôt en surface tandis que la phase à hétérococcolithes serait localisée plus en profondeur (surtout en été). D'autres auteurs ont préalablement associé *Helicosphaera carteri* à des eaux riches en nutriments (Giraudeau, 1992) et sa phase à holococcolithes, *S. catilliferus*, à la zone de surface (voir Jordan et Winter, 2000). La stratégie de développement de *Helicosphaera carteri* semble être identique à celle de *Coronosphaera mediterranea* : phase haploïde en surface, dans les eaux pauvres mais chaudes et phase diploïde en profondeur, dans une masse d'eau plus froide mais riche en nutriments (Cros *et al.*, 2000).

- ***Emiliana huxleyi*** (Isochrysidales)

Emiliana huxleyi diffère des trois précédentes coccolithophores de par son cycle qui comprend une phase haploïde, flagellée mais non calcifiée (sans coccolithes) et une phase diploïde non mobile à hétérococcolithes. Du fait de cette différence, et devant l'ubiquité de cette espèce, le cycle écologique d'*Emiliana huxleyi* peut potentiellement être très différent de celui de *Coccolithus braarudii*.

Les deux phases apparaissent comme ayant le même optimum de **température** avec une gamme un peu plus large pour la phase haploïde. Les précédentes études font état d'une tolérance très large de cette espèce vis-à-vis de la température, de 1 à 30°C (Winter *et al.*, 1994). Toutefois, les données concernent tous les écotypes de *E. huxleyi*, sachant que, suivant ces derniers, la gamme de tolérance varie. Le morphotype R de *E. huxleyi* utilisée ici a été récemment reconnu (voir Young *et al.*, 2003) mais jamais étudié d'un point de vue écophysologique jusqu'à présent. Par rapport aux trois précédentes coccolithophores, sa gamme de température est effectivement la plus large, s'étalant entre 11,5 à 25,5°C (15°C étant la limite inférieure notée ici pour la phase haploïde). Les taux de croissance obtenus pour les deux phases ne sont pas significativement différents pour aucune des températures testées, excepté pour la plus basse.

Du point de vue **nutrition**, les deux phases présentent un comportement différent en milieux de culture artificiels, la phase non mobile n'étant pas affectée par ce type de milieu tandis que la phase flagellée est clairement inhibée. Ceci permet de supposer des besoins légèrement différents pour les deux générations. En présence d'extrait de terre, les deux phases voient leur taux de croissance chuter mais de façon moindre pour la phase haploïde flagellée. On peut invoquer une capacité hétérotrophe pour cette dernière, toutefois la petite taille des cellules doit limiter considérablement la taille des proies et l'absence d'haptonème peut même empêcher toute phagotrophie, autorisant la mixotrophie uniquement. Par ailleurs, il a déjà été mis en évidence que la phase diploïde possède des capacités mixotrophes, absorbant des composés tels que l'urée, des purines (Palenik et Henson, 1997). Il est dès lors fort probable que la phase haploïde dispose des mêmes capacités. Dans les conditions de l'expérience, la mixotrophie de la phase diploïde ne permettrait pas de compenser la diminution des nutriments due à la compétition avec les bactéries, ce qui expliquerait la chute de son taux de croissance tandis que la phase haploïde, avec des capacités mixotrophes plus développées compenserait mieux ce manque.

Concernant les sels nutritifs, la phase haploïde présente des taux de croissance légèrement supérieurs à ceux de la phase diploïde dans le milieu le plus riche (K/2). Toutefois, quand la quantité de nutriments diminue, les deux phases ont un comportement différent. La croissance de la phase diploïde est meilleure que celle de la phase haploïde pour le K/25 et le K/100, avec des taux similaires pour les trois milieux les plus riches. *E. huxleyii*, phase à coccolithes, est réputée pour son affinité très importante pour les nutriments, ce qui expliquerait en partie son succès écologique (Egge et Heimdal, 1994 ; Riegman *et al.*, 1992 ; Riegman *et al.*, 2000 ; Smayda, 1997) notamment dans des milieux plus ou moins carencés comme le K/25 et le K/100. Toutefois la phase haploïde flagellée semble moins compétitive dans ce type de milieu, ce qui pourrait s'expliquer par une affinité moins élevée pour les nutriments.

Cette hypothèse est en partie confirmée par les résultats obtenus en supprimant un sel nutritif dans le milieu artificiel ESAW : ce milieu étant complètement artificiel, il n'introduit pas de biais dans sa composition quant aux quantités de sels nutritifs, par opposition aux milieux de type K à base d'eau de mer naturelle. En absence de phosphore dans le milieu artificiel, la phase à coccolithe d'*Emiliana huxleyi* présente une croissance, légèrement inhibée par rapport au milieu de référence. Pourtant, ce composé est essentiel à la vie de la cellule et après la période d'acclimatation (quatre repiquages, soit environ trois semaines) les

réserves potentielles de cette dernière sont épuisées. Cependant, le milieu artificiel étant conservé dans des bouteilles de polyéthylène (lavées et autoclavées avant chaque utilisation), il est possible que des traces de phosphate soient présentes le long des parois résultant de précédentes utilisations et relarguées dans ce milieu. Ces traces peuvent suffire à expliquer la croissance d'*E. huxleyi*. En effet, elle est reconnue pour avoir de grandes affinités pour le phosphate, sa constante de demi saturation étant de 1 nM, ce qui est très faible comparé à celle d'autres algues étudiées jusqu'à présent (Smayda, 1997). La phase haploïde présente elle aussi une croissance mais plus faible, ce qui suggère là encore une affinité pour le phosphate mais plus réduite que pour la phase diploïde.

L'absence de toute croissance dans un milieu sans source azotée concorde bien avec les résultats obtenus par différents auteurs, à savoir qu'*Emiliana huxleyi* est peu compétitive pour l'azote (voir Riegman *et al.*, 1992). Malgré tout, les résultats obtenus avec une croissance en présence de nitrate et en absence d'ammonium sont en contradiction avec ceux précédemment rapportés chez cette espèce et mériteraient une nouvelle vérification. En effet, *E. huxleyi* utiliserait préférentiellement l'ammonium par rapport au nitrate (Flynn *et al.*, 1999 ; Page *et al.*, 1999), ce qui ne concorde pas avec les résultats obtenus ici. Ils pourraient être dus à une inversion involontaire des sources azotées lors de l'expérience (pour le phosphate, l'expérience a été récemment refaite et les résultats obtenus sont confirmés).

La **turbulence** affecte les deux phases de cette espèce en réduisant leur croissance. La phase haploïde apparaît comme ayant des taux de croissance plus faibles en conditions d'agitation que la phase à coccolithes, mais en des proportions moindres que les phases haploïdes des coccolithophores précédemment testées qui ne présentaient aucune croissance.

Emiliana huxleyi est une espèce particulière au sein des coccolithophores notamment parce qu'elle appartient, avec un autre genre proche (*Gephyrocapsa*), à l'ordre des Isochrysidales tandis que le reste des coccolithophores appartient aux Coccolithales. Son cycle est lui-même assez original, proche de celui des coccolithophores côtières, avec alternance entre une phase à hétérococcolithes et une phase à écailles sans coccolithes, alors que cette espèce, tout en étant très ubiquiste, est surtout océanique. Elle est commune dans presque tous les domaines marins et sous de nombreuses latitudes, sous divers morphotypes. Elle est capable de fortes efflorescences, visibles par satellite (Holligan *et al.*, 1993). C'est donc une espèce qui a été très étudiée depuis le début des années 1990, mais toujours sous sa phase à coccolithes (diploïde).

Pourtant, les différentes expériences réalisées dans ce travail montrent que les comportements des deux phases sont très similaires et qu'elles semblent avoir des exigences écologiques proches.

Contrairement aux trois précédentes espèces de coccolithophores, la stratégie d'*Emiliana huxleyi* ne semble pas correspondre au modèle de cycle écologique que nous avons proposé : pas de différences (ou minimales) entre les deux phases vis-à-vis de la température ou de la turbulence et une phase diploïde qui paraît avoir plus d'affinités pour les sels nutritifs que la phase haploïde à l'inverse des autres coccolithophores...Par ailleurs, l'absence de données en milieu naturel pour la phase haploïde ne fournit aucune indication quant à sa distribution spatiale et temporelle. Cependant cette absence d'informations ne doit pas être interprétée comme une non-existence de la phase haploïde dans le milieu naturel. En effet, cette phase flagellée est très petite (moins de 5µm de diamètre) et peut donc facilement passer inaperçue. De plus, dans beaucoup d'échantillons fixés, les flagelles ne sont plus visibles, et souvent la pose de la lamelle de verre en microscopie photonique entraîne elle aussi une perte des flagelles, ce qui rend difficile toute identification. Il est donc possible que la place de cette phase mobile d'*Emiliana huxleyi* soit largement sous-estimée alors qu'elle pourrait avoir une incidence dans l'apparition ou la fin des blooms (la possibilité de mixotrophie de cette la phase haploïde pouvant alors intervenir).

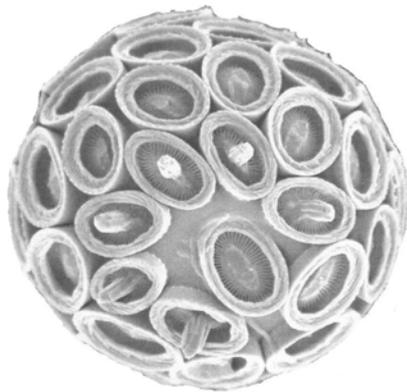
Une autre hypothèse peut également être avancée, basée sur l'importance de la sexualité, pour expliquer la « rareté » de la phase haploïde dans le milieu naturel. La sexualité intervient généralement chez les espèces phytoplanctoniques en conditions de stress, ce qui est le cas des fins de blooms d'*Emiliana huxleyi* : la sexualité interviendrait à ce moment chez cette espèce afin de créer de nouvelles combinaisons génétiques. La phase haploïde jouerait alors essentiellement un rôle temporaire de gamètes, permettant un brassage du pool génétique afin d'optimiser les possibilités de survie. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, dans aucune des conditions testées, un changement de phase haploïde vers diploïde n'est intervenu dans les cultures d'*E. huxleyi* (absence de fécondation, alors que pour les autres coccolithophores, ces changements spontanés ont été observés au cours des années. Par contre chez *E. huxleyi*, des changements de phase diploïde vers haploïde ont eu lieu spontanément ce qui sous-entend un phénomène de méiose. L'explication à l'absence de changement de phase dans l'autre sens de nos cultures pourrait être un phénomène d'hétérothallisme chez *Emiliana huxleyi*, à savoir que des cellules issues de la même souche, identiques du point de vue génome, ne peuvent fusionner. L'hétérothallisme est un phénomène connu chez les microalgues phytoplanctoniques. C'est notamment le cas de plusieurs diatomées pennées,

comme par exemple le genre *Pseudo-nitzschia*, qualifié de dioïque (Davidovich et Bates, 1998), ou encore de certains dinoflagellés hétérothalliques (voir Faust et Gualledge, 2002). Un éventuel hétérothallisme (avec gamètes de signes opposés) chez *E. huxleyi* n'est donc pas exclu et en absence de partenaire du type opposé, les cellules de la phase haploïde se perpétueraient végétativement, ce qui est constaté dans nos cultures.

Des études complémentaires sont donc nécessaires, notamment dans en conditions de fin de blooms, afin de vérifier si la phase haploïde d'*Emiliana huxleyi* est présente dans le milieu océanique ou côtier, de façon durable ou anecdotique. De plus, des expériences sur un éventuel hétérothallisme devront être menées ; elles nécessitent la mise en culture de clones de différentes origines et la mise en oeuvre de croisements. A l'heure actuelle, un seul clone haploïde d'*E. huxleyi* est cultivé avec succès au laboratoire. Ces études pourront éventuellement trancher en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses : sous-estimation de l'importance de la phase haploïde en milieu naturel ou rôle temporaire de gamète de cette phase.

Dans tous les cas, il apparaît nécessaire d'intégrer ce paramètre de l'existence d'une phase haploïde, aux différents modèles réalisés pour cette espèce (Nanninga et Tyrrel, 1996) qui n'en tiennent pas compte et considèrent, en règle générale, que cette espèce est monophasique.

Chapitre VI :



IMPACT DE LA LUMIERE SUR LA BIOLOGIE ET L'ÉCOLOGIE DE QUATRE COCCOLITHOPHORES

Photo: A.Houdan

Impact de la lumière sur la biologie et l'écologie des coccolithophores

Ce chapitre fera l'objet d'une publication, en préparation :

A.Houdan, I. Probert, K. van Lenning et C. Billard. Impact of light on the biology and ecology of coccolithophores (en préparation)

I. INTRODUCTION

La lumière est un facteur écologique majeur en milieu marin, affectant une grande variété de phénomènes, de la production primaire à la vision des poissons. Les organismes phytoplanctoniques autotrophes sont particulièrement liés à la lumière, du fait de la photosynthèse qui utilise l'énergie lumineuse pour la production de composés organiques. La quantité de photons disponible est fonction de la quantité, de l'intensité lumineuse mais aussi de la qualité de la lumière.

Dans le milieu marin, la quantité de lumière pénétrant la colonne d'eau est fonction notamment de la profondeur et l'intensité lumineuse diminue en même temps que celle-ci augmente. Ainsi, un seuil très important pour les organismes photosynthétiques a été défini par ce phénomène, la profondeur critique qui correspond à la profondeur à laquelle l'intensité lumineuse est égale à 1% de celle de la surface. Généralement, ce seuil marque la profondeur à partir de laquelle la production de la photosynthèse devient inférieure à la respiration, et définit la limite inférieure de la zone photique. Les coccolithophores vivant à des profondeurs particulières, comme *Florisphaera profunda*, rencontrée uniquement (au delà de 70m sont sans doute sûrement acclimatées à ces faibles intensités lumineuses soit par le développement de l'hétérotrophie (aucune donnée biologique n'existe sur cette espèce, on ne sait si elle est réellement plastidiée) et/ou d'une forte efficacité photosynthétique (adaptation du contenu pigmentaire en quantité/ qualité ?), d'autant que *F. profunda* vit plutôt dans les zones tropicales où la pénétration de la lumière est maximale (presque jusqu'à 150m, Raymont,

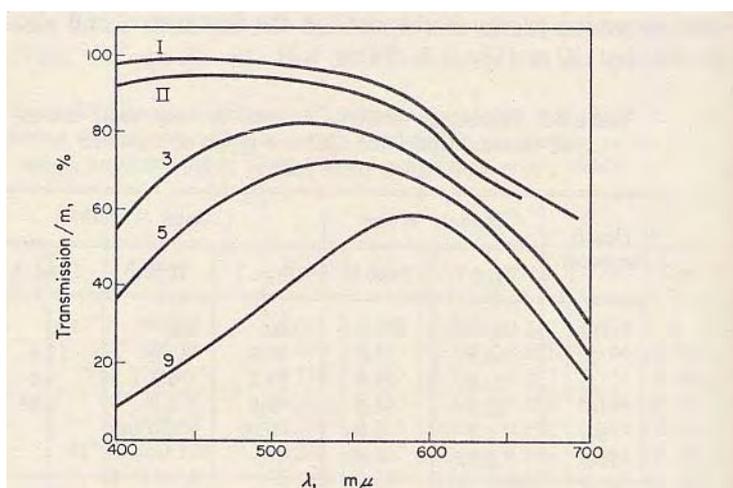


Figure VI-1 : Pénétration de la lumière dans deux types d'eaux océaniques (I et II) et trois types d'eaux côtières (3, 5, 9) à la turbidité croissante. Transmission en % par mètre, d'après Jerlov (1951).

1967). L'intensité lumineuse est effectivement également dépendante de la latitude et du type d'eau de mer (Jerlov, 1951). Plusieurs zones ont ainsi été définies en fonction du type d'eau, dont au moins 2 océaniques (dont une plus chargée en particules comme la Mer Rouge) et trois côtières plus ou moins turbides (Figure VI-1).

En parallèle, l'angle de pénétration des rayons lumineux, variable selon la latitude et la saison, influence la quantité d'énergie lumineuse qui sera disponible dans la colonne d'eau, elle est maximale à l'équateur quand l'angle est à 90° et minimale aux deux pôles quand l'angle diminue. Les conditions météorologiques influant sur cette intensité, ainsi, les nuages qui tendent à arrêter les rayons lumineux (Fig VI-2).

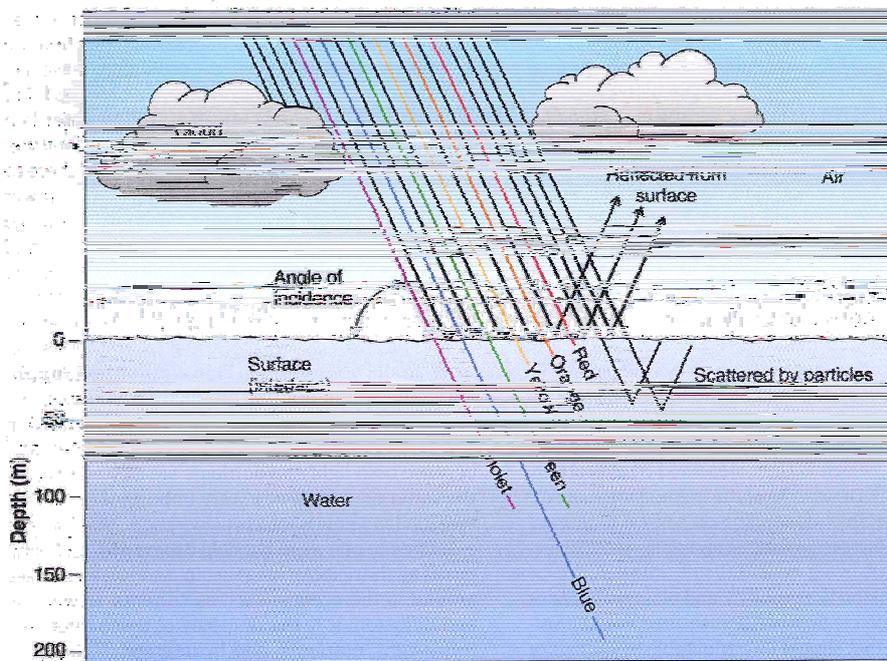


Figure VI-2 : Pénétration de la lumière dans un océan suivant les longueurs d'onde, in Nybakken (2001).

Etroitement couplée à cette notion d'intensité lumineuse qui varie avec la profondeur, l'angle d'incidence et le type de milieu, la qualité de la lumière a une influence notable dans le milieu marin. La lumière blanche qui arrive à la surface de l'eau est composée de radiations de différentes longueurs d'ondes, dont celles appartenant au spectre visible (majoritairement utilisé par le phytoplancton) entre 400 et 700 nm, les ultraviolets (< 400 nm) et les infrarouges (> 700 nm) qui pénètrent différemment dans la colonne d'eau (Figure VI-2). Suivant le type d'océan ou de mer (Figure VI-1) la pénétration des différentes longueurs d'ondes les

radiations rouges sont arrêtées dès les premiers mètres de la colonne d'eau, tandis que les bleues et les vertes pénètrent plus profondément. Comme pour l'intensité lumineuse, les organismes phytoplanctoniques présenteront des capacités d'adaptation plus ou moins grandes à ces différentes longueurs d'ondes notamment suivant leur composition pigmentaire. Ils pourraient réagir aux longueurs d'ondes de leur habitat par une modification de la qualité de leurs pigments et / ou de leur quantité.

La variation de ces deux paramètres, intensité et qualité de la lumière, influence vraisemblablement l'écologie des coccolithophores. Il a donc semblé intéressant d'étudier le comportement des deux phases de quelques espèces pour confirmer ou infirmer le cycle écologique hypothétique présenté dans le chapitre V. Quatre espèces ont été plus particulièrement étudiées à cet égard, *Emiliana huxleyi*, *Coccolithus pelagicus*, *Coronosphaera mediterranea* et *Calcidiscus leptoporus*. Dans un premier temps, l'influence de l'intensité lumineuse sur ces espèces, chacune sous leurs deux phases sera analysée, puis celle de la qualité de la lumière.

II. MATERIELS ET METHODES

Dans tous les expériences suivantes, les différentes espèces de coccolithophores sont cultivées séparément sous leur deux phases, haploïde et diploïde. Elles ont toutes été cultivées dans des conditions standards : une photopériode de 16 :8, à une température constante de 17°C, dans des armoires thermostatées, dans du milieu K/2 (milieu Keller dilué deux fois, voir matériel et méthodes Chapitre V) .Les cultures sont toutes réalisées en triplicats et les taux de croissance sont mesurés au jour 5 (milieu de la phase exponentielle de croissance en K/2 et lumière du jour). Les taux de croissance sont calculés selon la formule présenté dans le Chapitre V.

Pour chacune des conditions testées, les algues sont acclimatées pendant 3 à 4 repiquages (Brand, 1982) avant l'expérience proprement dite.

La concentration cellulaire est obtenue par mesure de la chlorophylle a *in vivo* par fluorimétrie (fluorimètre Turner Design 700) calibrée par le biais de comptages sur cellules de Malassez où de Sedgwick-Rafter suivant la taille des espèces. Les cultures sont observées tous les jours afin de noter tout changement de phase.

1. Quantité de la lumière

Les cultures sont réalisées dans des flacons de type Iwaki et placées dans des enceintes fermées sur les cotés et au fond afin de limiter tout apport non désiré de lumière (Figure VI-3). Sur le dessus de chaque boîte un filtre n'altérant pas le spectre lumineux est collé, filtrant respectivement 60% ($14 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 30% ($25 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et 0% ($35 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de l'intensité lumineuse. La densité des microalgues est évaluée régulièrement (tous les deux jours) pendant la période d'acclimatation puis tous les jours durant l'expérience proprement dite.

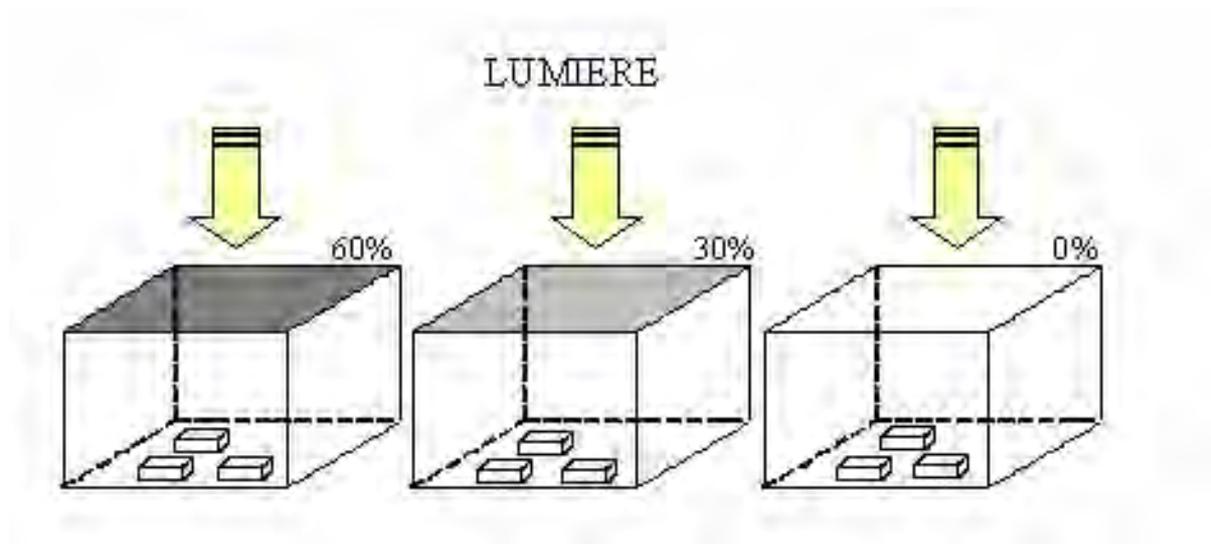


Figure VI-3 : Montage expérimental pour l'étude sur la quantité de lumière.

Deux coccolithophores sont testées avec ce dispositif *Emiliana huxleyi* et *Coccolithus pelagicus*, chacune sous les phases haploïde et diploïde. *Calcidiscus leptoporus* est cultivée dans des conditions similaires avec seulement des variations du point de vue de l'intensité lumineuse ($14 \mu\text{M}$ pour la faible lumière et de $25 \mu\text{M}$ pour la plus forte).

2. Phototactisme

Plusieurs espèces ont été testées quant à leur capacité de phototactisme. Le stade flagellé de *Coccolithus braarudii*, de *Calcidiscus leptoporus*, d'*Emiliana huxleyi* mais également les deux phases flagellées (haploïde et diploïde) de *Coronosphaera mediterranea*. Les cultures ont été réalisées en erlenmeyers de 150 mL et avec un éclairage de $25 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lorsque les cultures des flacons ont atteint un stade de croissance où la

concentration cellulaire est élevée (coloration nettement visible), elles sont placées dans des boîtes de Pétri obturées différemment selon les cas (Figure VI-4). La source lumineuse est placée au dessus des cultures. Après une demi-journée de latence, les boîtes de Pétri sont observées rapidement sous loupe binoculaire et la répartition des cellules dans chacune des boîtes est notée.

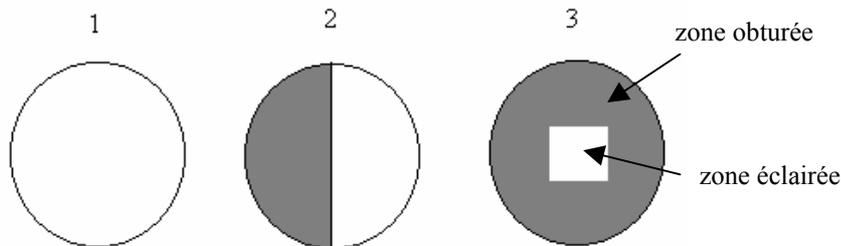


Figure VI-4 : Représentation schématique de l'obturation des boîtes de Pétri lors de l'expérience sur le phototactisme.

3. Qualité de la lumière

L'intensité lumineuse est la même pour toutes les cultures (autour de $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Comme pour l'expérience précédente, les algues sont cultivées en flacons Iwaki dans des boîtes dont les cotés et le fond sont opaques, la lumière n'accédant que par le dessus (Figure VI-5). Au dessus de cette ouverture différents filtres sont collés de façon à obtenir des lumières à dominance bleue, verte et de type lumière du jour (spectre des filtres en annexe 4).

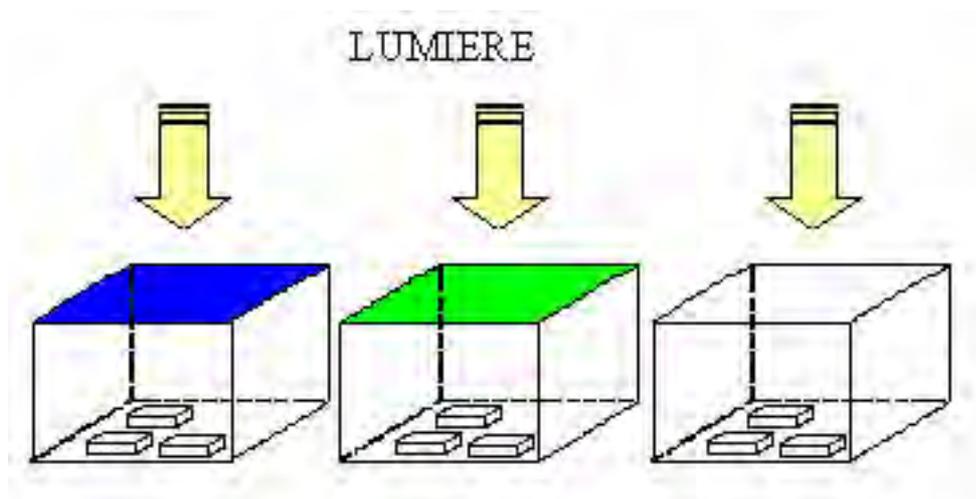


Figure VI-5 : Montage expérimental pour l'étude sur la qualité de la lumière avec trois conditions lumineuses différentes (lumières bleues, vertes et lumière du jour).

Les deux espèces étudiées, *Emiliana huxleyi* et *Coccolithus pelagicus*, sont acclimatées pendant trois ou quatre repiquages comme dans l'expérience sur la qualité de la lumière avant l'expérience finale durant laquelle la concentration cellulaire est mesurée tous les jours.

Au milieu de la phase exponentielle de croissance (cinquième jour pour les lumière bleues et de type lumière du jour, septième pour la lumière verte), 5ml de chaque culture d'*E. huxleyi* (phases haploïde et diploïde) sont filtrées sur des filtres GF-C (Whatmann) et congelés à -20°C afin de réaliser une analyse quantitative et qualitative des pigments.

4. Etude qualitative et quantitative des pigments

Cette étude est menée en collaboration avec Kees Van Lenning (Institut de Ciències del Mar, Barcelone, Espagne) pour l'extraction et la caractérisation des pigments.

a) *Emiliana huxleyi*

Les filtres collectés durant l'expérience sur la qualité de la lumière sont immergés dans 3 mL d'HPLC-grade acetone SDS à 90% (Peypin, France) et conservés 24h à -10°C pour une extraction passive des pigments. L'extraction finale est obtenue par une homogénéisation des cellules au froid pendant 5 min suivie d'une phase de centrifugation (15 min à 5°C) afin de culotter les débris organiques et ceux du filtre. Le surnageant est collecté par fraction de 1mL qui sont transférés dans des flacons d'injection, conservées à 5°C et diluées par l'addition de 0,2 mL d'eau (eau Milli-Q, Waters S.A., Molsheim, France) juste avant l'injection de chaque échantillon dans l'HPLC (pour plus de détails se référer à Van Lenning *et al.*, 2003a). Les analyses de pigments sont réalisées avec un chromatographe Thermo Separation Products (actuellement Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) comprenant un module d'injection de solvant P2000, un détecteur d'UV UV3000, un détecteur de fluorescence FL2000, un contrôleur SN4000 et un auto-injecteur d'échantillon réfrigérant de type A/S-3000 (5°C). La méthode utilisée est basée sur celle de Zapata *et al.*, 2000 modifiée par Van Lenning *et al.* (2003) spécifiquement pour les haptophytes. Les deux éluants utilisés sont : 1. un mélange 50 :25 :50 de méthanol-acétonitrile-solution aqueuse (0,25 M de pyridine ajustée à un pH de 5.0 avec de l'acide acétique) 2. un mélange 60 :20 :20 d'acétonitrile-méthanol-acétone. Le gradient de solvant (étapes linéaires à un flux de 1 mL min⁻¹) est programmé de la façon suivante : 0 min 0%, 10-23 min 23%, 25 min 32%, 35 min 40%, 38 min 75%, 46 min 85%, 48-55 min 100%, 57 min 0%. La phase stationnaire utilisée est une colonne (150 x 4,6 mm de

diamètre interne., particules de taille 3µm) C₈ Symmetry (Waters, Milford, USA), protégée par une colonne contenant la même phase stationnaire et maintenue à 25°C.

Pour l'analyse quantitative, le détecteur d'UV est programmé pour collecter les données à une longueur d'onde de 440 nm. L'identité des pics pour chaque échantillon est évaluée pendant un second passage en utilisant le mode scanner (400-750 nm, résolution de 1 nm) du détecteur. Les caractéristiques d'absorbance de l'éluant, collectés près de chaque pic, sont soustraits des données de spectre obtenues à chaque pic maximal correspondant. Les temps de rétention et les caractéristiques d'absorbance de chaque pic sont comparés avec ceux de standards fournis par DHI (Hørsholm, Danemark) et avec des chromatographies d'algues dont les compositions pigmentaires sont bien connues (Zapata *et al.*, 2000).

b) *Coccolithus braarudii*

Pour cette espèce, le même protocole que pour *Emiliana huxleyi* est appliqué sur des filtres provenant de cultures en phase exponentielle de phase haploïde et diploïde cultivées dans les mêmes conditions environnementales standards (lumière du jour avec une intensité lumineuse de 25µmol photons m⁻² s⁻¹, photopériode de 16 :8, dans du K/2, en triplicat).

III. RESULTATS

Dans tous les graphiques suivants, les données concernant la phase haploïde de chaque espèce (N) sont en bleu et ceux concernant la phase diploïde (2N) en rouge. La présence d'une astérisque signale les cultures où des changements de phase ont été observés.

1. Influence de l'intensité lumineuse

a) *Coccolithus braarudii*

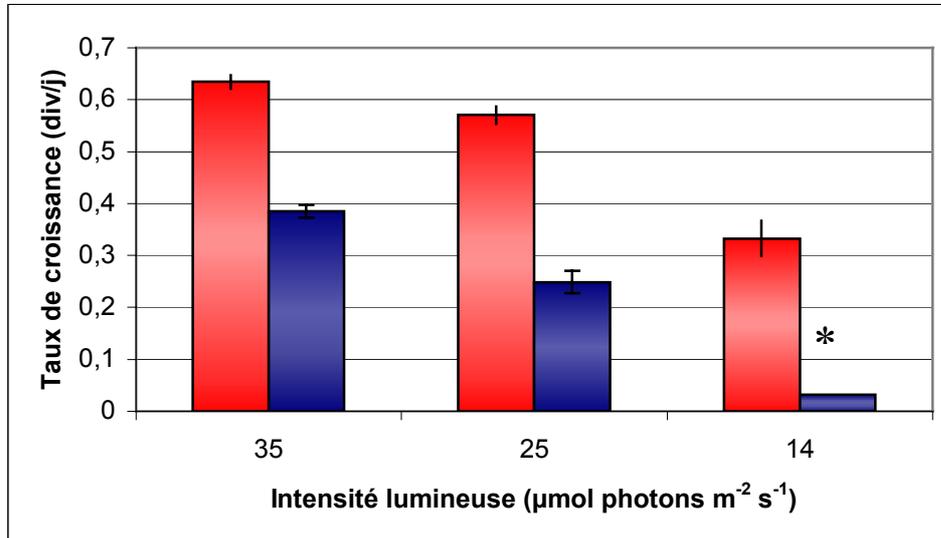


Figure VI-6: Taux de croissance de *Coccolithus braarudii*, phase diploïde (en rouge) et haploïde (en bleu), dans différentes conditions d'intensité lumineuse : 35, 24,5 et 14 μmol de photons par m^{-2} et s^{-1} .

