
Université de Lille1 Sciences et Technologies

Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences

Ecole doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de L'environnement

Thèse de Doctorat

Présentée par

Fabien DUFOSSÉ

En vue de l'obtention du grade de

Docteur

Spécialité

Géosciences, Écologie
Paléontologie, Océanographie

**Effets de la limitation en sels nutritifs, de la température et
de leurs interactions sur la réponse de cinq espèces
phytoplanctoniques : Approche multifactorielle
expérimentale en monoculture et en communauté**

Date de soutenance : 16 Décembre 2014

Devant le Jury composé de

Pr. Pascal claquin	Université de Caen Basse-Normandie	Rapporteur
Dr. Jean-Luc Mouget	Université du Maine, Le Mans	Rapporteur
Pr. Jean-Michel Brylinski	Université du Littoral Côte d'Opale	Examineur
Dr. Alexandrine Pannard	Université de Rennes 1	Examineur
Pr. Sébastien Lefebvre	Université de Lille 1	Directeur de Thèse
Dr. Valérie Gentilhomme	Université de Lille 1	Responsable scientifique

Résumé court

Les effets de la limitation en azote et en phosphore, de la température et de leurs interactions ont été étudiés expérimentalement sur différents traits de réponse de cinq microalgues marines présentant des phénologies différentes en Manche Orientale ainsi qu'une large gamme de volumes cellulaires. Notre étude montre que le volume cellulaire est un paramètre essentiel à prendre en compte dans la définition de groupes fonctionnels car il conditionne une partie des réponses des microalgues aux différentes conditions environnementales. Une forte diminution de l'activité photosynthétique est constatée pour les petites cellules du fait d'une interaction entre les sels nutritifs et la température. De plus, l'intensité de la réponse aux différentes conditions environnementales augmente quand la taille diminue. Les sels nutritifs, la température et leur interaction influencent la formation d'hydrates de carbone de façon spécifique, aboutissant à une augmentation d'hydrates de carbone par cellule en cas de limitation. Par ailleurs, nos résultats montrent un effet plus fort des sels nutritifs par rapport à la température sur les différents traits mesurés et des différences de réponse au sein d'un même groupe fonctionnel classique (diatomées). Enfin, des communautés expérimentales en limitation azote, phosphore et sans limitation, ont été constituées afin de comparer la productivité des communautés et des monocultures. La limitation en azote influence la composition spécifique des communautés et aucune relation claire entre diversité et productivité n'est mise en évidence. Cependant, les communautés sont plus efficaces que les monocultures pour l'absorption des sels nutritifs et de lumière traduisant un effet de complémentarité. Toutes ces observations sont essentielles pour comprendre les effets des modifications environnementales sur les microalgues dans le cadre du changement global et par extension, sur le fonctionnement des écosystèmes marins.

Mots clefs : *phytoplankton, approche multifactorielle, limitation en sels nutritifs, température, traits fonctionnels, photosynthèse, hydrates de carbone*

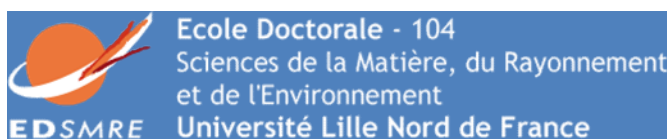
Short abstract

The effects of nitrogen and phosphorus depletion, temperature and their interaction were studied on five microalgae which differ in terms of phenology and size. By a multifactorial experimental approach, we demonstrated that nutrient effects override temperature effects, and that species from a same classical functional group could show different responses. Our results suggest that size matters for the responses of microalgae in our different conditions. Indeed, an interactive effect of temperature and nutrients was observed leading to decrease of photosynthetic activity of the small sized algae. These species also showed a high variability in their responses compared to larger ones. Furthermore, particular and dissolved carbohydrates per cell was positively influenced by nutrient limitation, temperature or their interaction, independently of cell size but rather in a specific way. Lastly, in order to highlight the relationship between productivity and diversity three experimental communities were done under nitrogen or phosphorus depletion. Our results demonstrated a better efficiency of nutrient and light absorption of communities compared to monocultures. However these communities were overall less productive than monocultures in terms of carbohydrate and biomass formation. No clear trend between diversity and productivity was shown in our study. Our results provide useful information about the responses of phytoplankton to environmental gradients and consequently of several ecosystem processes taking into account the modifications expected through global change.

Keywords: *phytoplankton, nutrient limitation, temperature, functional response traits, diversity/productivity relationship, photosynthesis, carbohydrates*

Avant-propos

Ce travail de recherche à été réalisé au sein de l'école doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement (SMRE), attaché à l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1, dans le Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences de Wimereux (LOG).



Cette thèse s'inscrit dans le cadre du programme « Impact des Changements Climatiques et Anthropiques sur la biodiversité des pRotistes des Ecosystèmes côtiers » (ICCARE) financé par la région Nord/Pas-de-Calais et la Fédération de Recherche sur la Biodiversité (FRB).



**RÉGION
NORD-PAS DE CALAIS**

Remerciements

Trois ans se sont écoulés depuis le début de cette thèse. Trois ans durant lesquels j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes, avec qui j'ai travaillé ou que j'ai simplement côtoyé et que j'aimerais remercier.

Je tiens à remercier en tout premier lieu Pascal Claquin et Jean-Luc Mouget pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Jean-Michel Brylinski et Alexandrine Pannard, examinateurs de ce travail.

Merci à Sébastien Lefebvre, mon directeur de thèse, et à Valérie Gentilhomme, responsable scientifique, qui m'ont permis de réaliser ce travail sans réelles contraintes matérielles. Merci à toi, Sébastien, pour m'avoir procuré ce confort de travail, pour ton suivi et ta réactivité qui ne m'ont jamais fait défaut, même pendant tes vacances. Merci également de m'avoir montré différentes méthodes de travail et de m'avoir initié, entre autres, aux analyses en fluorescence modulée et aux joies de la programmation. Merci à toi Valérie pour avoir suivi ce travail, pour m'avoir formé aux analyses de sels nutritifs et pour tous les conseils que tu as pu me procurer pendant ces trois ans. Enfin j'aimerais vous remercier tous les deux de m'avoir permis d'enseigner en tant que moniteur à l'université de Lille 1. Ce fut une expérience enrichissante.

Merci à Francois Schmitt, directeur du Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire.

Tout au long de ces trois ans j'ai eu l'occasion de collaborer avec des chercheurs que j'aimerais remercier. Tout d'abord, merci à Fabienne Goulard d'avoir contribué activement à ce travail et pour son expertise en tant que biochimiste. Réussir à rendre la biochimie intéressante n'est pas à la portée de tous ! Un grand merci à Elsa Breton pour m'avoir appris à me servir correctement d'un microscope, pour avoir fourni certaines souches algales et pour nos trop rares discussions scientifiques. Merci également à François Gevaert pour sa contribution aux analyses pigmentaires, que je n'ai malheureusement pas encore eu le temps de valoriser. Enfin, merci à Gonzalo Marquez pour m'avoir initié à la modélisation DEB, pour m'avoir familiarisé avec Matlab et pour m'avoir accueilli chez lui, à Lisbonne.

Merci également à Nicole Degros et Gwendoline Duong pour leur contribution aux analyses CHN et pigmentaires.

Durant cette thèse j'ai encadré, au moins en partie, des stagiaires issus de formations et d'horizons différents que je tiens à remercier. Merci donc à Charlotte, Julie, Julien, Kevin, Khedidja, Marion, Noémie et Ragil pour votre contribution à ce travail. J'espère que cette expérience a été aussi enrichissante pour vous que pour moi. Je remercie également Morgane, assistant ingénieur, entre autres pour son aide concernant les prélèvements, l'étude du coefficient spécifique de la chlorophylle *a*, les extractions et dosages de la chlorophylle *a* et pour n'avoir pas trop rechigné à faire la vaisselle et à remplir les boîtes de cônes.

Pendant ces trois ans j'ai eu la chance de côtoyer au quotidien de nombreuses personnes que j'aimerais remercier. Tout d'abord, merci aux différents chercheurs, qu'ils soient de la station marine ou du côté obscur du laboratoire (la MREN !), avec qui je n'ai pas nécessairement travaillé mais qui m'ont tous apporté un petit quelque chose, et particulièrement Dorothée (pour ses conseils, ses encouragements et son soutien sans faille), Nicolas (pour nos trop rares échanges de mails) ou encore Vincent (qui fait un super Tajine).

Merci aux autres personnels du laboratoire et plus particulièrement, que les lecteurs n'y voient pas là une scission stérile (et inexistante...) entre les deux bâtiments, à tout le personnel de la station marine que j'ai davantage côtoyé. Merci donc aux BITOSS Didier, Michel, Patrick et Thierry (le cerbère de la porte également expert en chambre froide) pour leur aide et leur disponibilité. Merci également à Josette, pour avoir gardé un œil bienveillant sur ma personne, à Christelle et Christine pour le café (entre autres) et à Dominique (notre Mc Gyver local) pour son aide mais aussi pour ces petits moments du quotidien (rassure toi je ne prendrai plus ta place au café !) et pour les noix. Merci à Philippe qui veille au bon fonctionnement de cette cochonnerie d'informatique et au personnel administratif qui, en s'occupant de toutes ces formalités, nous sort une belle épine du pied. Merci également à Murielle et Valérie pour les friandises et à Katia et Virginie pour ce petit grain de folie qui à, bien souvent, égayé mes journées.

Merci également à tous mes compagnons d'infortune pour tous ces moments passés que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur du laboratoire. Je vous souhaite à tous bon courage pour la fin de votre thèse ou pour la suite pour ceux qui ont déjà terminé. Force et Honneur.

Merci à tous les gens qui ont gravité autour de moi durant ces trois dernières années pour leur soutien sans faille et pour tous les moments de détente salvateurs. Vous faites, vous aussi, parti de cette aventure doctorale. Je pense particulièrement à Fp (danseur invétéré) et Tiphaine (pour qui je ne suis qu'une coureuse de rempart orchidoclaste) mais aussi à Nat, Clémence

Oudard (ce sont mes remerciements, j'en fais ce que je veux), Thomas, Cédric, Max, Micky, Jb, Antoine, Virginie, Mick... et à tous les autres que je n'ai pas l'occasion de suffisamment voir.

Un merci particulier à ma petite Alice, pour son soutien indéfectible et tout ce que tu m'apportes au quotidien.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et Benj' qui ont toujours été là pour moi et m'ont toujours soutenu. Tous les remerciements du monde ne seront jamais à la hauteur de ce que je vous dois !

Table des matières

<u>I.Introduction Générale.....</u>	<u>1</u>
I.1 Le phytoplancton : définition, intérêt et dépendance environnementale.....	3
I.1.1 Influences possibles et observées du changement global.....	4
I.1.2 Sels nutritifs.....	4
I.1.3 Température	6
I.2 Une diversité spécifique et fonctionnelle du phytoplancton	7
I.2.1 Diversité fonctionnelle et définitions associées	9
I.2.2 Dépendance des traits physiologiques et morphologiques.....	10
I.2.3 Vers une approche fonctionnelle des processus phytoplanctoniques.....	12
I.3 Effets du changement global sur le phytoplancton : méthodes d'étude et traits considérés	13
I.3.1 Effets environnementaux sur les principaux traits phytoplanctoniques.....	15
I.3.2 Production d'hydrates de carbone et exsudation.....	21
I.3.3 Etude de la biomasse	23
I.4 Les relations productivité/diversité	24
I.5 Problématiques, objectifs et organisation du manuscrit	28
I.5.1 Espèces d'intérêt	29
I.5.2 Déroulement du manuscrit	33
<u>II.Influence of dissolved inorganic phosphate limitation on several response traits of three marine phytoplankton species.....</u>	<u>36</u>
II.1 Introduction	39
II.2 Material and methods	41
II.2.1 Species choice	41
II.2.2 Experimental design.....	42
II.2.3 Phytoplankton counts, and algal biomass measurements.....	43
II.2.4 Nutrient analysis.....	44
II.2.5 Elemental analysis.....	44
II.2.6 Photosynthetic capacity.....	44
II.2.7 Carbohydrates.....	46
II.2.8 Statistical analyses.....	46
II.3 Results	47
II.3.1 Biomass and nutrient dynamics.....	47
II.3.2 Photosynthetic capacity.....	49
II.3.3 Carbohydrates production and content.....	51

II.3.1	Stoichiometry	52
II.3.2	Principal Component Analysis.....	54
II.4	Discussion.....	55
II.4.1	Nutrient, biomass and stoichiometry.....	55
II.4.2	Photosynthesis	57
II.4.3	Carbohydrates.....	58
II.4.4	Interest of multi-traits studies.....	60

III. Size-dependence of interactive effects of nutrient and temperature on photosynthetic response traits of five phytoplankton species..... 64

III.1	Introduction.....	67
III.2	Material and methods.....	70
III.2.1	Species choice	70
III.2.2	Experimental design.....	71
III.2.3	Biomass proxies and growth	72
III.2.4	Dissolved inorganic nutrients.....	73
III.2.5	Particulate organic carbon analysis	73
III.2.6	Chlorophyll <i>a</i>	73
III.2.7	Photosynthetic response traits	74
III.2.8	Statistical analysis	75
III.3	Results.....	77
III.3.1	General patterns as revealed by redundancy analysis	77
III.3.2	Co-variation of photosynthetic parameters $rETR_{max}$ vs E_k	80
III.3.3	Closer look on response traits	80
III.4	Discussion.....	90
III.4.1	Nutrient and temperature separate effects	91
III.4.2	Interactive effect of nutrient and temperature for small species	94
III.4.3	Various responses to a same limitation: size matters.....	96
III.5	Conclusions.....	98