Coccolithus braarudii est un espèce qui pousse dans les trois conditions lumineuses testées ici. Les deux phases ont un taux de croissance maximal sous l'intensité lumineuse la plus forte (Figure VI-6), la phase diploïde étant toutefois plus performante. Dans les conditions lumineuses les plus faibles, la phase haploïde est nettement plus inhibée que la phase diploïde (voir Tableau VI-1). De plus, dans ces conditions de faible lumière, la phase haploïde présente de nombreux changements de phase vers celle diploïde (jusqu'à 50% de la culture en une journée).

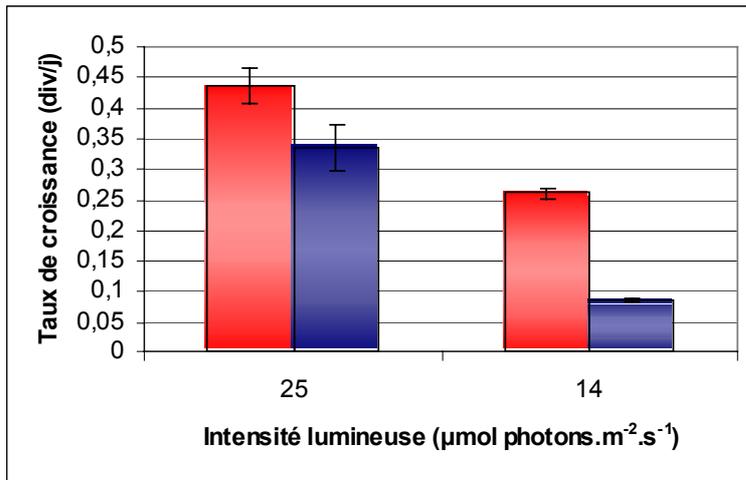
b) *Calcidiscus leptoporus*

Figure VI-7 : Taux de croissance de *Calcidiscus leptoporus*, phase diploïde (en rouge) et haploïde (en bleu), dans différentes conditions d'intensité lumineuse.

Les taux de croissance pour *Calcidiscus leptoporus* sont très variables en fonction de l'intensité lumineuse disponible, que ce soit pour la phase haploïde ou diploïde (Figure VI-7). Leur taux de croissance augmente avec l'intensité lumineuse dans les conditions expérimentales testées. Toutefois, la phase diploïde a un taux de croissance minoré de 40% à $14 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la plus faible intensité lumineuse par rapport à la plus forte testée, tandis que celui de la phase haploïde diminue de 74% (Tableau VI-1).

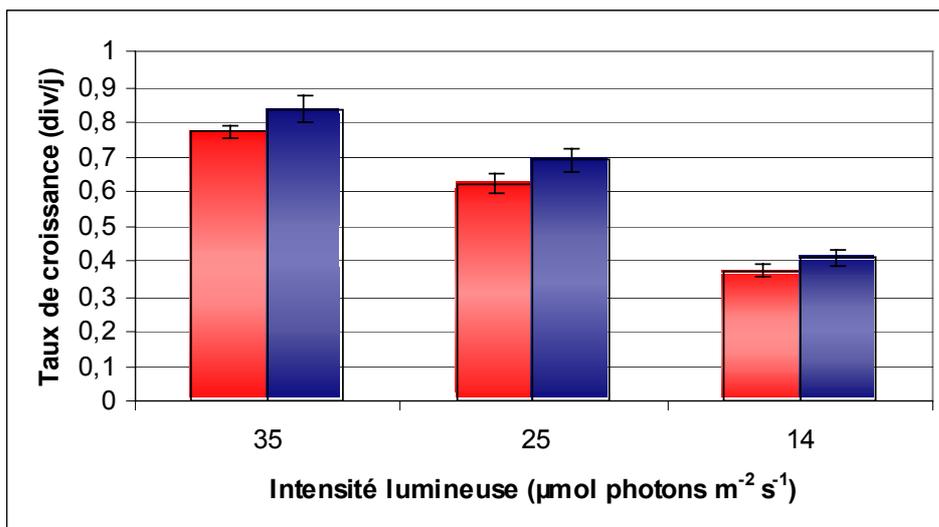
c) *Emiliana huxleyi*

Figure VI-8 : Taux de croissance de *Emiliana huxleyi*, phase diploïde (en rouge) et haploïde (en bleu), dans différentes conditions d'intensité lumineuse.

Les deux phases d'*Emiliana huxleyi* présentent des taux de croissance très similaires, non différents statistiquement ($p > 0,05$) pour chacune des intensités lumineuses testées (Figure

VI-8). Leur taux de croissance est maximal dans les conditions de plus forte intensité lumineuse ($35 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et il diminue de moitié environ dans les conditions de luminosité les plus faibles (Tableau VI-1).

Tableau VI-1 : Pourcentages d'inhibition des taux de croissance de trois coccolithophores par rapport au taux de croissance à la plus forte intensité lumineuse ($35 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Intensité lumineuse ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Phase haploïde		Phase diploïde	
	25	14	25-	14
<i>Coccolithus braarudii</i>	$28\% \pm 6,5\%$	$92\% \pm 1\%$	$10\% \pm 4,5\%$	$47\% \pm 6,4\%$
<i>Calcidiscus leptoporus</i>	-	$74\% \pm 4,2\%$	-	$40\% \pm 2,3\%$
<i>Emiliana huxleyi</i>	$14\% \pm 5,5\%$	$46\% \pm 4,8\%$	$19\% \pm 3,5\%$	$52\% \pm 3\%$

2. Phototactisme

Les résultats obtenus avec les différentes espèces testées du point de vue du phototactisme sont rassemblés dans le Tableau VI-2.

Tableau VI-2 : Réaction phototactisme des différentes coccolithophores étudiées.

Espèces	Réaction phototropique
<i>Calcidiscus leptoporus</i> (N)	
<i>Coccolithus braarudii</i> (N)	+
<i>Coronosphaera mediterranea</i> (2N)	+
<i>Coronosphaera mediterranea</i> (N)	+
<i>Emiliana huxleyi</i> (N)	

Les deux phases de *Coronosphaera mediterranea* et la phase flagellée de *Coccolithus braarudii* présentent un phototactisme positif, elles sont attirées par la lumière et donc retrouvées préférentiellement dans les zones non-obturées des boîtes de Pétri. A l'inverse, les phases flagellées de *Calcidiscus leptoporus* et d'*Emiliana huxleyi* ne présentent aucune attirance particulière vis à vis de la source lumineuse, les cellules sont réparties uniformément dans les boîtes de Pétri, les obturations n'influent en aucune façon leur comportement. Il est intéressant de noter que le comportement des différentes espèces se retrouve lors des cultures de routine, les cellules flagellées de *C. mediterranea* et de *C. braarudii* étant le plus souvent concentrées le long de la paroi la plus proche de la source lumineuse.

3. Influence de la qualité de la lumière

a) *Coccolithus braarudii*

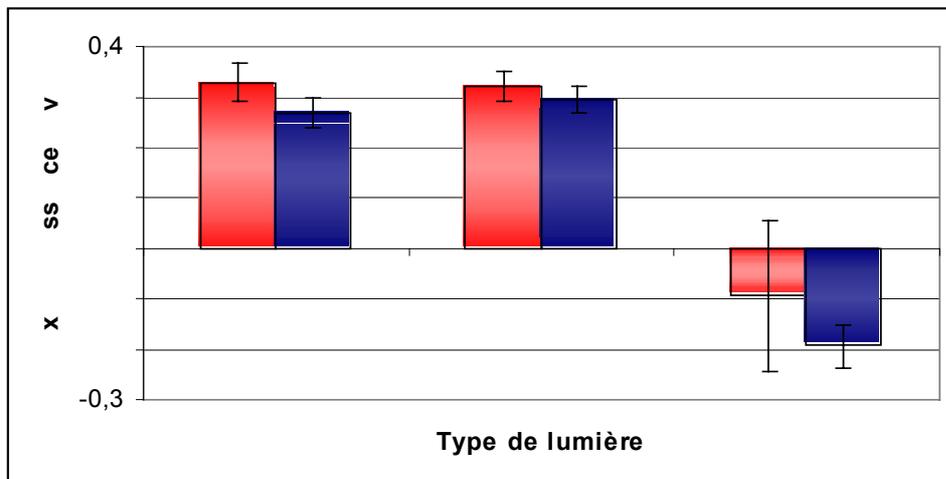


Figure VI-9 : Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de la qualité de la lumière (LJ : lumière du jour ; B : lumière bleue ; V : lumière verte). La phase diploïde est en rouge et la phase haploïde en bleu.

Les deux phases de *Coccolithus braarudii* présentent une grande similarité de comportement face aux différentes lumières testées (Figure VI-9). Ainsi, pour les deux stades, il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre la lumière du jour et la lumière bleue. En lumière verte, les deux phases présentent le même comportement, avec une absence de croissance.

b) *Emiliana huxleyi*

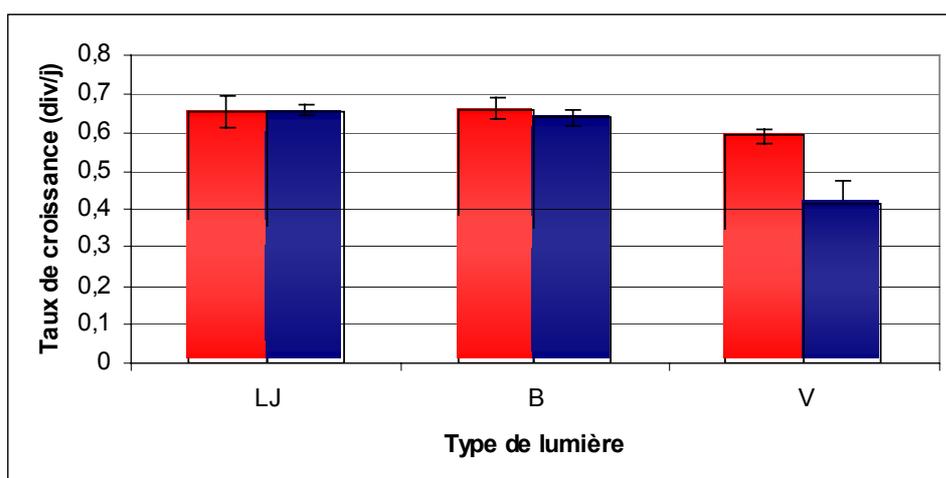


Figure VI-10 : Taux de croissance de *Emiliana huxleyi* en fonction de la qualité de la lumière (LJ : lumière du jour ; B : lumière bleue ; V : lumière verte). La phase diploïde est en rouge et la phase haploïde en bleu.

Comme pour *Coccolithus braarudii*, les deux phases d'*Emiliana huxleyi* ne présentent aucune différence de leur taux de croissance en lumière du jour et en lumière bleue (Figure

VI-10). En lumière verte, le comportement de cette espèce diffère, mais contrairement à *C. braarudii*, une croissance est maintenue. Elle est toutefois plus faible pour les deux phases. Les deux phases présentent également des taux de croissance différents en lumière verte (autour de 0,4 divisions par jour pour la phase haploïde contre 0,6 pour la diploïde).

4. Composition pigmentaire

a) *Coccolithus braarudii*

Dans le Tableau VI-3 sont rassemblés les principaux pigments obtenus par HPLC, pour la phase haploïde (N) et diploïde (2N) de cette espèce cultivée en lumière du jour. Les quantités relatives de chaque pigment par rapport à la quantité de chlorophylle *a* sont également indiquées. La phase diploïde en phase exponentielle contient environ $0,0021 \pm 0,0001$ ng de chlorophylle *a* par cellule tandis que la phase haploïde contient environ deux fois moins de chlorophylle *a* avec environ $0,0011 \pm 0,0002$ ng de chlorophylle *a* par cellule.

Tableau VI-3 : Principaux pigments des deux phases de *Coccolithus braarudii* en lumière du jour et concentration relative par rapport à la chlorophylle *a*.

Pigments	2N	N
Divinyl chlorophylle c3 (DV-Chl c3)	0,178 ± 0,014	0,207 ± 0,013
Monovinyl chlorophylle c3 (MV-Chl c3)	0,055 ± 0,016	0,014 ± 0,004
Chlorophyllide <i>a</i> (Chlide <i>a</i>)	0,037 ± 0,004	0,006 ± 0,002
Mg-divinyl-phytoporphyrine (MgDVP)	0,013 ± 0,003	0,007 ± 0,00
Chlorophylle c2 (Chl c2)	0,198 ± 0,007	0,165 ± 0,012
chlorophylle c1 (Chl c1)	0,049 ± 0,003	0,037 ± 0,002
19'-Butanoyloxyfucoxanthine (BFx)	0,011 ± 0,008	0,013 ± 0,001
Fucoxanthine (Fx)	1,096 ± 0,138	0,945 ± 0,076
4-kéto-19'-hexanoyloxyfucoxanthine (4-KetoHFx)	0,079 ± 0,008	0,089 ± 0,005
Violaxanthine (Vx)	0,001 ± 0,002	0,010 ± 0,002
19'-hexanoyloxyfucoxanthine (HFx)	0,086 ± 0,011	0,081 ± 0,008
Diadinoxanthine (Ddx)	0,107 ± 0,017	0,110 ± 0,010
Diatinoxanthine (Dtx)	0,006 ± 0,001	0,023 ± 0,004
Inconnu type zéaxanthine (Unk-2)	0,072 ± 0,022	0,005 ± 0,000
α-carotène (α-car)	0,034 ± 0,004	0,047 ± 0,005
β-carotène (β-car)	0,029 ± 0,004	0,028 ± 0,002

Afin de faciliter la comparaison entre les deux phases, une représentation graphique sous forme d'histogrammes est présentée en Figure VI-10.

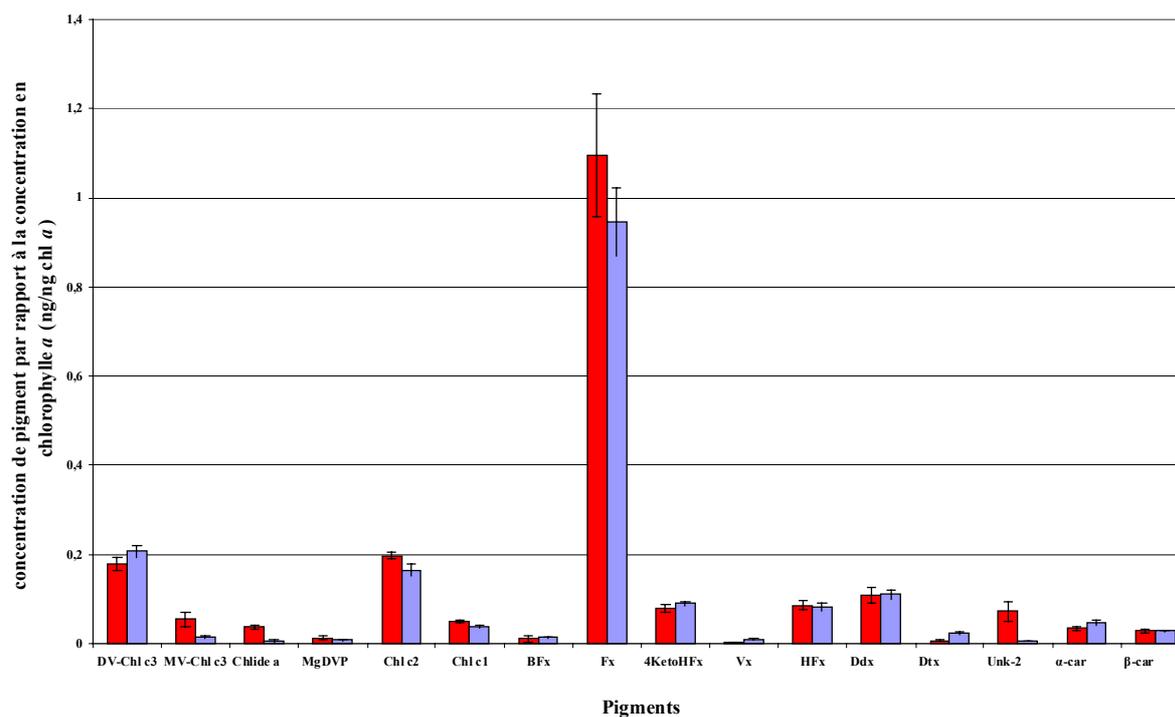


Figure VI-11 : Concentrations relatives des principaux pigments de *Coccothius braarudii* par rapport à chlorophylle *a*, selon la phase du cycle (diploïde en rouge et haploïde en bleu).

Des différences quantitatives apparaissent entre les deux phases du point de vue composition pigmentaire, les deux phases présentant par ailleurs exactement les mêmes pigments. Toutefois, la quantité de certains d'entre eux par rapport à celle de chlorophylle *a* varie suivant la phase, ces variations ne sont toutefois pas significatives statistiquement, ce ne sont que des tendances. Ainsi la phase haploïde possède relativement plus de la forme divinyl de la chlorophylle *c3*, et davantage de certains caroténoïdes notamment violaxanthine, diatoxanthine et α -carotène, que la phase diploïde (Tableau VI-3 et Fig VI-11). Cette dernière présente quant à elle une quantité relativement plus importante de la forme monvinyl de la chlorophylle *c3*, de chlorophylles *c2* et *c1* ainsi que de chlorophyllide *a*, le pigment inconnu, type zéaxanthine, est également plus abondant (Tableau VI-3 et Fig VI-11).

b) *Emiliana huxleyi*

La phase diploïde d'*Emiliana huxleyi* contient autour de $4 \cdot 10^{-5}$ ng/cellule de chlorophylle *a* en phase exponentielle et en lumière du jour ainsi qu'en lumière bleue (la différence entre la lumière du jour et la lumière bleue n'est pas significative) contre $6 \cdot 10^{-5}$ ng/cellule en lumière verte (Tableau VI-4). Concernant la phase haploïde, une différence apparaît entre les trois éclairagements, avec une concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ ng/cellule en lumière bleue, plus de $5 \cdot 10^{-5}$ ng/cellule en lumière du jour et plus de $7 \cdot 10^{-5}$ ng/cellule en lumière verte.

La différence de quantité de chlorophylle *a* entre les deux phases est variable avec une plus grande quantité en lumière du jour et en lumière verte pour la phase haploïde par rapport à la phase diploïde. En lumière bleue, la différence est moins nette avec une concentration légèrement supérieure de chlorophylle *a* pour la phase diploïde.

Tableau VI-4 : Concentration (ng/cellule) en chlorophylle *a* en fonction du type de lumière et de la phase d'*Emiliana huxleyi* ; LJ : lumière du jour ; B : lumière bleue ; V : lumière verte.

	2N ($\times 10^{-5}$)	N ($\times 10^{-5}$)
LJ	4,27 \pm 0,40	5,85 \pm 0,21
B	3,70 \pm 0,37	3,06 \pm 0,39
V	6,01 \pm 0,31	7,35 \pm 0,49

Comme pour *Coccolithus braarudii*, les principaux pigments obtenus par HPLC sont présentés dans le Tableau VI-5 pour la phase haploïde (N) et diploïde (2N). Là encore, les quantités relatives de chaque pigment par rapport à la quantité de chlorophylle *a* sont reportées.

Tableau VI-5 : Principaux pigments des deux phases d'*Emiliana huxleyi* et concentrations relatives par rapport à la chlorophylle *a* en fonction de différents éclairagements.

Pigments	Lumière verte		Lumière bleue		Lumière du jour	
	2N	N	2N	N	2N	N
DV-Chl <i>c3</i>	0,220 \pm 0,020	0,180 \pm 0,010	0,170 \pm 0,010	0,222 \pm 0,019	0,191 \pm 0,023	0,196 \pm 0,006
MV-Chl <i>c3</i>	0,050 \pm 0,010	0,050 \pm 0,010	0,056 \pm 0,015	0,073 \pm 0,019	0,060 \pm 0,013	0,065 \pm 0,014
Chlide <i>a</i>	0,010 \pm 0,010	0,010 \pm 0,000	0,019 \pm 0,019	0,008 \pm 0,013	0,007 \pm 0,013	0,000 \pm 0,000
MgDVP	0,010 \pm 0,000	0,010 \pm 0,000	0,011 \pm 0,000	0,013 \pm 0,006	0,017 \pm 0,006	0,019 \pm 0,005
Chl <i>c2</i>	0,240 \pm 0,010	0,300 \pm 0,010	0,260 \pm 0,005	0,378 \pm 0,037	0,280 \pm 0,019	0,332 \pm 0,005
Fx	0,490 \pm 0,020	0,510 \pm 0,010	0,019 \pm 0,016	0,043 \pm 0,019	0,067 \pm 0,027	0,203 \pm 0,072
BFx	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,003 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00
4KetoHFx	0,110 \pm 0,000	0,120 \pm 0,010	0,020 \pm 0,004	0,058 \pm 0,012	0,052 \pm 0,008	0,082 \pm 0,015
HFx	0,280 \pm 0,020	0,270 \pm 0,010	1,074 \pm 0,058	1,182 \pm 0,063	1,017 \pm 0,050	0,862 \pm 0,094
Ddx	0,020 \pm 0,000	0,020 \pm 0,000	0,027 \pm 0,012	0,007 \pm 0,006	0,000 \pm 0,000	0,009 \pm 0,015
Dtx	0,020 \pm 0,000	0,010 \pm 0,000	0,020 \pm 0,003	0,013 \pm 0,006	0,028 \pm 0,010	0,018 \pm 0,004
Unk-2	0,060 \pm 0,030	0,150 \pm 0,050	0,474 \pm 0,124	0,248 \pm 0,065	0,282 \pm 0,382	0,298 \pm 0,167

Les deux phases d'*Emiliana huxleyi* ne présentent aucune différence quant aux nombres de pigments majoritaires révélés par HPLC (Tableau VI-5 et Figure VI-12). Toutefois la concentration relative par rapport à la quantité de chlorophylle *a* peut varier pour certains pigments avec la ploïdie. Ainsi, la chlorophylle *c2*, la fucoxanthine et la 4-19'-kétotetrahydroxyfucoxanthine sont plus abondantes, toujours par rapport à la chlorophylle *a*, chez la phase haploïde, tandis que la concentration de 19'-hexanoyloxyfucoxanthine est plus élevée chez la phase diploïde. Toutefois, il ne s'agit que de tendance, ces résultats n'étant pas

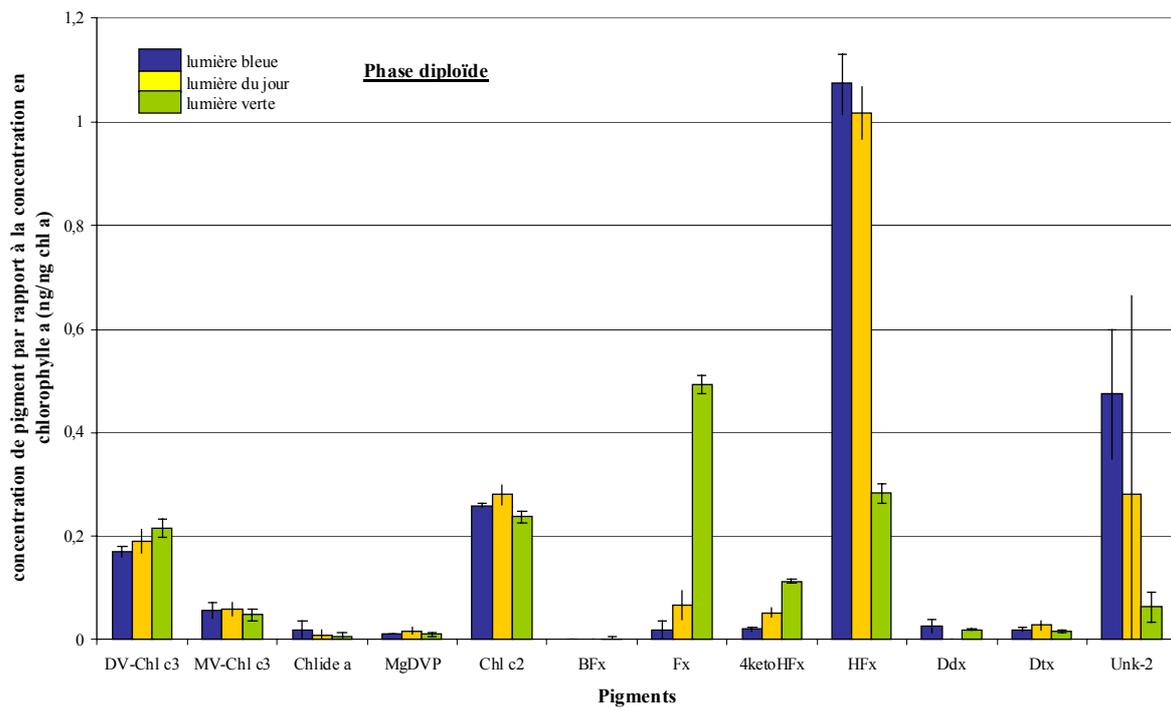


Figure VI-13 : Concentrations relatives par rapport à la chlorophylle *a* des principaux pigments d'*Emiliana huxleyi*, phase diploïde, en fonction de différents éclairagements.

significatifs statistiquement. En lumière bleue, la phase haploïde voit sa concentration relative de 19'-hexanoyloxyfucoxanthine augmentée et être plus élevée que pour la phase diploïde ; de plus, le pigment inconnu de type zéaxanthine présente lui aussi une augmentation de sa concentration en lumière bleue mais uniquement chez la phase diploïde. En lumière verte, les différences de concentration de pigment entre les deux phases se nivellent, seule persiste la plus forte concentration relative de la chlorophylle *c2* chez la phase haploïde ; d'autre part la situation s'inverse par rapport à la lumière bleue pour le pigment type zéaxanthine qui devient plus concentré chez la phase haploïde.

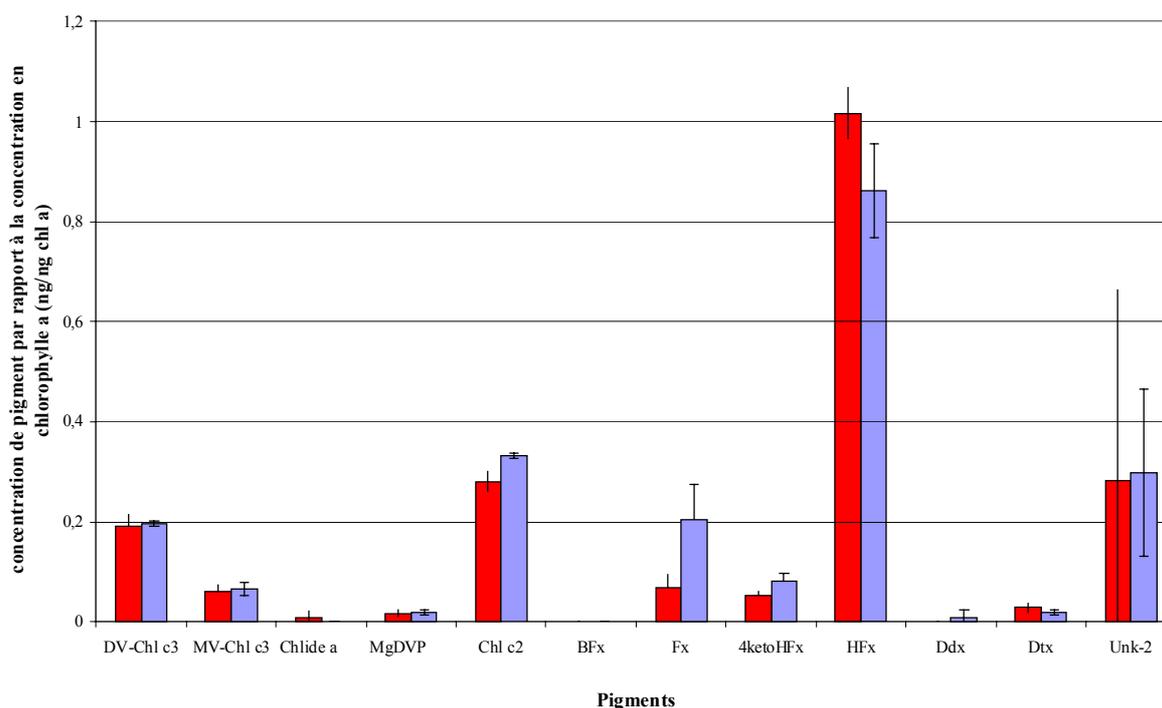


Figure VI-12 : Concentrations relatives des principaux pigments d'*Emiliana huxleyi* par rapport à la chlorophylle *a* en lumière du jour, selon la phase du cycle (haploïde en bleu et diploïde en rouge).

En comparant pour une même phase, les concentrations de pigments relativisées par rapport à la chlorophylle *a*, quelques tendances nettes se dégagent. Tout d'abord pour la phase diploïde (Figure VI-13), de forts changements apparaissent pour le couple fucoxanthine/19'-hexanoyloxyfucoxanthine. En lumière du jour et en lumière bleue, le 19'-hexanoyloxyfucoxanthine apparaît comme étant le caroténoïde majoritaire, tandis qu'en lumière verte il est remplacé par la fucoxanthine.. Le pigment inconnu de type zéaxanthine présente lui aussi des variations étranges mais les écart types étant forts, elles sont difficiles à interpréter. Concernant les autres pigments, des variations légères sont visibles mais, elles sont rarement significatives. En lumières bleue et verte, de la diadinoxanthine apparaît,

pigment non présent en lumière du jour. De plus, en lumière verte, de la 19'-butanoyloxyfucoxanthine apparaît également.

La phase haploïde présente les mêmes grandes tendances que la phase diploïde du point de vue de la composition pigmentaire selon le type de lumière (Figure VI-14) : même évolution pour le couple fucoxanthine / 19'-hexanoyloxyfucoxanthine et pour la 4-kéto-19'-hexanoyloxyfucoxanthine, variation de la quantité du pigment de type zéaxanthine. La phase haploïde présente également des variations au niveau de la chlorophylle *c2* (moins concentrée en lumière verte qu'en lumière du jour et en lumière bleue, toujours relativement à la quantité de chlorophylle *a*). Elle présente une quantité voisine de diadinoxanthine sous tous les éclairagements et une absence totale de 19'-butanoyloxyfucoxanthine quelle que soit la lumière.

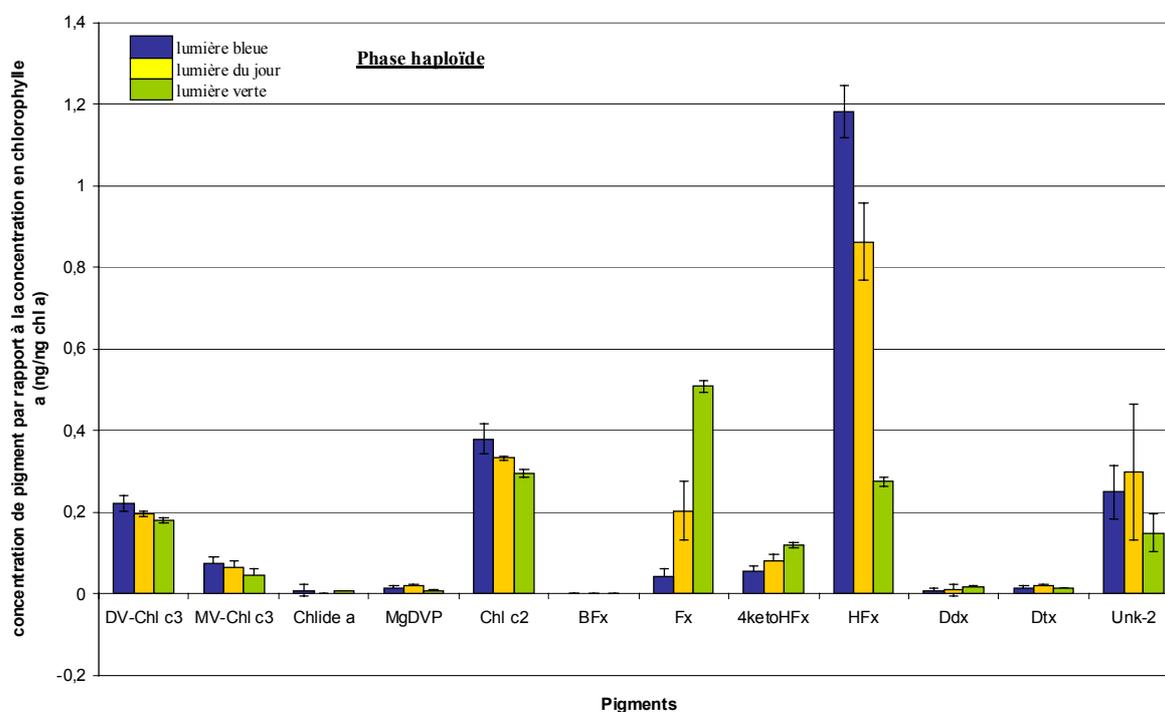


Figure VI-14 : Concentrations relatives par rapport à la chlorophylle *a* des principaux pigments d'*Emiliana huxleyi* phase haploïde en fonction des différents éclairagements.