IV. Dépendance taxonomique des effets de la limitation en sels nutritifs, de la température et de leur interaction sur la production d'hydrates de carbone..... 100

IV.1	Introduction.....	104
IV.2	Matériels et méthodes	108
IV.2.1	Espèces étudiées	108
IV.2.2	Design expérimental.....	109
IV.2.3	Suivi de biomasse.....	110

IV.2.4	Concentration en sels nutritifs.....	111
IV.2.5	Hydrates de carbone dissous et particulaires.....	111
IV.2.6	Mesure du carbone organique particulaire (COT)	112
IV.2.7	Chlorophyll <i>a</i>	112
IV.2.8	Paramètres photosynthétiques	113
IV.2.9	Analyses statistiques	113
IV.3	Résultats.....	114
IV.3.1	Quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous	114
IV.3.1	Effet taille	117
IV.3.2	Relation hydrates de carbone particulaires/hydrates de carbone dissous.....	120
IV.3.3	Photosynthèse.....	122
IV.3.1	Carbone organique particulaire total (COT)	122
IV.4	Discussion.....	124
IV.4.1	Effet de la température, de la limitation en azote ou en phosphore ou de leurs interactions	125
IV.4.2	Effets de l'interaction sels nutritifs/température	130
IV.4.3	Relation entre la quantité d'hydrates de carbone et la taille des cellules	132
IV.4.4	Dépendance taxonomique des réponses observées	135
IV.5	Conclusion	136

V. Etude de la relation diversité/productivité de communautés microalgales sous influence environnementale..... 138

V.1	Introduction	141
V.2	Matériels et méthodes	144
V.2.1	Design expérimental.....	144
V.2.2	Paramètres étudiés.....	146
V.2.3	Carbone organique et azote total particulaire.....	147
V.2.4	Paramètres photosynthétiques	147
V.2.5	Analyses mathématiques : calcul de rendements	147
V.2.6	Indice de diversité : l'indice de Shannon	148
V.2.7	Analyses statistiques	149
V.3	Résultats.....	150
V.3.1	Structure des communautés.....	150
V.3.1	Relations avec les sels nutritifs	152
V.3.2	Comparaison des rendements en monoculture et en communauté	157
V.4	Discussion.....	163

V.4.1	Structure des communautés expérimentales	163
V.4.2	Analyse des rendements : les communautés sont-elles plus productives que les monocultures ?	166
V.5	Conclusion et intérêt de l'approche multifactorielle	170

VI.Synthèse générale 172

VI.1	Des réponses contrastées aux différentes conditions environnementales des traits mesurés	174
VI.2	Des réponses spécifiques et fonctionnelles	179
VI.3	Des relations productivité/diversité non établies	186
VI.4	Perspectives.....	189

VII.Références bibliographiques..... 192

Liste des figures

Fig. I-1: évolution du rapport N/P de surface (avec $N = \text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) au point côte de Boulogne-sur-Mer ($1^\circ 31' 17'' \text{ E } 50^\circ 40' 75'' \text{ N}$) entre novembre 1997 et décembre 2013. Données fournies par le service d'observation en milieu littoral (SOMLIT).	5
Fig. I-2: prévisions des changements de température de surface des océans (moyenne annuelle à l'échelle globale) basé sur les résultats d'ensembles multi-modèles (IPCC, 2007) à l'horizon 2060 (à gauche). Différents scénarii (RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0 et RCP8.5) sont ici retranscrits. Les zones ombrées correspondent aux gammes de variations des estimations. Prévisions du changement de température des eaux marines de surface selon le scénario RCP4.5 à l'horizon 2030 (à droite)(Kirtman <i>et al.</i> , 2013).	6
Fig. I-3: typologie des principaux traits fonctionnels phytoplanctoniques (Litchman and Klausmeier, 2008).	11
Fig. I-4: évolution du taux de transfert relatifs d'électrons ($\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en fonction de l'intensité lumineuse ($\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).	18
Fig. I-5: Organisation des photosystèmes II (a) et de la chaîne de transport d'électrons (b). Le photosystème II est composé : d'un complexe pigment-protéine périphérique (LHCII) qui sert d'antenne collectrice de lumière mais aussi au transport de l'énergie lumineuse, d'antenne collectrice de lumière interne (CP) qui servent d'intermédiaires entre LHCII et les protéines D1 et D2 ou débute la dissociation de l'eau et le transfert d'électrons. Ce transfert d'électrons est décrit en détail sur la figure b. Quatre complexes protéiques sont représentés : le Photosystème II (PSII), le cytochrome b6-f, le photosystème I (PSI) ainsi que l'ATP synthase. Sont représentés : l'antenne acceptrice de lumière (LHCII), deux protéine CP, le centre réactionnel (RCII), la phéophytine, la quinone A et B (premier et deuxième accepteurs d'électrons), le pool de plastoquinone (PQ), une plastocyanine (PC), une ferredoxine (Fd, accepteur final d'électron en aval du PSI), La ferredoxine-NADP réductase (où à lieu la réduction du NADP). Les sources de protons (H^+) sont également représentées. Les flèches rouges continues et pointillées signalent respectivement le transport linéaire d'électrons et les voies alternatives de transport d'électrons (Huot and Babin, 2010)	20
Fig. I-6: hypothèses sur les relations biodiversité/fonctionnement de l'écosystème selon Cardinale <i>et al.</i> (2011).	25
Fig. I-7: schéma conceptuel reprenant les composantes du modèle décrit par Cardinale <i>et al.</i> (2009) et leurs interdépendances (représentées par les flèches). Ce modèle est bâti sur quatre composantes : la disponibilité en ressource (resource availability), les ratios de ces ressources	

(resource ratios), la richesse spécifique (species richness) et la biomasse de la communauté (community biomass)..... 27

Fig.II-1 : biomass dynamics of *Ditylum brightwellii*, *Phaeocystis globosa* and *Thalassiosira rotula* from *in vivo* fluorescence analysis (left) and changes of Dissolved Inorganic Phosphate (DIP) concentration (right) (μM) in the three P-treatments (Circles: P_{high} , square: P_{med} and diamond: P_{low}). Bars represent standard deviation. Note that only data from the first day of dilution are presented and scales of the figures are different..... 48

Fig. II-2: maximum electron transport rate (ETR_{max})(left) and maximum light use efficiency (right) values in P_{low} (black), P_{med} (grey) and P_{high} (dark grey) in *Thalassiosira rotula*, *Phaeocystis globosa* and *Ditylum brightwellii*. Error bars denote standard deviation. Note that scales of the figures are different. 51

Fig. II-3: daily production of exudates by *Thalassiosira rotula*, *Phaeocystis globosa* and *Ditylum brightwellii* ($\text{pg Eqglc.cell}^{-1}.\text{day}^{-1}$) (right) and their carbohydrate content ($\text{pg Eqglc.cell}^{-1}$) (left) under Different Inorganic Phosphate (DIP) concentrations (P_{low} : black, P_{med} : grey, P_{high} : dark grey). 53

Fig. II-4 : principal component analysis (PCA) loading plot of main responses of phytoplankton to different Inorganic Phosphate (DIP) limitation (a). Factorial plan issued from the previous PCA plotting the *Db*, *Pg* and *Tr* individuals for each treatment (b). 56

Fig. III-1 : ordination biplot showing the explained variables (grey arrows) in relation to temperature, species and nutrient treatments (explanatory variables, black arrows) for the two first (a) and the first and third (c) axes. As explained variables: a^* : the chlorophyll a specific absorption coefficient, biomass: proxy of biomass through fluorescence *in vivo*, α : relative maximum light use efficiency, yield: maximum effective quantum yield of PSII, $r\text{ETR}_{\text{max}}$: relative maximum electron transport rate, C:Chl *a*: Carbon/Chl *a* ratio, Ccell: Carbon per cell and logcellvolume: logarithm of cell volume. Sample ordination biplot for the two first (b) and the first and third (d) axes. Samples are designated following this scheme: “species” (D for *Db*, T for *Tr*, S for *Sk*, P for *Pg* and H for *Hr*), “temperature” (1 for 10°C and 2 for 14°C) “treatment” (N for N-lim, P for P-lim and C for Control) “replicates” (1 and 2). 79

Fig. III-2: temperature (upper bracket), treatment (two lowers brackets) or their interaction (Int) effects on the average maximum relative electron transport rate ($r\text{ETR}_{\text{max}}$; Fig.a) and logarithmic $\text{ETR}_{\text{max}}^{\text{cell}}$ (Fig.b) for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited (“species”_N), P-limited (“species”_P) and Control (“species”_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc

test at $P < 0.05$). Significant General Linear Model results are indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. NS Not significant. Bars denote standard deviation..... 82

Fig. III-3: temperature (upper bracket), treatment (two lowers brackets) or their interaction (Int) effects on the average Carbon:cell ($\mu\text{C}\cdot\text{cell}^{-1}$) and Chl *a*:cell ($\mu\text{Chl } a\cdot\text{cell}^{-1}$) ratios for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited (“species”_N), P-limited (“species”_P) and Control (“species”_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$). Significant General Linear Model results are indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. NS Not significant. Bars denote standard error. Note those ordinate axes are Log-transformed. . 84

Fig. III-4: temperature (upper bracket), treatment (two lowers brackets) or their interaction (Int) effects on the average maximum biomass from in vivo fluorescence (Fig.a) and proxies as cell volume (Fig.b) reached during the experiments for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited (“species”_N), P-limited (“species”_P) and Control (“species”_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$). Significant General Linear Model results are indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. NS Not significant. Note those ordinate axes are Log-transformed. Bars denote standard error..... 85

Fig. III-5: Temperature (upper bracket), treatment (two lowers brackets) or their interaction (Int) effects on the average cell volume for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited (“species”_N), P-limited (“species”_P) and Control (“species”_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$). Significant General Linear Model results are indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. NS Not significant. Note that ordinate axis is Log-transformed. Bars denote standard error..... 87

Fig. III-6: relationship between the logarithmic relative maximum electron transport rate (fig a; $r\text{ETR}_{\text{max}} \mu\text{mol } e^{-}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and logarithmic $\text{ETR}_{\text{max}}^{\text{cell}}$ (fig b; $\mu\text{mol } e^{-}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$) versus logarithmic cell volume (μm^3) in P-lim (light grey), N-lim (dark grey) and Control (black) treatments at 10°C (circle) and 14°C (triangle)..... 89

Fig. III-7 : relationship between the logarithmic chlorophyll *a* specific absorption coefficient (a^* , $\text{m}^2\cdot\text{mg Chl } a^{-1}$) depending on logarithmic cell volume (μm^3) in P-lim (light grey), N-lim (dark grey) and Control (black) treatments at 10°C (circle) and 14°C (triangle). 90

Fig. IV-1 : effets de la température (crochet supérieur), de la limitation en sels nutritifs (crochets inférieurs) ou de leur interaction (Int) sur la quantité d’hydrates de carbone dissous (a) et particuliers (b) totaux par cellule pour *Db*, *Tr*, *Sk*, *Pg* et *Hr* dans les conditions limitées

en azote ('espèce'-N), en phosphore ('espèce'-P) ou dans le témoin ('espèce'-C) à 10°C et 14°C. Pour chacune des espèces, les moyennes ne montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test post-hoc de Tukey <0,05). Les résultats du modèle linéaire général significatifs sont indiqués de la manière suivante : * pour p<0,05, ** pour p<0,01, *** pour p<0,001 et NS quand les différences sont non significatives. Les barres représentent les écarts types. 118

Fig. IV-2 : Evolution du logarithme de la quantité d'hydrates de carbone dissous (a) et particulaires (b) totaux (ng Eqglc.cell⁻¹) par cellule en fonction du logarithme du biovolume (µm³) dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle)..... 119

Fig. IV-3: Pourcentage d'hydrates de carbone exsudés (PER) en fonction du logarithme du biovolume (µm³) (a) dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle). (b) Evolution de la quantité d'hydrates de carbone particulaires en fonction de la quantité d'hydrates de carbone dissous pour Db, Tr, Ske, Pg et Hr dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle). Les régressions linéaires suivent le même code couleur que les conditions. En trait plein les différentes conditions à 10°C. En pointillé les différentes conditions à 14°C. 120

Fig. IV-4: Evolution du logarithme de quantité d'hydrates de carbone dissous totaux (a, ng Eqglc.jour⁻¹.µm⁻³) et du contenu en hydrates de carbone particulaires (b, ng Eqglc.µm⁻³) par unité de biovolume en fonction du logarithme du biovolume (µm³) dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle)..... 121

Fig. IV-5: effets de la température (crochet supérieur), de la limitation en sels nutritifs (crochets inférieurs) ou de leur interaction (Int) sur le taux de transport d'électron (ETR^{cell}₁₁₀, µmol e⁻.cell⁻¹) à la lumière d'exposition de l'expérimentation (110 µmol photons.m⁻².s⁻¹) pour Db, Tr, Sk, Pg et Hr dans les conditions limitées en azote ('espèce'-N), en phosphore ('espèce'-P) ou dans le témoin ('espèce'-C) à 10°C et 14°C. Pour chacune des espèces, les moyennes ne montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test post-hoc de Tukey <0,05). Les résultats du modèle linéaire général significatifs sont indiqués de la manière suivante : * pour p<0,05, ** pour p<0,01, *** pour p<0,001 et NS quand les différences sont non significatives. Les barres représentent les écarts types. 123