IV. DISCUSSION

La lumière constitue pour les organismes photosynthétiques un facteur clé de leur réussite écologique, tant par sa qualité (longueur d'onde) que par sa quantité (intensité lumineuse) et sa périodicité (photopériode). Dans un premier temps l'influence de la quantité de la lumière sur différentes espèces de coccolithophores a été analysée, notamment en lien avec leur cycle de vie. Parmi les trois espèces étudiées, *Coccolithus braarudii* et *Calcidiscus leptoporus* présentent un cycle haplo-diplophasique hétéromorphe, avec alternance entre cellules à hétérococcolithes et à holococcolithes, (voir Chapitres III et IV). Ces deux espèces présentent des comportements tout à fait similaires vis-à-vis de la quantité de lumière. Ainsi dans ces deux cas, la phase diploïde apparaît comme étant nettement plus compétitive en faible lumière que la phase haploïde, d'un point de vue des taux de croissance (Figures VI-6 et VI-7). Ceci est largement corroboré par le fait que chez *C. braarudii*, des changements de phase de la phase haploïde à la phase diploïde ont été constatés à plusieurs reprises en conditions de faible lumière ($14 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tandis que dans les autres conditions lumineuses aucun changement dans un sens ou dans l'autre n'est détectable. Les résultats obtenus ici correspondent à ceux obtenus pour *Coccolithus pelagicus* par Rowson (1986), avec la phase haploïde plus compétitive dans des conditions de forte intensité lumineuse. Pour des faibles intensités lumineuses, les deux phases ont des taux de croissance très similaires. Elles présentent le même optimum de lumière (voir Figure VI-15).

La phase diploïde de *Coccolithus braarudii* apparaît donc comme étant plus apte à survivre à de faibles irradiances par rapport à la phase haploïde. Cet argument, ajouté à ceux fournis dans le chapitre V sur la turbulence (phase diploïde résistant mieux à la turbulence), la température (optimum plus élevé pour la phase haploïde) et la nutrition (comportement plus oligotrophique de la part de la phase haploïde), vient renforcer l'hypothèse de deux niches écologiques différentes dans la colonne d'eau pour chacune des phases. Une de ces niches serait en surface ou dans la partie supérieure de la colonne d'eau (pour la phase haploïde flagellée) et l'autre serait plus en profondeur (phase diploïde non mobile, plus compétitive dans ces conditions).

Un autre argument joue en faveur de cette hypothèse, le phototactisme. En effet, un phototactisme positif a été montré chez plusieurs stades flagellés, dont la phase haploïde de

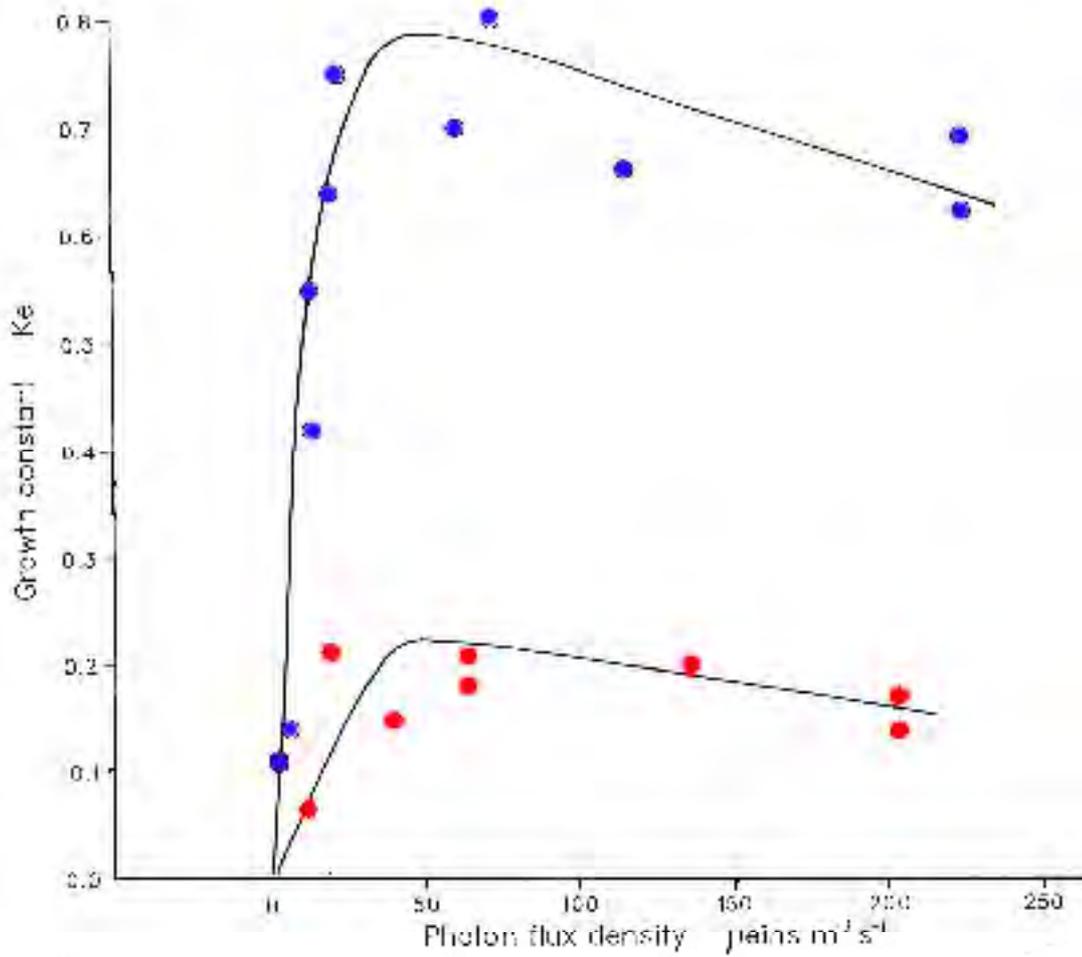


Figure VI-15 : Taux de croissance de *Coccolithus pelagicus* en fonction du flux de photons ou intensité lumineuse, phase haploïde en bleu, phase diploïde en rouge, d'après Rowson (1986).

Coccolithus braarudii et les deux phases de *Coronosphaera mediterranea* bien que ces espèces soient dépourvues de stigma (zone photosensible du chloroplaste) comme toutes les coccolithophores. Il paraît clair que, dans la colonne d'eau, ce tactisme va entraîner une attirance de ces phases mobiles vers la zone de surface ou de sub-surface, plus éclairée. La phase haploïde de *Calcidiscus leptoporus* n'a pas montré de phototactisme, toutefois un thermotactisme positif (attirance par la chaleur) est soupçonné chez cette espèce (M. Geisen, communication personnelle), qui pourrait avoir la même signification écologique, le compartiment de surface étant généralement le plus chaud.

Ces phénomènes de phototactisme et de thermotactisme sont également à relier à la sédimentation. En effet, la phase diploïde, massive et non flagellée de *Coccolithus braarudii* et de *Calcidiscus leptoporus*, sédimente et peut atteindre des profondeurs assez importantes lors de conditions de turbulence faible (pas de remise en suspension) d'où un avantage à posséder une compétitivité importante en faible lumière. Toutefois, elle atteint à un moment donné une zone limite où elle se trouve en difficulté pour réaliser la photosynthèse : un changement de phase pourrait alors intervenir de la phase diploïde vers la phase haploïde du fait de son phototactisme, celle-ci pourrait alors remonter vers la surface, suivant le même principe que les migrations verticales de certains dinoflagellés. Les capacités hétérotrophiques (voir Chapitre V) de la phase haploïde pourraient, par ailleurs, avoir une importance non négligeable dans sa survie dans des zones où la photosynthèse est impossible, son phototactisme positif lui permettant par la suite de regagner des zones éclairées. Ce mécanisme pourrait expliquer la rencontre anecdotique de la phase à holococcolithes de *Coccolithus pelagicus* s. l. à des profondeurs importantes (Samtleben et Schröder, 1992).

L'influence de la qualité de la lumière a également été étudiée chez les deux phases de *Coccolithus braarudii*. Celles-ci présentent des taux de croissance similaires en longueurs d'ondes majoritairement bleues ou en lumière du jour, et aucune croissance n'a été constatée en lumière verte. Cette espèce paraît donc avoir une bonne capacité de photoadaptation aux lumières du jour (en surface) et bleues (en profondeur) lui permettant ainsi une survie possible en profondeur. Les deux phases du cycle ne présentant pas de comportements différents quant à la qualité de la lumière, l'intensité lumineuse pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'écologie de cette espèce. Des expériences croisées seraient malgré tout nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En lumière du jour, une étude qualitative et quantitative a été réalisée des pigments des deux phases de *Coccolithus braarudii*. Elles montrent que des différences quantitatives

minimes concernant surtout les pigments minoritaires. Toutefois, celles-ci peuvent expliquer les différences de taux de croissance entre les deux phases pour une même intensité lumineuse. Les pigments trouvés chez les deux phases de *C. braarudii* correspondent à ceux précédemment détectés par Van Lenning *et al.* (2003b) chez 3 souches phases diploïdes de *C. braarudii*. L'étude des pigments révèle une différence entre *C. braarudii* et *Coccolithus pelagicus*, cette dernière ne possédant pas de chlorophylle *c1* (Van Lenning *et al.*, 2003b). Ces mêmes auteurs comparent également les deux phases d'une souche de *C. braarudii* différente que celle étudiée ici, et montrent là aussi une absence de différence qualitative quant aux différents types de pigments présents. Toutefois ces auteurs n'ont pas réalisé d'étude quantitative de ces pigments.

Dans ce cas présent, des expériences complémentaires, avec étude qualitative et quantitative des différents pigments, seraient nécessaires à différentes intensités lumineuses ou différentes longueurs d'ondes, afin de mieux appréhender les capacités de photoadaptation de ces deux phases de *Coccolithus braarudii*.

Concernant le facteur lumière, *Emiliania huxleyi* présente un comportement tout à fait particulier par rapport aux deux autres coccolithophores étudiées ici.

En condition de variations de l'intensité lumineuse, les deux phases répondent de la même façon, avec des taux de croissance similaires (respectivement autour de 0,8 , 0,65 et 0,4 divisions par jour à 35, 25 et 14 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ils diminuent d'environ de moitié entre l'intensité lumineuse la plus élevée et celle plus faible. Aucun changement de phase n'a été observé dans ces conditions. Les deux phases d'*Emiliania huxleyi* semblent donc capables de se développer dans les trois intensités lumineuses avec une nette préférence pour les « fortes » intensités (les intensités utilisées ici sont conditionnées par nos installations et sont moins fortes que dans le milieu naturel). Ce résultat correspond bien aux observations faites des conditions optimales d'efflorescence de cette espèce : dans une eau stratifiée et relativement chaude, en sub-surface le plus souvent (Nanninga et Tyrell, 1996 ; Tyrrel et Taylor, 1996). D'autres facteurs interviennent, comme sa spécificité pour certains nutriments (notamment le phosphate) et certainement un pré-conditionnement de la masse d'eau (voir Chapitre V ; Lampert, 2001 et Paasche, 2001), mais les conditions précédemment citées sont néanmoins nécessaires. Ces conditions ne sont réunies, surtout dans les zones tempérée et polaires (blooms les plus fréquents) que lors d'un temps particulièrement calme, avec une forte illumination des couches superficielles de la colonne d'eau qui permet la mise en place de la

thermocline. Ceci correspond au fait qu'*Emiliana huxleyi* (sous ses deux phases) soit plus compétitive en condition lumineuse élevée.

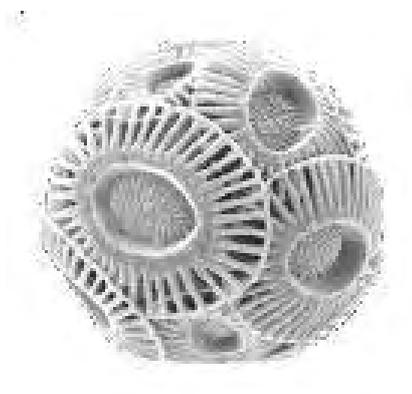
Les expériences réalisées sur le phototactisme n'ont pas permis de mettre en évidence une réaction quelconque de la phase haploïde et flagellée d'*Emiliana huxleyi* vis-à-vis de la direction de la source lumineuse. Cette espèce colonise, en général, tout l'environnement disponible sans être influencée par la proximité ou non de la lumière. Elle pourrait toutefois présenter comme *Calcidiscus leptoporus*, un thermotactisme positif, qui remplacerait le phototactisme présent chez d'autres coccolithophores. Mais l'absence totale d'information sur la répartition géographique de la phase haploïde d'*Emiliana huxleyi* qui peut être due à des problèmes d'échantillonnage et/ou de phase haploïde réduite en milieu naturel (voir Chapitre V), ne permet pas, à partir des données fournies par ces expériences, de préciser la zone préférentielle hypothétique de cette espèce dans la colonne d'eau. Dans le cas d'un rôle réduit en milieu naturel de la phase haploïde flagellée, avec une fonction essentiellement de gamètes, le phototactisme paraît avoir peu de raison d'être, et cette phase se retrouverait partout dans la colonne d'eau, en lien avec la répartition de la phase diploïde. L'absence de phototactisme pourrait également signifier que cette phase haploïde vit plutôt en profondeur, et les zones les plus échantillonnées étant superficielles, ceci pourrait expliquer le problème d'échantillonnage.

Les deux phases d'*Emiliana huxleyi* présentent sensiblement la même composition pigmentaire qualitative en lumière du jour, mais des variations quantitatives existent pour quelques un d'entre eux. Toutefois ces variations semblent trop minimes pour influencer le comportement des deux phases qui, en lumière du jour et dans les différentes conditions testées, est identique. Des variations de contenu pigmentaire sont également observables entre les deux phases en fonction de la qualité de la lumière, notamment pour deux caroténoïdes, la fucoxanthine et la 19'-hexanoyloxyfucoxanthine : en lumière bleue et en lumière du jour la quantité de fucoxanthine est moins élevée qu'en lumière verte tandis que la quantité de 19'-hexanoyloxyfucoxanthine est plus importante. Cela peut être mis en relation avec le fait que les taux de croissance des deux phases présentent également des différences suivant le type de lumière : taux de croissance similaires en lumières du jour et bleue, plus élevés que ceux en lumière verte. La phase haploïde apparaît comme étant plus inhibée en lumière verte que la phase diploïde, ce qui peut être expliqué par une diminution de la quantité relative de nombreux pigments par rapport à la chlorophylle *a* dans ces conditions.

La phase haploïde d'*Emiliana huxleyi* semble donc moins capable de croître en lumière verte que la phase diploïde, toutefois les deux phases présentent la même capacité de croissance en lumière bleue et en lumière du jour. Au niveau écologique, ceci pourrait indiquer l'existence de deux niches différentes. La phase haploïde est aussi compétitive en lumière du jour (qui correspondrait à une niche écologique en surface) et en lumière bleue (niche plus en profondeur), toutefois le fait que cette phase photoinhibe à forte intensité nous indique qu'elle serait plus adaptée à une vie plus en profondeur. La phase diploïde, quant à elle, est plus compétitive que la phase haploïde dans les zones intermédiaires, du fait qu'elle peut croître aisément en lumières bleues et vertes, et cela correspond aux zones de sub-surface (autour de 30 m) où ont souvent lieu les blooms de cette espèce.

Concernant *Emiliana huxleyi*, il est donc difficile d'établir un cycle écologique comme pour *Coccolithus braarudii* ou *Calcidiscus leptoporus*, ses deux phases étant beaucoup plus proches d'un point de vue comportemental que ne le sont les deux phases des deux autres espèces. Les deux hypothèses générales formulées dans la discussion du Chapitre V et dans les paragraphes précédents restent plausibles : dans le premier cas la phase haploïde flagellée aurait un rôle très temporaire de gamète et serait donc une étape courte du cycle d'*Emiliana huxleyi*, tandis que dans l'autre cas cette phase pourrait perdurer et serait définie par une niche écologique différente plus en profondeur dans la colonne d'eau par rapport à la phase diploïde.

Chapitre VII :



PHOTOSYNTHESE ET CYCLE BIOLOGIQUE CHEZ *EMILIANA* *HUXLEYI*

Photo: J.R. Young

Photosynthèse et cycle biologique chez *Emiliana huxleyi*

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication actuellement soumise dans *Marine Ecology Progress Series* (date de soumission : novembre 2003)

A. Houdan, I. Probert, K. van Lenning et S. Lefebvre. Comparison of photosynthetic responses in different life cycle phase of *Emiliana huxleyi*

Résumé:

Emiliana huxleyi est une coccolithophore ubiquiste, capable de former des efflorescences très importantes. Cette espèce présente un cycle de développement digénétique hétéromorphe, avec une phase non mobile diploïde, portant des coccolithes, et une phase flagellée haploïde non calcifiée. La variation de la production d'oxygène à différents niveaux d'irradiance de ces deux phases a été étudiée dans deux conditions physiologiques différentes (au milieu et à la fin de la phase exponentielle de croissance), dans les mêmes conditions environnementales de culture. Il n'apparaît pas de différence dans les paramètres photosynthétiques classiques (α^{Chla} , $P_{\text{max}}^{\text{Chla}}$ et E_K) entre les deux phases de cette espèce. Toutefois, la phase diploïde ne montre aucune photoinhibition et ce jusqu'à plus de $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tandis que pour la phase haploïde une photoinhibition apparaît autour d'une intensité lumineuse de $400\text{-}500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, avec un taux photosynthétique qui chute à 75% du P_{max} à $1400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Les deux phases cultivées dans les mêmes conditions (non saturantes en terme de lumière) ne présentent pas de différences significatives quant au contenu pigmentaire. Ces résultats sont discutés dans un contexte écologique.

Abstract:

Emiliana huxleyi is a ubiquitous coccolithophore, which is capable of forming large blooms. This species presents a digenetic heteromorphic life-cycle, the non-motile diploid phase typically bearing coccoliths and the flagellated haploid phase being non-calcified. The oxygen production response at different irradiances of both phases was studied at two different

physiological conditions (mid- and late exponential growth phase), cultured under identical environmental conditions. There were no significant differences in basic photosynthetic parameters (α^{Chla} , $P_{\text{max}}^{\text{Chla}}$ and E_K) between the two life cycle phases of this species, but whereas the diploid phase did not exhibit photoinhibition at light intensities up to 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, photoinhibition was recorded in the haploid phase at light intensities above 400-500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and photosynthetic rate decreased to ca 75% of P^{max} at 1400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The two phases cultured under identical (non-saturating in terms of light) conditions did not present any significant differences in pigment content. These results are discussed in an ecological context.

I. INTRODUCTION

Emiliana huxleyi (Lohmann) Hay et Mohler is numerically the most abundant coccolithophore in the modern ocean and is capable of forming vast blooms in the open ocean. These blooms, are phenomena which are often clearly visible in satellite images, which may have a surface area $>100\,000 \text{ km}^2$ (Brown & Yoder 1994) with cell concentrations up to $10\,000 \text{ cells ml}^{-1}$ and concentrations of detached coccoliths up to $300\,000 \text{ liths ml}^{-1}$ (Holligan et al. 1993), are phenomena which are often clearly visible in satellite images. This species has been intensely studied in the contexts of biogeochemistry (especially relating to the global carbon and sulphur cycles), cellular carbon physiology, biomineralization, and plankton ecology (see review by Paasche 2001).

The quasi-totality of this interest has focussed on the coccolith-bearing stage in the life cycle of this species. Klaveness (1972) reported that *E. huxleyi* presents a heteromorphic life cycle with the coccolith-bearing non-motile ('C-cell') stage and non-calcified non-motile ('N-cell') alternating with non-calcifying (but organic scale-bearing) flagellated ('S-cell') stages, all stages being capable of independent asexual reproduction. Green et al. (1996) demonstrated that this cycle is digenetic, the C-cell and N-cell stages typically being diploid relative to the haploid motile S-cell stage. Despite the immense interest in this species and the fact that this cycle was elucidated over 30 years ago, very little is currently known about the distribution, physiology or ecological role of the motile haploid stage of *E. huxleyi*. Blooms of the coccolith-bearing stage of *E. huxleyi* typically were reported occur occur in highly stratified water with a mixed layer depth always $\leq 30\text{m}$, and the lack of photoinhibition in the diploid life cycle phase at light intensities up to at least $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ has been

suggested to contribute to the dominance of this species in high light intensity surface waters (Nanninga & Tyrell 1996). Recent evidence suggests that all coccolithophores exhibit a dimorphic haplo-diploid life cycle (Houdan et al. in press). Among the hypotheses for the maintenance of a haplo-diploid cycle is the possibility that each phase occupies a distinct ecological niche (see review by Valero et al. 1992), and some evidence for niche separation of known coccolithophore life cycle associations is available from distribution studies in the natural environment (e.g. Cros 2002).

In order to test for potential differences in the physiological capacities of different coccolithophore life cycle phases which may provide evidence for them being adapted to different niches, photosynthetic responses and pigment composition of the two phases of the important species *E. huxleyi* cultured under identical conditions were compared in this study.

II. METHODS

1. Strain and culture conditions.

The original (non-axenic) culture of *Emiliania huxleyi* employed in this study (strain AC472 from the Algalbank Culture Collection, Caen, France, isolated from a sample collected west of New Zealand in October 1998) was clonal, one cell in the heterococcolith-bearing phase being isolated from a mixed sample with a micropipette. This strain has been identified as *E. huxleyi* type R (see Paasche 2002, Young et al. 2003). Following phase change in culture, pure cultures of each phase (i.e. only one life cycle phase present) were established by isolating one cell of each phase from the mixed-phase culture using the same method. The stock cultures were maintained in sterile single-use polystyrene culture flasks (Iwaki, Tokyo, Japan) in filter-sterilized enriched seawater K/2 (-Tris) medium (Keller et al. 1987) at 17°C with daylight fluorescent tubes providing an irradiance level of 90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ measured with a quantum radiometer photometer (Licor, Lincoln USA) with a photoperiod of 16L:8D. For the experiments, batch cultures were conducted in triplicate under the same culture conditions. Growth was monitored daily both by manual counting using a Malassez haematocytometer and fluorimetric measurement of *in vivo* chlorophyll *a* (Turner Designs, California, USA). Specific growth rates were calculated using the equation $k = \ln(C/C_0)/t$, with *C* being the fluorescence reading at 5 days, *C*₀ initial fluorescence, and *t* the time in days.

2. *Measurements of photosynthetic parameters.*

Experiments were conducted with pure cultures of each (diploid and haploid) phase of *E. huxleyi*, both at two different growth rates, ca 0.75 d⁻¹ (= mid exponential growth phase) and ca 0.35 d⁻¹ (= late exponential growth phase) (Table 1). The maximal growth rates obtained in culture for both phases of this strain were ca 1 d⁻¹ (unpublished results). Two different growth rates were tested in order to compare photosynthetic parameters at different physiological states. The photosynthesis versus irradiance (*P-E*) measurements were conducted 8 h into the light period (i.e. mid light period). Immediately prior to measurement of photosynthetic activity, cultures were concentrated by gentle centrifugation (5 min at 1000 rpm). Gross photosynthetic capacity and dark respiration were assessed by measuring oxygen evolution with a Clarke type oxygen electrode (Hansatech, Norfolk, UK) in a 2 ml chamber according to Dubinsky et al. (1987). The samples were maintained for 5 min in obscurity and then progressively exposed to 12 different irradiances ranging from 0 to 1500 μmol photons m⁻² s⁻¹. To determine the quantity of chlorophyll *a*, 5 ml of culture were filtered onto a GF/C filter (Whatman, Kent, UK) in duplicate and stored frozen at -80°C. Chlorophyll *a* was subsequently extracted by grinding the filters in 4 ml of 90% acetone. 6 mL of 90% acetone was added and samples were stored in the dark at 4°C for 6 h. This period was followed by a centrifugation step (15 min, 1000 rpm) and the supernatant was then separated from the filter and cell debris. Chlorophyll *a* was quantified in particle-free samples by fluorimetry (Turner Designs, California, USA).

3. *Determination of pigment content*

The pigment content of pure cultures of both phases of *E. huxleyi* strain AC472 was determined in triplicate in mid-exponential phase cultures grown under identical conditions to those described above. Cultures were harvested by filtration onto Whatman GF/C filters (Whatman, Kent, UK) and stored frozen at -80°C until analysis. Pigment extraction and HPLC quantification was conducted following the method of Van Lenning et al. (2003). The concentration of all pigments was normalized to that of chlorophyll *a*.

4. *Calculation of photosynthetic parameters.*

The maximal photosynthetic rate ($P_{\max}^{\text{Chl } a}$) and the light-saturation parameter (E_k) are defined as follows:

$$P_{\max}^{\text{chla}} = P_s^{\text{chla}} \left(\frac{\alpha}{\alpha + \beta} \right) \left(\frac{\beta}{\alpha + \beta} \right)^{\alpha/\beta}$$

$$E_k = \frac{P_{\max}^{\text{chla}}}{\alpha}$$

P - E curves were fitted by non-linear parameteric estimation according to the model of Platt *et al.* (1980):

$$P^{\text{chla}}(E) = P_s^{\text{chla}} \left[1 - \exp\left(-\frac{\alpha E}{P_s^{\text{chla}}}\right) \right] \exp\left(-\frac{\beta E}{P_s^{\text{chla}}}\right)$$

where according to Sakshaug *et al.* (1997), P^{chla} is the Chl a specific photosynthetic rate, α is the maximum light utilization coefficient, β is the photoinhibition parameter, P_s^{chla} is the potential maximum photosynthetic rate.

5. Statistical analyses.

All statistics and fitting were performed with Sigma stat 2.0 software. Two-way (non parametric due to low replication) ANOVAs on ranks were performed to test the difference between the means for culture variables (μ , Fo, cell and Chl a concentration, the Chl a / cell ratio, pigment content) using the life cycle stage (2N or N) and the physiological state (growth rate) or pigment type (for pigment content) as factors. When significant differences were observed, means were ordered using post hoc Student-Newman-Keul's test. The student's paired t test was used to test for significant differences in each of the photosynthetic parameters between different experimental conditions (Scherrer, 1984).

III. RESULTS

Four P - E response curves were obtained for *E. huxleyi* (Figure 1), two for cultures of the diploid stage (2N) at growth rates of 0.78 and 0.35 div.day⁻¹ and two for cultures of the haploid stage (N) at growth rates of 0.7 and 0.35 div.day⁻¹ (Table 1). With these curves, three characteristics of photosynthesis were calculated: α^{Chla} the light limited initial slope, P_{\max}^{Chla} the light saturated maximal rate of photosynthesis, and E_K the light saturation parameter (Table 2).

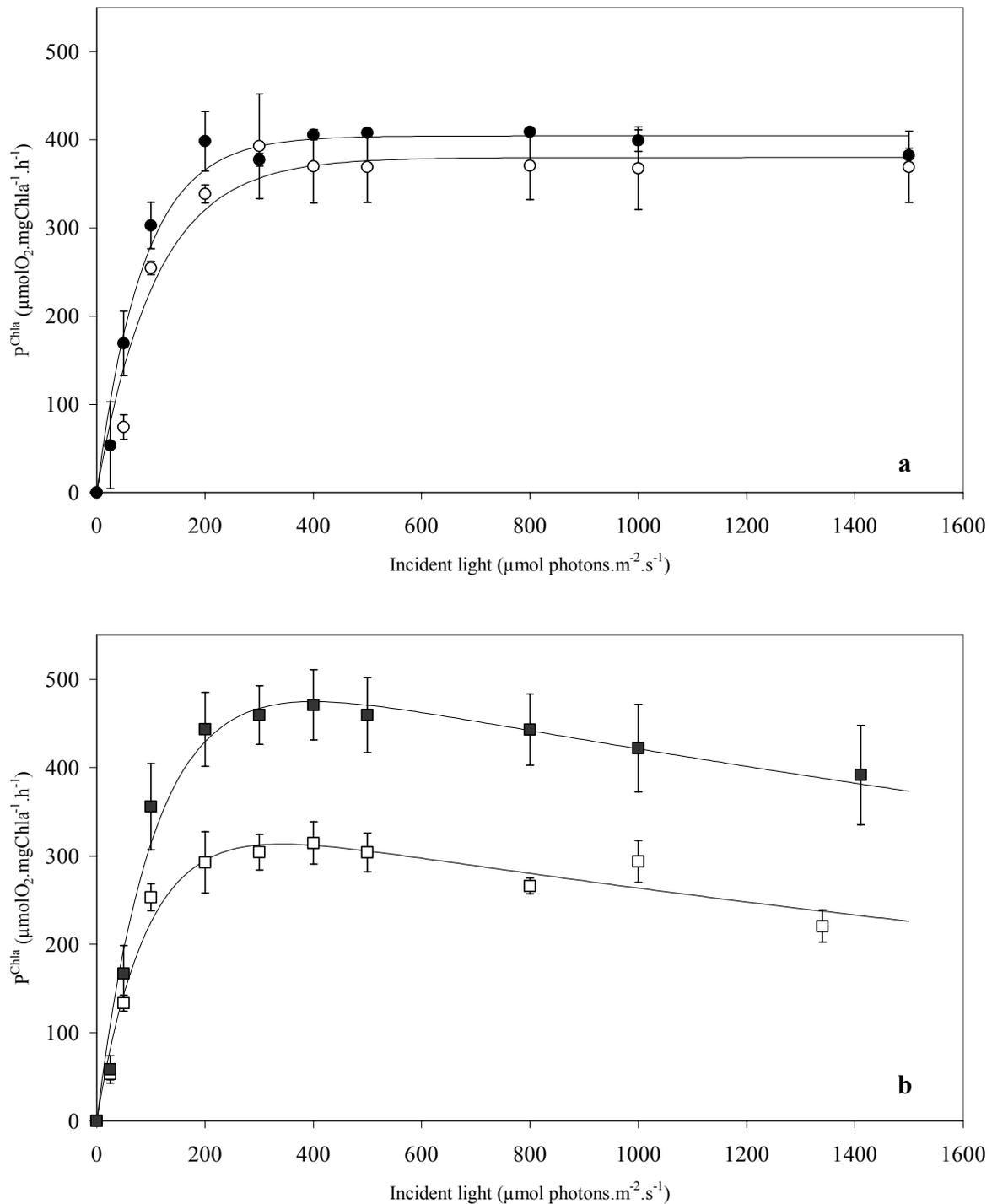


Figure 1 : Photosynthesis irradiance response curves of the diploid (a) and haploid (b) stages of *Emiliana huxleyi* at two different growth rates, around 0.70 day^{-1} (white) and 0.35 day^{-1} (black) (mean \pm se) and associated fitted P/E model curves (Platt et al. 1980).

Figure VII-1: Courbe P-E pour la phase diploïde (a) et haploïde (b) d'*Emiliana huxleyi* à deux différents taux de croissance, autour de $0,70 \text{ j}^{-1}$ (blanc) et $0,35 \text{ j}^{-1}$ (noir) (\pm erreurs standards) avec les courbes P-E obtenues par le modèle de Platt *et al.* (1980).

Table 1 : Different characteristics of *Emiliania huxleyi* cultures in haploid (N) and diploid (2N) phases: μ the growth rate (d^{-1}), F_o intensity of *in vivo* fluorescence, chl *a* chlorophyll *a* concentration ($\mu g l^{-1}$) and the cell concentration (cells ml^{-1}). Mean \pm se (n=3 except for diploid stage with $\mu=0.35$, n=2). Results from two way ANOVAs on ranks showed significant differences between the means ($P<0.05$). Means not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$, Student-Newman-Keuls' test).

Tableau VII-1: Différentes caractéristiques de cultures d' *Emiliania huxleyi* phase haploïde (N) et diploïde (2N) : μ taux de croissance (j^{-1}), F_o intensité de fluorescence *in vivo*, chl *a* concentration en chlorophylle *a* ($\mu g l^{-1}$) et concentration cellulaire (cell ml^{-1}). Les résultats d'Anova à deux facteurs montrent une différence significative entre les valeurs ; celles qui n'ont pas des lettres en exposant identiques sont significativement différentes.

	μ	F_o	Chla	Cell ml^{-1}	Chla/Cell
N	0.74 \pm 0.01 ^a	138.4 \pm 21.5 ^b	193.5 \pm 12.4 ^a	159400 \pm 11982 ^a	1.22 \pm 0.02 ^a
N	0.37 \pm 0.02 ^b	232.9 \pm 41.0 ^a	372.0 \pm 15.3 ^b	263167 \pm 18176 ^b	1.42 \pm 0.07 ^b
2N	0.78 \pm 0.01 ^a	53.6 \pm 4.8 ^c	58.5 \pm 6.1 ^c	50083 \pm 870 ^c	1.17 \pm 0.11 ^a
2N	0.34 \pm 0.03 ^b	225.1 \pm 26.9 ^a	294.4 \pm 1.9 ^d	220317 \pm 5961 ^d	1.34 \pm 0.03 ^b

For each phase the high and low growth rates were significantly different ($P<0.05$), but between phases there was no statistically significant difference between either high growth rates or low growth rates ($P<0.05$; Table 2). At equivalent growth rates there was no significant difference between values of Chl *a* cell⁻¹, but for each phase the cellular Chl *a* content increased in the late exponential growth stage.

Table 2 : Mean of three characteristics of photosynthesis for the haploid (N) and diploid (2N) stages of *Emiliania huxleyi* at two different growth rates: around 0.7 day⁻¹ and 0.3 day⁻¹: P_m^{chla} the light saturated maximal rate, α^{chla} the light limited initial slope and E_k the light saturated parameter. Paired t test showed no significant difference between the two stages or the two growths

Tableau VII-2: Valeurs de trois paramètres photosynthétiques pour les phases haploïde (N) et diploïde (2N) d' *Emiliania huxleyi* : P_m^{chla} production d'oxygène maximale, α^{chla} efficacité photosynthétique et E_k le paramètre de lumière saturante. Des tests t par paires ne montrent aucune différence significative entre les deux stades ou les deux taux de croissance.

	Stages	0.70 d ⁻¹	0.35 d ⁻¹
P_m^{chla} ($\mu mol O_2 \cdot mg Chl a^{-1}$)	N	318.9 \pm 47.7	486.9 \pm 65.9
	2N	396.0 \pm 81.1	355.0 \pm 110.8
α^{chla} ($\mu mol photons \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} / \mu mol O_2 \cdot mg Chl a^{-1}$)	N	4.0 \pm 0.4	5.2 \pm 1.9
	2N	3.8 \pm 0.7	4.5 \pm 2.5
E_k ($\mu mol photons \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	N	80.1 \pm 15.2	96.8 \pm 21.0
	2N	107.8 \pm 36.2	86.9 \pm 26.7

There was no statistically significant difference in the values for either the maximum light utilization coefficient light limited initial slope (α^{chla} ca 4.4 $\mu mol photons m^{-2} s^{-1} / \mu mol O_2 \cdot mg Chl a^{-1}$) or the light- saturation parameter (E_k ca 90 $\mu mol photons m^{-2} s^{-1}$) between the two growth rates of each phase or between the two phases (Figure 2, Tables 2 and 3). For all cultures the maximal rate of photosynthesis ($P_{max}^{Chl a}$) was attained at light

intensities of between 300 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and whereas the values of $P_{\text{max}}^{\text{Chl } a}$ varied, there was no significant difference correlation with between either life cycle phase or growth rate.