Fig. IV-6: effets de la température (crochet supérieur), de la limitation en sels nutritifs (crochets inférieurs) ou de leur interaction (Int) sur biomasse carbonée (µg C.l⁻¹) pour Db, Tr, Sk, Pg et Hr dans les conditions limitées en azote ('espèce'-N), en phosphore ('espèce'-P) ou dans le témoin ('espèce'-C) à 10°C et 14°C. Pour chacune des espèces, les moyennes ne

montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test post-hoc de Tukey <0,05). Les résultats du modèle linéaire général significatifs sont indiqués de la manière suivante : * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$, *** pour $p < 0,001$ et NS quand les différences sont non significatives. Les barres représentent les écarts types..... 124

Fig. V-1 : pourcentage des biovolumes totaux spécifiques pour *Db*, *Hr*, *Ske* et *Pg* dans les conditions limitées en DIP (P-lim), en DIN (N-lim) et les témoins (Control) pour les Comm3, Comm4 et Comm6 (a)..... 152

Fig. V-2: Valeur moyenne de l'indice de Shannon relevée pour les Comm3, Comm4 et Comm6 dans les conditions N-lim (gris foncé), P-lim (gris clair) et Témoin (noir). 153

Fig. V-3: Cercle des corrélations pour les deux premières composantes (a) et les composantes 1 et 3 (b). Les variables d'intérêts sont : le logarithme de l'abondance de *Db* (Db , en cellules.l⁻¹), de *Ske*, de *Hr* et de *Pg*, la concentration en azote inorganique dissous (DIN, $\mu\text{mol.l}^{-1}$) et en phosphore inorganique dissous (DIP, $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Le logarithme du rapport N/P est intégré en tant que variable supplémentaire. Projection des individus sur les deux premières composantes (c) et les composantes 1 et 3 (d) des individus de la Comm3 (rond), Comm4 (triangle) et de la Comm6 (carré) dans les conditions P-lim (bleu), N-lim (vert) et Témoin (rouge). 155

Fig. V-4: logarithme de l'abondance cellulaire (en cellules.l⁻¹) en fonction du logarithme du rapport N/P pour *Pg* (a), *Ske* (b) et *Db* (c). Les regressions linéaires significatives sont tracées par communauté sans distinction de condition expérimentale. Légende : Comm3 (rond noir, trait noir), Comm4 (carré gris, trait gris), Comm6 (rond rouge, trait rouge). 156

Fig. V-5: rendement spécifique du biovolume total Chez *Db* (rond), *Ske* (croix), *Hr* (triangle) et *Pg* (carré) dans les communautés à 6, 4 et 3 espèces dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir). -1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture 157

Fig. V-6: rendement de l'absorption de DIN (a) et DIP (b) dans les conditions limitées en DIN (N-lim, gris foncé), en DIP (P-lim, gris clair) et témoin (Control, noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture. 159

Fig. V-7: rendements du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (a, a^*) et du taux de transfert d'électrons (b, ETR_{110}) dans les conditions limitées en DIN (gris foncé), en DIP (gris clair) et témoin (noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). Le a^* était exprimé en $\text{mg Chl}a.\text{l}^{-1}$ et ETR_{110} en $\mu\text{mol e}^{-}.\text{mg Chl}a^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour les cultures mono

et plurispécifiques. 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture. 160

Fig. V-8:rendement du contenu en hydrates de carbone dissous (a) et particulaires (b), et en carbone organique particulaire (c) et en azote organique total (d) dans les conditions limitées en DIN (gris foncé), en DIP (gris clair) et témoin (noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). La quantité d'hydrates de carbone était exprimée en $\mu\text{gEq glc. cell}^{-1}$, le POC et le PON en $\mu\text{g C.cell}^{-1}$ et $\mu\text{g N.cell}^{-1}$ pour les cultures mono et plurispécifiques. 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture 161

Fig. V-9:rendement du biovolume total dans les conditions limitées en DIN (gris foncé), en DIP (gris clair) et témoin (noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). Le biovolume total était exprimé en $\mu\text{m}^3.\text{l}^{-1}$ pour les cultures mono et plurispécifiques. 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture..... 162

Fig. VI-1 : schéma conceptuel reprenant les principaux effets de la limitation en azote (DIN), en phosphore (DIP), de la température (T°) et de leur interaction sur l'activité photosynthétique, la quantité d'hydrates de carbone par cellule et la quantité de biomasse. Les flèches symbolisent la présence d'effet entre les deux compartiments visés. La largeur de ces flèches augmente avec l'importance de cet effet. Les effets peuvent se traduire par une augmentation (+), une diminution (-) ou un effet dépendant de l'espèce (\pm) du processus ou de la quantité relatifs au compartiment visé. Les influences non mesurés dans notre étude apparaissent en pointillés. Ce schéma représente une vue globale des effets observés et il important de garder à l'esprit que les effets ont une dépendance spécifique ou fonctionnelle forte. 180

Fig. VI-2: logarithme de la production d'hydrates de carbone particulaires en fonction du logarithme de biovolume à 10°C (rond) et 14°C (triangle) dans les condition limitées en phosphore (P-lim, gris clair), en azote (N-lim, gris foncé) et témoin (Control, noir)..... 181

Fig. VI-3:Schéma conceptuel des effets de la limitation en azote (DIN), en phosphore (DIP), de la température et de leur interaction en fonction de la taille des cellules (taille croissante de la gauche vers la droite). La largeur des flèches augmente avec l'intensité des effets. Les effets négatifs (-) et positif (+) de la limitation en sels nutritifs et/ou de la température sont représentés. Pour chaque gamme de taille est dénommée la nature de l'effet (à savoir effet sels nutritifs, température, d'interaction ou de synergie entre sels nutritifs et température) sur la photosynthèse (Les traits de réponses développés sont ceux influencés) et la formation

d'hydrates de carbone. Ce schéma vise à récapituler les principaux liens entre la taille et les réponses aux conditions environnementales. 183

Liste des tableaux

Tableau I-1: groupe phylogénétique, taille (μm), colonialité, occurrence principale en Manche Orientale (jour julien), et forme géométrique (d'après Hillebrand <i>et al.</i> , 1999) de <i>Ditylum brightwellii</i> , <i>Thalassiosira rotula</i> , <i>Skeletonema sp.</i> , <i>Hemiselmsis rufescens</i> et <i>Phaeocystis globosa</i>	31
Table II-1: main occurrence and growth phase (julian day), size (μm), coloniality and geometric shape (Hillebrand <i>et al.</i> , 1999) of <i>Thalassiosira rotula</i> , <i>Phaeocystis globosa</i> and <i>Ditylum brightwellii</i> observed in Eastern English Channel. Data resumed 13 years of bi-m bi-monthly observations ($50^{\circ}40'75\text{N}$; $1^{\circ}31'17\text{E}$) from SOMLIT (Service d'Observation en Milieu LITtoral-INSU CNRS) network	42
Table II-2: Dissolved Inorganic Phosphate (DIP) concentration (μM) in the three treatments at the beginning of the experiments for each species.....	43
Table II-3: minimum Dissolved Inorganic Phosphate (DIP), Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN) and Dissolved Silicates (DSi) concentrations (μM) recorded over the course of the experiments for <i>Thalassiosira rotula</i> , <i>Phaeocystis globosa</i> and <i>Ditylum brightwellii</i> under P_{high} , P_{med} and P_{low} treatments.....	49
Table II-4: mean ($\pm\text{sd}$) of chlorophyll-a specific absorption coefficient ($a^* \times 10^3 \text{ m}^2.\text{mg chl a}^{-1}$) and maximum effective quantum yield of PSII (F_v/F_m) treatments of <i>Thalassiosira rotula</i> , <i>Phaeocystis globosa</i> and <i>Ditylum brightwellii</i> under P_{high} , P_{med} and P_{low} treatments depending on time (day) and Dissolved Inorganic Phosphate (DIP) limitations.....	50
Table II-5: total N/cell ($\times 10^{-6} \mu\text{mol N. cell}^{-1}$), inorganic P/cell ($\times 10^{-7} \mu\text{mol P. cell}^{-1}$) and organic C/cell ($\times 10^{-5} \mu\text{mol C. cell}^{-1}$) ratios for <i>Tr</i> , <i>Pg</i> and <i>Db</i> according to time and P-treatments	54
Table II-6 : Day chosen for each response trait included into the PCA. ETR_{max} and α are supplementary variables due to their link with chlorophyll-a specific absorption coefficient..	62
Table II-7: Synopsis effects of dissolved inorganic phosphate limitation on biomass, photosynthesis and carbohydrates exudates and content for <i>Thalassiosira rotula</i> (<i>Tr</i>), <i>Phaeocystis globosa</i> (<i>Pg</i>) and <i>Ditylum brightwellii</i> (<i>Db</i>). 0: no effect, *: significant effect, **: highly significant effect.....	62
Table III-1: main occurrence and growth phase (julian day), size (μm), coloniality and geometric shape (according to Hillebrand <i>et al.</i> , 1999) of <i>Ditylum brightwellii</i> , <i>Thalassiosira rotula</i> , <i>Skeletonema sp.</i> , <i>Hemiselmsis rufescens</i> and <i>Phaeocystis globosa</i> observed in Eastern	

English Channel. Data resumed 13 years of bi-monthly observations (50°40'75N; 1°31'17E) from SOMLIT (Service d'Observation en Milieu Littoral-INSU CNRS) network	71
Table III-2: mean values (\pm standard error) of the maximum effective quantum yield of PSII (F_v/F_m , dimensionless), mean values of the maximum light use efficiency (α , $\mu\text{mol e}^- \cdot \mu\text{mol photons}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and chlorophyll <i>a</i> specific absorption coefficient (a^* , $\times 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) at the end of the experiments in N-lim, P-lim and Control treatments at 10°C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$).....	87
Table III-3: maximum relative growth rate (day^{-1}) depending on species and temperature. P value indicates the significance of the growth rate difference according to temperature and N the number of measured growth rates used for the analysis.....	88
Tableau V-1 : biovolumes totaux spécifiques ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{l}^{-1}$) inoculés en début d'expérimentations dans les communautés à 6 (Comm6), 4 (Comm4) et 3 espèces (Comm3).	145
Tableau V-2: Séquence de prélèvements des paramètres mesurés durant les expérimentations	146
Tableau V-3: Biovolume totaux moyen en μm^3 (\pm écart type) de <i>Db</i> , <i>Ske</i> , <i>Hr</i> et <i>Pg</i> dans les différentes conditions (P-lim, N-lim et témoin) et communautés expérimentales. Pour chacune des espèces, les moyennes ne montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test <i>post-hoc</i> de Tukey < 0.05)	151
Tableau VI-1: effet de la réduction en sels nutritifs de la Seine et du Scheldt sur la biomasse annuelle (exprimée en %) des diatomées (diatoms) et de <i>Phaeocystis</i> de la zone côtière Belge selon les prévisions du modèle MIRO (Gypens <i>et al.</i> , 2007). Les années pluvieuses (wet) sont distinguées de moins humides (dry) du fait de l'importance de la pluviométrie sur l'apport de sels nutritifs.	186

« *On fait la science avec des faits,
 comme on fait une maison avec des pierres :
 mais une accumulation de faits n'est pas plus une science
 qu'un tas de pierres n'est une maison. »*
 Henri Poincaré

I. Introduction Générale

I.1 Le phytoplancton : définition, intérêt et dépendance environnementale

Le microphytoplancton constitue l'ensemble des microalgues marines pélagiques. Ces microalgues unicellulaires autotrophes sont des organismes clefs dans de nombreux processus écosystémiques marins. En effet, en tant qu'organisme autotrophe, le phytoplancton est responsable de 46 % de la production primaire globale selon Field *et al.* (1998). Celle-ci est définie comme la quantité de carbone fixée par unité de temps (Falkowski *et al.*, 1998). Le phytoplancton est composé de nombreuses espèces qui peuvent être regroupés au sein de groupes (dont les diatomées, les haptophytes et les cryptophytes). Le phytoplancton constitue un groupe polyphylétique très diversifié dont la composition des communautés affecte fortement les cycles biogéochimiques de nombreux éléments comme le carbone, l'azote ou encore le phosphore (Falkowski and Raven, 1997; Litchman and Klausmeier, 2008). Les deux derniers éléments sont indispensables à de nombreux processus physiologiques chez les microalgues (Tilman *et al.*, 1982). La physiologie du phytoplancton est donc dépendante de facteurs chimiques, comme par exemple la disponibilité en ressource telle que l'azote et le phosphore inorganique dissous, mais aussi de paramètres physiques, comme la température, l'intensité et la qualité de lumière ou encore la turbulence. De plus, le phytoplancton, en tant que producteur primaire, est à la base de la plupart des réseaux trophiques marins (Kiørboe, 1993; Verity and Smetacek, 1996). La taille des cellules va en partie conditionner les interactions trophiques. Le phytoplancton de grande taille (majoritairement constitué de diatomées) se distingue du phytoplancton de plus petite taille dans les relations trophiques, le premier étant efficacement brouté par le mésozooplancton (Irigoien *et al.*, 2002) tandis que le second l'est davantage par des protistes hétérotrophes (Razzoulzadegan *et al.*, 1988). Les facteurs environnementaux influencent fortement la physiologie ainsi que la répartition des microalgues. Des modifications de ces facteurs peuvent donc avoir un effet sur le phytoplancton à l'échelle cellulaire, des populations et des communautés. Compte tenu de l'importance du phytoplancton au niveau écosystémique, ces effets vont également affecter le fonctionnement des écosystèmes.

I.1.1 Influences possibles et observées du changement global

Le changement global regroupe l'ensemble des modifications environnementales majeures engendrées par les activités anthropiques et les forçages naturels à l'échelle de la planète. Ce changement global est illustré par les modifications de nombreuses variables telles que l'augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique, la diminution du pH océanique, l'élévation du niveau de la mer, l'érosion de la biodiversité à l'échelle mondiale, l'augmentation de l'occurrence des événements climatiques rares et extrêmes, l'augmentation des températures moyennes, la modification des régimes de précipitations et de la configuration des vents ou encore les changements d'apport en sels nutritifs en milieu marin (Fu *et al.*, 2012; IPCC, 2007; Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Palmer *et al.*, 2008; Quiel *et al.*, 2011).

Les organismes phytoplanctoniques, bien qu'ils soient capables de s'acclimater voire de s'adapter, sont fortement dépendants des conditions environnementales dans lesquelles ils évoluent. De nombreuses modifications, telles que les changements d'apports en sels nutritifs d'origine anthropique et le changement climatique, qui sont observés depuis de nombreuses années façonnent la répartition et influencent les protistes marins à plusieurs échelles, de la cellule à la communauté (Cloern, 2001) ; ces modifications se répercutent ensuite à l'échelle écosystémique. Dans le contexte du changement global actuel, des changements multiples des propriétés physiques, chimiques et biologiques sont observés sur de nombreux écosystèmes à l'échelle planétaire ; le milieu marin n'est pas épargné. Dans une synthèse, Hallegraeff (2010) met en évidence quatre grands effets des différents facteurs du changement global sur le phytoplancton, à savoir :

- l'augmentation de la zone de répartition des espèces d'eaux chaudes vers les pôles
- la modification de l'abondance et de la phénologie de certaines espèces
- une précocité (dans le temps) de l'initiation des efflorescences phytoplanctoniques
- une influence sur les réseaux trophiques associés au phytoplancton

I.1.2 Sels nutritifs

Les activités humaines ont, depuis des années, fortement modifié les zones d'interfaces entre le continent et l'océan ouvert que sont les zones côtières. Ces zones sont très productives, 10.2% de la production primaire mondiale y est effectuée (Geider *et al.*, 2001), alors qu'elles

ne représentent que 7% de la surface de l’océan mondial (Mantoura *et al.*, 1991). Ces zones présentent de fortes variations de la concentration en sels nutritifs notamment en azote et en phosphore, mais également en silice. Les rapports N/P présentent d’ailleurs de fortes variations dans ces zones (e.g. Fig.I-1). Ces variations de rapport et de concentration, influencées par les activités anthropiques, sont associées à des changements de productivité et d’abondance des microalgues ainsi qu’à des changements dans la composition des communautés phytoplanctoniques (Gentilhomme and Lizon, 1998; Lefebvre *et al.*, 2011; Loebel *et al.*, 2009; Schapira *et al.*, 2008).

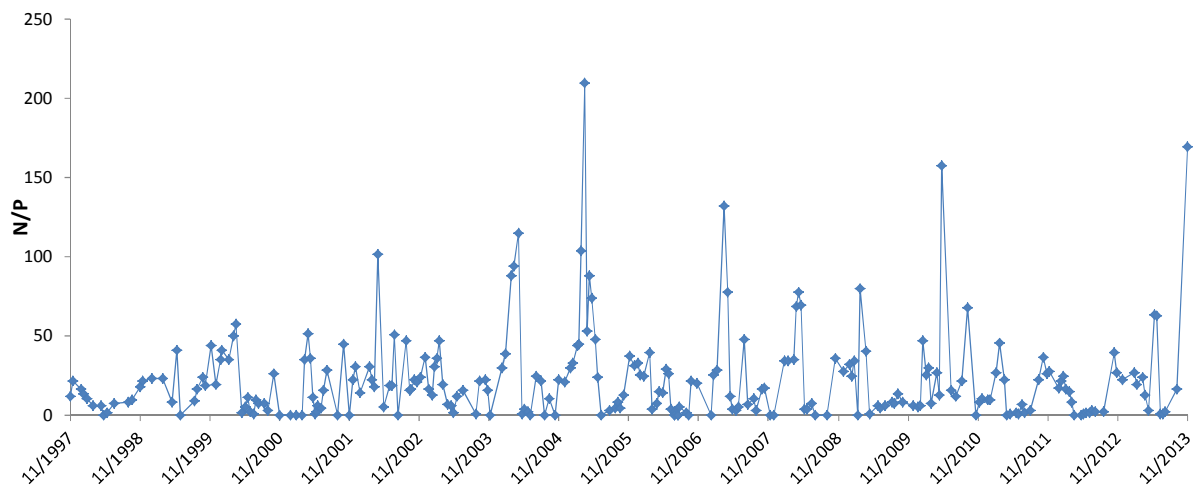


Fig. I-1: évolution du rapport N/P de surface (avec $N=NH_4^++NO_3^-+NO_2^-$) au point côte de Boulogne-sur-Mer ($1^\circ 31' 17'' E 50^\circ 40' 75'' N$) entre novembre 1997 et décembre 2013. Données fournies par le service d’observation en milieu littoral (SOMLIT).

Les études sur les relations entre la concentration en sels nutritifs et la physiologie du phytoplancton marin ont longtemps considéré l’azote comme étant le principal élément limitant (Oviatt *et al.*, 1995; Rees *et al.*, 1995; Vitousek and Howarth, 1991). Cependant, en conséquence des apports anthropiques de sels nutritifs et de la mise en place de politiques de réduction de ces apports, plus efficaces pour le phosphore que pour l’azote (Artioli *et al.*, 2008), une tendance à l’augmentation des rapports N/P est observée dans les zones côtières du nord-ouest de l’Europe. Celle-ci implique alors une augmentation des phénomènes de limitation en phosphore et en silice (Billen and Garnier, 2007; Grizzetti *et al.*, 2012; Hernández-Fariñas *et al.*, 2013; Lefebvre *et al.*, 2011; Loebel *et al.*, 2009; McQuatters-Gollop *et al.*, 2007).

La Manche Orientale et la Mer du Nord suivent cette tendance. En effet les suivis de la concentration en sels nutritifs ont mis en évidence une tendance à l’augmentation des phénomènes de limitation en phosphore et en silice dans cette zone géographique fortement

influencée par les apports de la Seine et de l'Elbe (Billen and Garnier, 2007; Lefebvre *et al.*, 2011; Peperzak *et al.*, 1998). Toutes les espèces phytoplanctoniques ne possèdent pas les mêmes affinités pour l'azote et le phosphore. Hillebrand *et al.* (2013) mettent en évidence la présence de rapport N/P optimaux plus grands pour les prymnesiophycées que les diatomées. L'évolution du rapport N/P constitue un paramètre important qui régit, du moins en partie, la nature des communautés phytoplanctoniques.

I.1.3 Température

L'augmentation de la concentration atmosphérique des gaz à effet de serre a, en conjonction avec les forces naturelles, aboutit à des changements climatiques à l'échelle mondiale. Ces changements se traduisent principalement par une modification des configurations spatiales et temporelles des précipitations, une augmentation de la fréquence des phénomènes climatiques rares et extrêmes, une élévation du niveau de la mer et par une augmentation des températures à la surface de la terre (Fig.I-2) et des eaux marines de surface. Bien qu'un réchauffement plus important (compris selon les modèles entre 1.4 et 5.8°C) soit attendu en zone terrestre comparativement au milieu marin, les modèles estiment une augmentation de température des eaux marines de surface pouvant atteindre 4°C à l'horizon 2100 pour le modèle le plus pessimiste (IPCC, 2007). L'augmentation de la température est estimée à partir de modèles climatiques multiparamétriques dont les prévisions sont représentées sur la figure I-2 (Kirtman *et al.*, 2013).

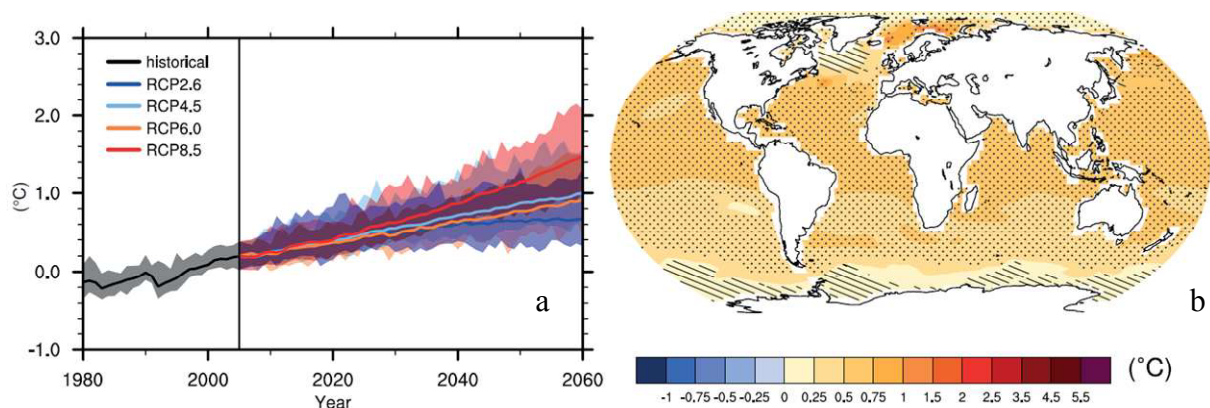


Fig. I-2: prévisions des changements de température de surface des océans (moyenne annuelle à l'échelle globale) basé sur les résultats d'ensembles multi-modèles (IPCC, 2007) à l'horizon 2060 (à gauche). Différents scénarii (RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0 et RCP8.5) sont ici retranscrits. Les zones ombrées correspondent aux gammes de variations des estimations. Prévisions du changement de température des eaux marines de surface selon le scénario RCP4.5 à l'horizon 2030 (à droite)(Kirtman *et al.*, 2013).

La température joue un rôle important sur la physiologie des espèces animales et végétales (e.g. Atkinson *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004; Claquin *et al.*, 2008; Gillooly *et al.*, 2001; Toseland *et al.*, 2013) ainsi que sur leur phénologie, leur répartition et donc, la structure des communautés (e.g. Beaugrand *et al.*, 2010; Edwards and Richardson, 2004; Regaudie-de-Gioux and Duarte, 2012; Richardson and Schoeman, 2004).

L'augmentation de la température qui va s'accroître dans les années à venir influence d'ores et déjà les espèces marines. Dans leur étude, Edwards et Richardson (2004), en s'intéressant à l'évolution de la phénologie de divers organismes planctoniques depuis 1958, mettent en évidence des modifications de la phénologie du zooplancton et du phytoplancton qu'ils relient à la température. Cet effet dépend de l'organisme observé et de sa période de présence dans l'environnement. Une autre étude menée par Beaugrand *et al.* (2010) montre une augmentation de la biomasse phytoplanctonique avec la température en mer du nord depuis les années 1986.

Enfin, Kahru *et al.* (2011) mettent en évidence la présence de phénomènes d'efflorescences phytoplanctoniques de plus en plus précoces, entre 1997 et 2009, dans l'océan arctique. Du fait du réchauffement climatique, et d'une couverture de glace qui diminue, les efflorescences phytoplanctoniques ont débuté jusqu'à 50 jours plus tôt durant la période 1997-2009. En Manche et en Mer du Nord, de nombreuses espèces risquent de montrer un changement de répartition comme l'estiment Rombouts *et al.* (2012) via une approche modélisatrice : une dispersion vers le nord de certains mollusques (*Glycymeris glycymeris* et *Pecten maximus*) et d'un annélide (*Ophelia borealis*) à cause de l'augmentation de la température de l'eau est prévue. Dans la même zone géographique, Raybaud *et al.* (2013) décrivent une potentielle extension de la zone de distribution de *Laminaria digitata* (macroalgue) vers le nord, associé à une diminution de la présence de cette espèce dans le sud de la Manche, suite à cette même augmentation de température.

I.2 Une diversité spécifique et fonctionnelle du phytoplancton

Le phytoplancton présente une large diversité génétique et spécifique et colonise un milieu relativement peu structuré. Hutchinson (1961) dénomme « paradoxe du plancton » le décalage entre la théorie, qui penche vers une exclusion par la compétition des espèces, et l'observation, qui met en évidence une forte diversité spécifique et la coexistence de nombreux compétiteurs en milieu naturel. La question qu'il se pose est alors simple :

« Sachant qu'elles entrent en compétition pour les mêmes ressources, comment est-il possible pour un grand nombre d'espèce de coexister dans un environnement relativement peu structuré ? ». Ce concept, qui s'applique au domaine végétal en globalité, a été au centre de nombreuses études depuis lors. Douze théories ont depuis vu le jour pour expliquer ce paradoxe, certaines étant facilement réfutables (pour une synthèse voir Wilson, 2011). Trois grands types de paramètres permettent néanmoins d'expliquer la présence de nombreuses espèces phytoplanctoniques. Le premier concerne la variabilité de l'environnement. En effet, de fortes variations (à courte et grande échelles temporelles) de la concentration en sels nutritifs et de la quantité de lumière sont observées, via par exemple des modifications des apports par les fleuves ou encore des perturbations climatiques, aboutissant à une variabilité dans la disponibilité de ces deux ressources principales. Cette variabilité est alors précurseur de diversité. Par ailleurs, les nombreuses espèces présentes simultanément dans un même écosystème possèdent chacune des propriétés différentes qui vont moduler leurs interactions avec le milieu. Concernant les sels nutritifs, certaines espèces phytoplanctoniques vont pouvoir disposer de sources différentes, certaines cyanophycées diazotrophes sont par exemple capables d'utiliser le diazote comme source azotée et certaines espèces (comme les haptophytes) ont la possibilité d'utiliser des sources organiques de sels nutritifs (Dyrhman and Palenik, 2003; Ietswaart *et al.*, 1994; Van Boekel and Veldhuis, 1990). De plus, les besoins en sels nutritifs peuvent différer au sein d'un même groupe d'espèce comme chez les diatomées pour la silice, certaines espèces étant plus fortement silicifiées que d'autres (Raven and Waite, 2004). Les mêmes constatations peuvent être faites sur les besoins en lumière qui diffèrent en fonction des microalgues du fait, par exemple, de la composition et des arrangements pigmentaires différents (Behl *et al.*, 2011; Stockenreiter *et al.*, 2013). Enfin, le troisième paramètre concerne les relations trophiques multiples et complexes qui vont également affecter les communautés phytoplanctoniques via un contrôle top-down.