Table 3 :Photosynthetic parameters estimation fitted from the P-E model (Platt et al., 1980) mean (\pm se) P_s photosynthetic rate, alpha maximum light utilization coefficient , beta photoinhibition parameter, R respiration rate.

Tableau VII-3: Estimation à travers le modèle P-E (Platt et al., 1980) des paramètres photosynthétiques avec leurs erreurs standards ; P_s taux de photosynthèse, alpha coefficient d'efficacité photosynthétique, beta coefficient de photoinhibition et R taux de respiration.

	Haploid stage		Diploid stage	
Growth rates	0.74 (\pm 0.01)	0.37 (\pm 0.02)	0.78 (\pm 0.01)	0.34 (\pm 0.03)
Model	***	***	***	***
n	35	32	30	32
r ²	0.85	0.91	0.82	0.95
Photosynthetic parameters				
P_s	358.3 \pm 26.0 *	536.8 \pm 48.0 *	379.92 \pm 15.4 *	404.45 \pm 9.87 *
Alpha	3.73 \pm 0.41 *	4.91 \pm 0.70 *	3.53 \pm 0.59 *	4.76 \pm 0.49 *
Beta	0.11 \pm 0.04 **	0.13 \pm 0.06 ***		
R ($\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg chl } a^{-1}$)	-7.00 $10^{-4} \pm 1.00 10^{-4}$	-6.00 $10^{-4} \pm 1.50 10^{-4}$	-8.00 $10^{-4} \pm 1.70 10^{-4}$	-12.7 $10^{-4} \pm 4.90 10^{-4}$

* $p < 0.05$

** $p < 0.05$

*** $p < 0.001$

In the diploid coccolith-bearing phase, in cultures at both high and low growth rates, there was no significant photoinhibition at light intensities up to at least 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. By contrast, the motile non-calcifying haploid phase exhibited significant photoinhibition at light intensities greater than 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 1, Table 3)

E. huxleyi contained the following pigments: chlorophyll *a* (Chl *a*), divinyl and monovinyl chlorophyll *c3* (DV, MV Chl *c3*), chlorophyllid *a* (Chlide *a*), Mg-divinyl-phytoporphyrin (MgDVP), chlorophyll *c2* (Chl *c2*), fucoxanthin (Fx), 19'-butanoyloxyfucoxanthin (BFx), 4-keto-19'-hexanoyloxyfucoxanthin (4-KetoHfx), 19'-hexanoyloxyfucoxanthin (Hfx), diadinoxanthin (Ddx), diatinoxanthin (Dtx) and an unknown type of zeaxanthine (Unk-2).

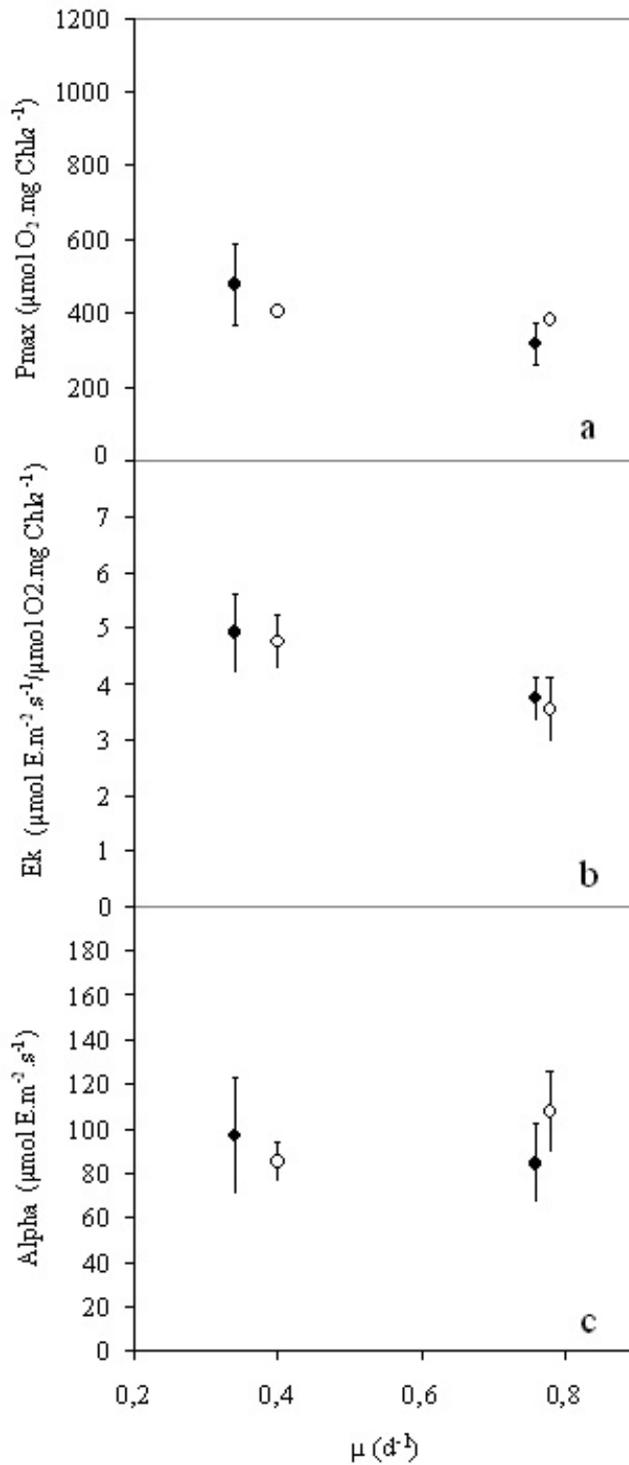


Figure 2 : Photosynthetic parameters for the haploid (black) and diploid (white) stages of *Emiliana huxleyi*: (a) $P_m^{Chl a}$ the maximal photosynthetic rate ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg chl} a^{-1} \text{ h}^{-1}$), (b) E_k the light-saturation parameter ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and (c) $\alpha^{Chl a}$ the maximum light utilization coefficient ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}/\mu\text{mol O}_2.\text{mg Chl } a^{-1}$) (mean \pm se).

Figure VII-2: Paramètres photosynthétiques pour la phase haploïde (noir) et diploïde (blanc) d'*Emiliana huxleyi* : (a) $P_m^{Chl a}$ production d'oxygène maximale ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg chl} a^{-1} \text{ h}^{-1}$), (b) E_k le paramètre de lumière saturante ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and (c) $\alpha^{Chl a}$ le coefficient d'efficacité photosynthétique ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}/\mu\text{mol O}_2.\text{mg Chl } a^{-1}$) (\pm erreurs standards).

The relative concentrations of the principal pigments in each life cycle phase are shown in Table 4. For all of these pigments content, there was no significant difference in content in relative concentration between the diploid and haploid phases ($P < 0.05$).

Table 4 : Pigment composition and relative concentration for the haploid and diploid stages of *Emiliana huxleyi*.

Tableau VII-4: Composition pigmentaire et concentration relative des pigments pour la phase haploïde et diploïde d'*Emiliana huxleyi*.

Pigments	Diploid stage	Haploid stage
Divinyl chlorophyll <i>c3</i>	0.191 ± 0.023	0.196 ± 0.006
Monovinyl chlorophyll <i>c3</i>	0.060 ± 0.013	0.065 ± 0.014
Chlorophyllid <i>a</i>	0.007 ± 0.013	0.000 ± 0.000
Mg-divinyl-phytoporphyrin	0.017 ± 0.006	0.019 ± 0.005
Chlorophyll <i>c2</i>	0.280 ± 0.019	0.332 ± 0.005
Fucoxanthin	0.067 ± 0.027	0.203 ± 0.072
19'-Butanoyloxyfucoxanthin	0.003 ± 0.00	0.005 ± 0.00
4-keto-19'-hexanoyloxyfucoxanthin	0.052 ± 0.008	0.082 ± 0.015
19'-hexanoyloxyfucoxanthin	1.017 ± 0.050	0.862 ± 0.094
Diadinoxanthin	0.000 ± 0.000	0.009 ± 0.015
Diatinoxanthin	0.028 ± 0.010	0.018 ± 0.004
Unknow type zeaxanthin	0.282 ± 0.382	0.298 ± 0.167

IV. DISCUSSION

The photosynthetic characteristics E_k and P_{\max}^B of *Emiliana huxleyi* vary with irradiance in much the same way as those of other phytoplankton (Nielsen 1997). Within species, photosynthetic parameters are acclimation dependent, i.e. they vary with environmental factors such as nutrients, dissolved organic carbon, temperature and daily irradiance (Nielsen 1997). Comparing the range of values of photosynthetic parameters for a species in the literature may provide some idea of the reliability of each set of results, but direct comparisons between the values reported in different studies can only be made when culture conditions were very similar. In balanced growth, phytoplankton tend to acclimate to light conditions by matching E_k to the incident irradiance level by varying the values of α and P_{\max} (Sakhaug *et al.* 1997, McIntyre *et al.* 2002). The fact that E_k was similar to the culture irradiance level in all of our experiments indicates that the cultures were well adapted to the light conditions. Under broadly similar conditions of temperature, irradiance / photoperiod, nutrients and specific growth rate, our results for the diploid stage of *E. huxleyi* are broadly comparable with those of Nielsen (1997). $P_{\max}^{\text{Chl } a}$ and E_k were lower in our study (396 compared to 435 $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl } a^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, and 108 compared to 153 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectively) and $\alpha^{\text{Chl } a}$ was higher (3.8 compared to 2.84 $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl } a^{-1} \cdot \text{h}^{-1} / \mu\text{mol}$

photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Van Bleijswijk *et al.* (1994) reported that there are no significant differences in light saturation kinetics between *E. huxleyi* types A and B, and Paasche (1999) came to the same conclusion when comparing clones from different latitudes. Our results for E_K and I_{sat} suggest that this is also the case between the diploid and haploid life cycle phases of the same strain.

The functional role that the presence of coccoliths plays in the ecology of coccolithophores has been a subject of speculation and debate for many years (see review by Young 1994). One of the earliest hypotheses was that coccoliths might act as protective screens against the harmful effects of high light intensities (Braarud *et al.* 1952; Berge 1952). If coccoliths served such a function, then two possible effects might be observed (Nanninga & Tyrell 1996): (1) the light intensity at which P_{max} is attained (I_{sat}) would be higher in calcified cells, and (2) photoinhibition would be absent on exposure to high light intensities in calcified cells, but not in non-calcified cells. The fact that I_{sat} was similar in calcified and non-calcified cells was previously demonstrated using diploid coccolith-bearing and decalcified C-cell cultures and diploid non-calcifying N-cell cultures of *E. huxleyi* by Nanninga & Tyrell (1996). Our results are not quantitatively comparable to those just cited due to differences in culture conditions, but the conclusion is the same, i.e. that the I_{sat} values for calcified and non-calcified cells cultured under identical (non-saturating in terms of light) conditions is similar, and therefore that coccoliths do not act as protective light screens.

The remarkable lack of photoinhibition in the diploid phase of cultured *E. huxleyi* after short-term exposure to irradiances of up to $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which is equivalent to the maximum downwelling light intensity normally encountered in the field, has been reported by several authors (see compilation by Nanninga & Tyrell 1996) and is confirmed here. This has been suggested to contribute to the dominance of this species in surface waters of the ocean when mixed layer depths are shallow (Nanninga & Tyrell, 1996). Very high in-water scalar light intensities ($>900 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) have been measured in surface waters during blooms of this species (see Nanninga & Tyrell 1996), and high irradiances, up to $800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, have little if any inhibitory effect on the growth of the diploid phase of *E. huxleyi* in culture (Brand & Guillard 1981). The vast majority of laboratory experiments conducted to date have evidently used cultures acclimated to non-saturating light conditions, and hence a more conservative interpretation would be that the diploid phase adapted to relatively low (non-saturating) light is able to maintain photosynthetic rate upon short-term exposure to extremely high light conditions, such as, for example, could be

experienced by a non-motile cell in turbulent conditions. Balch et al. (1992), however, did not observe photoinhibition in *E. huxleyi* (diploid phase) cultured at an irradiance level of $1160 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. This strongly suggests that the capacity to avoid photoinhibition is an inherent characteristic of this phase of this species, which would, therefore, provide a competitive advantage in surface layers of stratified water columns, as well as mixed water columns.

Our results indicate that this lack of photoinhibition is exhibited only in the diploid phase within the life cycle of *E. huxleyi*. Many species of phytoplankton start to experience light saturation (I_{sat}) at light intensities of 400-500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, above which photoinhibition may be rather drastic (Kirk 1994). Under our culture conditions, the haploid motile non-calcifying phase of *E. huxleyi* exhibits a photoinhibition response similar to that of the majority of microalgal species tested to date, photoinhibition being initiated at 400-500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and the photosynthetic rate decreasing to ca 75% of $P_{\text{max}}^{\text{Chla}}$ at 1400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. It should be stressed that given our experimental conditions, the interpretation is limited to stating that the haploid phase acclimated to (probably) non-saturating light is not capable of short-term adaptation to avoid photoinhibition at high light intensity, in contrast to the diploid phase. Although it seems unlikely that the haploid phase acclimated to high culture irradiance would be capable of avoiding photoinhibition, this possibility cannot be ruled out at present.

Taken in isolation, our results might be interpreted as providing evidence for a role for coccoliths in preventing photoinhibition. However, it was previously shown that the diploid phase of *E. huxleyi* does not exhibit photoinhibition at high light intensities independent of the presence of coccoliths (Nanninga & Tyrell 1996). This indicates that the remarkable phenotypic variability in the ability to integrate short-term exposure to high light intensities demonstrated here for *E. huxleyi* is related to other factors, potentially to differences in photosynthetic pigment physiology between the diploid and haploid phases. Accessory pigments may contribute to light harvesting or to photoprotective dissipation ('quenching') of excitation energy. An important short-term (on the scale of minutes) modulator of energy flow to the photosynthetic reaction centres involves an enzymatic de-epoxidation reaction of specific xanthophyll pigments, in the case of chromophytes the conversion of diadinoxanthin to diatoxanthin, the latter being the quenching form (McIntyre *et al.*, 2002). In addition, β -carotene may serve as an energy quencher, although it is not regulated in the same manner as the xanthophyll cycle (McIntyre *et al.*, 2002). Our preliminary results, which for the first time

compare the pigment composition of the two phases within the haplo-diploid life cycle of coccolithophores, indicate that there are no fundamental differences in pigment content between the two phases cultured under identical conditions. β -carotene was not detected in either phase of this strain of *E. huxleyi* grown and harvested at non-limiting light intensity in our experiment, but has been reported to be produced in trace amounts in this species (e.g. Garrido & Zapata 1998). Future laboratory studies should test firstly whether similar physiological responses are observed in the two phases of *E. huxleyi* cultivated under a range of light intensities during short-term exposure to very high light intensities, and if so, whether these photoprotective carotenoids are differentially expressed. Differences in the photosynthetic physiology of these two phases may also be a result of differential structural packaging of pigments. If this were the case, photoinhibition responses could differ even if overall pigment composition was similar. No obvious differences in chloroplast structure were detected in the only study that has compared the ultrastructure of the two phases of *E. huxleyi* (Klaveness 1972), but a focussed biophysical approach (*in vivo* fluorescence, light absorption) would be required to confirm this fact.

The motile S cells could have a role in the biology of *Emiliania huxleyi* beyond that of serving as gametes (Paasche 2001). The results of this study provide some indications as to the possible ecology of the motile haploid phase of *E. huxleyi*. Flagellates, which typically dominate in the middle part of the seasonal succession of phytoplankton in summer when the water column is stratified (cf. Margalef 1978), might intuitively be thought to be better adapted to high light conditions. However, Richardson *et al.* (1983) concluded that on average diatoms have a higher light saturation irradiance (I_{sat}) for growth than dinoflagellates. Direct comparison of I_{sat} values is difficult since this parameter depends on a number of factors related to culture conditions, but indirect support is provided by the conclusion that it is the non-motile phase of *E. huxleyi* which seems to be better adapted to short-term exposure to high light due to the capacity to avoid photoinhibition. An alternative hypothesis is that highly motile (i.e. flagellated) phytoplankton cells are able to avoid photoinhibition by actively migrating away from harmfully high light intensities. This behavioural response would preclude the need for flagellates to have evolved specific physiological mechanisms for preventing photo-injury. Being apparently less capable of supporting extreme variations in light intensities, the haploid phase of *E. huxleyi* may be present earlier or later in the year when fluctuations in light intensity are less pronounced, or concurrently with the diploid phase but lower in the water column, possibly employing a vertical migration strategy to

optimise the exploitation of light and nutrients. In this context, however, it is interesting to note that in our experience the motile phase of *E. huxleyi* exhibits neither positive nor negative phototactic responses under a range of culture irradiance levels, whereas the majority of motile coccolithophores maintained in our culture collection actively migrate towards light (unpublished obs.). Non-flagellated phytoplankton cells may have some degree of control over their position in the water column through osmolite-related vacuolar regulation of buoyancy (McKay *et al.* 2000) or possibly by excessive production of coccoliths to enhance sinking (Young 1994) for example, but these processes are unlikely to be as efficient as active swimming on short time-scales. In terms of nutrient physiology, the non-motile phase of *E. huxleyi* is highly competitive under conditions of nutrient stress (particularly phosphorus stress, Riegman *et al.* 2000) such as those characteristically encountered in the high light surface waters of a stratified water column. Since flagella are absent in this phase, the evolution of a system for protection against the harmful effects of high light intensity represents an essential complimentary aspect of the highly successful ecological strategy of this phase of the life cycle. This requirement may be accentuated by the fact that *E. huxleyi* coccoliths are particularly efficient at scattering light (Voss *et al.* 1998).

The results of this study demonstrate an important physiological difference between diploid and haploid phases in the life cycle of *E. huxleyi*, and we therefore stress the opinion of Paasche (2001) that it is important to state clearly which cell form was used in a given investigation. Further physiological comparisons of coccolithophore life cycle phases are essential for developing an understanding of the total ecological strategy of these important microalgae, and for *E. huxleyi* there is a clear need for quantification of the spatial and temporal distribution of the non-calcifying haploid stage in the field. This is complicated by the fact that positive identification of scaly S cells in mixed samples is next to impossible using routine light microscopy and is very difficult (and time-consuming) using electron microscopy. Development of innovative techniques involving molecular genetics will probably be required before data on the distribution and abundance of this phase can be gathered routinely.

V. CONCLUSIONS

P-E curves have been derived for both the diploid coccolith-bearing and haploid non-calcifying phases in the life cycle of *Emiliania huxleyi* cultured under identical conditions. Basic photosynthetic responses were similar, but whereas the diploid phase did not exhibit

photoinhibition at light intensities up to at least 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in accordance with previous studies, photoinhibition in the haploid phase was recorded at and above light intensities of 400-500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. This remarkable phenotypic variability may have important implications for the overall ecology of the species. The dimorphic life cycle of *E. huxleyi*, with each phase capable of independent asexual propagation and easy to culture, and each exhibiting a different response to exposure to high light, clearly makes this species a very promising model for the study of the biochemical and structural bases for adaptive avoidance of the effects of photoinhibition.

Acknowledgements. This work was conducted with the financial support of the Conseil Regional de Basse Normandie, the Agence de l'Eau Seine Normandie and the EC funded CODENET (Coccolithophore Evolutionary Biodiversity and Ecology) network.

Chapitre VIII :



TOXICITE DES COCCOLITHOPHORES

Photo: I. Probert

Toxicité des coccolithophores.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication actuellement soumise dans *Journal of Plankton Research* (date de soumission : août 2003)

A. Houdan, A. Bonnard, J. Fresnel, S. Fouchard, C. Billard & I. Probert. Toxicity of coccolithophores (Prymnesiophyceae, Haptophyta).

Résumé:

Durant la dernière décennie, certaines coccolithophores, en particulier l'espèce capable de grandes efflorescences *Emiliana huxleyi*, ont fait l'objet d'études pluridisciplinaires approfondies. Plusieurs coccolithophores, appartenant notamment aux familles des Pleurochrysidaceae et des Hymenomonadaceae, sont spécifiques d'un habitat côtier où elles peuvent occasionnellement proliférer, et avoir alors un impact sur les ressources aquacoles. La toxicité vis-à-vis des larves d'*Artemia* de onze espèces de coccolithophores, neuf côtières et deux espèces océaniques de l'ordre des Coccolithales, a été testée. Pour les neuf espèces côtières, les tests ont été réalisés avec des cultures en phases exponentielle et stationnaire de croissance, à différentes concentrations cellulaires et pour deux temps d'exposition (24 et 48h). Cinq de ces espèces (quatre du genre *Pleurochrysis* ainsi que *Jomonolithus littoralis*) se sont révélées toxiques. L'effet allélopathique potentiel d'un filtrat d'une culture de coccolithophore toxique a également été testé sur trois espèces de microalgues flagellées : *Scrippsiella trochoidea*, *Tetraselmis* sp. et *Isochrysis galbana*. A partir des résultats obtenus (effet négatif du filtrat sur les taux de croissance et sur la mobilité de *S. trochoidea* et *Tetraselmis* sp.), nous suggérons que la toxine produite par les coccolithophores testées pourrait être une exotoxine, proche de celle produite par d'autres représentants non calcifiés des Prymnesiophyceae.

Abstract:

Over the last decade certain coccolithophores, in particular the ubiquitous bloom-forming species *Emiliana huxleyi*, have been the subject of extensive multidisciplinary research. Several species of coccolithophores, belonging mainly to the families Pleurochrysidaceae and Hymenomonadaceae, inhabit inshore coastal waters where they may

Table 1. Reported toxic marine prymnesiophytes (non-calcifying species)

Tableau VIII-1: Espèces marines non-calcifiées appartenant aux Prymnesiophyceae, recensées comme toxique dans la littérature.

Species	Tested on	References
<i>Chrysochromulina brevifilum</i>	<i>Electra pilosa</i>	Jebram 1980
<i>Chrysochromulina kappa</i>	<i>Electra pilosa</i>	Jebram 1980
<i>Chrysochromulina leadbeateri</i>	fish	Eikrem & Throndsen 1993
<i>Chrysochromulina polylepis</i>	fish, invertebrates...	Yasumoto <i>et al.</i> , 1990
<i>Chrysochromulina strobilus</i>	<i>Electra pilosa</i>	Jebram 1980
<i>Prymnesium calathiferum</i>	fish	Chang 1985
<i>Prymnesium faveolatum</i>	<i>Artemia salina</i>	Fresnel <i>et al.</i> , 2001
<i>Prymnesium parvum</i> *	fish, invertebrates...	see Moestrup 1994
<i>Prymnesium zebrinum</i>	<i>Artemia salina</i>	Fresnel <i>et al.</i> , 2001
<i>Phaeocystis pouchetii</i>	Sea urchin embryos	Hansen <i>et al.</i> , 2003

* The alternate phase of this species (*P. patelliferum*) is also toxic (Larsen *et al.*, 1993).

occasionally bloom and hence impact aquaculture resources. The toxicity to *Artemia* larvae of eleven species of coccolithophore, nine coastal and two oceanic members of the order Coccolithales, was tested. For the nine coastal species, tests were undertaken with rapid growth and stationary phase cultures at different cellular concentrations and for two different exposure times (24 and 48 h). Five of the coastal species (four in the genus *Pleurochrysis* as well as *Jomonlithus littoralis*) were found to be toxic. Allelopathic effects of a cell-free filtrate of a culture of a toxic coccolithophore were also tested on three flagellate microalgal species, *Scrippsiella trochoidea*, *Tetraselmis* sp. and *Isochrysis galbana*. With the results obtained (negative effects of the filtrate on growth rates and motility of *S. trochoidea* and *Tetraselmis* sp.), we suggest that the toxin of the coccolithophore tested could be an exotoxin similar to that produced by other non-calcifying members of the Prymnesiophyceae.

I. INTRODUCTION

Over the last few decades the incidence of nuisance and toxic blooms of phytoplankton organisms has apparently been increasing in coastal waters world-wide (GEOHAB, 2001). Nuisance effects include the production of foam or mucilage, while toxins synthesized by microalgae may be the causative agents of mass mortalities of marine vertebrates or invertebrates (water-soluble exotoxins), or illnesses in humans through the food chain accumulation of toxins in shellfish or finfish (potent endotoxins which may have harmful effects even when microalgal cell concentration is low).

Several taxonomic groups of microalgae feature genera with known harmful marine species. These include the dinoflagellates (*Alexandrium*, *Dinophysis*, *Gymnodinium*, and *Karenia* being among the main toxic genera), the diatoms (mainly *Pseudo-nitzschia*), and the raphidophytes (*Chattonella*, *Fibrocapsa*, *Heterosigma*). In the Haptophyta Hibberd ex Edvarsen et Eikrem, toxic species are also known in the class Prymnesiophyceae Hibberd. This class contains four orders (Edvarsen *et al.*, 2000), two of which contain known toxic species. The order Prymnesiales Papenfuss emend. Edvarsen et Eikrem includes some well known toxic species, notably in the genera *Prymnesium* Massart and *Chrysochromulina* Lackey, which have been reported to have caused large fish kills (Moestrup, 1994). Four species of *Prymnesium* have been reported to be toxic (Table 1), producing potent haemolytic compounds termed 'prymnesins' by Yariv and Hestrin (Yariv and Hestrin 1961). The chemical structure of prymnesins has not been fully characterised. Several haemolytic compounds have been found in *P. parvum*, one of which was identified by Kozakai *et al.* (Kozakai *et al.*, 1982)

as a mixture of two galactolipids. Igarashi *et al.* (Igarashi *et al.*, 1993) found two haemolytic compounds, known as prymnesins 1 and 2, which were identified as polyoxy-polyene-polyethers. Five species of *Chrysochromulina* are also listed as toxic (Table 1), notably *C. polylepis* and *C. leadbeateri*, both of which are bloom-forming species which have been held responsible for massive fish-kills in Scandinavian waters (Moestrup and Thomsen, 1995). Yasumoto *et al.* (Yasumoto *et al.*, 1990) established that *C. polylepis* produced two compounds, one haemolytic and one ichthyotoxic. The major haemolytic compound was a galactolipid, 1-acyl-3-digalacto-glycerol. Small amounts of a polyunsaturated fatty acid, octadecapentaenoic acid, were also detected.

With respect to the order Phaeocystales Medlin, large blooms of species belonging to the genus *Phaeocystis* Lagerheim regularly occur in the North Sea and the English Channel with high biomass levels resulting in anoxic phenomena, clogging of fishing nets and fish gills, important production of dimethylsulfide (DMS), and foam generated from decomposition of organic compounds (Moestrup and Thomsen, 1995). Blooms of *Phaeocystis* with similar effects are also known from the southern hemisphere, namely in New Zealand (Moestrup, 1994). *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim, which has recently been shown to excrete anti-mitotic compounds (Hansen *et al.*, 2003), is thus far the only toxic species known in the genus, and is suspected to be responsible for reduced growth, fecundity and survival of other marine organisms.

Species of the other two orders of the Prymnesiophyceae, the Isochrysidales Pascher emend. Edvardsen et Eikrem and the Coccolithales Schwarz emend. Edvardsen et Eikrem, are generally not considered as potential toxin producers and indeed *Isochrysis galbana*, a non-calcifying member of the Isochrysidales, is commonly used as bivalve food in mariculture (Jeffrey *et al.*, 1994). The coccolithophores, which are calcifying and almost exclusively marine prymnesiophytes, are distributed between the orders Isochrysidales and Coccolithales. The question of the potential toxicity of these organisms has rarely been addressed. Only two positive reports of toxicity exist, referring to only two species from the Coccolithales. Jebram (Jebram 1980), using a wide range of microalgae as food for the bryozoan *Electra pilosa*, concluded that old cultures of the coccolithophore *Ochrosphaera neapolitana* were toxic to this test organism. More recently, Reifel *et al.* (Reifel *et al.*, 2001) showed that bloom samples from a large saline lake (Salton Sea, California), dominated by the coccolithophore *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* Gayral et Fresnel, were moderately toxic using a brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. The genera *Ochrosphaera* Schussnig and *Pleurochrysis* Pringsheim belong to a small group of coccolithophores

occurring consistently in near-shore marine waters, in contrast to the majority of the coccolithophores which are open ocean organisms (Heimdal, 1993). To our knowledge, the only other report of toxicity tests involving coccolithophores was that of Rhodes *et al.* (Rhodes *et al.*, 1994), who found that the common oceanic species *Emiliana huxleyi* Hay et Mohler and *Gephyrocapsa oceanica* Kamptner, both members of the Isochrysidales, were non-toxic to brine shrimp.

The ALGOBANK microalgal culture collection at the University of Caen, France (<http://www.unicaen.fr/algobank>), contains unialgal cultures of a large number of haptophytes including one of the most important collections of living coccolithophores, with over 30 species in culture (Probert and Houdan, in press). We have performed a preliminary screening using the brine shrimp lethality assay in order to evaluate the toxicity of coccolithophores. Considering that natural toxic events linked to marine prymnesiophytes in general have been reported in near-shore areas (or in saline ponds/lakes), we focussed on species from families typically found in in-shore coastal waters (nine species tested) and this paper presents the results of a screening including a total of eleven cultures of different species of coccolithophore.

II. MATERIAL AND METHODS

1. Cultures and culture conditions

Table VII-2 lists the eleven species of coccolithophore obtained from ALGOBANK and used in the toxicity assessment. All algal strains were clonal and in the diploid, heterococcolith-bearing stage of the life cycle. For coastal species, cultures were grown in 1:1 K/2 (Keller *et al.*, 1987) and ES Tris II (Cosson, 1987) under controlled conditions of 17°C and a light/dark (L:D) cycle of 16:8h. Two series of cultures were conducted under identical conditions in order to test two stages, rapid growth and stationary stage. Cell density was measured by manual counting using a Malassez counting slide. For the two oceanic species tested here, cultures were grown in K/5 medium (Keller *et al.*, 1987) with other culture conditions being identical, and toxicity tests were conducted at the end of the growth stage (about 100 000 cells.ml⁻¹).

Table 2. Origin of the species used in the toxicity tests**Tableau VIII-2:** Origine des espèces utilisées pour les tests de toxicité.

Family	Species	Strain	Origin
Isochrysidaceae	<i>Isochrysis galbana</i> Parke	AC 34	Plymouth Collection
Prymnesiaceae	<i>Prymnesium parvum</i> N. Carter	AC 45	Bretagne (Fr)
Pleurochrysidaceae	<i>Pleurochrysis carterae</i> (Braarud et Fagerland) Christensen	AC 1	Morocco
	<i>Pleurochrysis dentata</i> (Johansen et Doucette) Probert	AC 6	California (USA)
	<i>Pleurochrysis elongata</i> (Droop) Jordan <i>et al.</i>	AC 86	CCAP 961/1
	<i>Pleurochrysis placolithoides</i> Fresnel et Billard	AC 59	Belle-Ile (Fr)
	<i>Pleurochrysis roscoffensis</i> (Dangeard) Fresnel et Billard	AC 230	La Tremblade (Fr)
Hymenomonadaceae	<i>Hymenomonas coronata</i> Mills	AC 115	Guadeloupe
	<i>Hymenomonas globosa</i> (Magne) Gayral et Fresnel	AC 30	Iles Chausey (Fr)
	<i>Ochrosphaera neapolitana</i> Schussnig	AC 94	Roscoff (Fr)
	<i>Jomonlithus littoralis</i> Inouye et Chihara	AC 513	Valencia (Sp)
Coccolithaceae	<i>Coccolithus braarudii</i> (Gaarder) Baumann <i>et al.</i>	AC 392	Arcachon (Fr)
	<i>Calcidiscus leptoporus</i> (Murray et Blackman) Loeblich et Tappan	AC 370	South Atlantic (Sa)

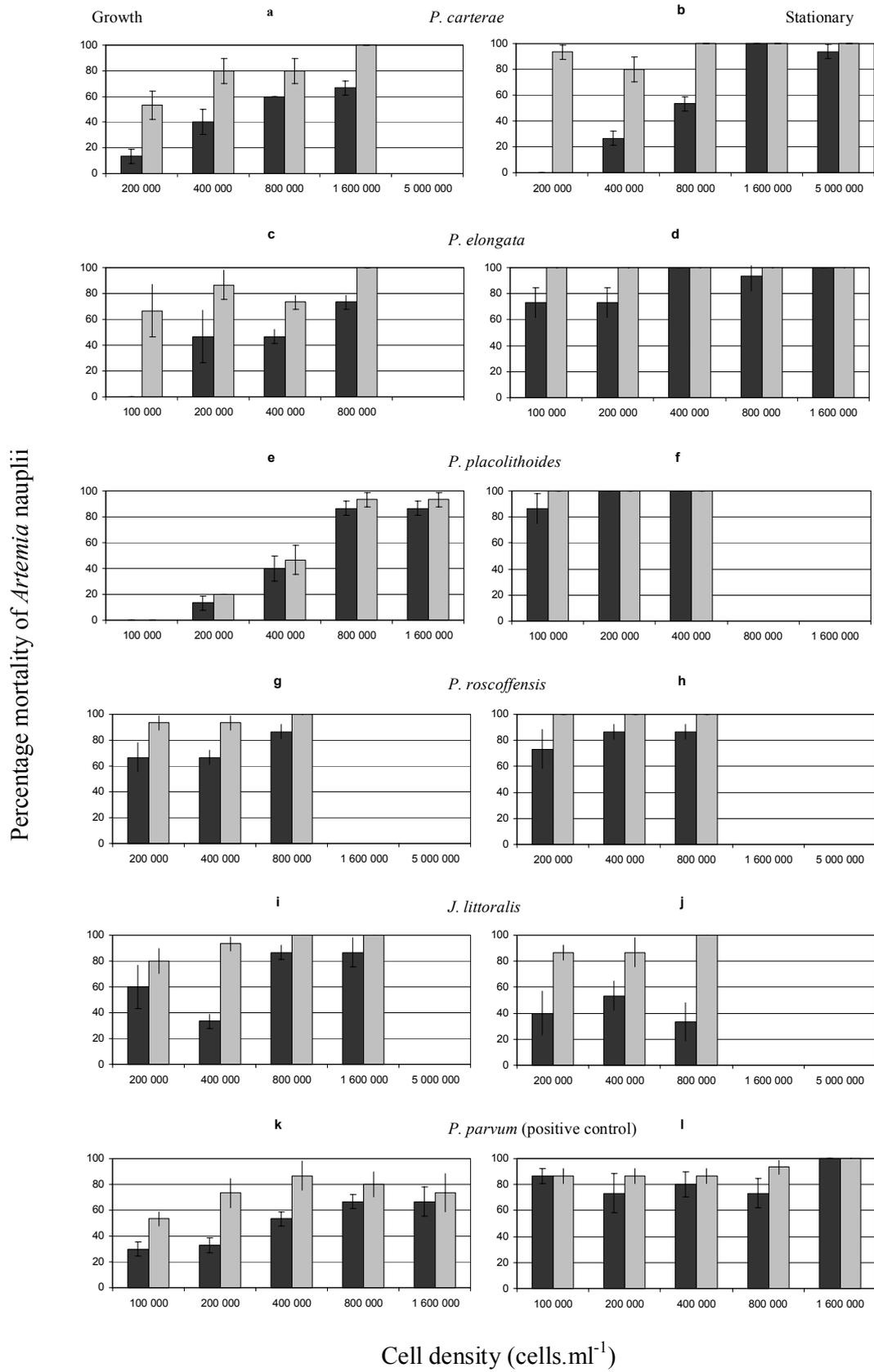
Two non-calcifying prymnesiophytes, *Isochrysis galbana* and *Prymnesium parvum*, were used as controls in the *Artemia* test (see below) and grown in exactly the same conditions as the coastal coccolithophores. *I. galbana*, along with two other strains from ALGOBANK, *Tetraselmis* sp. (AC260) and *Scripsiella trochoidea* (AC219), were used in the allelopathy tests and culture conditions are defined below.

2. Toxicity bioassay

Artemia tests were performed following the protocol of the Artemia Reference Center with some minor modifications. *Artemia* cysts (Hobby, Bonn, Germany) were incubated for 48h in 2 litres of sterile seawater under a 16:8 L:D photoperiod at room temperature with moderate aeration to achieve continuous suspension. After 48h an aliquot of hatched nauplii was collected and 5 individuals were transferred with approximately 50 µl of seawater into each of two hundred and fifty 5 ml tubes. Control tubes were filled with 5ml of sterile culture medium, and experimental tubes were each completed with 5ml of varying algal cultures and concentrations. Either three or four concentrations were tested for each algal culture (concentrations from 1×10^5 to 5×10^6 cells/ml depending on the species) in triplicate. Living and dead larvae were counted in each tube after 24h and 48h of exposure.

3. Allelopathy test

A stationary phase culture of *Pleurochrysis roscoffensis* was filtered on 1.2 µm Whatman GF/C glass fibre filters to eliminate cells and subsequently through 0.22 µm cellulose acetate membrane filters for sterilisation. The filtrate obtained was enriched with K/5 medium supplements (Keller *et al.*, 1987). Three species, *Isochrysis galbana*, a prasinophyte *Tetraselmis* sp. and the dinoflagellate *Scripsiella trochoidea* were cultured in this enriched *Pleurochrysis* filtrate (all three species were grown in K/5 medium prior to the experiment) in 15 ml borosilicate tubes. Each of these species was also cultured in both K/5 and K/2 medium as controls. Growth was monitored by recording *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence daily (at the same point in the L:D cycle) using a Turner Designs 700 fluorimeter. Growth rate 'k' was calculated following the formula $k = \ln(C/C_0)/t$, with C being the fluorescence reading at 5 days, C_0 initial fluorescence, and t the time of experiments (t=5 days, end of exponential phase of *Isochrysis galbana*).



4. Statistical analyses and DL50

Statistical analyses were conducted with Statgraphs software, using the Kuskall-Wallis test with $p = 0,05$. The DL50 was obtained with a linear regression between cell concentration and percentages of mortality of *Artemia* nauplii. This index represents the microalgal cell concentration which leads to 50% mortality of *Artemia*.

III. RESULTS

1. Toxicity

Among the eleven species of coccolithophores tested here, six were non-toxic to *Artemia salina* larvae: *Hymenomonas coronata*, *H. globosa*, *Ochrosphaera neapolitana* and *Pleurochrysis dentata* (coastal species), *Calcidiscus leptoporus* and *Coccolithus braarudii* (oceanic species). For all of these species, as for the negative (non-toxic) control species *Isochrysis galbana*, there was 0% mortality of *A. salina*, both in growth and stationary phases, and at all of the cellular concentrations tested. There was also 0% mortality after 48h in the control tubes with sterile medium only.

Five species of coastal coccolithophore belonging to the genera *Pleurochrysis* or *Jomonolithus* showed some degree of toxicity to brine shrimp with up to 100% mortality of *Artemia* nauplii (Figure 1, Table 3).

Figure 1: Graphical representation of the percentage mortality of *Artemia* nauplii as a function of algal cell concentration for the following species (a) *Pleurochrysis carterae* growth phase, (b) *P. carterae* stationary phase; (c) *P. elongata* growth phase, (d) *P. elongata* stationary phase ;(e) *P. placolithoides* growth phase, (f) *P. placolithoides* stationary phase; (g) *P. roscoffensis* growth phase, (h) *P. roscoffensis* stationary phase; (i) *Jomonolithus littoralis* growth phase, (j) *J. littoralis* stationary phase; (k) *Prymnesium parvum* growth phase, (l) *P. parvum* stationary phase. In black 24h of exposure and in grey 48h.

Figure VIII-1: Représentation graphique du pourcentage de mortalité des nauplii d'*Artemia salina* en fonction de la concentration en algues pour les espèces suivantes: (a) *Pleurochrysis carterae* phase exponentielle, (b) *P. carterae* phase stationnaire; (c) *P. elongata* phase exponentielle, (d) *P. elongata* phase stationnaire;(e) *P. placolithoides* phase exponentielle, (f) *P. placolithoides* phase stationnaire; (g) *P. roscoffensis* phase exponentielle, (h) *P. roscoffensis* phase stationnaire; (i) *Jomonolithus littoralis* phase exponentielle, (j) *J. littoralis* phase stationnaire; (k) *Prymnesium parvum* phase exponentielle, (l) *P. parvum* phase stationnaire. En noir 24h d'exposition et en gris 48h.

Table 3. DL 50 of the five toxic species and *Prymnesium parvum* (positive control)**Tableau VIII-3:** DL 50 des cinq espèces toxiques et de *Prymnesium parvum* (témoin positif)

Time of exposure	Growth phase		Stationary phase	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Pleurochrysis carterae</i>	750 000	<200 000	800 000	<200 000
<i>Pleurochrysis elongata</i>	500 000	<100 000	<100 000	<100 000
<i>Pleurochrysis placolithoides</i>	650 000	600 000	<100 000	<100 000
<i>Pleurochrysis roscoffensis</i>	<200 000	<200 000	<200 000	<200 000
<i>Jomonlithus littoralis</i>	250 000	<200 000	300 000	<200 000
<i>Prymnesium parvum</i>	500 000	<100 000	<100 000	<100 000

Pleurochrysis carterae caused 100% mortality of *Artemia* nauplii at the highest cell concentration in growth phase after 48 h of exposure (Figures 1 a and b). In the stationary phase culture, 100% mortality was obtained at 1 600 000 cells.ml⁻¹ for 24 h of exposure and at 800 000 cells.ml⁻¹ after 48 h. The DL50 for *P. carterae* was similar in growth and stationary phases, but variable with the time of exposure (Table 3).

The toxic effect of *P. elongata* was similar to that of *P. carterae* in the growth phase, but 100% mortality of nauplii was recorded at the lowest cell concentration after 48h of exposure (Figure 1 c and d). The DL50 differed between growth and stationary phase and between 24h and 48h of exposure for the growth phase culture (Table 3).

For *P. placolithoides* there was a very different mortality of *Artemia* between growth and stationary phase cultures. In the growth phase, none of the cell concentrations led to 100% mortality of *Artemia* (Figure 1 e and f). However, in the stationary phase culture, there was 80% mortality at the lowest cell concentration tested after 24h of exposure, and 100% mortality for all other concentrations and at all concentrations after 48h of exposure. The DL50 differed between the growth and the stationary phases (Table 3).

P. roscoffensis caused more than 60% mortality of *Artemia* after 24h of exposure in the growth phase and more than 80% at 48h, with 100% at the highest cell concentration (Figures 1 g and h). In the stationary phase culture, after 24h of exposure, the percentages of mortality were similar to those of the growth phase culture, but after 48h 100% mortality was reached for all concentrations tested. The DL50 was inferior at the lowest concentration tested in both growth and stationary phases (Table 3).

J. littoralis caused 100% mortality of *Artemia* at and above 800 000 cells.ml⁻¹ in the growth phase after 48h of exposure (Figures 1 i and j). After 24h of exposure, mortality was below 85%. In the stationary phase culture, mortality was maximal (100%) at the highest concentration tested after 48h of exposure. The DL50 was similar between growth and stationary phases at between 250 000 and 300 000 cells.ml⁻¹ after 24h and less than 200 000 cells.ml⁻¹ after 48h of exposure (Table 3).

P. parvum (Figures 1 k and l) did not cause 100% mortality in the growth phase, but reached this percentage at the highest cell concentration tested in the stationary phase culture after both 24 and 48h of exposure. The DL50 differed between 24h and 48h of exposure in the growth phase, with 500 000 cells.ml⁻¹ for 24h and less than 100 000 for 48h. In the stationary phase, the DL50 was in both cases less than 100 000 cells.ml⁻¹ (Table 3).

2. Effect of culture age

Statistically, there were no differences ($p > 0,05$) in toxicity between rapid growth and stationary phase cultures for three of the five toxic species tested here. Cultures of *P. elongata* and *P. placolithoides* were significantly more toxic ($p < 0,05$) during the stationary phase.

3. Effect of algal cell concentration

While the five toxic species were typically more toxic at higher cell concentrations (Figure 1), only three species, *P. carterae*, *P. elongata*, and *P. placolithoides*, presented statistically positive ($p < 0,05$) effects. For *P. roscoffensis* and *J. littoralis*, the negative effect of cell concentration on mortality was a result of high mortality of *A. salina* nauplii at low cell concentrations of these coccolithophores.

4. Effect of exposure time

The time of exposure (24h or 48h) had an effect on mortality of *Artemia* for three of the coccolithophores tested. *P. carterae* and *P. elongata* were significantly more toxic ($p < 0,05$) after 48h of exposure, in both growth and stationary phase cultures (Table 3). The effect of *P. placolithoides* was similar to that of *P. carterae* in rapid growth phase, but for the stationary phase culture all of the *Artemia* died after 24h, precluding statistical tests. *P.*

roscoffensis and *J. littoralis* also induced a high mortality rate (100%) after 24h, without the possibility of testing a time effect.

5. Allelopathy

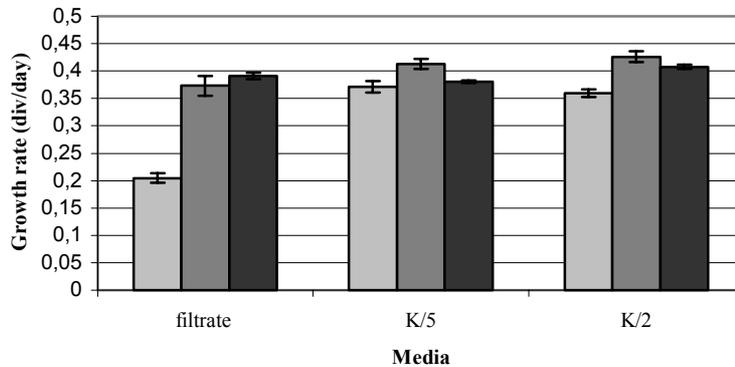


Figure 2. Growth rates of *Scripsiella trochoidea*, *Tetraselmis* sp. and *Isochrysis galbana* in an enriched cell-free filtrate of *Pleurochrysis roscoffensis* compared to control cultures (grey : *Tetraselmis* sp.; dark-grey: *S. trochoidea* ; black : *I.galbana*).

Figure VIII-2. taux de croissance de *Scripsiella trochoidea*, *Tetraselmis* sp. et *Isochrysis galbana* dans un milieu enrichi à base de filtrat de culture de *Pleurochrysis roscoffensis* et dans les deux milieux témoins (gris : *Tetraselmis* sp.; gris foncé: *S. trochoidea* ; noir : *I.galbana*).

The growth response in the control media (K/5 and K/2) of two of the test species, *Scripsiella trochoidea* and *Tetraselmis* sp (Figure 2), was similar, but both of these species were more or less inhibited by the cell-free filtrate of *P. roscoffensis* (respectively 10 and 45% inhibition). Moreover, the cells of these flagellates lost their ability to swim. In contrast, there was no alteration of growth rate or motility for the prymnesiophyte *Isochrysis galbana* when grown in the cell-free filtrate of *P. roscoffensis* (Figure 2).

IV. DISCUSSION

In this study, five coastal coccolithophore species, *Pleurochrysis carterae*, *P. elongata*, *P. placolithoides*, *P. roscoffensis* and *Jomonolithus littoralis*, were demonstrated to be toxic using the brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. Three of these, *P. elongata*, *P. placolithoides*, and *P. roscoffensis*, were more toxic (DL50, Table 3) than *Prymnesium parvum*, the positive control. *J. littoralis* was more toxic than *P. parvum* during the growth phase but equally or less toxic in the stationary phase. *Pleurochrysis carterae* had a toxic

effect similar to that of the positive control in the growth phase, but lower in the stationary phase. The other coastal coccolithophores examined in this study, *Hymenomonas coronata*, *H. globosa*, *Ochrosphaera neapolitana* and *Pleurochrysis dentata*, were non-toxic to *A. salina* (0% mortality).

Emiliania huxleyi and *Gephyrocapsa oceanica*, two species commonly found in open-ocean environments, were previously shown to be non-toxic using the same brine shrimp lethality assay by Rhodes *et al.* (Rhodes *et al.*, 1995). Our results demonstrate that cultures of two other oceanic species, *Calcidiscus leptoporus* and *Coccolithus braarudii*, are also non-toxic to brine shrimp.

Within the range of coccolithophores tested so far, two major groups featuring potentially toxic species may be defined, which correspond to the families Pleurochrysidaceae and Hymenomonadaceae. In this work, five of the nine described species belonging to the Pleurochrysidaceae were studied. Four of these were found to be toxic to *Artemia* and one of the remaining species of this genus, *Pleurochrysis pseudoroscoffensis*, was previously suggested also to be toxic (Reifel *et al.*, 2001). All members of the Pleurochrysidaceae for which toxicity has been tested, with the exception of *P. dentata*, are, therefore, toxic to *Artemia*. Toxicity of microalgae being dependent on culture conditions (Johansson and Granéli, 1999), all of our experiments were realised in the same conditions and the lack of toxicity of *P. dentata* is significant. This organism, originally described as *P. carterae* var *dentata*, was discovered in an inland saline pond in New Mexico (USA), far removed from coastal waters (Johansen *et al.*, 1988), in contrast to other members of the genus *Pleurochrysis* which are typically found in coastal marine environments. Formally considered as a simple variety of *P. carterae*, this taxon has recently been raised to the species level as *P. dentata* following molecular studies of genetic markers (Sáez *et al.*, 2003). Whereas *P. carterae* is toxic, *P. dentata* is not, and our results provide further support for the conclusion that this coccolithophore is a distinct species which occupies an isolated position within the Pleurochrysidaceae.

The family Hymenomonadaceae, with a number of members tested here, seems to have a majority of non-toxic species. *Ochrosphaera neapolitana* was previously found to be toxic to the bryozoan *Electra pilosa* (Jebram, 1980), but there is no confirmation of its toxicity to invertebrates using the *Artemia* test. Jebram found several haptophytes to be toxic for this bryozoan, but for the majority of these (*Chrysochromulina brevifilum*, *C. kappa*, *C.*

strobilus), this toxicity has not been confirmed in subsequent studies (Moestrup and Thomsen, 1995). Both species of *Hymenomonas* tested here proved also to be non-toxic.

The last coccolithophore tested, *Jomonolithus littoralis*, is the only member of this genus with distinctive heterococcoliths (Inouye and Chihara, 1983) which was classified as *Incertae sedis* by Jordan and Green (Jordan and Green, 1994). Based on its internal cellular organisation, this coastal species shows affinities with both the Pleurochrysidaceae and the Hymenomonadaceae (Inouye and Chihara, 1983). At present, the family Pleurochrysidaceae contains the single genus *Pleurochrysis* where coccolithogenesis is distinctive, implying discrete coccolithosomes (Outka and Williams, 1971). Because of the absence of coccolithosomes in *J. littoralis*, Billard and Inouye (Billard and Inouye, in press) tentatively placed this species in the Hymenomonadaceae. With respect to toxicity, *J. littoralis* is closer to the Pleurochrysidaceae where most of the toxic species of coccolithophores belong. Clearly more data are needed to clarify the taxonomic position of this enigmatic species which may in fact belong to a family of its own.

The toxins of two non-calcifying members of the Prymnesiophyceae, *Prymnesium parvum* (Igarashi *et al.*, 1993) and *Chrysochromulina polylepis* (Yasumoto *et al.*, 1990), have been studied in recent years, and in both cases it appears that these toxins are haemolytic compounds. Allelopathic tests were carried out with *C. polylepis* by Myklestad *et al.* (Myklestad *et al.*, 1995), who showed that addition of dense suspensions or filtrates of this flagellate to cultures of the diatom *Skeletonema costatum* resulted in growth inhibition. The fact that filtrates could inhibit growth were interpreted as indicating that the *C. polylepis* toxin is an exotoxin. Schmidt and Hansen (Schmidt and Hansen, 2001) showed that dinoflagellates exposed to suspensions of *C. polylepis* lost their motility, and growth rates were also reduced. Allelopathy of *Prymnesium parvum* was demonstrated by Granéli and Johansson (Granéli and Johansson, 2000) who studied the effect of nutrient conditions on this ability. Also using cell-free filtrates, these authors confirmed the exotoxin nature of the *P. parvum* compounds. Concerning *Phaeocystis pouchetii*, Hansen *et al.* (Hansen *et al.*, 2003) concluded that senescent colonial cells excreted an anti-mitotic compound to their surroundings. Our study has shown that cell-free filtrates of a *P. roscoffensis* culture have a negative effect on growth rates and motility of *Tetraselmis* sp. and *Scripsiella trochoidea*. The prymnesiophyte *Isochrysis galbana* was unaffected by the *Pleurochrysis* filtrates. These results indicate that the coccolithophore produces an extracellular substance with allelopathic effects on other, unrelated, flagellate microalgal species. Consequently, we suggest that the toxin of *P.*

roscoffensis is an exotoxin, which could be similar to that produced by other non-calcifying members of the Prymnesiophyceae, namely *C. polylepis* and *P. parvum*. Both of these flagellates belong to the Prymnesiales, an order which is phylogenetically closer to the Coccolithales (containing the toxic coccolithophores) than the Phaeocystales in which *Phaeocystis pouchetii* is classified (Edwardsen *et al.*, 2000). To further test the hypothesis that *Pleurochrysis* toxins are similar to those of members of the Prymnesiales, it would be interesting to screen the toxic coccolithophore species for haemolytic compounds.

Allelopathy seems to be a significant factor affecting the interaction between different species of phytoplankton and consequently phytoplankton succession (Keating, 1978). Production of allelochemicals could be an important ecological strategy for species with a moderate growth rate such as *Prymnesium parvum* (Brand, 1984; Fistarol *et al.*, 2003) and the majority of *Pleurochrysis* species (in this study, the growth rate of the *Pleurochrysis* species tested was inferior to that of *P. parvum*). Fresnel *et al.* (Fresnel *et al.*, 2001) reported that the slow growing *Prymnesium zebrinum* was toxic, while *Prymnesium annuliferum* which grows very rapidly and produces dense cultures, showed no signs of toxicity. The release of toxins to the surrounding water may explain how slow-growing species can occasionally bloom.

Certain ubiquitous coccolithophores, such as *Emiliania huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, and *Coccolithus pelagicus* are well-known bloom-forming organisms (Paasche, 2001; Rhodes *et al.*, 1995), but these are all oceanic species which are apparently non-toxic. In recent years, a number of localised blooms of coastal coccolithophores have been observed. In France, for example, *P. roscoffensis* or *P. pseudoroscoffensis* may proliferate, generally during the autumn, in oysters ponds or water reservoirs for aquaculture in various localities along the coast (unpublished observations, with records since 1993). A bloom of *Pleurochrysis* sp. was recorded in August 1995 in Malmö (Sweden) and mortality of ducks was noted (C. Legrand, pers. com.). Reifel *et al.* (Reifel *et al.*, 2001) reported dense populations of *P. pseudoroscoffensis* in the Salton Sea (California) during February-August 1999, but concluded that such blooms were probably not toxic to vertebrates using the mouse bioassay.

According to the present study, certain coccolithophores are susceptible to be toxic to invertebrates and further tests should be performed to assess their haemolytic capacities. Considering the capacity of certain of these species to bloom in secluded coastal environments (e.g. oyster ponds), and their ability to excrete toxic allelochemicals, the

possible impact on aquaculture of these coccolithophores, and particularly *Pleurochrysis* species, should be considered in the future.

Acknowledgements

This work was conducted with the financial support of the Conseil Regional de Basse Normandie, the Agence de l'Eau Seine Normandie and the EC funded CODENET (Coccolithophore Evolutionary Biodiversity and Ecology) network.

Chapitre IX :



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Photo: M.Geisen

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'analyse des pratiques culturelles des coccolithophores a permis de mettre en évidence un manque certain de données concernant le groupe, avec seulement deux espèces bien connues, l'une océanique *Emiliana huxleyi* et l'autre côtière *Pleurochrysis carterae*. Pourtant, de par le monde et notamment dans la collection (ALGOBANK) du laboratoire, d'autres souches de ce groupe existent et des expérimentations sur ce matériel en culture permettraient de mieux comprendre la biologie des coccolithophores et par la suite de mieux appréhender leur écologie par le biais de leur écophysiologie.

Cette thèse s'est donc centrée sur ces notions en étudiant plus particulièrement le cycle de développement et son rôle dans l'écologie de plusieurs coccolithophores. Quatre espèces ont été sélectionnées parmi les nombreuses souches du laboratoire, en raison de leur changement de phase observé en culture au laboratoire au cours de ces trois dernières années de culture au laboratoire : *Coccolithus braarudii*, *Calcidiscus leptoporus*, *Coronosphaera mediterranea* et *Emiliana huxleyi*. L'observation directe de leur morphologie externe (écailles et coccolithes) et de phénomènes sexuels comme la méiose et la fécondation a permis d'émettre des hypothèses quant à la ploïdie de ces phases. Des mesures de la quantité relative d'ADN (par cytométrie en flux sur des noyaux isolés et marqués par un marqueur fluorescent) de chacune des deux phases de ces espèces ont confirmé le fait que ces deux générations présentent un niveau de ploïdie différent : la phase à hétérococcolithes étant diploïde et la phase alternante haploïde. Au sein des haptophytes, il apparaît que ce cycle digénétique haplodiplophasique hétéromorphe pourrait être commun à toutes les Prymnesiophyceae (incluant l'ensemble des coccolithophores et des genres non calcifiés comme *Prymnesium*, *Chrysochromulina*, *Phaeocystis*...).

Les quatre espèces étudiées ici présentent deux types de cycles morphologiquement différents : l'un avec une alternance hétérococcolithophore / holococcolithophore, l'autre avec alternance entre une hétérococcolithophore et une phase non calcifiée. Pour chacune des espèces, les deux phases ont été maintenues en culture monophasique. Dans le cadre d'une étude préliminaire réalisée en DEA (Houdan, 2000) un cycle écologique hypothétique a été proposé pour *Coccolithus braarudii* et basé sur les comportements de ses deux phases vis-à-vis des sels nutritifs. Au cours du présent travail, l'influence de quatre facteurs abiotiques différents (température, turbulence, sels nutritifs et lumière) a été étudiée et l'expérimentation

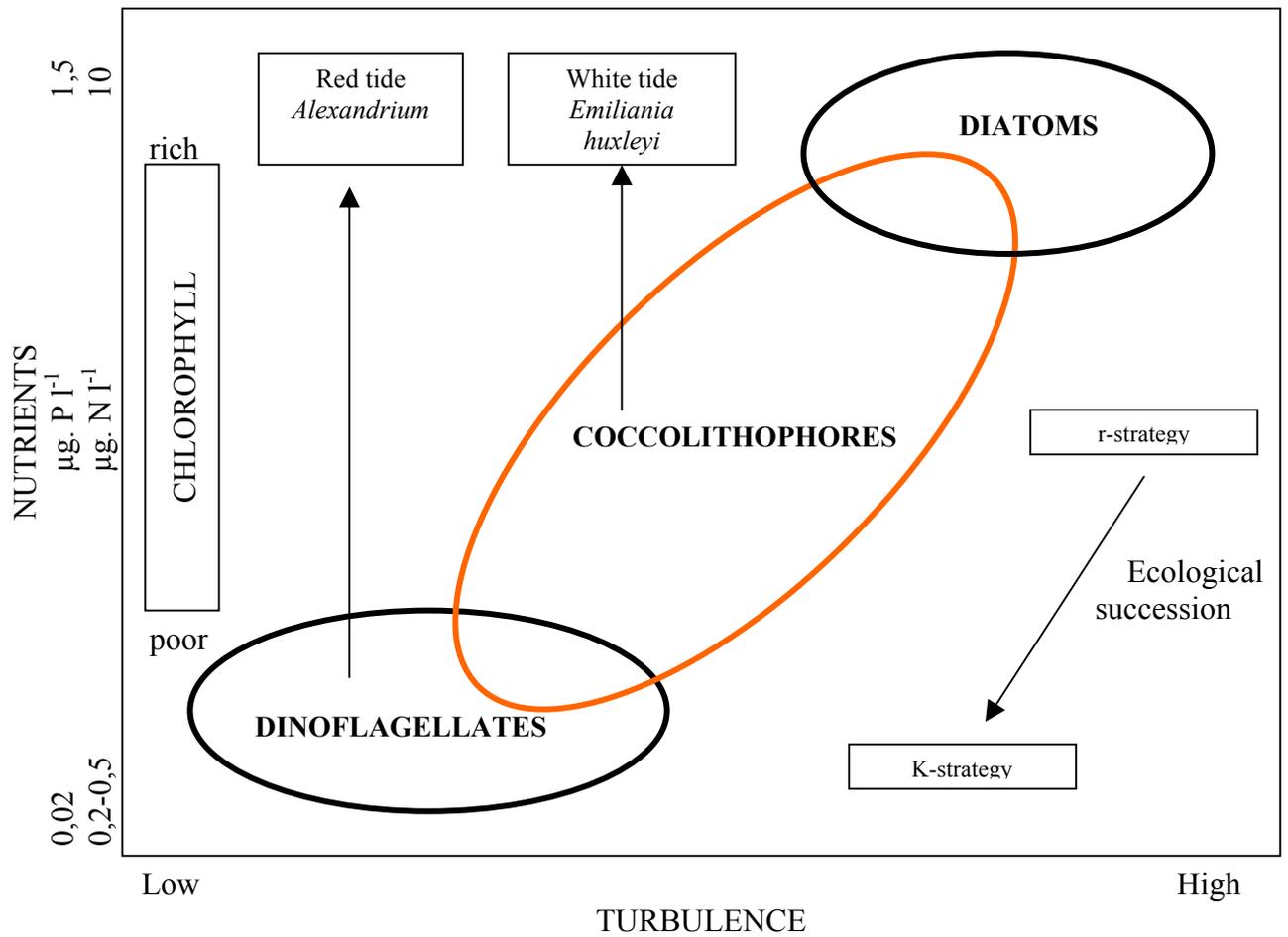


Figure IX-1 : Niches écologiques des trois principaux groupes phytoplanctoniques (diatomées, dinoflagellés et coccolithophores) en fonction des nutriments et de la turbulence, d'après Margalef (1983).

étendue à d'autres coccolithophores. Les résultats ont montré que des variations inter et intraspécifique existent, en fonction de l'écologie propre de chaque espèce, mais qu'un cycle écologique similaire peut effectivement s'appliquer à trois d'entre elles. Chez *Coccolithus braarudii*, *Calcidiscus leptoporus* et *Coronosphaera mediterranea*, à alternance hétéro / holococcolithophore chacune des phases occuperait une niche écologique différente (les deux niches étant séparées géographiquement ou spatialement). La phase haploïde (à holococcolithes) occuperait des environnements stratifiés, plutôt pauvres en sels nutritifs, avec des températures relativement chaudes et une intensité lumineuse assez élevée ; cette phase flagellée posséderait des capacités d'hétérotrophie et serait capable de migrations verticales (phototactisme positif chez certaines espèces). Cette génération haploïde manifesterait un comportement semblable aux espèces phytoplanctoniques à stratégie K, type dinoflagellés (Figure IX-1). La phase diploïde non mobile, qui peut résister à des conditions de turbulence (à l'exception de *Coronosphaera mediterranea*, flagellée), présente un optimum de température plus bas, peut se développer en conditions d'intensité lumineuse faible, mais indique une préférence pour des milieux non carencés en sels nutritifs. Cette génération diploïde montre une stratégie de développement plus proche de celles des diatomées de type r (Figure IX-1). Les coccolithophores avec leur cycle écologique particulier par rapport aux deux autres principaux groupes phytoplanctoniques (diatomées et dinoflagellés) pourraient ainsi présenter les deux types de stratégies, r et K, suivant leur phase. Les changements de phase seraient déclenchés par des conditions de stress (turbulence, faibles intensités lumineuses...).

Pour les deux espèces tempérées, *Coccolithus braarudii* et *Calcidiscus leptoporus*, les niches des deux phases seraient séparées temporellement (Figure IX-2). Chez *Coronosphaera mediterranea*, la séparation des deux niches serait plutôt spatiale, à différents niveaux dans la colonne d'eau, celle-ci demeurant beaucoup plus stratifiée tout au long de l'année dans les zones de répartition de cette espèce d'eau chaude ; cette stratégie est potentiellement liée au fait que les deux phases sont ici flagellées. Les deux phases de *C. mediterranea* pourraient cohabiter, l'une ou l'autre étant plus compétitive selon les conditions environnementales. Les changements de phase pourraient être liés à des modifications dans les masses d'eau, comme une diminution de la température pour un passage de la phase haploïde vers diploïde (et inversement). Ce changement pourrait de fait être soumis à une saisonnalité (en hiver la température de l'eau diminue même si la thermocline se maintient).

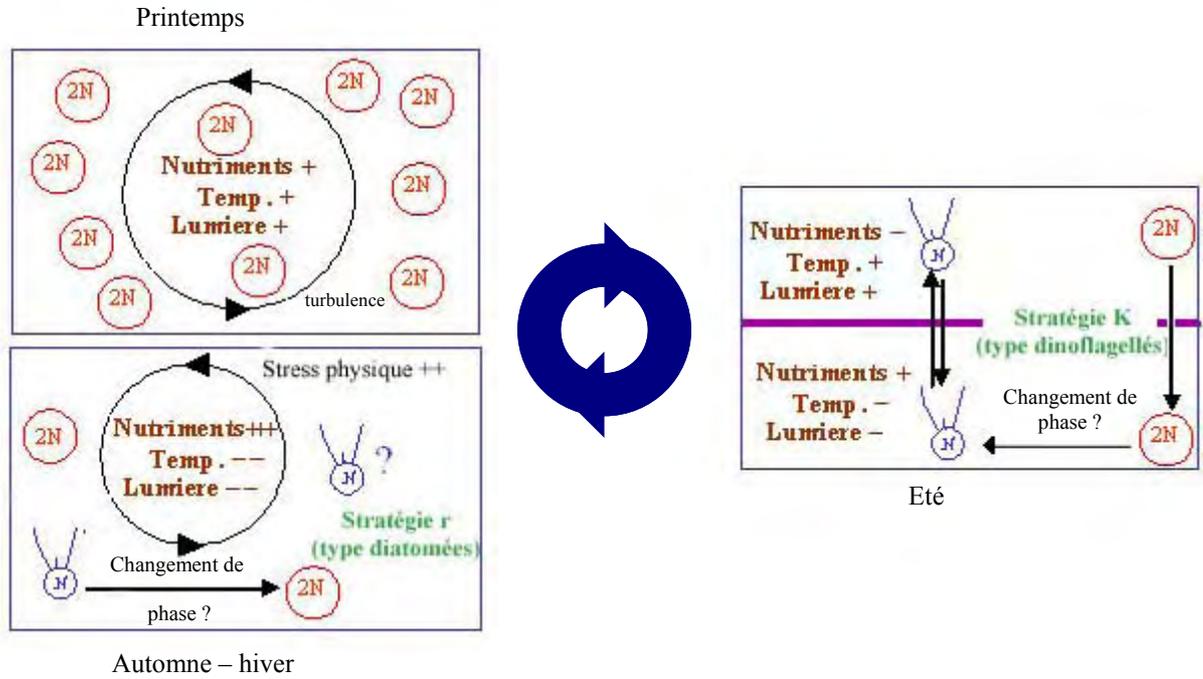


Figure IX-2 : Cycle écologique hypothétique pour *Cocolithus braarudii* et *Calcidiscus leptopus*, phase haploïde et diploïde.