Ces quelques exemples mettent en évidence que la variabilité de l'environnement et des caractéristiques des microalgues, qui ne présentent ni les mêmes besoins, ni les mêmes fonctions dans un même environnement, permettent une coexistence de ces espèces si l'environnement varie (Ptacnik *et al.*, 2010; Wilson, 2011). Les environnements extrêmes et peu variables existent et montrent souvent peu de diversité spécifique, une ou deux espèces dominant alors l'écosystème jusqu'à l'arrivée d'une perturbation (Connel, 1979; Salisbury, 1931).

I.2.1 Diversité fonctionnelle et définitions associées

Lorsqu'il s'agit d'étudier le fonctionnement des écosystèmes, la diversité spécifique est bien plus qu'un simple descripteur quantitatif du nombre d'espèces présentes dans une communauté donnée. En effet, cette diversité spécifique implique une diversité fonctionnelle qui va définir la performance des communautés, les interactions entre celles-ci et l'environnement et donc, le fonctionnement de l'écosystème (Tilman, 2001). Cette diversité fonctionnelle correspond à l'intégration des traits fonctionnels des espèces constituant une communauté (Diaz and Cabido, 2001; Tilman, 2001). Ces traits fonctionnels sont définis différemment selon les auteurs (e.g. Behl *et al.*, 2011; Lavorel and Garnier, 2002; Mc Gill *et al.*, 2006; Violle *et al.*, 2007). Mc Gill *et al.* (2006) définissent un « trait » comme étant une propriété mesurable bien définie d'un organisme, mesuré à l'échelle individuelle. Violle *et al.* (2007), quant à eux, définissent un trait comme toute caractéristique morphologique, physiologique ou phénologique d'un individu. Un trait fonctionnel est alors un trait qui influence la performance de l'organisme considéré (Mc Gill *et al.*, 2006; Violle *et al.*, 2007). D'un autre côté, Behl *et al.* (2011), Petchey et Gaston (2006) ou encore Hooper *et al.* (2005) apportent une dimension supplémentaire à la précédente définition en décrivant un trait fonctionnel comme une caractéristique (morphologique, physiologique ou phénologique) de l'individu qui va affecter un ou plusieurs processus écosystémiques. Enfin, sont dénommés traits de réponses les traits utilisés pour estimer l'influence des conditions environnementales sur les caractéristiques d'un organisme (Diaz and Cabido, 2001; Hooper *et al.*, 2005; Violle *et al.*, 2007).

Définitions utilisées dans ce manuscrit

Trait : défini au sens de Violle et al. (2007) comme une caractéristique physiologique ou morphologique mesurée à l'échelle individuelle.

Trait de réponse : trait utilisé pour estimer l'influence des conditions environnementales sur un individu donné (et par extrapolation un groupe d'individu ou une espèce).

Groupe fonctionnel : Ensemble d'espèces présentant des traits et/ou réponses fonctionnels similaires; ces groupes sont établis sur des critères morphologiques et physiologiques, sans lien avec la phylogénie.

La grande diversité spécifique du phytoplancton marin, associée à la forte variabilité des conditions environnementales, implique une grande diversité de traits (Litchman and Klausmeier, 2008). Différentes espèces peuvent cependant montrer des traits communs appartenant alors au même groupe fonctionnel. Les espèces d'un même groupe fonctionnel seront alors susceptibles de montrer les mêmes interactions avec les facteurs biotiques et abiotiques de l'écosystème (Barton *et al.*, 2013; Tilman, 2001). De nombreux auteurs définissent les groupes fonctionnels en regroupant les espèces d'une même classe algale, formant alors des groupes comme les diatomées, les coccolithophores, ou encore les cyanophycées (Behl *et al.*, 2011; Follows *et al.*, 2007; Litchman *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2002). Ceux ci se basent alors sur l'hypothèse forte que ces espèces présenteront une homogénéité de réponse aux mêmes conditions environnementales. D'autres auteurs forment leurs groupes fonctionnels selon des critères morphologiques tels que la taille des cellules (Hulot *et al.*, 2014) (Kruk *et al.*, 2010; Kruk and Segura, 2012 pour le phytoplancton en eau douce), ou physiologiques, tels que la température ou encore la sensibilité à une limitation en sels nutritifs (Reynolds *et al.*, 2002).

I.2.2 Dépendance des traits physiologiques et morphologiques

Les traits d'une espèce vont déterminer les caractéristiques de sa niche écologique (Litchman *et al.*, 2012) et ainsi sa place et ses rôles au sein de l'écosystème. Ces traits sont multiples et regroupent des caractéristiques photosynthétiques, comme la composition pigmentaire ou la capacité photosynthétique maximale, des caractéristiques relatives à l'absorption et l'assimilation des sels nutritifs, le taux de croissance, la mobilité des cellules, la reproduction ou encore la taille (pour une synthèse voir Litchman and Klausmeier, 2008), la taille étant considérée comme un trait fondamental qui va conditionner d'autres traits (Fig.I-3).

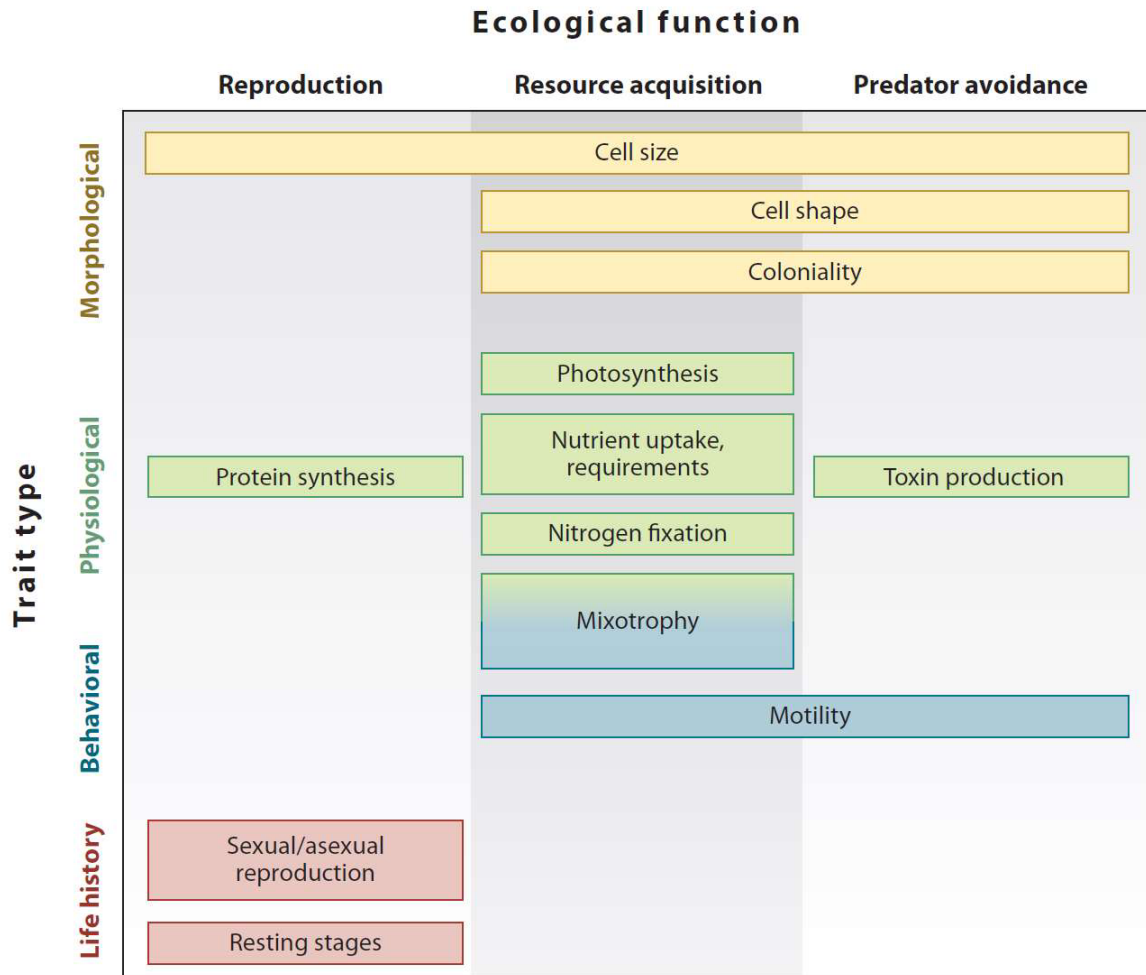


Fig. 1-3: typologie des principaux traits fonctionnels phytoplanctoniques (Litchman and Klausmeier, 2008).

Il existe un lien fort entre la taille et le métabolisme d'un individu. En effet, pour tous les organismes la taille peut prédire l'activité métabolique selon l'équation :

$$\frac{M}{B} = a V^b$$

Avec **a** une constante spécifique, **b** l'exposant « taille-échelle », **V** le volume de la cellule, **M** le taux métabolique et **B** la biomasse (nombre de cellules, carbone...) (Finkel, 2001). L'exposant **b** a longtemps été considéré comme égal à $\frac{3}{4}$ mais il a été montré que cet exposant pouvait varier en fonction du paramètre étudié et des conditions environnementales (présence de stress) (Finkel *et al.*, 2004).

La taille d'une cellule phytoplanctonique joue également un rôle clef pour l'absorption des sels nutritifs. En effet une cellule de petite taille, possédant un rapport surface/volume élevé, a

tendance à être plus efficace pour l'absorption des sels nutritifs présents en faibles concentrations. Ce rapport surface/volume élevé permet une meilleure capacité d'absorption des sels nutritifs par un phénomène de diffusion (Marañon *et al.*, 2013; Ploug *et al.*, 1999; Raven, 1998). Au contraire, les grandes cellules présentent une diminution de ce phénomène de diffusion mais ont une capacité de stockage intracellulaire des sels nutritifs plus forte que les petites cellules (Marañon *et al.*, 2013).

Le volume influence aussi la photosynthèse de la cellule, une augmentation du contenu pigmentaire est attendue lorsque la taille de la cellule augmente. La taille est alors associée au coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (a^* en $\text{m}^2.\text{mg chl}a^{-1}$), une augmentation de la taille aboutit à une diminution du a^* dû à une augmentation du phénomène d'auto-ombrage (Morel and Bricaud, 1981). Tous les paramètres photosynthétiques ne sont pas dépendants de la taille des cellules, comme par exemple le rendement quantique maximum (Finkel, 2001).

Enfin, la taille de la cellule influence également (1) la composition élémentaire de la cellule due à différents degrés de vacuolation (Raven, 1997), (2) le taux de croissance, qui a tendance à augmenter quand la taille de la cellule diminue (jusqu'à une taille seuil, Marañon *et al.*, 2013), ou encore (3) les relations trophiques (Kjørboe, 1993).

I.2.3 Vers une approche fonctionnelle des processus phytoplanctoniques

Du fait de leur rôle essentiel dans de nombreux processus écosystémiques, les producteurs primaires sont au centre de nombreuses études scientifiques. Parmi ces études beaucoup s'intéressent aux relations entre producteurs primaires et leur environnement. Ces études cherchent à montrer les effets des variations de conditions environnementales sur la physiologie des producteurs primaires et/ou les processus à plus large échelle. Ces dernières années, ces études ont montré un intérêt grandissant pour les approches basées sur les traits fonctionnels, la prise en compte de ces traits permettant d'accroître la compréhension de l'organisation des communautés végétales et de leurs réponses au changement global (Lavorel and Garnier, 2002; Litchman *et al.*, 2012; Litchman and Klausmeier, 2008; Mc Gill *et al.*, 2006). En effet la prise en compte de la diversité fonctionnelle, en lieu et place de la diversité spécifique, permet de mieux comprendre les réponses des organismes, à des perturbations environnementales par exemple, à l'échelle individuelle, populationnelle et écosystémique, augmentant ainsi de façon notable la compréhension du fonctionnement des systèmes biologiques à ces différents niveaux (Hooper *et al.*, 2005; Lavorel and Garnier, 2002). Ce type

d'approche existe depuis longtemps aussi bien en milieu terrestre (Mc Gill *et al.*, 2006; Westoby and Wright, 2006) qu'aquatique (Behl *et al.*, 2011; Falkowski and Raven, 1997; Litchman *et al.*, 2007) et est de plus en plus utilisé sur tous types d'organismes et d'écosystèmes compte tenu des changements globaux observés (e.g. érosion de la biodiversité, composition élémentaire des zones côtières) et de leurs conséquences actuelles et futures (Cardinale *et al.*, 2006; Diaz and Cabido, 2001; Worm *et al.*, 2006).

Les organismes phytoplanctoniques possèdent un temps de génération relativement court, peuvent aisément être cultivés et présentent des caractéristiques qui rendent ces organismes idéaux pour réaliser des études basées sur les traits fonctionnels. Par ailleurs, les principaux traits caractéristiques qui régissent les niches écologiques des espèces planctoniques sont bien identifiés (Fig.I-3) et facilement mesurables en laboratoire (Litchman and Klausmeier, 2008). De plus la répartition des différents grands groupes fonctionnels phytoplanctoniques en fonction des conditions environnementales est globalement bien connue (Finkel *et al.*, 2010a; Follows *et al.*, 2007; Margalef, 1978).