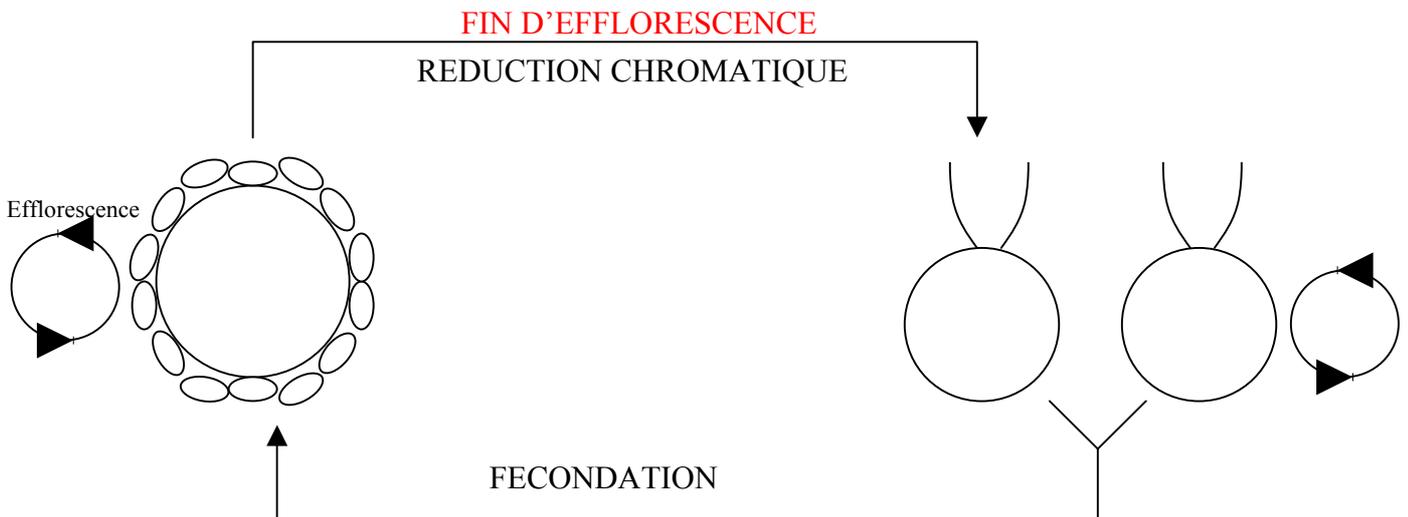


Figure IX-3 : Cycle écologique hypothétique d'*Emiliana huxleyi*.

D'autres espèces océaniques à alternance hétérococcolithophore/holococcolithophore ont une forte probabilité d'occuper des niches écologiques différentes, comme par exemple *Helicosphaera carteri*, dont les données de répartition spatiale et temporelle (Cros, 2002) indiquent un cycle proche de celui de la figure IX-2.

Des suivis temporels de sites de référence où sont couramment rencontrés ces différentes espèces permettraient de pouvoir confirmer ce cycle écologique de type océanique.

De même, les coccolithophores côtiers comme *Pleurochrysis*, à phase diploïde nageuse à coccolithes et à phase haploïde benthique, doivent présenter des exigences écologiques variables suivant les générations.

Les études écophysologiques devraient être étendues à d'autres coccolithophores et notamment aux espèces côtières, pour affiner l'hypothèse présentée ici de cycle écologique en rapport étroit avec le cycle biologique (digénétique) des coccolithophores.

Le cas d'*Emiliana huxleyi*, espèce cosmopolite et ubiquiste, est différent. Le manque de données en milieu naturel et le peu d'études consacrées jusqu'ici à sa phase haploïde flagellée laissent supposer que son rôle est sous-estimé, voire méconnu. Nos résultats comparatifs montrent que les deux générations mobile et non mobile de son cycle ont des exigences écologiques très proches avec une nuance importante par rapport à la photoinhibition, la phase haploïde présentant ce phénomène contrairement à la phase diploïde. Des hypothèses ont été émises concernant le rôle putatif de la phase flagellée : influence dans la mise en place et la terminaison des blooms de la phase diploïde à coccolithes, vie plus en profondeur ou rôle plus temporaire de gamètes permettant la reproduction sexuée de l'espèce (Figure IX-3). Dans tous les cas, cette espèce est atypique par rapport aux autres coccolithophores océaniques.

L'occurrence et l'impact de la phase flagellée d'*Emiliana huxleyi* mériteraient d'être quantifiés dans le milieu naturel, et, en raison des difficultés d'observations directes, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire s'avérera sans doute nécessaire. Un suivi d'échantillons d'eau de mer contenant potentiellement cette espèce pourrait être réalisé, avec utilisation de sondes moléculaires spécifiques couplées à un marqueur fluorescent. La concentration totale de cellules d'*Emiliana huxleyi* étant connue après mesure de la fluorescence par cytométrie en flux, celle de la phase haploïde serait

déduite après séparation par cytométrie des deux types cellulaires (séparation basée sur la quantité relative d'ADN des noyaux).

Suite aux différents bioessais menés sur onze coccolithophores (9 côtières et deux océaniques), cinq se sont révélées toxiques pour les invertébrés (type *Artemia*). Ces coccolithophores toxiques appartiennent toutes à la famille des Pleurochrysidaceae sauf *Jomonolithus littoralis* (*Incertae sedis*). L'effet allélopathique potentiel de *Pleurochrysis roscoffensis* a été testé sur trois autres microalgues flagellées. Deux d'entre elles, une algue verte et un dinoflagellé, ont un taux de croissance inhibé et perdent leur mobilité dans un milieu à base de filtrat de cultures stationnaires de *P. roscoffensis*. La toxine produite par les coccolithophores testées semble donc être une exotoxine. A noter que la troisième microalgue, une prymnesiophyte non calcifiée, *Isochrysis galbana*, n'est pas affectée par la coccolithophore toxique.

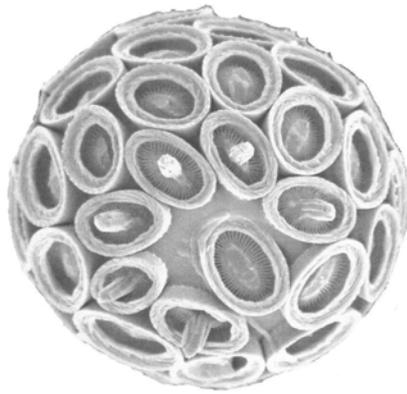
Certaines coccolithophores dont la toxicité potentielle a été démontrée ici, peuvent proliférer dans des lieux d'importance aquacole comme les claires ; leur toxicité pourrait donc avoir un retentissement sur les organismes croissant dans ces milieux comme les huîtres et autres bivalves d'intérêt économique.

Ces recherches sur les coccolithophores toxiques méritent donc d'être poursuivies, afin de déterminer notamment le mode d'action de l'exotoxine présente : activité hémolytique ou anti-mitotique ? sachant que ces deux types de toxines existent chez les Prymnesiophyceae non calcifiée. Des tests hémolytiques (sur érythrocytes de vertébrés) devront être réalisés pour tester la première éventualité. Quant à l'activité anti-mitotique, les tests sur la fécondation et le développement d'œufs et d'embryons d'oursins apportent des résultats clairs, certaines toxines de microalgues ayant été montrées comme affectant l'assemblage des microtubules, le signal de transduction et de réplication de l'ADN, ainsi que l'activité certaines protéines régulatrices (voir Hansen *et al.*, 2003). Ces tests nécessiteraient d'abord une extraction puis une purification du ou des composés toxiques des coccolithophores par le biais de l'HPLC.

Par la suite et du fait de la présence fréquente de coccolithophores côtières potentiellement toxiques dans les claires à huîtres, des bioessais sur ces bivalves pourraient apporter des informations importantes sur l'impact physiologique de cette (ces) toxine(s) et permettraient de déterminer si une surveillance floristique régulière des

claires s'avère nécessaire. De plus, les premiers résultats obtenus indiquent qu'un effet allélopathique est lié à ce ou ces composés, ce qui implique des modifications de la flore lors d'une prolifération de ces coccolithophores.

Là encore il serait important de poursuivre les investigations dans cette voie afin de mieux comprendre les interactions entre espèces phytoplanctoniques co-occurrentes et coccolithophores potentiellement toxiques qui pourraient influencer sur ces écosystèmes et sur la nutrition des organismes filtreurs. Sachant que les coccolithophores définies comme toxiques ici présentent toutes une générations benthiques dans leur cycle de vie, leur impact sur les organismes brouteurs pourrait également être évalué.



BIBLIOGRAPHIE

Photo: A.Houdan

A

- Alcober J. et R.W. Jordan (1997). An interesting association between *Neosphaera coccolithomorpha* and *Ceratolithus cristatus* (Haptophyta). *Eur. J. Phycol.y.* **32**: 91-93.
- Allen E.J. et E.W. Nelson (1910). On the artificial culture of plankton organisms. *J. Mar. Biol. Ass. UK* **8**: 15- 28.
- Amon R.M.W. et R. Benner (1994). Rapid cycling of high-molecular weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature* **369**: 549-552.
- Andersen R.A. (1992). Diversity of eukaryotic algae. *Biodivers. Cons.* **1**:267-292.
- Andersen O.K. (1981). Coccolith formation and calcification in an N-cell culture of *Emiliana huxleyi* during phosphorus-limited growth in batch and chemostat cultures. Ph-D thesis. University of Oslo, 66p.
- Anderson D.M. (1998). Physiology and bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species, with emphasis on life cycle transitions. In: Anderson D.M., Cembella A.D. et G.M. Hallegraeff (eds) *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 29-48.
- Anderson D.M., Kulis D.M., Orphanus J.A. et A.R. Ceurvels (1984). Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*: cyst yield in batch cultures. *J. Phycol.* **20**: 418-425.
- Andruleit H. (1997). Coccolithophore fluxes in the Norwegian-Greenland Sea: seasonality and assemblage alterations. *Mar. Micropal.* **31**:45-64.

B

- Balch W.M., Kilpatrick K.A. et C.C. Trees (1996). The 1991 coccolithophore bloom in the central North Atlantic 1. Optical properties and factors affecting their distribution. *Limnol. Oceano.* **41**:1669-1683.
- Balch W.M., Holligan P.M. et K.A. Kilpatrick (1992). Calcification, photosynthesis and growth of the bloom-forming coccolithophores, *Emiliana huxleyi*. *Cont. Shelf Res.* **12**:1353-1374.

- Barker G.L.A., Green J.C., Hayes P.K. et L.K. Medlin (1994). Preliminary results using the RAPD analysis to screen bloom population of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). *Sarsia* **79**:301-306.
- Baumann K.-H., Young J.R., Cachao M. et P. Ziveri (2000). Biometric study of *Coccolithus pelagicus* and its palaeoenvironmental utility. Abstracts 8th INA Conference, Bremen, *Newsletter International Nannoplankton Association* **22**:82.
- Baumann K.-H., Andrulleit H., Schröder-Ritzrau A. et C. Samtleben (1997). Spatial and temporal dynamics of coccolithophores communities during low production phases in the Norwegian Greenland Sea. In: Hass H.C. et M.A. Kaminsky (eds) *Contribution to the micropaleontology and paleoceanography of the Northern North Atlantic*. Grybawski Foundation Special Edition Volume 5, pp227-243.
- Beech P.L. et R. Wetherbee (1988). Observations on the flagellar apparatus and peripheral endoplasmic reticulum of the coccolithophorid *Pleurochrysis carterae* (Prymnesiophyceae). *Phycologia* **27**:124-158
- Berge G. (1962). Discoloration of the sea due to *Coccolithus huxleyi* "bloom". *Sarsia* **6**: 27-41.
- Berges J.A., Franklin D.J. et P.J. Harrison (2001). Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *J. Phycol.* **37**: 1138-1145.
- van Bleijswijk J.D.L., Kempers R.S., Veldhuis M.J. et P. Westborek (1994). Cell and growth characteristics of types A and B of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) as determined by flow cytometric and chemical analyses. *J. Phycol.* **30**:230-241
- Billard C. (1994). Life cycles. In: Green J.C. & Leadbeater B.S.C. (eds.) *The Haptophyte Algae*. Systematics Association Special Volume No. 51. Clarendon Press, Oxford. pp 167-186.
- Billard, C. et I. Inouye (sous presse) What's new in coccolithophore biology ? In: Thierstein H.R. and Young J.R. (eds) *Coccolithophores - From molecular processes to global impact* SpringerVerlag, Germany.
- Bodas K., Brenning C., Diller K.R. et J.J. Brand (1995). Cryopreservation of Blue-green and Eukaryotic Algae in the Culture Collection at the University of Texas at Austin. *Cryo-letters* **16**:267-274.
- Borman A.H., Jong de E.W., Huizinga M., Kok D., Westbroek P. et L. Bosch (1982). The role in CaCO₃ crystallization of an acid Ca⁺⁺-binding polysaccharide associated with coccoliths of *E. huxleyi*. *Eur. J. Biochem.* **129**:179-183

- Bown P.R. et J.R. Young (1997). A generic level revision of calcareous nannofossil taxonomy. In: BOWN P.R. (ed.) *A Stratigraphical Atlas of Calcareous Nannofossils*. British Micropalaeontology Society Series.
- Boye M. et C.M.G. van den Berg (2000). Iron availability and the release of iron-complexing ligands by *Emiliana huxleyi*. *Mar. Chem.* **70**:277-287
- Braarud T. (1979). The temperature range of the non-motile stage of *Coccolithus pelagicus* in the North Atlantic region. *Br. phycol. J.* **14** :349-352.
- Braarud T. (1963). Reproduction in the marine coccolithophorid *Coccolithus huxleyi* in culture. *Pubblicazione della Stazione Zoologica di Napoli* **33**:110-116.
- Braarud T. (1954). Coccolith morphology and taxonomic position of *Hymenomonas roseola* Stein and *Syracosphaera carterae* Braarud and Fagerland. *Nytt. Mag. Bot.* **3**: 1-4.
- Braarud T. (1945). A phytoplankton survey of the polluted waters of inner Oslo fjord. *Hvalraadets Skrifter* **28**:1-142
- Braarud T., Gaarder K.R., Markali J. et E. Nordli (1952) Coccolithophorids studied in the electron microscope. Observations on *Coccolithus huxleyi* and *Syracosphaera carterae*. *Nytt. Mag. Bot.* **1**: 129-134.
- Braarud T. et E. Fagerland (1946). A coccolithophorid in laboratory culture *Syracosphaera carterae* n. sp. *Avh. Norske Vidensk. Akad i oslo I. Mat. -Naturv. Kl* **2**: 3-12
- Bramlette M.N. et W.R. Riedel (1954). Stratigraphic value of discoasters and some other microfossils related to recent coccolithophores. *J. Paleontol.* **28**:385-403.
- Brand L.E. (1994). Physiological ecology of marine coccolithophores In: Winter A. et W.G. Siesser (eds.) *Coccolithophores*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 39-49.
- Brand L.E. (1990). The isolation and culture of microalgae for biotechnological applications In: Labeda D.P. (ed.) *Isolation of biotechnological organisms from nature*. McGraw-Hills, New-York, pp. 81-115.
- Brand L.E. (1986). Nutrition and culture of autotrophic ultraplankton and picoplankton. *Can. Bull. Fish. Aqua. Sci.* **214**: 205-233.
- Brand L.E. (1984). The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuar. Coast. Shelf S.* **18**:543-556.
- Brand L.E. (1982). Genetic variability and spatial patterns of genetic differentiation in the reproductive rates of the marine coccolithophores *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Limnol. Oceanogr.* **27** (2) :236-245.
- Brand L.E. (1981). Genetic variability in reproduction rates in marine phytoplankton populations. *Evolution* **35**: 1117-1127.

- Brand L.E., Sunda W.G. et R.R.L. Guillard (1983) Limitation of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **96**:225-250.
- Brand L.E. et R.R.L. Guillard (1981). A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.* **3**: 193-201.
- Brand LE et R.R.L. Guillard (1981). The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **50**:119-132.
- Brown C.W. et J.A. Yoder (1994). Distribution pattern of coccolithophorid blooms in the Western North Atlantic Ocean. *Cont. Shelf Res.* **14**(2/3):175-198.
- Braarud T., Gaarder K.R., Markali J. et E. Nordli (1952). Coccolithophorids studied in the electron microscope. *Nytt. Mag. Bot.* **1**:129-134.
- Burns D.A. (1977). Phenotypes and dissolution morphotypes of the genus *Gephyrocapsa* Kamptner and *Emiliana huxleyi* (Lohmann). *N.Z. J. Geol. Geophys.* **20**(1):143-155.

C

- Cachão M. et M.T. Moita (2000). *Coccolithus pelagicus*, a productivity proxy related to moderate fronts off Western Iberia. *Mar. Micropal.* **39**: 131-155.
- Carlucci A.F. et P.M. Bowes (1970). Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed cultures. *J. Phycol.* **6**:393-400.
- Cavalier-Smith T. (1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell. Sci.* **34**:247-278.
- Chang, F.H. (1985). Preliminary toxicity test of *Prymnesium calathiferum* n. sp. isolated from New Zealand. In: Anderson D.M., White A.W. et D.G. Baden (eds). *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier Science Publishing, New York, pp. 109-112.
- Chrétiennot -Dinet M.-J. (1990). Classe des Prymnesiophyceae Hibberd, 1976. In: Edition du CNRS (ed) *Atlas du phytoplancton marin* Tome 3, Paris, pp. 75-106.
- Christensen T. (1962). *Botanik*, Vol. 2. Kobenhavn:Munksgaard, Alger , 178 pp.
- Cortés M.Y. (2000). Further evidence for the heterococcolith-holococcolith combination *Calcidiscus leptoporus*-*Crystallolithus rigidus*. *Mar. Micropal.* **39**:35-37.

- Cortés M.Y. et J. Bollmann (2002). A new combination coccosphere of the heterococcolith species *Coronosphaera mediterranea* and the holococcolith species *Calyptrolithina hasleana*. *Eur. J. Phycol.* **37**:145-146.
- Cosson J. (1987). Croissance des sporophytes issus d'hybridations interspécifiques et intergénériques chez les laminaires. *Cryptogamie Algol.* **8**(1):61-72.
- Costas E. et V. Lopez-Rodas (1991). Evidence for an annual rhythm in cell ageing in *Spirogyra insignis* (Chlorophyceae). *Phycologia* **30**:597-599.
- Costas E. et M. Varela (1989). Circannual rhythm in cyst formation and growth rates in the dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* Stein. *Chronobiologica* **16**:265-270.
- Cros, L. (2002). *Planktonic coccolithophores of the NW Mediterranean*. PhD Thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona: 181 pp
- Cros L. (2000). Variety of exothecal coccoliths of *Syracosphaera*. *Journal of Nannoplankton Research* **22**(1):41-51.
- Cros L. et J.-M Fortuño.(2002). Atlas of northwestern Mediterranean Coccolithophores. *Sci. Mar.* Special Issue No. 66.
- Cros L., Kleijne A., Zeltner A., Billard C. et J. Young (2000). New examples of holo/heterococcolithophorids combination coccospheres and their implications for coccolithophorids biology. *Mar. Micropal.* **39**:1-34.

D

- Danbara A. et Y. Shiraiwa (1999). The requirement of selenium for the growth of marine coccolithophorids *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* and *Helladosphaera* sp.(Prymnesiophyceae). *Plant Cell Physiol.* **40**: 762-766.
- Davidovich N.A. et S.S. Bates (1998). Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriis* and *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **34**:126-137.
- Destombe C. & A. Cembella (1990). Mating-type determination, gametic recognition and reproductive success in *Alexandrium excavatum* (Gonyaulacales, Dinophyta), a toxic red-tide dinoflagellate. *Phycologia* **29**:316-325.
- Drebes G. (1977). Sexuality. In: Werner D. (eds.) *Biology of diatoms*, University of California Press, Berkeley, pp.250-283.

- Droop M.R. (1974). Heterotrophy of carbon. In: Stewart W.D.P. (ed) *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. pp530-559.
- Dubinsky Z, Falkowsky P.G., Post A.F. et U.M. van Hes (1987). A system for measuring phytoplankton photosynthesis in a defined light field with an oxygen electrode. *J.Plankton Res.* **9**(4):607-612.

E

- Edvardsen B. et D. Vaultot (1996). Ploidy analysis of the two motile forms of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* **32**:94-102.
- Edvardsen B., Eikrem W., Green J.C., Andersen R.A., Moon-Van der Staay S.Y. et L.K. Medlin (2000). Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia* **39** (1) :19-35.
- Egge J.K et B.R. Heimdal (1994). Blooms of phytoplankton including *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). Effects of nutrients supply in different N:P ratios. *Sarsia* **79**:333-348.
- Eglinton T.I., Conte M.H., Eglinton G. et J.M. Hayes (2001). Proceedings of a workshop on alkenone-based paleoceanographic indicators. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* **2**:2000GC000122
- Eikrem, W. et J. Throndsen (1993) Toxic prymnesiophytes identified from Norwegian coastal waters. In: Smayda, T.J. and Y. Shimizu (eds) *Toxic phytoplanktonic blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam, pp 687-692.

F

- Faust M.A. et R.A. Gulledge (2002). Identifying harmful marine dinoflagellates. *Smithsonian contributions from the United States National Herbarium*, vol 42, 144p.
- Fistarol G.O., Legrand C. et E. Granéli (2003) Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **255**:115-125.

- Flynn K.J., Page S., Wood G. et C.R. Hipkin (1999). Variations in the maximum transport rates for ammonium and nitrate in the prymnesiophyte *Emiliania huxleyi* and the raphidophyte *Heterosigma carterae*. *J. Plankton Res.* **21**:355-371.
- Fresnel J. (1994). A heteromorphic life cycle in two coastal coccolithophorids, *Hymenomonas lacuna* and *Hymenomonas cornata* (Prymnesiophyceae). *Can. J. Bot.* **72** :1455-1462.
- Fresnel J. *Les coccolithophorides (Prymnesiophyceae) du littoral. Genres: Cricosphaera, Cruciplacolithu, Hymenomonas et Ochrosphaera, ultrastructure, cycle biologique, systématique.* Thèse, Université de Caen, 1989.
- Fresnel J. (1986). Nouvelles observations sur une Coccolithacée rare: *Cruciplacolithus neohelis* (McIntyre et Bé) Reinhardt (Prymnesiophyceae). *Protistologica* **22**: 193-204.
- Fresnel J. et I. Probert (sous presse). The ultrastructure and life-cycle of the coastal coccolithophorids *Ochrosphaera neapolitana* (Prymnesiophyceae). *Eur. J. Phycol.*
- Fresnel J., Probert I. et C. Billard, (2001) *Prymnesium faveolatum* sp. nov. (Prymnesiophyceae), a new toxic species from the Mediterranean Sea. *Vie et Milieu* **51**:89-97.
- Fresnel J. et C. Billard (1991). *Pleurochrysis placolithoides* sp. nov. (Prymnesiophyceae) a new marine coccolithophorid with remarks on the status of cricolith-bearing species. *Br. Phycol. J.* **26** :67-80.
- Fujiwara S., Tsuzuki M., Kawachi M., Minaka N. et I. Inouye (2001). Molecular phylogeny of the Haptophyta based on the *rbcL* gene and sequence variation in the spacer region of the Rubisco operon. *J. Phycol.* **37**: 121-129.

G

- Gaarder K.R. (1970). Three new taxa of Coccolithinae. *N. Mag. f. Bot.* **17**: 113-126.
- Gaarder K.R. et J. Markali (1956). On the Coccolithophorid *Crystallolithus hyalinus* n. gen., n. sp. *N. Mag. f. Bot.* **5** :1-6.
- Gaarder K.R. et B.R. Heimdal (1977). A revision of the genus *Syracosphaera* Lohmann (Coccolithineae). "*Meteor*" *Forsch.-Ergebnisse, Reihe D* **24**:54-71.
- Garrido J.L. et M. Zapata (1998). Detection of new pigments from *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) by high-performance-liquid-chromatography, liquid-

- chromatography-mass-spectrometry, visible spectroscopy and fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Phycol.* **34**:70-78.
- Gayral P. et J. Fresnel (1976). Nouvelles observations sur deux coccolithophoracées marines: *Cricosphaera roscoffensis* (P.Dangeard) comb.nov. et *Hymenomonas globosa* (F. Magne) comb.nov. *Phycologia* **15**(3-4):339-355.
- Gayral P. et J. Fresnel (1983). Description, sexualité et cycle de développement d'une nouvelle coccolithophoracée (Prymnesiophyceae): *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* sp. nov. *Protistologica*, **XIX** (2) :245-261.
- Gayral P. et J. Fresnel-Morange (1971). Resultats preliminaires sur la structure et la biologie de la coccolithacee *Ochrosphaera neapolitana* Schussnig. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Paris. Série D - Sciences Naturelles*, **273**:1683-1686.
- Geisen M., Billard C., Broerse A.T.C., Cros L., Probert I. et J. Young (2002). Life cycle associations involving pairs of holococcolithophorid species: Intraspecific variation or cryptic speciation ? *Eur. J. Phycol.* **37**:531-550.
- GEOHAB (2001) *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*, Science Plan. P. Golbert and G. Pitcher (eds). SCOR and IOC, Baltimore and Paris. 86pp.
- Giraudeau J. (1992). Coccolith paleotemperature and paleosalinity estimates in the Caribbean Sea for the Middle-Late Pleistocene (DSDP Leg 68-Hole 502B). *Memorie Scienze Geologiche, Padova* **43**:375-387.
- Giraudeau J., Monteiro P.M.S. et K. Nikodemus (1993). Distribution and malformation of living coccolithophores in the northern Benguela upwelling system off Namibia. *Mar. Micropal.* **22**:93-110.
- Granéli E. et N. Johansson (2000) Nitrogen or phosphorus deficiency increases allelopathy in *Prymnesium parvum*. In: Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J. et R.J. Lewis (eds) *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001.
- Green J.C. (1980). The fine structure of *Pavlova pinguis* and a preliminary survey of the order pavlovaes (Prymnesiophyceae). *Br. Phycol. J.* **15** :151-191.
- Green J.C. et K. Hori (1994). Flagella and flagellar roots. In: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds) *The Haptophyte Algae*. For the Systematics Association by Clarendon Press, Oxford, pp. 91-110.
- Green J.C. et P.A. Course (1983). Extracellular calcification in *Chrysotila lamellosa* (Prymnesiophyceae). *B. Phycol. J.*, **18** :367-382.

- Green J.C., Course P.A. et G.A. Tarran (1996). The life-cycle of *Emiliana huxleyi*: a brief review and a study of relative ploidy levels analysed by flow cytometry. *J. Marine Syst.* **9** :33-44.
- Green J.C., Perch-Nielsen K. et P. Westbroek (1989). Prymnesiophyta. In: Margulis L. et al. (eds.) *Handbook of Protoctista*. Jones & Bartlett, Boston, 293-317pp.
- Guillard R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates In: Corp P.P. (ed.) *Culture of marine invertebrate animals*, New -York, pp. 29-60.
- Guillard R.R.L. (1973). Division rates. In: Stein J.R. (ed) *Handbook of phycological methods, culture methods and growth measurements*. London, pp. 289-312.
- Guillard R.R.L. et M.D. Keller (1984). Culturing dinoflagellates In: Spectro D.L. (ed) *Dinoflagellates*, Academic Press, New York, 545 pp.

H

- Halldal P. et J. Markali (1955). Electron microscope studies on Coccolithophorids from the Norwegian Sea, the Gulf Stream and the Mediterranean. *Norske Vidensk.-Akad.Mat.-Nat.* **1**: 1-30.
- Hallegraeff G.M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**: 79-99.
- Hansen E., Eilertsen H.C., Ernstsén A. et A.-M. Genièvre (2003) - Anti-mitotic activity towards sea urchin embryos in extracts from the marine haptophycean *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim collected along the coast of northern Norway. *Toxicon* **41**: 803-812.
- Harada A. et T. Yamagishi (1984). Meiosis in *Spirogyra* (Chlorophyceae). *Japan Journal of Phycology* **32**: 10-18.
- Harrison P.J., Waters R.E. et F.J.R Taylor (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* **16**, 28-35.
- Heimdal B.R. (1993). Modern coccolithophorids. In: Tomas C.R. (ed) *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego, pp. 147-247.
- Holligan P. M., Viollier M., Harbour D. S., Camus P. et M. Champagne-Philippe (1983). Satellite and ship studies of coccolithophore production along a continental shelf edge. *Nature*, **304**:339-342.

- Holligan P.M., Fernández E., Aiken J., Balch W.M., Boyd P., Burkill P.H., Finch M., Groom S.B., Malin G., Muller K., Purdie D.A., Robinson C., Trees C.C., Turner S.M. et P. van der Wal (1993). A biochemical study of the coccolithophore, *Emiliana huxleyi*, in the north Atlantic. *Global Biogeochemical Cycles* **7**: 879-900.
- Houdan A. (2000). Influence de facteurs abiotiques sur la croissance et le cycle biologique de la coccolithophoride *Coccolithus pelagicus* (Haptophycées). Rapport de DEA Océanologie biologique et Environnement Marin, Université Pierre et Marie Curie, 30pp.
- Houdan A., Billard C., Marie D., Not F., Sáez A.G., Young J.R. et I. Probert (sous presse). Holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles: flow cytometric analysis of relative ploidy levels. *Systematic and Biodiversity*.
- Hulburt E.M. et N.A. Corwin (1969). Influence of the Amazon River outflow on the ecology of the western tropical Atlantic. *J. Mar. Res.* **27**: 55-72.

I

- Iestwaart T., Schneider P.J. et R.A. Prins (1994). Utilization of organic nitrogen source by two phytoplankton species and a bacterial isolate in pure and mixed culture. *Appl Environ. Microbiol.* **60**:1554-1560.
- Igarashi T., Oshima Y., Murata M. et T. Yasumoto (1993). Chemical studies on prymnesins isolated from *Prymnesium parvum*. In: *Sixth International conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Nantes, France, 18-22 october 1993, abstracts, p.103.
- Inouye I. et M. Kawachi (1994). The haptonema. In: Green J.C. et Leadbeater B.S.C. (eds.) *The Haptophyte Algae*. Systematics Association Special Volume No. 51. Clarendon Press, Oxford. pp 73-90.
- Inouye I. et R.N. Pienaar (1984) New observations on the coccolithophorid *Umbilicosphaera sibogae* var. *foliosa* (Prymnesiophyceae) with reference to cell covering, cell structure and flagellar apparatus. *Br. Phycol. J.* **19**: 357-369.
- Inouye I. et M. Chihara (1983). Ultrastructure and taxonomy of *Jomonolithus littoralis* gen. et sp. nov. (Class Prymnesiophyceae), a coccolithophorid from the Northwest Pacific. *The Botanical Magazine, Tokyo* **96**: 365-376.

- Inouye I. et M. Chihara (1979). Life history and taxonomy of *Cricosphaera roscoffensis* var. *haptonemofera* var. nov. (Class Prymnesiophyceae) from the Pacific. *The Botanical Magazine, Tokyo* **92**: 75-87.
- Inouye I. et R.N. Pienaar (1988). Light and electron microscope studies of the type species of *Syracosphaera*, *S. pulchra* (Prymnesiophyceae). *Br. phycol. J.* **23**:205-217.
- Inouye I. et R.N. Pienaar (1984). New observations on the coccolithophorid *Umbilicosphaera sibogae* var. *foliosa* (Prymnesiophyceae) with reference to cell covering, cell structure and flagellar apparatus. *Br. phycol. J.* **19**:357-369.

J

- Jackson G.A. et P.M. Williams (1985). Importance of dissolved organic nitrogen and phosphorus to biological nutrient cycling. *Deep Sea Res.* **32**:223-235
- Jebram, D. (1980) Prospection for a sufficient nutrition for the cosmopolitic marine bryozoan *Electra pilosa* (Linnaeus). *Zoologische Jb. (Syst.)*, **107**: 368-390.
- Jeffrey S.W. et S.W. Wright (1994). Photosynthetic pigments in the Haptophyta. In: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds). *The Haptophyte Algae*. For the Systematics Association by Clarendon Press, Oxford, pp. 111-132.
- Jeffrey S.W., Brown M.R. et J.K. Volkman (1994). Haptophytes as feedstocks in mariculture. In: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds) *The Haptophyte Algae*. For the Systematics Association by Clarendon Press, Oxford, pp 1-21.
- Jerlov N.G. (1951). Optical Studies of Ocean Water. *Report of Swedish Deep-Sea Expeditions* **3**:73-97.
- Jochem F.J. (2000). Probing the physiological state of phytoplankton at the single-cell level. *Scie. Mar.* **64**: 183-195.
- Johansen J.R., Doucette G.J., Barclay W.R. et J.D. Bull (1988). The morphology and ecology of *Pleurochrysis carterae* var. *dentata* var. nov. (Prymnesiophyceae), a new coccolithophorid from in inland saline pond in New Mexico, USA. *Phycologia* **27**: 78-88.
- Johansson N. et E. Graneli (1999). Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures. *J. Exp. Mar. Biol. ecol.* **239**: 243-258

- Jones H.L.J., Leadbeater B.S.C. et J.C. Green (1994). Mixotrophy in haptophytes. *In*: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds) *The Haptophyte Algae*. For the Systematics Association by Clarendon Press, Oxford, pp. 247-264.
- Jordan R.W. et A. Kleijne (1994). A classification system for living coccolithophores. *In*: Winter A. et W.G. Siesser (eds) *Coccolithophores*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp.83-105.
- Jordan, R.W. et J.C. Green (1994). A check-list of the extant Haptophyta of the world. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **74**:149-174.