Enfin, la taille de la cellule étant directement liée à sa physiologie, elle apparaît comme un trait à privilégier dans les approches fonctionnelles. En effet, en plus de définir en grande partie la niche écologique d'une espèce phytoplanctonique, la taille va conditionner les interactions avec l'environnement en influençant la composition élémentaire de l'individu et du milieu, la production primaire, la production de biomasse, mais aussi les relations trophiques au sein de l'écosystème.

I.3 Effets du changement global sur le phytoplancton : méthodes d'étude et traits considérés

Afin de comprendre les effets des différentes composantes du changement global sur les caractéristiques des microalgues et les conséquences qui en découlent (e.g. production primaire, cycles biogéochimiques, relations trophiques), il est essentiel d'étudier les réponses physiologiques d'espèces représentatives des principaux groupes phytoplanctoniques et les modifications de la structure des communautés de microalgues face au changement global. Ces réponses peuvent être abordées par la mise en place d'expérimentations, d'observations *in situ* à long terme, ou en utilisant la modélisation. Les observations à long terme, bien qu'elles soient très représentatives de la réalité du milieu et donc riches en enseignements, sont contraignantes et coûteuses à mettre en place. De plus, elles permettent d'observer

uniquement les changements du fonctionnement des écosystèmes sous médiations environnementales à l'échelle des communautés, qui résultent de changements à l'échelle populationnelle.

Au contraire l'approche expérimentale et modélisatrice, surtout réalisée en se basant sur des traits de réponse ou une approche fonctionnelle permettent d'enregistrer rapidement des informations sur les principaux changements au niveau individuel, populationnel mais aussi des communautés face aux variations d'une ou plusieurs composantes du changement global (Litchman *et al.*, 2012). De telles approches, bien qu'elles soient des simplifications de la réalité des processus réalisées en milieu naturel, donnent des informations sur les changements sous-jacents aux modifications de fonctionnement observés via les approches *in situ* (Edwards *et al.*, 2013).

Le choix des traits est très important dans les études visant à étudier l'évolution de ceux-ci en fonction de gradients environnementaux. En effet, ils doivent être facilement mesurables (pour augmenter la fréquence d'étude surtout en cas d'approche multifactorielle), avoir une forte pertinence écologique et surtout doivent en partie contribuer à la définition de la niche écologique de l'organisme étudié (Litchman and Klausmeier, 2008). Une approche multifactorielle doit être privilégiée, incluant plusieurs traits de réponse, afin de mettre en évidence les effets des facteurs environnementaux à plusieurs niveaux et de comprendre la réponse globale de ces organismes (Duffy and Stachowicz, 2006). Par ailleurs, les différents facteurs du changement global peuvent influencer chacun des traits de manière différente. Certains de ces facteurs sont indissociables et interviennent simultanément en milieu naturel, aboutissant à de potentiels effets synergiques ou d'interactions. Il apparaît alors nécessaire d'appréhender ces effets de façon multiple en imposant des gradients environnementaux multiparamétriques. Peu d'études ont porté sur les effets cumulés de plusieurs paramètres environnementaux sur la physiologie du phytoplancton, pourtant ces études mettent en évidence la présence d'interactions entre la température et la concentration en sels nutritifs sur la croissance (Rhee and Gotham, 1981; Shatwell *et al.*, 2013), la taille des cellules (Peter and Sommer, 2013) ou encore la production carbonée (Borchard and Engel, 2012; Vidyarthna and Granéli, 2013) du phytoplancton. De même, de nombreuses approches expérimentales basées sur les effets de changements environnementaux sur différents traits du phytoplancton ont été réalisées. Cependant, ces études ne s'intéressent bien souvent simultanément qu'aux variations d'un seul paramètre environnemental sur un nombre très limité de traits (e.g.

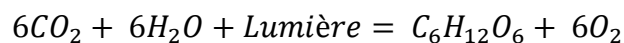
Aguilera *et al.*, 2000; Claquin *et al.*, 2008; Granum *et al.*, 2002; Urbani *et al.*, 2005; Westoby and Wright, 2006).

I.3.1 Effets environnementaux sur les principaux traits phytoplanctoniques

Comme nous venons de le mentionner, de nombreuses études ont mis en évidence la dépendance environnementale de nombreux traits phytoplanctoniques (e.g. Alcoverro *et al.*, 2000; Baumert and Petzoldt, 2008; Davison, 1991; Lai *et al.*, 2011; Raven and Geider, 1988; Turpin, 1991). Dans ce manuscrit trois ensembles de traits de réponse seront étudiés à savoir : les paramètres photosynthétiques, la production d'hydrates de carbone, et la production de biomasse en quantité (abondance cellulaire, biovolume) et en qualité (contenu en hydrates de carbone, en carbone organique et en azote total). Ces trois ensembles sont interdépendants, fluctuent avec les paramètres environnementaux et nous apportent des informations sur le fonctionnement de la cellule à plusieurs niveaux ainsi que sur les conséquences possibles pour les communautés.

I.3.1.1 *Activité photosynthétique*

La photosynthèse est un processus complexe incluant une cascade de réactions qui permet de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique. La réaction globale de la photosynthèse est décrite selon l'équation suivante :



La photosynthèse débute avec l'absorption de photons par les pigments photosynthétiques et en utilisant du carbone inorganique, aboutit à la production de d'hydrates de carbone et de dioxygène. Le processus photosynthétique se fait en deux phases. Une phase claire durant laquelle sont transportés les électrons et une phase sombre durant laquelle est réalisée la fixation du CO₂ via le cycle de Calvin.

La quantité et la qualité de la lumière, la température et la concentration en sels nutritifs sont les trois principaux facteurs environnementaux influençant la production primaire phytoplanctonique (Anning *et al.*, 2000; Claquin *et al.*, 2008; Davison, 1991; Geider *et al.*, 1998b; Harrison *et al.*, 1990; Turpin, 1991; Wykoff *et al.*, 1998). La capacité photosynthétique des microalgues détermine cette production primaire et peut être mesurée par des méthodes quantifiant des flux d'oxygène (Montford, 1969), des méthodes basées sur

le suivi de traceurs isotopiques du carbone (Steemann Nielsen, 1952) ou via l'étude de la fluorescence de la chlorophylle *a* (Schreiber *et al.*, 1986). Les méthodes basées sur les flux d'oxygène ou de carbone 14 ou 13 sont plus contraignantes que les méthodes basées sur l'étude de la fluorescence de la chlorophylle *a* en étant plus coûteuses et nécessitant des temps d'incubations relativement longs. Il existe plusieurs méthodes d'études de la capacité photosynthétique des microalgues basées sur l'étude de la fluorescence chlorophyllienne (Kolber *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1986), nous avons utilisé la méthode PAM (pour Pulse Amplitude Modulation).

I.3.1.2 *La méthode PAM*

La méthode PAM est une méthode optique basée sur la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle *a*. La photosynthèse consiste, en présence de lumière, à la production d'énergie organique à partir d'énergie lumineuse. La lumière est absorbée au niveau d'assemblage de pigments et de protéines, les photosystèmes I et II, situés dans les membranes thylacoïdales des chloroplastes des cellules planctoniques. Il existe trois voies d'utilisation de la lumière. La première consiste en l'absorption de lumière au niveau des PSII aboutissant à une séparation de charge initiant alors la chaîne de transport d'électrons pour la production d'énergie chimique (photochimie). Les deux autres voies consistent en la réémission de l'énergie lumineuse sous la forme de fluorescence ou en l'évacuation de l'énergie lumineuse en excès sous forme de chaleur (Non photochemical Quenching, NPQ) (Huot and Babin, 2010) (Fig.I-4). Ces trois voies entrent en compétition, l'augmentation de l'une résulte en la diminution de l'une ou des deux autres. La méthode PAM consiste en la mesure de la fraction de lumière réémise sous forme de fluorescence et à l'estimation du non photochemical quenching. Connaissant ces deux paramètres, l'efficacité de la troisième voie d'utilisation de la lumière, à savoir la photochimie, peut alors être calculée.

Après une mise à l'obscurité de 15 minutes, nécessaire à l'oxydation des accepteurs d'électrons, l'échantillon est soumis à de très court flash de très faible intensité qui ne génère ni NPQ, ni photochimie mais qui permettent de mesurer la fluorescence de base (F_0). Un court flash de lumière saturante est alors émis et permet de mesurer, en se basant sur la fraction réémise sous forme de fluorescence ou de chaleur, le rendement quantique maximal calculé selon l'équation suivante :

$$\frac{Fv}{Fm} = \frac{Fm - F0}{Fm}$$

F_m correspond au niveau de fluorescence maximum obtenu après l'application d'un flash de lumière saturante sur un échantillon acclimaté au noir et F_v/F_m correspond au rendement quantique maximum (Huot and Babin, 2010).

Puis l'échantillon est soumis à des paliers de lumière d'intensités croissantes ponctuées toutes les 1 à 2 minutes (selon l'espèce) de flashes lumineux saturants (8 dans nos travaux) permettant la mesure des processus de fluorescence, de photochimie et dégagement de chaleur ayant lieu au niveau des photosystèmes II à chaque palier. Cette méthode permet de générer des « Steady state light curves » à partir desquelles seront constituées les courbes taux de transfert d'électrons/éclairage (Fig.I-4). Le modèle de Webb *et al.* (1974) est ensuite appliqué, basé sur le résultat des courbes taux de transfert d'électrons/éclairage et permet de calculer les paramètres photosynthétiques des microalgues. Ainsi, la pente aux faibles éclairagements correspond à l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière, notée α , le plateau atteint correspond au taux de transfert d'électron relatif maximum ($rETR_{max}$) et le point d'intersection entre la pente initiale et le plateau correspond à l'intensité lumineuse de saturation (E_k) (Fig.I-4).

Le taux de transfert d'électrons était calculé à chaque palier lumineux par la multiplication du rendement quantique effectif ($(F_m' - F)/F_m'$) par l'intensité lumineuse et un coefficient de 0.5 qui correspond à la proportion de lumière captée par les photosytèmes II.

$$rETR = [(Fm' - F)/Fm'] E 0.5$$

F_m' et F correspondent au niveau maximum et stable de fluorescence obtenue des cellules exposées à la lumière.

Afin de prendre en compte les variations d'absorption de lumière au niveau des PSII dans le calcul du taux de transfert d'électrons, celui-ci est multiplié par le coefficient a^* qui correspond au coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle a . Celui-ci est mesuré par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Mitchell *et al.* (2003).

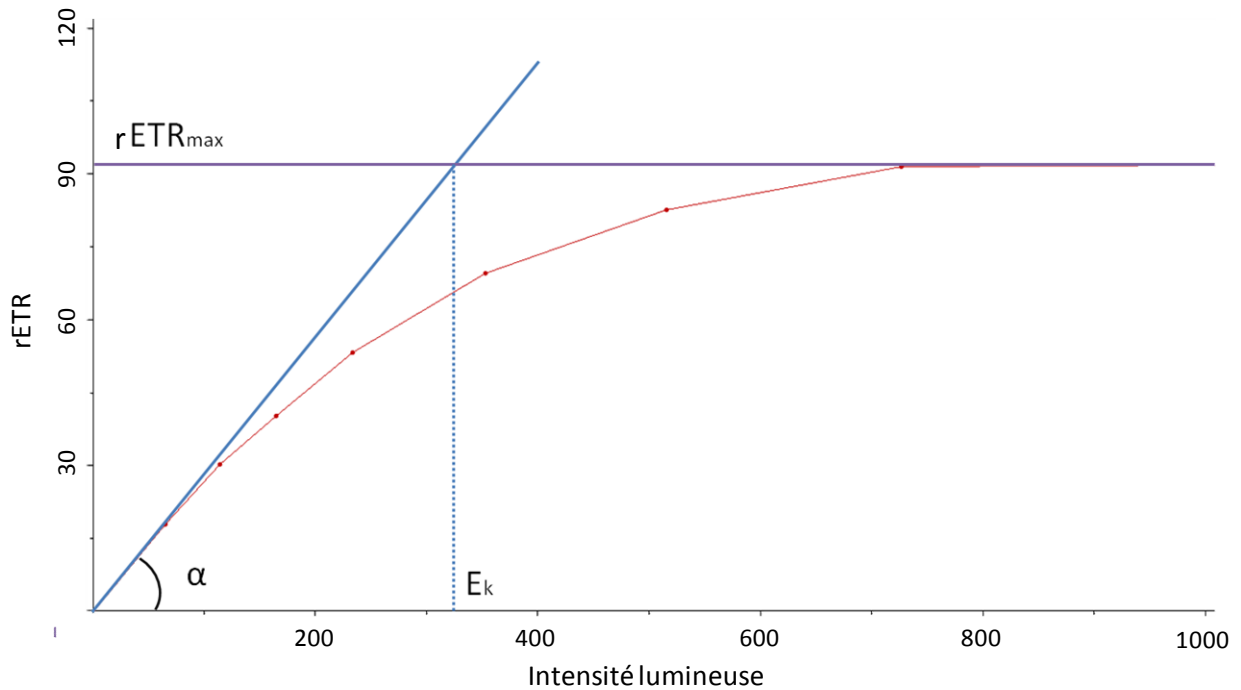


Fig. I-4: évolution du taux de transfert relatifs d'électrons ($\mu\text{mol e}^{\cdot}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en fonction de l'intensité lumineuse ($\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

I.3.1.3 Dépendance environnementale

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle central de la concentration en azote et en phosphore sur les paramètres photosynthétiques de nombreux taxons phytoplanctoniques (Da Silva *et al.*, 2009; Geider *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 2013; Napoléon *et al.*, 2013; Turpin, 1991; Wykoff *et al.*, 1998). Ces deux éléments n'affectent pas les processus photosynthétiques de la même façon. En effet, la limitation en phosphore peut aboutir à une diminution du taux de transfert d'électrons au niveau du PSII (Geider *et al.*, 1993; Lippemeier *et al.*, 2001; Wykoff *et al.*, 1998) en endommageant les centres réactionnel. Par ailleurs, le phosphore entre dans la composition d'ATP (adénosine tri-phosphate), une molécule énergétique impliquée par exemple dans la photosynthèse ou encore le cycle de Calvin. Une diminution de la production d'ATP due à une carence en phosphore (Beardall *et al.*, 2005; Gauthier and Turpin, 1997) va influencer le gradient de pH au niveau des thylacoïdes aboutissant à une diminution de l'activité photosynthétique (Gauthier and Turpin, 1997). Cette diminution d'ATP va également impacter négativement la RubisCO, une enzyme clef du cycle de Calvin, limitant alors la fixation du CO_2 et donc l'efficacité des processus photosynthétiques (Anwaruzzaman *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2013). Enfin, le phosphore entre dans la composition des phospholipides, des composés membranaires essentiels. La limitation en phosphore va alors

influencer la structure de ces membranes (Paytan and McLaughlin, 2007), comme par exemple les membranes des thylacoïdes, avec des répercussions possibles sur l'activité synthétique.

La limitation en azote, quant à elle, aboutit à la diminution de la capacité photosynthétique en provoquant une diminution de la synthèse des pigments photosynthétiques azotés. En parallèle, une diminution de la production d'acides aminés et de protéines, et donc de certaines enzymes impliquées dans les processus photosynthétiques, est observée en cas de limitation en azote (Da Silva *et al.*, 2009; Geider *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 2013; Turpin, 1991; Young and Beardall, 2003). Geider *et al.* (1993) mettent, par exemple, en évidence la diminution de la production de protéine D1 (Fig.I-5) aboutissant à une baisse de l'activité photosynthétique d'une diatomée. Enfin, la limitation en azote induit une diminution de l'activité du cycle de Calvin et aboutit à une diminution des besoins en ATP, ce qui perturbe le gradient transthylacoïdal (Fig.I-5) et conduit à une diminution du taux de transport d'électrons au niveau des photosystèmes II (Lippemeier *et al.*, 2001).

La température affecte également la capacité photosynthétique des microalgues. Une tendance à l'augmentation de la capacité photosynthétique avec la température est observée, et ce jusqu'à une température seuil à partir de laquelle la capacité photosynthétique diminue avec la température (Claquin *et al.*, 2008; Davison, 1991). Claquin *et al.* (2008) mettent en effet en évidence une augmentation du taux de transfert d'électrons avec la température, jusqu'à une température optimale et une température seuil spécifiques.

Si de nombreux travaux ont porté sur les effets des concentrations en sels nutritifs sur la photosynthèse à une température donnée ou sur les effets de la température à une concentration en sels nutritifs donnée (e.g. Claquin *et al.*, 2008; Davison, 1991; Regaudie-de-Gioux and Duarte, 2012), il n'existe que peu d'études ayant abordé les effets simultanés de ces deux facteurs environnementaux sur l'activité photosynthétique (Petrou *et al.*, 2012; Staehr and Sand-Jensen, 2006; Tadonlélé, 2010). Pourtant, compte tenu des effets potentiels de la température et la concentration en sels nutritifs sur la photosynthèse, et des modifications environnementales attendues dans le cadre du changement global, il semble intéressant d'étudier les effets cumulés de ces facteurs sur l'activité photosynthétique.

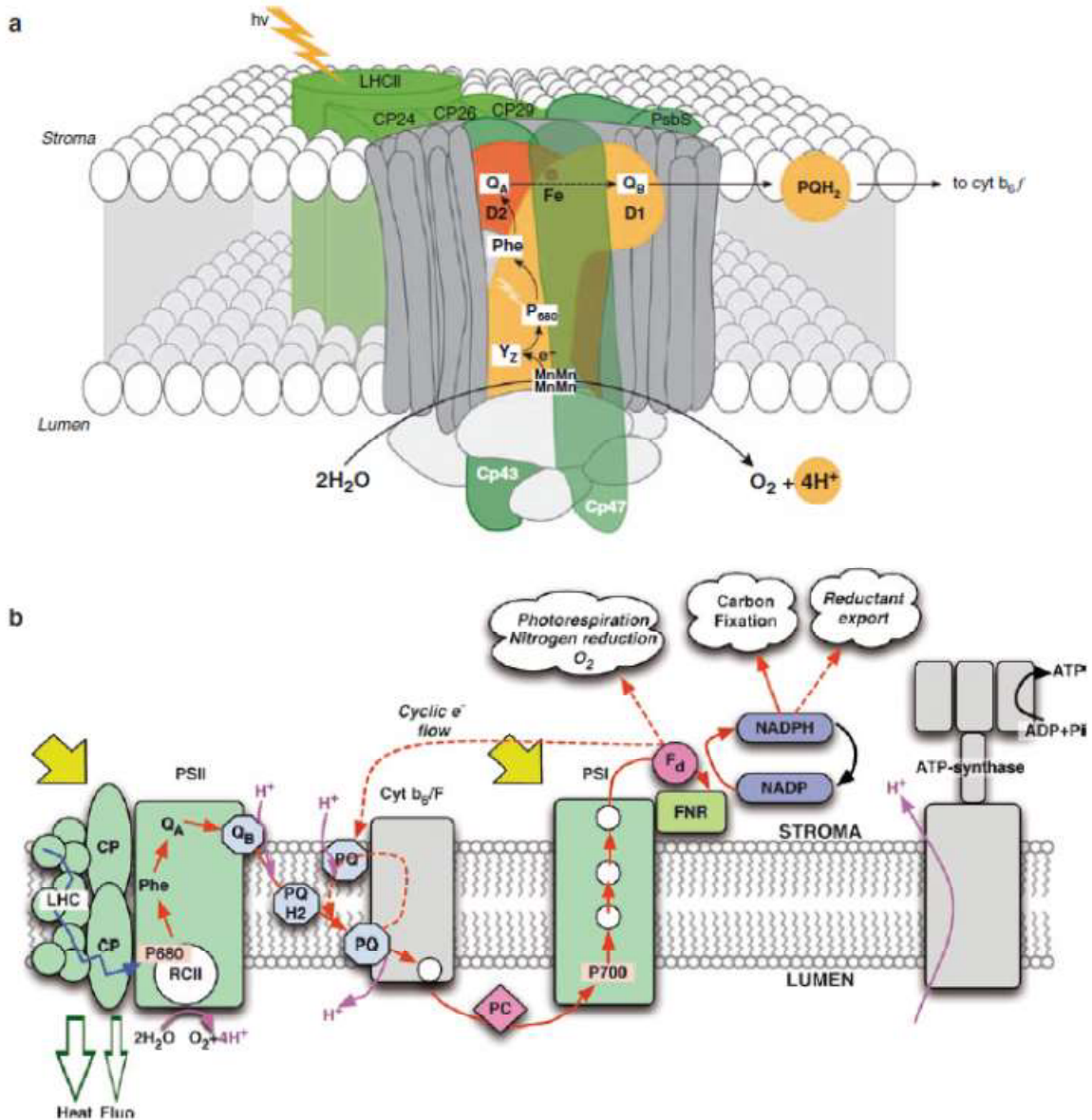


Fig. I-5: Organisation des photosystèmes II (a) et de la chaîne de transport d'électrons (b). Le photosystème II est composé : d'un complexe pigment-protéine périphérique (LHCII) qui sert d'antenne collectrice de lumière mais aussi au transport de l'énergie lumineuse, d'antenne collectrice de lumière interne (CP) qui servent d'intermédiaires entre LHCII et les protéines D1 et D2 ou débute la dissociation de l'eau et le transfert d'électrons. Ce transfert d'électrons est décrit en détail sur la figure b. Quatre complexes protéiques sont représentés : le Photosystème II (PSII), le cytochrome b6-f, le photosystème I (PSI) ainsi que l'ATP synthase. Sont représentés : l'antenne acceptrice de lumière (LHCII), deux protéine CP, le centre réactionnel (RCII), la phéophytine, la quinone A et B (premier et deuxième accepteurs d'électrons), le pool de plastoquinone (PQ), une plastocyanine (PC), une ferredoxine (Fd, accepteur final d'électron en aval du PSI), La ferredoxine-NADP réductase (où à lieu la réduction du NADP). Les sources de protons (H⁺) sont également représentées. Les flèches rouges continues et pointillées signalent respectivement le transport linéaire d'électrons et les voies alternatives de transport d'électrons (Huot and Babin, 2010)

I.3.2 Production de d'hydrates de carbone et exsudation

La photosynthèse aboutit à la production de matière organique présente sous différentes formes dans la cellule. En effet, cette matière organique est composée de d'hydrates de carbone, acides aminés, protéines, lipides, vitamines et de différents biopolymères dans des proportions variables, en fonction de l'espèce et de l'état physiologique (Moal *et al.*, 1987; Mykkestad, 2000; Panagiotopoulos and Sempéré, 2005). L'étude de la composition du phytoplancton, en termes de matière organique, est importante car elle définit l'état physiologique et la contribution des microalgues dans les réseaux trophiques.

Les hydrates de carbone représentent une large proportion de cette matière organique. Une partie des hydrates de carbone intracellulaires vont se retrouver excrétés par les microalgues, cette excrétion étant considérée comme une part de la production primaire phytoplanctonique (Mykkestad, 2000). Cette excrétion est active. Les hydrates de carbone peuvent également se retrouver dans le compartiment dissous suite à la lyse cellulaire.

L'étude de la quantité d'hydrates de carbone, intracellulaire ou excrétée, peut être réalisée de façon globale via des dosages colorimétriques qui permettent de doser la quantité de d'hydrates de carbone en séparant les monosaccharides et polysaccharides sans connaître la nature chimique exacte de ces hydrates de carbone. Il existe trois méthodes colorimétriques pour le dosage des hydrates de carbone en milieu marin : la méthode au phénol de Dubois (Dubois *et al.*, 1956), la méthode MBTH (pour 3-méthyl-2-benzo thiazoline hydrazone hydrochloride) (Parson *et al.*, 1984) et la méthode TPTZ (pour 2,4,6-tripyrindyl-s-triazine) (Mykkestad *et al.*, 1997). Ces trois méthodes diffèrent dans leur protocole expérimental, leur sensibilité et leur capacité à doser séparément les mono- et polysaccharides. La méthode MBTH (Parson *et al.*, 1984) est utilisée dans notre étude. Cette méthode permet le dosage des hydrates de carbone neutres (pentoses, hexoses), hydrates de carbone aminés, acides uroniques et certains diholosides comme le maltose (pour une synthèse voir Panagiotopoulos and Sempéré, 2005). De plus, cette méthode permet de doser séparément les mono- et polysaccharides (après hydrolyse acide) et présente une forte précision même à des concentrations faibles, permettant alors de doser les hydrates de carbone dissous. Pour déterminer la nature des hydrates de carbone des analyses plus lourdes et plus poussées, chromatographiques, enzymatiques ou analyse de résonance magnétique sont requises (Panagiotopoulos and Sempéré, 2005). La quantité et la nature des hydrates de carbone produits dépendent de l'espèce et de l'état physiologique des cellules et présentent une forte

dépendance aux facteurs environnementaux et particulièrement, à la concentration en sels nutritifs et la température.

La limitation en azote et en phosphore aboutit généralement à une augmentation du contenu en hydrates de carbone ainsi qu'à une augmentation de l'excrétion (Mykkestad, 2000), et ce, chez plusieurs groupes phytoplanctoniques comme les prymnesiophyceae (Alderkamp *et al.*, 2007), les cryptophyceae (Da Silva *et al.*, 2009) ou encore les diatomées (e.g. Granum *et al.*, 2002; Guerrini *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 1990; Mykkestad, 2000). Cette augmentation résulte d'une moindre utilisation des hydrates de carbone qui continuent à être produits par les processus photosynthétiques qui perdurent, bien qu'ils puissent être eux-mêmes affectés par la limitation en sels nutritifs. Certains éléments, tels l'azote et le phosphore, vont alors être indispensables pour l'utilisation des hydrates de carbone produits qui ne vont plus pouvoir être couplés à ces éléments en cas de limitation. Si la quantité d'hydrates de carbone produits dépassent les besoins nécessaires à la respiration et la synthèse de cellules, ceux-ci peuvent s'accumuler dans la cellule jusqu'à un certain seuil puis être excrétés (Berman-Frank and Dubinsky, 1999). Une excrétion des hydrates de carbone produits est observée chez de nombreuses espèces phytoplanctoniques et est souvent renforcée en cas de stress environnemental. Cette augmentation peut provenir d'un phénomène de lyse cellulaire, dû à un mauvais état général des cellules stressées, ou de cellules saines qui envoient à l'extérieur de la cellule les hydrates de carbone présents en excès ou non dans le compartiment intracellulaire (Mykkestad, 2000; Staats *et al.*, 2000). Toutes ces modifications du contenu et de l'excrétion en hydrates de carbone vont avoir, en plus des répercussions au niveau individuel, plusieurs répercussions à l'échelle des communautés notamment au travers des réseaux trophiques.