K

- Kamptner E. (1950). Über den submikroskopischen Aufbau der Coccolithen. *Anz. Österr. Akad. Math.-Naturw. Kl.* **87**:152-158.
- Kamptner E. (1943). Zur Revision der Coccolithineen-Spezies *Pontosphaera huxleyi* Lohmann. *Akad. Wiss. Wien., Anz.* **80**:43-49.
- Kamptner E. (1941) Die Coccolithineen der Südwestküste von Istrien. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 51:54-149
- Kamptner E. (1937). Neue und bemerkenswerte Coccolithineen aus dem mittelmeeer. *Arch. Protistenk.* **89**:297-316.
- Kawachi M. et I. Inouye (1994). Observations on the flagellar apparatus of a coccolithophorid, *Cruciplacolithus neohelis* (Prymnesiophyceae). *J. Plant Res.* **107**:53-62.
- Kawachi M., Inouye I., Maeda, O. et M. Chihara (1991). The haptonema as a food-capturing device- observations on *Chrysochromulina huta* (Prymnesiophyceae). *Phycologia* **30**(6):563-573.
- Keating K.I. (1978) Blue-green algal inhibition of diatom growth: Transition from mesotrophic to eutrophic community structure. *Science* **199**:971-973.
- Keller M.D., Selvin R.C., Claus W. et R R.L. Guillard (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* **23** :633-638.
- Klaveness D. (1973). The microanatomy of *Calyptrorphaera sphaeroidea*, with some supplementary observations on the motile stage of *Coccolithus pelagicus*. *Norw. J. Bot.*, **20** :151-162.

- Klaveness D. (1972). *Coccolithus huxleyi* (Lohmann) Kamptner. I.- Morphological investigations on the vegetative cell and the process of coccolith formation. *Protistologica*, **8**: 335-346.
- Klaveness D. et E. Paasche (1979). Physiology of coccolithophorids. In: Levandowsky M. et S.H. Hutner (eds) *Biochemistry and physiology of protozoa*, 2nd ed., vol 1. Academic Press, London, pp. 191-213.
- Klaveness D. et E. Paasche (1971). Two different *Coccolithus huxleyi* cell types incapable of coccolith formation. *Arch. Mikrobiol.* **75**:382-385.
- Klebs G. (1893). Flagellatenstudien I. u. II. *Zeitschr f wissenschaft Zoologie* 1893, Bd 55, S.265, 353.
- Kleijne A. (1993). Morphology, taxonomy and distribution of extant coccolithophorids (calcareous nannoplankton). Thesis. University of Amsterdam.
- Kleijne A. (1991). Holococcolithophorids from the Indian Ocean, Red Sea, Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean. *Mar. Micropal.* **17** :1-76.
- Kleijne A. (1992). Extant Rhabdosphaeraceae (coccolithophorids, class Prymnesiophyceae) from the Indian Ocean, Red Sea, Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean. *Scripta Geologica* **100**: 1-63.
- Kirk J.T.O. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. 2nd ed., Cambridge University Press, New York. 509 p.
- Knappertsbusch M. (2000). Morphologic evolution of the coccolithophorid *Calcidiscus leptoporus* from the upper Oligocene to Recent. *Journal of Palaeontology* **74**(3):712-730.
- Knappertsbusch M., Cortes M.Y. et H.R Thierstein. (1997). Morphologic variability of the coccolithophorid *Calcidiscus leptoporus* in the plankton, surface sediments and from the Early Pleistocene. *Mar. Micropal.* **30**:293-317.
- Kozakai H., Oshima Y. et T. Yasumoto (1982). Isolation and structural elucidation of hemolysin from the phytoflagellate *Prymnesium parvum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**:233-236.
- Kump L.R., Kasting J.F. et R.G Crane (1999). *The Earth System*. Prentice Hall, Upper

L

- Laguna R., Romo J., Read B.A. et T.M. Walhund (2001). Induction of phase variation events in the life cycle of the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Appl. Environ. Microb.* **67**: 3824-3831.
- Lampert L. (2001). Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l'Atlantique Nord (Golfe de Gascogne). Thèse, Université de Bretagne Occidentale, 294pp.
- Lancelot C., Billen G., Sournia A., Weisse T., Colijn F., Veldhuis M.J.W., Davies A. et P. Wassman (1987). *Phaeocystis* blooms and nutrient enrichment in the continental coastal zones of the North Sea. *Ambio* **16**:38-46.
- Larsen A. et B. Edvardsen (1998). Relative ploidy levels in *Prymnesium parvum* and *P. patelliferum* (Haptophyta) analyzed by flow cytometry. *Phycologia* **37**: 412-424.
- Larsen A., Eikrem W. et E. Paasche (1993). Growth and toxicity in *Prymnesium patellifera* (Prymnesiophyceae) isolated from Norwegian waters. *Can. J. Bot.* **71**: 1357-1362.
- Laws E.A., Popp B.N., Bidigare R.R., Riebesell U., Burkhardt S. et S.G. Wakeham (2001). Controls on the molecular distribution and carbon isotopic composition of alkenones in certain haptophyte algae. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* **2**:2000GC000057
- Leadbeater B.S.C. (1994) Cells coverings. In: Green J.C. et B.S.C. Leadbeater (eds) *The haptophyte algae*. Clarendon Press, Oxford, pp23-46.
- Leadbeater B.S.C. (1971). Observations on the life history of the haptophyceae alga *Pleurochrysis scherffellii* with special reference to the microanatomy of the different types of motile cells. *Annals Botany* **35**: 429-439.
- Leadbeater B.S.C. (1970). Preliminary observations on the different of scale morphology at various stage in the life cycle of "*Apistonema-Syracospaera*" *sensu* von Stosch. *British J. Phycol.* **5** :57-69.
- Leal M.F.C., Vasconcelos M.T.S.D. et C.M.G. van den Berg (1999). Copper-induced release of complexing ligands similar to thiols by *Emiliana huxleyi* in seawater culture. *Limnol.Oceanog.* **4**:1750-1762
- Lecal J. (1967). Le nanoplancton des côtes d'Israël. *Hydrobiologia* **29** :305-387.

- Lecourt M., Muggli D.L. et P.J. Harrison (1996). Comparison of growth and sinking rates of non-coccolith and coccolith forming strains of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) under different irradiance and nitrogen sources. *J. Phycol.* **32**:17-21.
- van Lenning K., Latasa M., Estrada M., Sáez A.G., Medlin L., Probert I., Véron B. et J. R. Young (2003). Pigment signatures and phylogenetic relationships of the Pavlovophyceae (Haptophyte). *J. Phycol.* **39**:379-389.
- van Lenning K., Probert I., Latasa M., Estrada M. et Young J.R. (sous presse). Pigment analyses and application to chemotaxonomic studies of haptophytes. In: Thierstein H.R. et J.R. Young (eds) *Coccolithophores - From molecular processes to global impact* SpringerVerlag, Germany.
- Lewis W.M.J. (1985). Nutrient scarcity as an evolution cause of haploidy. *Am. Nat.* **125** (5):692-701.
- Loeblich A.R. et H. Tappan (1978). The Coccolithophorid Genus *Calsidiscus* Kamptner and its Synonyms. *J. of Paleonto.* **52**(6):1390-1392.
- Lohmann H. (1902). Die Coccolithophoridae, eine Monographie der Coccolithen bildenden Flagellaten, zugleich ein Beitrag zur Kenntniss des Mittelmeerauftriebs. *Arch. Protistenkd.* **1**:89-105, pls 4-6, tables 1-6.
- Luning K. et P. Kadel (1993). Daylength range for circannual rhythmicity in *Pterygophora californica* (Alariaceae, Phaeophyta) and synchronization of seasonal growth by daylength cycles in several other brown algae. *Phycologia* **32**:379-387.

M

- McIntyre A. et A.W.H. Bé (1967). Modern coccolithophoridae of the Atlantic Ocean 1. Placoliths and cyrtoliths. *Deep-Sea res.* **14**:561-597.
- McIntyre A., Bé A.W.H. et M.B. Roche (1970). Modern Pacific Coccolithophorida: A paleontological thermometer. Transactions New York Academy of Sciences, Ser. II, **32**:720-731.
- McIntyre H.L., Kana T.M., Anning T. et R.J. Geider (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae. *J. Phycol.* **38**(1):17-38.

- MacIntyre J.G., Cullen J.J. et A.D. Cembella (1997). Vertical migrations, nutrition and toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **148**:201-216.
- McKay R.M., Villareal T.A. et J. LaRoche (2000). Vertical migration by *Rhizosolenia* spp. (bacillariophyceae): implications for Fe acquisition. *J. Phycol.* **36**:669-674.
- Malin G., Liss P.S. et S.M. Turner (1994). Dimethyl sulfide: production and atmospheric consequences. In: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds.) *The Haptophyte Algae*. Clarendon press, Oxford, pp. 303-320.
- Manton I. et G.F. Leedale (1969). Observations on the microanatomy of *Coccolithus pelagicus* and *Cricosphaera carterae*, with special reference to the origin and nature of coccoliths and scales. *J. mar. biol. Ass. U.K.* **49** :1-16.
- Manton I. et G.F. Leedale (1963). Observations on the micro-anatomy of *Crystallolithus hyalinus* Gaarder and Markali. *Arch. Mikrob.* **47** :113-136.
- Manton I. et L.S. Peterfi (1969). Observations on the fine structure of coccoliths, scales and protoplast of freshwater coccolithophorid *Hymenomonas roseola* Stein, with supplementary observations on the protoplast of *Cricosphaera carterae*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **172**: 1-15.
- Marchant H.J. et H.A. Thomsen (1994). Haptophytes in polar waters. In: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds.), *The Haptophyte Algae*. Systematics Association Special Volume No. 51, Clarendon Press, Oxford pp. 209-228.
- Margalef R. (1978). Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* **1**(4):493-509.
- Marie D., Simon N., Guillou, L., Partensky F. et D. Vaultot (2000). DNA, RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. In: *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc.11.12. pp 1-18.
- McArdle N.C. (1993). The use of stable sulphur isotopes to distinguish between natural and anthropogenic sulphur in atmosphere. Ph-D thesis, University of East Anglia, UK.
- Medlin L.K., Kooistra W.H.C.F., Potter D., Saunders G.W. et R.A. Andersen (1997). Phylogenetic relationships of the 'golden algae' (haptophytes, heterokont chromophytes) and their plastids. *Plant Systematic and Evolution* **11**: 187-219.
- Medlin L.K., Barker G.L.A., Campbell L., Green J.C., Hayes P.K., Marie D., Wrieden S. et D. Vaultot (1996). Genetic characterisation of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). *J. Mar. Syst.* **9**:13-31.

- Mills J.T. (1975). *Hymenomonas coronata* sp. nov. a new coccolithophorid from the Texas coast. *J. Phycol.* **11**:149-154
- Moestrup Ø. (1994). Economic aspects: “blooms”, nuisance species and toxins. In Green J.G and B.S.C. Leadbeater (eds), *The Haptophyte Algae*. Clarendon Press, Oxford, pp 265-285.
- Moestrup, Ø and H.A. Thomsen (1995). Taxonomy of toxic haptophytes (Prymnesiophytes). In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M. et A.D. Cembella (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manual and Guides, N° 33, UNESCO, pp 319-338.
- Muggli D.L. et Harrison P.J. (1997). Effects of iron on two oceanic phytoplankters grown in natural NE subarctic Pacific seawater with no artificial chelator present. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **212**:225-237.
- Muggli D.L. et P.J. Harrison (1996). EDTA suppresses the growth of oceanic phytoplankton from the Northeast Subarctic Pacific. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **205**: 221-227.
- Myklestad M. M., Ramlo B. et S. Hestmann (1995). Demonstration of strong interaction between the flagellate *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae) and a marine diatom. In: Lassus, P., Arzul, G., Gentien, P. et C. Marcaillou. (eds.), *Marine Harmful Algal blooms* . Intercept Ltd., Lavoisier, pp. 633–638.

N

- Nanninga H.J. et T. Tyrrell (1996). The importance of light for the formation of algal blooms by *Emiliania huxleyi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **136**:195-203
- Nielsen M.V. (1997). Growth, dark respiration and photosynthetic parameters of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) acclimated to different day length-irradiance combinations. *J. Phycol.* **33**:818-822.
- Norris R. E. (1965). Living cells of *Ceratolithus cristatus* (Coccolithophorineae). *Archiv fuer Protistenkunde* **108**:19-24.
- Nybakken J.W. (2001). *Marine Biology, an ecological approach*. Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman Inc., San Francisco, 515pp.

O

- Okada H. et S. Honjo (1973). The distribution of oceanic coccolithophorids in the Pacific. *Deep-Sea Res.* **20**:355-374.
- Okada H. et A. McIntyre (1979). Modern coccolithophores of the Pacific and North Atlantic Ocean. *Micropaleontology* **23**(1):1-55.
- Outka D.E. et D.C. Williams (1971). Sequential coccolith morphogenesis in *Hymenomonas carterae*. *Journal of Protozoology* **18**: 285-297.

P

- Paasche E. (2001). A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* **40**: 503-529.
- Paasche E. (1999). Reduced coccolithe calcite production under light-limited growth: a comparative study of three clones of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Phycologia* **38**:508-516.
- Paasche E. (1998). Roles of nitrogen and phosphorus in coccolithe formation in *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Eur. J. Phycol.* **33**:33-42.
- Paasche E. (1968). Biology and physiology of coccolithophorids. *Annual Review of Microbiology*. **22**:71-86
- Paasche E. (1964). A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolithe formation and photosynthesis in the coccolithophorid *Coccolithus huxleyi*. *Physiologia Plantarum* supplement **3**:1-82.
- Paasche E., Edvardsen B. et W. Eikreim (1990). A possible alternate stage in the life cycle of *Chrysochromulina polylepis* Manton et Parke (Prymnesiophyceae). *Nova Hedwigia Beihefte*. **100**: 91-99.
- Page S., Hipkin C.R. et Flynn K.J. (1999). Interactions between nitrate and ammonium in *Emiliana huxleyi*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **236**:307-319.
- Palenik B. et S.E. Henson (1997). The use of amides and other organics nitrogen sources by the phytoplankton *Emiliana huxleyi*. *Limnol Oceanog* **42**:1544-1551.

- Parke M. et I. Adams (1960). The motile (*Crystallolithus hyalinus* Gaarder & Markali) and the non-motile phases in the life history of *Coccolithus pelagicus* (Wallich) Schiller. *J. mar. biol. Ass. U.K.* **39** :363-274.
- Parke M., Manton I. et B. Clarke (1955). Studies on marine flagellates II. Three new species of *Chrysochromulina*. *J. mar. biol. Ass. UK* **34**: 579-609.
- Perrot V., Richerd S. et M. Valero (1991). Transition from haploidy to diploidy. *Nature* **351** (No.6322): 315-317.
- Pfiester L.A. et D.M. Anderson (1987). Dinoflagellates reproduction. In: F.J.R. Taylor (ed.), *The biology of dinoflagellates*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 611-648.
- Pienaar R.N. (1994) Ultrastructure and calcification of coccolithophores. In: Winter A. et W.G. Siesser (eds.) *Coccolithophore*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 13-37.
- Pienaar R.N. (1976). The micronanatomy of *Hymenomonas lacuna* sp. nov. (Haptophyceae). *J. mar. biol. Ass. UK* **56**: 1-11.
- Pienaar R.N. (1971). Coccolith production in *Hymenomonas carterae*. *Protoplasma* **73**:217-224.
- Platt T., Gallegos C.L. et W.G. Harrison (1980). Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* **38**:687-701.
- Pringsheim E.G. (1955). Kleine Mitteilungen über Flagellaten und Algen. I. Algenartige Chrysophyten in Reinkultur. *Arch Mikrobiol* **21**:401-410.
- Probert I. (2002). The induction of sexual reproduction in dinoflagellates : culture studies and field survey. In: E. Garcés, A. Zingone, M. Montresor, B. Reguera et B. Dale (eds) *LIFEHAB: Life histories of microalgal species causing harmful blooms*. European Commission: Directorate General, Science, Research and Development, pp. 57-59.
- Probert I. et A. Houdan (sous presse) The Laboratory Culture of Coccolithophores In Thierstein H.R. and J.R. Young (eds) *Coccolithophores - From molecular processes to global impact* SpringerVerlag, Germany.
- Provasoli L., McLaughlin J.J.A. et M.R. Droop (1957). The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* **25**:392-428.
- Provasoli L. et I. Pintner (1960). Artificial media for fresh-water algae: Problems and suggestions. *The Ecology of Algae* (Pymatuning Symposia).

R

- Raymont J.E.G. (1967). *Plankton and productivity in the oceans*. Pergamon Press, Oxford, 660p.
- Rayns D.G. (1962). Alternations of generations in a coccolithophorid, *Cricosphaera carterae* (Braarud & Fagerl.) Braarud. *J. mar. biol. Ass. U. K.* **42**:481-484.
- Reifel K.M., McCoy M.P., Tiffany M.A., Rocke T.E., Trees C.C., Barlow S.B., Faulkner D.J. et S.H. Hurlbert, (2001). *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* (Prymnesiophyceae) blooms on the surface of the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* **466**:177-185.
- Renaud S. et C. Klaas (2001). Seasonal variations in the morphology of the coccolithophore *Calcidiscus leptoporus* off Bermuda (N. Atlantic). *J. Plankton. Res.* **23**(8):779-795.
- Reviere B. de (2003). *Biologie et phylogénie des algues*. Tome 2. BelinSup, Belin, Paris, 255pp.
- Rhodes L. L., Peake B.M., Lincoln Mackenzie A. et S. Marwick (1995). Coccolithophores *Gephyrocapsa oceanica* and *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae= Haptophyceae) in New Zealand's coastal waters: characteristics of blooms and growth in laboratory culture. *New Zeal. J. Mar. Fresh.* **29**:345-357.
- Richardson K., Beardall J. et J.A. Raven (1983). Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist* **93**:157-191.
- Richard S., Couvet D. et M. Valéro (1993a). Evolution of the alternation of haploid and diploid phases in life cycles. II. Maintenance of the haplo-diplontic cycle. *J. Evol. Biol.* **6**:263-280.
- Richard S., Destombe C., Cuguen J. et M. Valéro (1993b). Variation of reproductive success in a haplo-diploid red alga, *Gracilaria verrucosa*: effects of parental identities and crossing distance. *Amer. J. Bot.* **80**: 1379-1391.
- Riegman R., Noordeloos A.A.M. et G.C. Cadee (1992). *Phaeocystis* blooms and eutrophication of the continental coastal zones of the North Sea. *Mar. Biol.* **112**:479-484.
- Riegman R., Stolte W., Noordeloos A.A.M. et D. Slezak (2000). Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC 3:1:3:1) activity of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous culture. *J. Phycol.* **36**:87-96
- Rowson J.D. (1986). An investigation of the ultrastructure, calcification and life cycle of *Coccolithus pelagicus*. PhD thesis, University of Birmingham.

Rowson J.D., Leadbater B.S.C. et J.C. Green (1986). Calcium carbonate deposition in the motile (*Crystallolithus*) phase of *Coccolithus pelagicus* (Prymnesiophyceae). *Br. phycol. J.*, **21** :359-370.

S

Sáez A.G., Probert I., Geisen M., Quinn P., Young J.R. et L.K. Medlin (2003). Pseudo-cryptic speciation in coccolithophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:7163-7168.

Sakshaug E., Bricaud A., Dandonneau Y., Falkowski P.G., Kiefer D.A., Legendre L., Morel A., Parslow J. et M. Takahashi (1997). Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *J. Plankt. Res.* **19**:1637-1670.

Samtleben C. et A. Schröder (1992). Living coccolithophore communities in the Norwegian-Greenland Sea and their record in sediments. *Mar. Micropal.*, **19**:333-354.

Samtleben C. et T. Bickert (1990). Coccoliths in sediment traps from the Norwegian Sea. *Mar. Micropal.*, **16**:39-64.

Sherrer B. (1984). *Biostatistique*. Chicoutini Gaëtan Morin éditeur 550p.

Schiller J. (1930). Coccolithineae. In: L. Rabenhorst (ed.) Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Vol. 10. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, pp. 89-267.

Schiller J. (1926). Über Fortpflanzung, geißellose, Gattungen und die Nomenklatur der Coccolithophoraceen. *Ibid*, Bd 53, p. 326.

Schluter L., Mohlenberg F., Havskum H. et S. Larsen (2000). The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **192**:49-63

Schmidt L.E. et P.J. Hansen (2001). Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **216**:67-81

Schreiber E. (1927). Die Reinkultur von marinen Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers. *Wiss Meeresuntersuch* **10**:1-34

- Schussnig B. (1930). *Ochrosphaera neapolitana*, nov. gen., nov. spec., eine neue Chysomonad mit Kalkkülle. *Österr Bot Z* **79**:164-170
- Schussnig B. (1925). Betrachtungen über das System d. niederen Pflanzen. Verhandl d zool bot ges Wien, Bd 75, p.196
- Schwarz E. (1932). Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Protophyten. *Archiv fuer Protistenkunde*. **77**:434-462.
- Siesser W.G. et Winter A. (1994). Composition and morphology of coccolithophore skeletons In: Winter, A. et W.G. Siesser (eds.) *Coccolithophores*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 51-62
- Simó R. et C. Pedrós-Alió (1999). Role of vertical mixing in controlling the oceanic production of dimethyl sulphide. *Nature*, **402**: 396-399
- Smayda T.J. (1997). Harmful algal blooms: their physiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* **42**:1137-1153.
- Sorby H.C. (1861). On the organic origin of the so-called 'crystalloids' of the chalk. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, Ser. 3, **8**:193-200.
- Sournia A. (1995). Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. In: Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P. et C. Marcaillou (eds) *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Paris. pp103-112.
- Stebbins G.L. et G.J.C. Hill (1980). Did multicellular plants invade the land? *The American Naturalist* **115**: 342-353.
- Stein J.R. (1973). *Handbook of phycological methods: Culture methods and Growth measurements*. Cambridge University Press, London and New York. 448pp.
- von Stosch H.A.(1967). Haptophyceae. In: Rhuland W. (ed.) *Vegetative Fortpflanzung, Parthogenese und Apogamie bei Algen*. Encyclopedia of Plant Physiology. Springer-Verlag, Berlin. pp. 646-656.
- von Stosch H.A. (1958). Der Geisselapparat einer Coccolithophoride. *Naturwiss.* **45**: 140-141
- Sunda W.G. (2000). Trace metal-phytoplankton interactions in aquatic systems In: Lovley D.R. (ed) *Environmental Microbe-Metal Interactions*, ASM Press, Washington. pp79-107.
- Sunda W.G. et S.A. Huntsman (1995). Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton: biological and geochemical implications. *Limnol. Oceanogr.* **40**:1404-1417
- Sunda W.G. et S.A. Huntsman (1992). Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol Oceanogr* **37**:25-40.

Sym S. et M. Kawachi (2000). Ultrastructure of *Calyptrorpha radiata*, sp. nov. (Prymnesiophyceae, Haptophyta). *Europ. J. Phycology* **35**:283-293.

T

- Tarran G.A., Zubkov M.V., Sleigh M.A., Burkill P.H. et M. Yallop (2001). Microbial community structure and standing stocks in the NE Atlantic in June and July of 1996. *Deep-Sea Res. Part II* **48**(4-5):963-985.
- Taylor F.J.R. (1987). Ecology of dinoflagellates. In: F.J.R. Taylor (ed.), *The biology of dinoflagellates*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 399-501.
- Taylor R. et R. Fletcher (1999). Cryopreservation of eukaryotic algae - a review of methodologies. *J. Appl. Phycol.* **10**: 481-501
- Thierstein H.R., Geitzenauer K.R., Molino B. et N.J. Shackleton (1977). Global synchronicity of late quaternary coccolith datum levels: validation by oxygen isotopes. *Geology* **5**:400-404.
- Thomsen H.A., Bjørn P. P., Højlund L., Olesen J. et J.B. Pedersen (1995). *Ericiolus* gen. nov. (Prymnesiophyceae), a new coccolithophorid genus from polar and temperate regions. *Eur. J. Phycol.* **30**: 29-34.
- Thomsen H.A., Ostergaard J.B. et L.E. Hansen (1991). Heteromorphic life histories in arctic coccolithophorids (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* **27**:634-642.
- Tillman U. (1998). Phagotrophy by a plastidic haptophyte, *Prymnesium patelliferum*. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**:155-160.
- Twiss M., Errécalde O., Fortin C., Campbell P., Jumarie C., Denizeau F., Berkelaar E., Hale B. et B. van Rees (2000). Guidelines for studies of metal bioavailability and toxicity - why metal speciation should be considered and how? Canadian Network of Toxicology Centres.
- Twiss M.R., Errécalde O., Fortin C., Campbell P.G., Jumarie C., Denizeau F., Berkelaar E., Hale B. et K. van Rees (2001). Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability.* **13**:9-24
- Tyrrel T. et A.H. Taylor (1996). A modelling study of *Emiliania huxleyi* in the NE Atlantic. *J. Marine Syst.* **9**:83-112.

V

- Valéro M., Richerd S., Perrot V. et C. Descombes. (1992). Evolution of alternation of haploid and diploid phases in life cycles. *Trends Ecol. and Evol.* **7**(1):25-29.
- Varela D.E. et P.J. Harrison (1999). Effect of ammonium and nitrate utilization by *Emiliana huxleyi*, a coccolithophore from the oceanic northeastern Pacific. *Mar Ecol Prog Ser* **186**:67-74.
- Vaulot D. (1989). CYTOPC : processing software for flow cytometric data. *Signal noise* **2**:8.
- Vaulot D., Birrien J-L., Marie D. Casotti R., Veldhuis M., Kraay G. et M-J. Chretiennot-Dinet (1994). Morphology, ploidy, pigment composition, and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* **30**:1022-1035.
- Veldhuis M.J.W., Cucci T.L. et M.E. Sieracki (1997). Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes : taxonomic and ecological implications. *J. Phycol.* **33**:527-541.
- Vrind-de Jong E.W., van Emburg P.R. et J.P.M. de Vrind (1994). Mechanisms of calcification: *Emiliana huxleyi* as a model system. In: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds.), *The Haptophyte Algae*. for the Systematics Association by Clarendon press, Oxford, pp. 149-166.
- Voss K., Balch W.M. et K.A. Kilpatrick (1998). Scattering and attenuation properties of *Emiliana huxleyi* cells and detached coccoliths. *Limnol. Oceanog.* **43**:870-876.

W

- van der Wal P., de Vrind P.M., de Vrind_de Jong E.W. et A.H. Borman (1987). Incompleteness of the coccosphere as a possible stimulus for coccolith formation in *Pleurochrysis carterae* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* **23**:218-221.
- van der Wal P., de Jong E.W., Westbroek P. et W.C. de Bruijn (1983a). Calcification in the coccolithophorid alga *Hymenomonas carterae*. *Ecol Bull (Stockolm)* **35**:251-258.
- van der Wal P., de Jong E.W., Westbroek P., de Bruijn W.C. et A.A. Mulder-Stapel (1983b). Polysaccharide localization, coccolith formation and Golgi dynamics in the coccolithophorid *Hymenomonas carterae*. *J Ultrastr Res* **85**:139-158.

- Westbroek P., van Hinte J.E., Brummer G.-J., Veldhuis M., Brownlee C., Green J.C., Harris R. et B.R. Heimdal (1994). *Emiliana huxleyi* as a key to biosphere-geosphere interactions. In: J.C. Green et B.S.C. Leadbeater (eds.), *The Haptophyte Algae*. for the Systematics Association by Clarendon press, Oxford, pp. 321-334.
- Westbroek P., Young J.R. et K. Linschooten (1989). Coccolith production (Biom mineralization) in the marine alga *Emiliana huxleyi*. *J Protozool* **36**: 368-373.
- Westbroek P., Wal P. van der, Emburg P.R. van, Vrind-de Jong E.W. de et W.C. de Buijn (1986). Calcification in the coccolithophorids *Emiliana huxleyi* and *Pleurochrysis carterae* I. Ultrastructural aspects. In: Leadbeater B.S.C. et R. Riding (eds) *Biom mineralization in lower plants and animals*. Systematics Assoc. Spec. Vol. **30**:189-203.
- Westbroek P., Jong de E.W., Wal van der P., Borman A.H., Vrind de J.P.M., Kok D., Bruijn de W.C. et S.B. Parker (1984). Mechanism of calcification in the marine alga *Emiliana huxleyi*. *Phil Trans R Soc* **B304**:435-444.
- Wilbur K.M. et N. Watabe (1963). Experimental studies on calcification in molluscs and the alga *Coccolithus huxleyi*. *Annals of the NY Academy of Sciences* **109**:82-112.
- Willson M.F. (1981). On the evolution of complex life-cycles in plants: a review and an ecological perspective. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **68**:275-300.
- Winter A., Jordan R. et P. Roth (1994). Biogeography of living coccolithophores in ocean waters. In: Winter A. et W.G. Siesser (eds) *Coccolithophores*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 161-178.

Y

- Yamagushi M. et I. Imai (1994). A microfluorimetric analysis of nuclear DNA at different stages in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Phycologia* **33**:163-170.
- Yariv J. et S. Hestrin (1961). Toxicity of the extracellular phase of *Prymnesium parvum* cultures. *J. Gen. Microbiol.* **24**:165-175.
- Yasumoto T., Underdahl B., Aune T., Hormazabal V. et O.M. Skulberg (1990) Screening for hemolytic activity and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepsis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. In: Granéli, E.; Sundström, B.;

- Edler, L et D.M. Anderson (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 436–440
- Young J.R. (1998): Neogene. In: Bown P.R. (ed.) *Calcareous Nannofossil Biostratigraphy*. British Micropalaeontology Society Series. p. 225-265.
- Young J.R. (1994). Functions of coccoliths. In: Winter A. et W.G. Siesser (eds) *Coccolithophores*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 63-82
- Young J.R. et P.R. Bown (1997). Higher Classification of Calcareous Nannofossils. *Journal of Nannoplankton Research*, **19**(1):15-47.
- Young J.R. et P. Westbroek (1991). Genotypic variation in the coccolithophorid species *Emiliana huxleyi*. *Mar. Micropal.* **18**:5-53.
- Young J.R., Geisen M., Cros L., Kleijne A., Sprengel C., Probert I. and J. Østergaard (2003). A guide to extant coccolithophore taxonomy. *J. Nannoplankton Res. Special Issue 1*.
- Young J.R., Davis S.A., Bown P.R. et Mann S. (1999). Coccolith ultrastructure and biomineralisation. *J. Struct. Biol.* **126**:195-215.
- Young J.R., Jordan R.W. et Cros L. (1998). Notes on nannoplankton systematics and life-cycles. *Ceratolithus cristatus*, *Neosphaera coccolithomorpha* and *Umbilicosphaera sibogae*. *Journal of Nannoplankton Research* **20**: 89-99.
- Young J.R., Bergen J.A., Bown P.R., Burnett J.A., Fiorentino A., Jordan R.W., Kleijne A., Niel B.E. van, Romein A.J.T. et K. Salis von (1997). Guidelines for coccolith and calcareous nannofossil terminology. *Palaeontology*, **40**(4): 875-912.
- Young J.R., Didymus J.M., Bown P.R., Prins B. et S. Mann (1992). Crystal assembly and phylogentic evolution in hétérococcolithe. *Nature* (London) **356**:516-518.

Z

- Zirbel M. J., Veron F. et M. I. Latz (2000). The reversible effect of flow on the morphology of *Ceratorys horrida* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **36**(1):46-58.
- Zapata M., Rodriguez F. et Garrido J.L. (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton : a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **195**:29-45.

LISTE DES FIGURES

- Figure I-1 :** Cycle du carbone inorganique
- Figure I-2:** Rôle des haptophytes dans le cycle du soufre
- Figure I-3:** Représentation schématique des différents axes de recherche du projet CODENET
- Figure I-4 :** Répartition spatiale des huit laboratoires participant au réseau CODENET
- Figure I-5:** Représentation schématique de la cytologie des coccolithophores
- Figure I-6 :** Représentation schématique de coccosphères dimorphes
- Figure I-7 :** Représentation schématique des différents types de cycles hétéromorphes répertoriés chez les coccolithophores
- Figure I-8 :** Les différentes zones biogéographiques de coccolithophores dans l’Océan Atlantique et dans l’Océan Pacifique
- Figure I-9 :** Schéma de la zonation verticale des coccolithophores dans la zone subtropicale
- Figure III-1 :** Arbre phylogénétique des haptophytes basé sur la séquence du gène ADN_r 18S
- Figure III-2 :** Cycle de vie d’*Emiliana huxleyi*
- Figure III-3 :** *Emiliana huxleyi*, phase C à hétérococcolithes (diploïde) et phase S sans coccolithes (haploïde).
- Figure III-4 :** Croissance d’un coccolithe d’*Emiliana huxleyi*
- Figure III-5 :** Répartition géographique d’*Emiliana huxleyi*
- Figure III-6 :** Répartition de *Emiliana huxleyi* en fonction des données de température et de profondeur
- Figure III-7 :** *Coccolithus pelagicus s. l.*, phase à hétérococcolithes
- Figure III-8:** *Coccolithus pelagicus s. l.*, phase à holococcolithes.
- Figure III-9 :** Répartition géographique de *Coccolithus pelagicus s. l.*
- Figure III-10 :** Répartition de *Coccolithus pelagicus s. l.* en fonction des données de température et de profondeur
- Figure III-11 :** *Calcidiscus leptoporus*, phases à hétérococcolithes et à holococcolithes.
- Figure III-12 :** Répartitions géographiques de *Calcidiscus leptoporus s. l.*
- Figure III-13 :** Répartition de *Calcidiscus leptoporus s.l.*, phase à hétérococcolithes, en fonction de la profondeur et de la température
- Figure III-14 :** *Coronosphaera mediterranea*, phase à hétérococcolithes et phases à holococcolithes
- Figure III-15 :** Schéma d’une coccosphère dimorphique de *Coronosphaera mediterranea*
- Figure III-16 :** Schéma d’une coccosphère dimorphique de type *Calyptrolithina*
- Figure III-17 :** Schéma d’une coccosphère dimorphique de *Calyptrolithophora hasleana*
- Figure III-18 :** Schéma d’une coccosphère dimorphique de *Zygospaera hellenica*
- Figure III-19 :** Répartition géographiques de *Coronosphaera mediterranea*
- Figure III-20 :** Répartition de *Coronosphaera mediterranea* en fonction des données de profondeur et de température
- Figure IV-1:** Les trois principaux cycles de vie observés chez les eucaryotes
- Figure IV-2:** Morphologie externes des espèces étudiées
- Figure IV-3:** Quantité relative d’ADN contenu dans les noyaux des deux phases de chacune des quatre espèces étudiées
- Figure IV-4:** Observations concernant la reproduction sexuée chez *Coccolithus pelagicus* et *Coronosphaera mediterranea*
- Figure IV-5:** Taxons pour lesquels un cycle haplo-diploïde a été démontré en culture ou pour lesquels des indications indirectes sont disponibles à partir des coccosphères mixtes) portés sur un arbre composite schématique des relations entre les haptophytes
- Figure V-2 :** Structure théorique de la colonne d’eau d’un océan tempéré en hiver et au printemps
- Figure V-2 :** Cycle écologique hypothétique de *Coccolithus braarudii* en zone tempérée
- Figure V-3 :** Schéma de la table à gradient de température.
- Figure V-4 :** Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de la température
- Figure V-5 :** Taux de croissance de *Coronosphaera mediterranea* en fonction de la température
- Figure V-6 :** Taux de croissance de *Emiliana huxleyi* en fonction de la température
- Figure V-7 :** Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de différents milieux de culture
- Figure V-8 :** Taux de croissance de *Calcidiscus leptoporus* en fonction de différents milieux de culture
- Figure V-9 :** Taux de croissance d’*Emiliana huxleyi* en fonction de différents milieux de culture
- Figure V-10 :** Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu K

- Figure V-11 :** Taux de croissance de *Calcidiscus leptoporus* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu K
- Figure V-12 :** Proportions des pseudo-colonies de *Calcidiscus leptoporus* phase haploïde dans différents milieux de culture.
- Figure V-13 :** Aspect d'une pseudo-colonie de *Calcidiscus leptoporus* phase haploïde en K/2
- Figure V-14 :** Taux de croissance d'*Emiliana huxleyi* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu K
- Figure V-15 :** Taux de croissance d'*Emiliana huxleyi* en fonction de différentes quantités de nutriments du milieu artificiel ESAW
- Figure V-16 :** Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* cultivé en présence de différentes concentrations d'acétate de sodium
- Figure V-17 :** Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* cultivé dans un milieu à base de cultures stationnaires de la même espèce
- Figure V-18 :** Phase haploïde de *Coccolithus braarudii* en présence de bactéries marquées par un fluorochrome
- Figure V-19 :** Taux de croissance des deux phases de *Coccolithus braarudii* en fonction de la turbulence
- Figure V-20 :** Taux de croissance des deux phases de *Calcidiscus leptoporus* en fonction de la turbulence
- Figure V-21 :** Taux de croissance des deux phases d'*Emiliana huxleyi* en fonction de la turbulence
- Figure V-22 :** Taux de croissance de *Coccolithus pelagicus s.s.* en fonction de la température, d'après Rowson (1986).
- Figure VI-1 :** Pénétration de la lumière dans deux types d'eaux océaniques et trois types d'eaux côtières
- Figure VI-2 :** Pénétration de la lumière dans un océan suivant les longueurs d'onde
- Figure VI-3 :** Montage expérimental pour l'étude sur la quantité de lumière.
- Figure VI-4 :** Représentation schématique de l'obturation des boîtes de Pétri lors de l'expérience sur le phototactisme
- Figure VI-5 :** Montage expérimental pour l'étude sur la qualité de la lumière avec trois conditions lumineuses différentes
- Figure VI-6 :** Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* dans différentes conditions d'intensité lumineuse
- Figure VI-7 :** Taux de croissance de *Calcidiscus leptoporus* dans différentes conditions d'intensité lumineuse
- Figure VI-8 :** Taux de croissance d'*Emiliana huxleyi* dans différentes conditions d'intensité lumineuse
- Figure VI-9 :** Taux de croissance de *Coccolithus braarudii* en fonction de la qualité de la lumière
- Figure VI-10 :** Taux de croissance d'*Emiliana huxleyi* en fonction de la qualité de la lumière
- Figure VI-11 :** Concentrations relatives des principaux pigments de *Coccolithus braarudii* par rapport à chlorophylle a, selon la phase du cycle
- Figure VI-12 :** Concentrations relatives des principaux pigments d'*Emiliana huxleyi* par rapport à chlorophylle a, selon la phase du cycle
- Figure VI-13 :** Concentrations relatives par rapport à la chlorophylle a des principaux pigments d'*Emiliana huxleyi* phase diploïde en fonction des différents éclairagements
- Figure VI-14 :** Concentrations relatives par rapport à la chlorophylle a des principaux pigments d'*Emiliana huxleyi* phase haploïde en fonction des différents éclairagements
- Figure VI-15 :** Taux de croissance de *Coccolithus pelagicus* en fonction du flux de photons ou intensité lumineuse, phase haploïde en bleu, phase diploïde en rouge
- Figure VII-1 :** Courbes P-E pour les phases haploïde et diploïde d'*Emiliana huxleyi* à deux taux de croissance
- Figure VI-2 :** Paramètres photosynthétiques pour les phase haploïde et diploïde d'*Emiliana huxleyi*
- Figure VIII-1 :** Représentation graphique du pourcentage de mortalité des nauplii d'*Artemia salina* en fonction de la concentration en algues
- Figure VIII-2 :** Taux de croissance de *Scropsiella trochoidea*, *Tetraselmis* sp. et *Isochrysis galbana* dans un milieu enrichi à base de filtrat de culture de *Pleurochrysis roscoffensis* et dans les deux milieux témoins
- Figure IX-1 :** Niches écologiques des trois principaux groupes phytoplanctoniques
- Figure IX-2 :** Cycle écologique hypothétique pour *Coccolithus braarudii* et *Calcidiscus leptoporus*, phase haploïde et diploïde
- Figure IX-3 :** Cycle écologique hypothétique d'*Emiliana huxleyi*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1: Principales différences biologiques entre les deux classes composant les Haptophyta.

Tableau I-2 : Les principaux types de coccolithes avec exemples de genres possédant ces coccolithes.

Tableau I-3 : Assemblages phytoplanctoniques et leurs stratégies écologiques, in Young (1994).

Tableau II-1: liste des toutes les espèces de coccolithophores jusqu'à présent cultivées

Tableau II-2: Les cultures de coccolithophores actuellement maintenues dans les principales collections de microalgues à travers le monde

Tableau II-3: Répartition des différentes espèces de coccolithophores cultivées jusqu'à présent au sein des différentes familles de ce groupe

Tableau III-1 : Classification des quatre coccolithophores étudiées d'après Edvardsen *et al.* (2000).

Tableau IV-1 : Cultures expérimentales.

Tableau IV-2: Quantité relative d'ADN (unités arbitraires) des cultures expérimentales, déterminée par cytométrie en flux sur des noyaux isolés.

Tableau V-2 : Proportions des différents constituants (en μM) du milieu K (Keller, 1987) et des dilutions utilisées au cours des expériences

Tableau V-2 : Pourcentage d'inhibition des différentes espèces de coccolithophores étudiées en fonction de la turbulence. * stade flagellé

Tableau VI-1 : Pourcentages d'inhibition des taux de croissance de trois coccolithophores par rapport au taux de croissance à la plus forte intensité lumineuse ($35 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Tableau VI-2 : Réaction phototactique des différentes coccolithophores étudiées.

Tableau VI-3 : Principaux pigments des deux phases de *Coccolithus braarudii* en lumière du jour et concentration relative par rapport à la chlorophylle *a*.

Tableau VI-4 : Concentration (ng/cellule) en chlorophylle *a* en fonction du type de lumière et de la phase d'*Emiliana huxleyi* ; LJ : lumière du jour ; B : lumière bleue ; V : lumière verte.

Tableau VI-5 : Principaux pigments des deux phases d'*Emiliana huxleyi* et concentrations relatives par rapport à la chlorophylle *a* en fonction de différents éclairagements.

Tableau VI-6 : Différentes caractéristiques des cultures de *Emiliana huxleyi*, phase haploïde et diploïde

Tableau VII-1 : Trois caractéristiques de la photosynthèse pour la phase haploïde et diploïde d'*Emiliana huxleyi* à deux taux de croissance différents

Tableau VII-2 : Estimation à travers le modèle P-E (Platt *et al.*, 1980) des paramètres photosynthétiques avec leurs erreurs standards

Tableau VII-3 : Composition pigmentaire et concentrations relatives des pigments pour la phase haploïde et diploïde d'*Emiliana huxleyi*

Tableau VIII-1: Espèces marines non calcifiées appartenant aux Prymnesiophyceae, recensées comme toxiques dans la littérature.

Tableau VIII-2: Origine des espèces utilisées pour les tests de toxicité.

Tableau VIII-3: DL 50 des cinq espèces toxiques et de *Prymnesium parvum* (témoin positif)

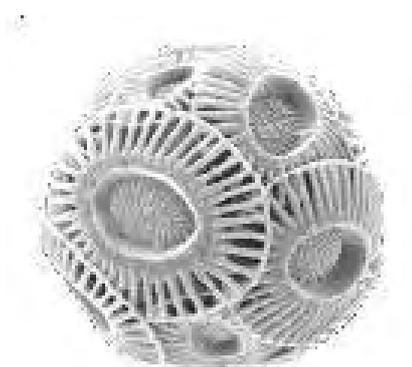
Colloques – Publications

- Communications orales et écrites :
 - ✓ Probert I., Houdan A., Fresnel J. & Billard C.(2000) – Des coccolithophorides (Haptophycées) en culture à Caen: présentation de la collection de souches isolées dans le cadre des campagnes du programme européen CODENET. Colloque Annuel de la Société Phycologique de France, Paris, 21-22 décembre 2000.
 - ✓ Houdan A., Probert I & Billard C.(2001) – Ecological strategies of coccolithophores. CODENET 4th annual workshop, Chateau de Blagnac, Cabara, France, 24-28 août 2001.
 - ✓ Houdan A., Probert I. & Billard C. (2002) – Ecological strategies of coccolithophores, a case study of *Coccolithus pelagicus*. EU-funded Conference “Coccolithophores – from molecular processes to global impact”, Ascona, Suisse, 10-15 février 2002. (Annexe 5)
 - ✓ Blair A. Steel, Markus Geisen, Ian Probert, Kees van Lenning, Aude Houdan and Jeremy R. Young. Photomovement in coccolithophorids: Mechanisms and evolutionary ecology . Progressive Paleontology 2002
 - ✓ Houdan A., Probert I. et C. Billard (2003) – Toxicity of coccolithophores. Third European Phycological Congress, Belfast, R.U., 21-26 juillet 2003.

- Publications acceptées :
 - ✓ Ian Probert et Aude Houdan. « The Laboratory Culture of Coccolithophores”. In: “*Coccolithophores - From molecular processes to global impact*”, Thierstein H.R. et Young J.R. (eds). SpringerVerlag, Germany (sous presse).
 - ✓ A.Houdan, C. Billard, D. Marie, F. Not, A. G. Sáez, J. R.Young & I.Probert. Holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles: flow cytometric analysis of relative ploidy levels. *Systematics and Biodiversity*

- Publications soumises:
 - ✓ Aude Houdan, Annabelle Bonnard, Jacqueline Fresnel, Swanny Fouchard, Chantal Billard and Ian Probert. Toxicity of coccolithophores (Prymnesiophyceae, Haptophyta). Soumise à *Journal of Plankton Research* en août 2003
 - ✓ A. Houdan, I. Probert, K. van Lenning and Sébastien Lefebvre. Comparison of photosynthetic responses in different life cycle phases of *Emiliana huxleyi*. Soumise à *Mar. Ecol. Prog. Ser.* en octobre 2003

- Publications en préparation :
 - ✓ A.Houdan, I. Probert et C. Billard. Effect of some abiotic factors on biology and ecology of four species of coccolithophores.
 - ✓ A. Houdan, I. probert, C. Zatylny et C. Billard. Nutrition of four species of coccolithophores.
 - ✓ A.Houdan, I. Probert, K. van Lenning et C. Billard. Impact of light on biology and ecology of coccolithophores.



ANNEXES

Photo: J.R. Young

ANNEXE 1

Tableau 1: Différentes collections microalgues dont les souches sont répertoriées dans le Tableau II-2

Nom de la collection	Pays	Site Internet
CCMP	USA	http://ccmp.bigelow.org
CCAP	UK	http://www.ife.ac.uk/ccap/
CCCM	Canada	http://www.botany.ubc.ca/cccm
UTEX	USA	http://www.bio.utexas.edu/research/utex/
PLY	UK	http://www.mba.ac.uk/culture-collection/culture-collection.htm
ALGOBANK	France (Caen)	http://www.unicaen.fr/unicaen/ufr/ibba/lbbm/algobank
RCC	France (Roscoff)	http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/collect.html
MBIC	Japan	http://www.seasquirt.mbio.co.jp/mbic
NIES	Japan	http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home.htm
CSIRO	Australia	http://www.marine.csiro.au
SAG	Germany	http://www.gwdg.de/~epsag/phykologia/epsag.htm

ANNEXE 2

Liste des références bibliographiques utilisées pour la cartographie:

Baumann K.-H., Andruleit H.A., & C. Samtleben (2000). Coccolithophores in the Nordic seas: comparison of living communities with surface sediment assemblages. *Deep Sea Research II* **47**:1743-1772.

Baumann K.-H., Andruleit H.A., Schröder-Ritzrau A., & C. Samtleben (1997). Spatial and temporal dynamics of coccolithophores communities during low production phases in the Norwegian-Greenland Sea. In: H.C. Hass & M.A. Kaminsky (eds) *Contributions to the micropaleontology and paleoceanography of the Northern North Atlantic*. Grybowski Foundation Special Publication, pp. 227-243.

Baumann, K.-H., Cepek, M., & H. Kinkel (1999). Coccolithophores as indicators of ocean waters masses, surface-water temperature, and paleoproductivity. Examples from the South Atlantic. In: G. Fischer & G. Wefer, (eds) *Use of proxies in paleoceanography: examples from the South Atlantic*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 117-144.

Borsetti A.M. & F. Cati (1972). Il nannoplancton calcareo vivente nel Tirreno centro-meridionale Parte I. *Giornale di Geologia* (2) **XXXVIII**:395-452.

Borsetti A.M. & F. Cati (1979). Il nannoplancton calcareo vivente nel Tirreno centro-meridionale Parte III. *Giornale di Geologia* (2) **XLIII**:157-174.

Borsetti A.M. & F. Cati. (1976). Il nannoplancton calcareo vivente nel Tirreno centro-meridionale Parte II. *Giornale di Geologia* (2) **XL**:209-240.

Braarud T. (1979). The temperature range of the non-motile stage of *Coccolithus pelagicus* in the north atlantic region. *Br. phycol. J.* **14**:349-352.

Brown, C.W. & G.P. Podesta (1997). remote sensing of coccolithophore blooms in the Western South Atlantic Ocean. *Remote Sensing Environment* **60**:83-91.

Cachao M. & M.T. Moita (2000). *Coccolithus pelagicus*, a productivity proxy related to moderate fronts off Western Iberia. *Mar. Micropal.* **39**:131-155.

Cros L. (2001). Planktonic coccolithophores of the NW Mediterranean. Thesis: Universitat de Barcelona, Barcelona, pp. 365.

Delesalle B. & M.-J Chretiennot-Dinet (1999). Efflorescences algales planctoniques dans les lagons d'Atolls de Polynésie Française. rapport final. Programme National Efflorescences Algales Toxiques.

Eynaud, F., J. Giraudeau, J.-J. Pichon et C.J. Pudsey (1999). Sea-surface distributions of coccolithophores, diatoms, silicoflagellates and dinoflagellates in the South Atlantic Ocean during the late austral summer 1995. *Deep-Sea Research I* **46**: 451-482

Findlay C.S. & J. Giraudeau (2001). Extant calcareous nannoplankton in the Australian Sector of the Southern Ocean (austral summers 1994 and 1995). *Mar. Micropal.* **40**:417-439.

Gayoso A. M. (1995). Bloom of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) in the western South Atlantic Ocean. *J. Plankton Res.* **17**(8): 1717-22.

Giraudeau, J. et G.W. Bailey (1995). Spatial dynamics of coccolithophore communities during an upwelling event in the Southern Benguela system. *Cont. Shelf Res.* **15**:1825-1852.

Giraudeau J., Monteiro P.M.S. et K. Nikodemus (1993). Distribution and malformation of living coccolithophores in the northern Benguela upwelling system off Namibia. *Mar. Micropal.*, **22**:93-110.

Hagino K. (1997). Distribution of living coccolithophores in the western Pacific Ocean off the coast of Northeast Japan. *Fossils* **63**:1-19.

- Haidar A.T. & H.R. Thierstein (2001).** Coccolithophore dynamics off Bermuda (N. Atlantic). *Deep Sea Research Part II* **48**:1925-1956.
- Halldal P. & J. Markali (1955).** Electron microscope studies on coccolithophorids from the Norwegian Sea, the Gulf Stream and the Mediterranean. *Avhandlingar utgitt av det Norske Videnskapsakademi i Oslo. Mat.- Naturvid. Klasse* **1**:1-30.
- Hallegraeff G.M. (1984).** Coccolithophorids (Calcareous Nanoplankton) from Australian Waters. *Botanica Marina* **27**:229-247.
- Hernández-Becerril D.U., Bravo-Sierra E. et Y. Ramírez-Valdéz (2001)** Coccolithophorids from the west coast of Baja California, Mexico. *Hydrobiologia* **452** (1/3):31-45
- Hiramatsu C. & P.D. Deckker (1996).** Distribution of calcareous nannoplankton near the subtropical convergence, South of Tasmania, Australia. *Mar. Freshwater Res.* **47**:707-713.
- Honjo S. & H. Okada (1974).** Community structure of coccolithophores in the photic layer of the mid-Pacific. *Micropaleontology* **20**:209-230.
- Jordan R.W. & A. Winter (2000).** Assemblages of coccolithophorids and other living micropalnkton off the coast of Puerto Rico during January-May 1995. *Mar. Micropaleontology*. **39**:113-130.
- Jordan R.W., Knappertsbusch M., Simpson W.R. & A.H.L. Chamberlain (1991).** *Turrilithus latericioides* gen. et sp. nov., a new coccolithophorid from the deep photic zone. *Br. phycol. J.* **26**:175-183.
- Kleijne A. (1991).** Holococcolithophorids from the Indian Ocean, Red Sea, Mediterranean Sea and North Atalntic Ocean. *Mar. Micropal.* **17**:1-76.
- Kleijne A. (1992).** Extant Rhabdosphaeraceae (coccolithophorids, class Prymnesiophyceae) from the Indian Ocean, Red Sea, Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean. *Scripta Geologica* **100**:1-63.
- Kleijne A. (1993).** Morphology, taxonomy and distribution of extant coccolithophorids (calcareous nannoplankton). Thesis Free University of Amsterdam, Amsterdam.
- Kleijne A., Jordan R,W. & A.H.L. Chamberlain (1991).** *Flosculosphaera calceolariopsis* gen. et s.p. nov. and *F. sacculus* sp. nov., new coccolithophorids (Prymnesiophyceae) from the NE Atlantic. *Br. Phycol. J.* **26**:185-194.
- Kopczynska E.E., Fiala M. & C. Jeandel (1998).** Annual and interannual variability in phytoplankton at a permanent station off Kerguelen Islands, Southern Ocean. *Polar biol.* **20**.
- Lebour, M.V.** *Coccolithophora pelagica* (Wallich) from the Channel. , 271-275.
- Lecal J. (1967).** Le nannoplancton des côtes d'Israël. *Hydrobiologia* **29**:305-387.
- Lecourt M., Muggli D.L. & P.J. Harrison (1996).** Comparison of growth and sinking rates of non-coccolith- and coccolith-forming strains of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) grown under different irradiances and nitrogen sources. *J. Phycol.* **32**:17-21.
- McIntyre A. et A.W.H. Bé (1967).** Modern coccolithophoridae of the Atlantic Ocean 1. Placoliths and cyrtoliths. *Deep-Sea res.* **14**:561-597.
- Nishida S. (1986).** Nannoplankton flora in the Southern Ocean, with special reference to siliceous varieties. *Memoirs of National Institute of Polar Research.* Special issue **40**:56-68.
- Norris R.E. (1984).** Indian Ocean nanoplankton. I. Rhabdosphaeraceae (Prymnesiophyceae) with a review of extant taxa. *J. Phycol.* **20**:27-41.

Norris R.E. (1985). Indian Ocean nanoplankton. II. Holococcolithophorids (Calyptrosphaeraceae, Prymnesiophyceae) with a review of extant genera. *J. Phycol.* **21**:619-641.

Okada H. & A. McIntyre (1977). Modern coccolithophores of the Pacific and North Atlantic Oceans. *Micropaleontology* **23**:1-55.

Okada H. & A. McIntyre (1979). Seasonal distribution of modern coccolithophores in the Western North Atlantic Ocean. Marine biology. *International Journal on Life in Oceans & Coastal Waters* **54**:319-328.

Okada H. & S. Honjo (1973). The distribution of oceanic coccolithophorids in the Pacific. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts* **20**:355-374.

Parke M. & I. Adams (1960). The motile (*Crystallolithus hyalinus* Gaarder & Markali) and non-motile phases in the life history of *Coccolithus pelagicus* (Wallich) Schiller. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **39**: 263-274.

Reid F.M.H. (1980). Coccolithophorids of the North Pacific Central Gyre with notes on their vertical and seasonal distribution. *Micropaleontology* **26**:151-176.

Samtleben C. & A. Schröder (1992). Living coccolithophore communities in the Norwegian-Greenland Sea and their record in sediments. *Mar. Micropal.* **19**:333-354.

Takahashi K. & H. Okada (2000). Environmental control on the biogeography of modern coccolithophores in the southeastern Indian Ocean offshore of Western Australia. *Mar. Micropal.* **39**:73-86.

Tarran G.A., Zubkov M.V., Sleigh M.A., Burkill P.H. et M. Yallop (2001). Microbial community structure and standing stocks in the NE Atlantic in June and July of 1996. *Deep-Sea Res. Part II* **48**(4-5):963-985.

Winter A., Reiss Z. & B. Luz (1979). Distribution of living coccolithophore assemblages in the Gulf of Elat ('Aqaba). *Mar. Micropal.* **4**:197-223

ANNEXE 3

Tableau 1: Composition du milieu ESAW d'après Berges *et al.*, 2001.

	Final concentration in media
<i>Salt solution I – anhydrous salts</i>	
NaCl	363,00 Mm
Na ₂ SO ₄	25,00 mM
KCl	8,04 mM
NaHCO ₃	2,07 mM
KBr	725,00 µM
H ₃ BO ₃	372,00 µM
NaF	65,70 µM
<i>Salt solution II – hydrated salts</i>	
MgCl ₂ 6H ₂ O	41,20 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	9,14 µM
SrCl ₂ 6H ₂ O	82,00 µM
<i>Major nutrients</i>	
NaNO ₃	1000,00 µM
NH ₄ Cl	10,00 µM
KH ₂ PO ₄	50,00 µM
<i>Metals</i>	
CuSO ₄	0,01 µM
ZnSO ₄	0,10 µM
Na ₂ MoO ₄	0,01 µM
CoCl ₂	0,01 µM
H ₂ SeO ₃	0,01 µM
<i>EDTA</i>	
Na ₂ EDTA	100,00 µM
NaFeEDTA	10,00 µM
<i>Vitamins</i>	
Vit. B12	0,01 µM
Biotine	0,001 µM
Thiamine	0,10 µM

ANNEXE 4

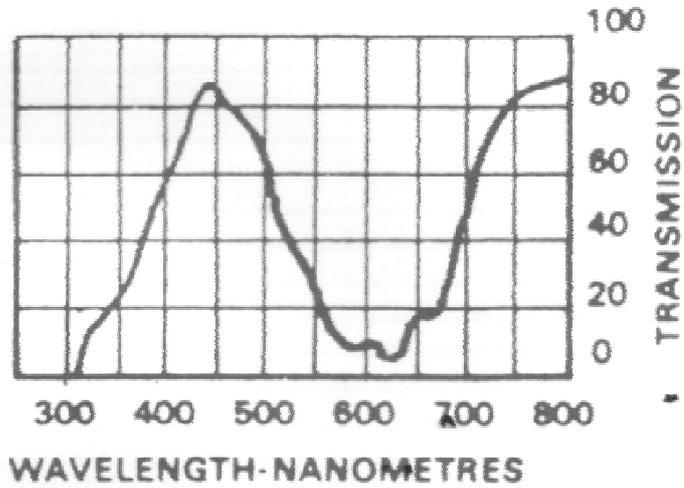


Figure 1 : Spectre d'absorption du filtre bleu vert utilisé pour les expériences sur la qualité de la lumière.

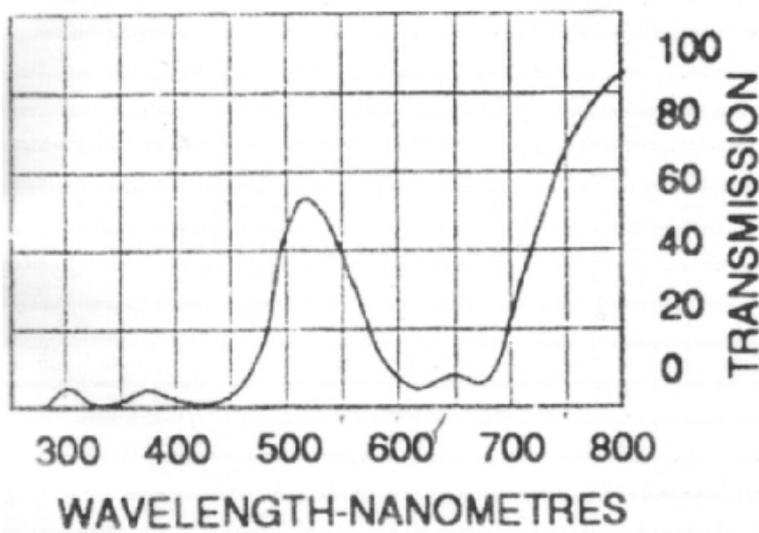


Figure 2 : Spectre d'absorption du filtre vert utilisé pour les expériences sur la qualité de la lumière.

ANNEXE 5



Ecological Strategies of Coccolithophores: A case study of *Coccolithus pelagicus*



A.HOUDAN¹, I. PROBERT², C. BILLARD³

¹houdan@ibba.unicaen.fr; ²ianprobert@hotmail.com; ³billard@ibba.unicaen.fr

Introduction

Parke & Adams (1960) demonstrated that two 'species' of coccolithophore, *Coccolithus pelagicus* (Wallich) Schiller (a heterococcolithophore) and *Crystallolithus braarudii* Gaarder (a holococcolithophore) are in fact separate stages in a heteromorphic life-cycle of one species, which keeps the name *Coccolithus pelagicus* (Figure 1). Certain coccolithophore life-cycles which involve alternation of a heterococcolith-bearing stage with a scale-bearing stage have been shown to be haplo-diplontic (e.g. *Pleurochrysis* sp., Rayns, 1962; Gayral & Fresnel, 1983; *Emiliania huxleyi*, Green *et al.*, 1996). Recently, several coccolithophore species have been shown to have complex life histories, presumed by analogy to be haplo-diplontic (Billard, 1994; Cros *et al.*, 2000). Few studies have addressed the ecological significance of this kind of haplo-diplontic heteromorphic life-cycle, particularly due to the lack of cultures of coccolithophores. The CODENET network has permitted the isolation and the culture of many species. For six of them we actually have both life-cycle stages in culture, *Coccolithus pelagicus* being the first to have changed phase in our laboratory. Flow cytometric analysis has confirmed that this species has a haplo-diplontic life-cycle (unpublished results). Over the last few years, *C. pelagicus* has been the focus of culture experiments aimed at developing our understanding of its life cycle and ecology.

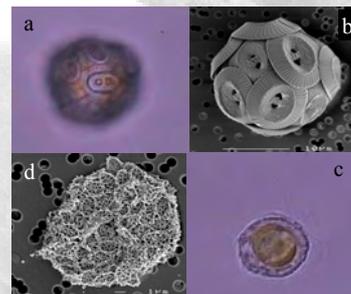


Figure 1: The diploid (a,b) and haploid (c,d) stages in the life-cycle of *Coccolithus pelagicus* viewed with light and electronic microscopy.

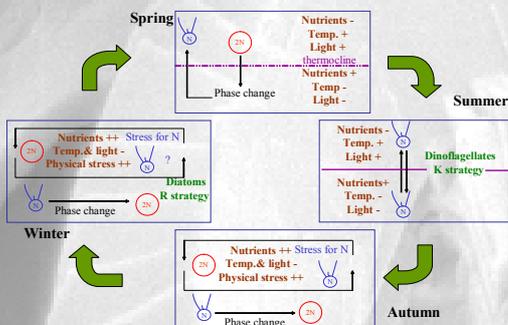


Figure 2: Hypothetical ecological cycle of *Coccolithus pelagicus* in temperate waters.

Objectives

From knowledge of the morphology (motile vs non-motile) and limited data on the temporal distribution of the two phases of *C. pelagicus*, a hypothetical model for the ecology of this species is proposed (Figure 2). In order to evaluate this model, culture experiments are being undertaken to study the influence of the following environmental factors on the growth and life cycle phase changes in pure cultures of each phase of *C. pelagicus*:

- nutrients: different concentrations of N and P in the culture medium;
- turbulence: oscillation table;
- light (quantity, quality with different wave-lengths, phototropism ...);
- temperature.

Results

Selected results from culture experiments are presented in Table 1 and Figures 3-4.

Nutrients (Table 1): growth rates are similar at each nutrient concentration, but the duration of growth is longer in the haploid phase leading to greater cell densities particularly at low nutrient concentrations.

Viability: The haploid stage can survive for > 1 year without subculturing, the diploid stage dies after ~ 1 month.

Turbulence (Figure 3): Reduced growth for both stages; relatively greater negative effect on haploid stage.

Light: Preliminary results (not shown) indicate that the haploid stage is better adapted to strong light intensities and vice versa. The haploid stage shows a strong positive phototropism (diploid stage non-motile).

Life-cycle observations: Different stages in the sexual reproductive cycle of *C. pelagicus* have been observed for the first time (Figure 4). First indications suggest the influence of light intensity, turbulence and culture age on this cycle.

	Medium	K	K'	D
2N	K0	0.243	0.237	25 100
	K/100	0.312	0.360	24 850
	K/25	0.383	0.464	36 333
	K/10	0.436	0.419	83 600
	K/2	0.486	0.651	116 100
N	K/100	0.397	0.405	51 000
	K/25	0.436	0.458	68 100
	K/10	0.397	0.523	97 600

Table 1: Cell specific growth rates over entire growth period (K), during exponential phase (K') and maximum cell densities (D) for cultures of each phase grown in K medium with varying concentrations of N and P (for K medium N=1000µM, P=36µM)

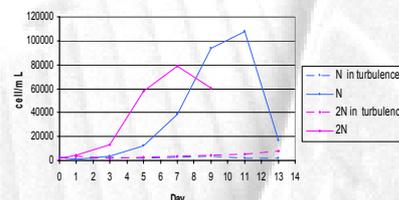


Figure 3: Growth curves of both stages of *C. pelagicus* with turbulence (15r.p.m.) and static control.

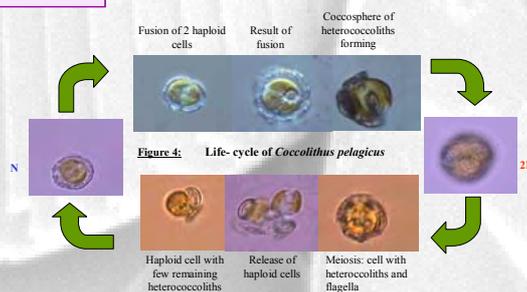


Figure 4: Life-cycle of *Coccolithus pelagicus*

Conclusion and Perspectives

First results lend support to the hypothesis that the diploid stage in the life-cycle of *C. pelagicus* is adapted to an *r*-strategy relative to the haploid stage which shows many features characteristic of *K*-selected phytoplankton. It is interesting to note that the classic *r*-strategists, the diatoms, have a diploid life cycle while the *K*-selected dinoflagellates have a haploid cycle. Ongoing and planned experiments include studies on the effects of light quality, temperature and salinity on the growth of each phase of *C. pelagicus*, as well as focus on the mixotrophic and migration capacities of the motile haploid phase. Similar autecological studies are planned for the other coccolithophore species for which we have both phases in culture (*Emiliania huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, *Calcidiscus leptoporus*, *Syracosphaera pulchra*, *Coronosphaera mediterranea*).

References

Billard, C. (1994). Life cycles. In: *The Haptophyte Algae*. J. C. Green and B. S. C. Leadbeater. Oxford, For the Systematics Association by Clarendon Press. 21: 167-86.
 Cros, L., A. Klejjar, A. Zeltner, C. Billard, and J. Young (2000). "New examples of holoheterococcolithophorid combination coccolithophores and their implications for coccolithophorid biology." *Marine Microgeology* 39(1-4): p. 1-34.
 Gayral, P. and J. Fresnel (1983). "Description, sexualité et cycle de développement d'une nouvelle coccolithophore (Prymnesiophyceae): *Pleurochrysis pseudonocardiformis* sp. nov." *Praxinologica* 10(2): 245-261.
 Green, J.C., P.A. Coombs and G.A. Tarran (1996). "The life-cycle of *Emiliania huxleyi*: a brief review and a study of relative ploidy levels analysed by flow cytometry." *Journal of Marine Systems* 9: 33-44.
 Parke, M. and I. Adams (1960). "The motile (*Crystallolithus bryllianus* Gaarder & Markali) and the non-motile phases in the life history of *Coccolithus pelagicus* (Wallich) Schiller." *J. mar. biol. Ass. U.K.* 39: 563-574.
 Rayns, D.G. (1962). "Alterations of generations in a coccolithophorid, *Cricosphaera carterae* (Braun & Fagerl) Braurud." *J. mar. biol. Ass. U.K.* 1962. 42: p. 481-484 (aggl.) Braurud *J. mar. biol. Ass. U.K.* 42: p. 481-484

Figure 1 : Poster réalisé lors du congrès « Coccolithophores – from molecular processes to global impact » à Ascona (Suisse) en février 2002.