La température va, elle aussi, potentiellement influencer la production d'hydrates de carbone. Une augmentation de la production de TEP (transparent exopolymeric particles) est souvent observée quand la température augmente et ce jusqu'à un certain seuil au-delà duquel cette production diminue (Claquin *et al.*, 2008). Cependant Claquin *et al.* (2008) mettent en avant le fait que ce patron ne fonctionne pas pour toutes les espèces, avec une absence de relation pour *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) et *Lepidodinium chlorophorum* (Dinophyceae). Sayegh et Montagnes (2011) démontrent, quant à eux, une absence de relation entre la température et le contenu en hydrates de carbone chez *Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis sp.* Aucun lien clair n'est donc fait sur la relation entre la température et la production ou le contenu en hydrates de carbone particuliers chez les microalgues.

Borchard et Engel (2012) et Vidyarathna et Granéli (2013) se sont intéressés aux effets simultanés de la limitation en sels nutritifs et de la température sur la production de matière carbonée. Des effets interactifs de ces paramètres environnementaux sur le métabolisme carboné ont été mis en évidence dans ces études, avec des contenus en hydrates de carbone plus forts à température sub-optimale (Vidyarathna and Granéli, 2013). Borchard *et al.* (2012), quant à eux, ont montré un renforcement de l'augmentation de la quantité d'exsudats dans les conditions limitées en azote quand la température augmente pour *Emiliana huxleyi*.

I.3.3 Etude de la biomasse

La biomasse phytoplanctonique peut être déterminée selon différents indicateurs tels que la quantité de cellules (Blache *et al.*, 2011; Granum *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2011), la quantité de carbone organique (Rousseau *et al.*, 2002), la quantité de chlorophylle *a* (Houliez *et al.*, 2013; Ptacnik *et al.*, 2008), le biovolume total (Behl *et al.*, 2011; Vuorio *et al.*, 2005) ou encore par l'étude de la fluorescence *in vivo* (Falkowski and Kiefer, 1985; Lippemeier *et al.*, 2001).

La formation de biomasse est un processus finalisé qui dépend d'autres processus en amont comme la photosynthèse et la production d'hydrates de carbone, et varie en fonction des conditions environnementales. La limitation en phosphore aboutit à une diminution de la formation de biomasse (e.g. Lai *et al.*, 2011; Magaletti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). En effet, le phosphore est un élément essentiel à la formation de phospholipides (Suzumura, 2005), composant membranaire de nombreuses espèces même si récemment Van Mooy *et al.* (2009) ont mis en évidence la capacité de certaines espèces à diminuer la quantité de phosphore dans les membranes cellulaires en cas de limitation. La concentration en azote influence également la production de biomasse de nombreuses espèces, une limitation en azote aboutit à une baisse de production des éléments cellulaires azotés (pigments, protéines, ADN...) et donc à une baisse de la synthèse de nouvelles cellules (e.g. Da Silva *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2011; Vuorio *et al.*, 2005).

Le choix de l'indicateur de biomasse n'est pas anodin et dépend de la problématique posée. Ces différents indicateurs ne répondent pas forcément de la même façon aux conditions environnementales. En effet, la limitation en sels nutritifs aboutit souvent à une diminution de la production de cellule tandis que la concentration de carbone par cellule a tendance à augmenter en cas de limitation en sels nutritifs (Myklestad, 1974). Ces deux facteurs ne vont

alors pas nécessairement retranscrire de la même façon l'effet de la limitation en sels nutritifs sur la biomasse.

La température influence également la production de biomasse des microalgues. Le taux de croissance est positivement corrélé à la température jusqu'à atteindre une température seuil spécifique à partir de laquelle ce taux de croissance diminue (Bissinger *et al.*, 2008; Eppley, 1972). La température n'influence pas tous les indicateurs de biomasse de la même façon. En effet, Eppley (1972) met en évidence une diminution du contenu en carbone par cellule chez *Skeletonema costatum* et *Ditylum brightwellii* quand la température augmente. Cette diminution est due à la relation négative qui existe entre contenu en carbone et taux de croissance (Wang *et al.*, 2010). Une cellule qui montre un fort taux de division contient moins de carbone qu'une cellule de la même espèce qui présente un taux de division plus faible. Enfin, certaines études utilisent le biovolume total, à savoir le produit de l'abondance cellulaire par le volume des cellules, comme indicateur de biomasse. Or, la température va affecter la taille des cellules phytoplanctoniques, une diminution de la taille étant attendue quand la température augmente (Atkinson *et al.*, 2003; Peter and Sommer, 2013). Enfin, Peter et Sommer (2013) ont mis en évidence un effet interactif de la température et de la concentration en sels nutritifs sur la taille des cellules avec une plus forte réduction du volume cellulaire quand la température augmente en présence de limitation en sels nutritifs.

I.4 Les relations productivité/diversité

Associée aux autres facteurs du changement global une érosion extrêmement rapide de la biodiversité, aussi bien en milieu terrestre qu'aquatique, a été constatée ces cinquante dernières années (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Cette diminution de la diversité spécifique implique une diminution de la diversité fonctionnelle qui pourrait affecter le fonctionnement des écosystèmes. Cette érosion de diversité observée à l'échelle globale sur différents écosystèmes n'est pas démontrée sur le phytoplancton. Au contraire, l'étude récente de Olli *et al.* (2014) met en évidence, à travers un suivi temporel débuté en 1966, une augmentation de la diversité des microalgues en mer Baltique qu'ils relient aux changements environnementaux. Même si cette étude ne suit pas la tendance globale à une érosion de la diversité, elle met en évidence des changements des communautés phytoplanctoniques en réponses aux changements environnementaux.

De nombreux auteurs se sont intéressés à la forme de la relation biodiversité/fonction des écosystèmes (Cardinale *et al.*, 2011; Naeem, 1998; Schlapfer *et al.*, 1999). En faisant une méta-analyse exhaustive des expérimentations visant à mettre en évidence les relations fonctionnement/diversité, Cardinale *et al.* (2011) proposent trois types de relations différentes (Fig.I-6).

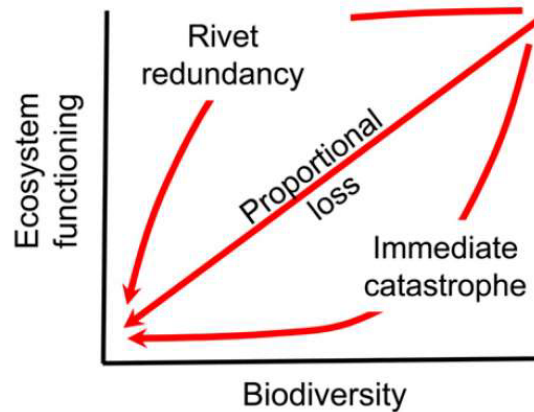


Fig. I-6: hypothèses sur les relations biodiversité/fonctionnement de l'écosystème selon Cardinale *et al.* (2011)

La première relation suit la théorie dite des rivets (Rivet redundancy). Du fait de la redondance de fonctions entre certaines espèces, une légère perte du nombre d'espèces n'aboutit qu'à de très faibles changements de fonctionnement. Cette perte peut perdurer jusqu'à atteindre une valeur seuil à partir de laquelle les conséquences sur le fonctionnement de l'écosystème deviennent significatives.

Le deuxième type de relation correspond à une perte proportionnelle de fonction avec le nombre d'espèces. Cette hypothèse implique l'absence de redondance de fonctions entre les espèces et s'appuie sur la notion de complémentarité (proportional loss).

Enfin, la troisième relation correspond à une perte exponentielle de fonctions avec la diversité. Les résultats de la méta-analyse qui porte sur des études menées en milieu terrestre montrent que 86% des expériences obéissent à une relation de type « rivets » qui n'implique cependant pas nécessairement une redondance de fonctions mais plutôt la proximité des niches écologiques des espèces en milieu naturel. Néanmoins, ces trois hypothèses reposent sur l'étude des relations diversité/productivité via une approche spécifique de la diversité. De nombreux auteurs préconisent plutôt une approche fonctionnelle de la diversité partant du principe que le fonctionnement de l'écosystème dépend davantage de la diversité des

fonctions plutôt que de la diversité des espèces (Cardinale *et al.*, 2011; Hooper *et al.*, 2005; Loreau *et al.*, 2001; Petchey and Gaston, 2006).

De nombreuses études se sont intéressées aux relations entre biodiversité et fonctionnement de l'écosystème, la plupart en milieu terrestre et dulcicole (Balvanera *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2005; Loreau *et al.*, 2001; Stachowicz *et al.*, 2007; Worm *et al.*, 2006). En effet, sur les 401 études relevées en 2006 qui traitent des relations diversité/fonctionnement des écosystèmes, seules 32 portaient sur le milieu marin et aucune sur le phytoplancton (Balvanera *et al.*, 2006). Néanmoins, les études sur la relation diversité/productivité et diversité/fonctionnement des écosystèmes (terrestre ou aquatique) mettent en évidence qu'en moyenne les communautés diversifiées (que ce soit génétiquement, spécifiquement, ou présentant une large gamme de traits fonctionnels) produisent davantage de biomasse et consomment davantage de ressources (sels nutritifs, lumière) que les populations ou les communautés moins diversifiées (pour une synthèse voir Cardinale *et al.*, 2013; Cardinale *et al.*, 2006; Duffy, 2009). Ce patron est observé dans des études portant sur des espèces, des niveaux trophiques et des écosystèmes différents mais n'est pas nécessairement généralisable. En effet, les études basées sur l'écologie du phytoplancton ont permis de mettre en évidence différents types de relation entre productivité et diversité (Ptacnik *et al.*, 2010). Des relations positives entre la richesse spécifique et la productivité chez des microalgues d'eau douce (Behl *et al.*, 2011; Power and Cardinale, 2009) ont été montrées. La plupart des études se basent principalement sur les stocks de biomasse (carbone, nombre de cellule ou chlorophylle *a*) comme indicateur de productivité, mais des études récentes se sont intéressées à des mesures de flux (Power and Cardinale, 2009) (Behl *et al.*, 2011; Olli *et al.*, 2014; Ptacnik *et al.*, 2008).

D'autres auteurs ne mettent pas en évidence de relation positive entre diversité et productivité. C'est le cas de l'étude réalisée par Schmidtke *et al.* (2010) qui ont mis en évidence une relation négative entre la diversité et la productivité. Par ailleurs, Gamfeldt *et al.* (2005) en travaillant sur trois espèces phytoplanctoniques d'eau douce, avec et sans prédateurs, ne montraient pas de relation entre la diversité des microalgues et la production de biomasse, probablement du fait de compétition pour la ressource entre les espèces. L'augmentation de productivité avec la diversité n'est donc pas une règle générale et va dépendre des conditions expérimentales et des espèces sélectionnées.

Toutes ces études ont été réalisées en l'absence de stress environnementaux qui pourtant façonnent les communautés en milieu naturel (Hillebrand *et al.*, 2014). En effet, les apports anthropiques de sels nutritifs vont influencer la diversité spécifique différemment en fonction du système étudié (Hillebrand *et al.*, 2007). De plus, ces contraintes vont influencer les cellules algales à plus petite échelle souvent en diminuant la productivité des individus à plusieurs niveaux. Cardinale *et al.* (2009) ont établi un modèle cherchant à relier la quantité de ressource, la diversité spécifique et la biomasse au sein des communautés en considérant la concentration en sels nutritifs comme étant, à la fois, une cause et une conséquence des variations de diversité et de biomasse (Fig.I-7).

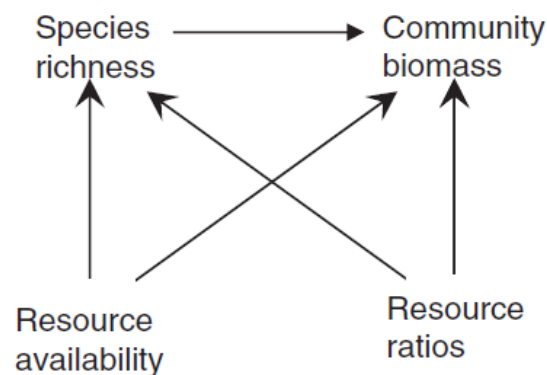


Fig. I-7: schéma conceptuel reprenant les composantes du modèle décrit par Cardinale *et al.* (2009) et leurs interdépendances (représentées par les flèches). Ce modèle est bâti sur quatre composantes : la disponibilité en ressource (resource availability), les ratios de ces ressources (resource ratios), la richesse spécifique (species richness) et la biomasse de la communauté (community biomass)

A partir de ce modèle les auteurs font trois hypothèses : (1) si les écosystèmes sont caractérisés par une forte disponibilité de ressources alors ils devraient présenter une forte diversité spécifique associée à une forte biomasse ; (2) Les écosystèmes caractérisés par un fort déséquilibre des ratios de différentes ressources devraient montrer des diversités faibles et une faible quantité de biomasse ; (3) quand la quantité et le déséquilibre des ressources sont constants, la biomasse devrait augmenter avec la diversité spécifique. Ces auteurs ont vérifié et validé ces trois hypothèses sur la base d'études *in situ* de phytoplancton dulcicole et de données environnementales. Néanmoins, ces hypothèses auraient besoin d'être validées aux travers d'autres études *in situ* ou expérimentales.

I.5 Problématiques, objectifs et organisation du manuscrit

Une augmentation de la température de surface mais aussi des eaux marines est observée à l'échelle globale. Les modèles climatiques prévoient une tendance à l'augmentation de la température marine jusqu'à 4°C à l'horizon 2100 pour le modèle le plus pessimiste. Par ailleurs, les activités humaines ont abouti à des perturbations des apports en sels nutritifs, de leurs concentrations mais aussi de leurs ratios. Des politiques européennes d'abattelements ont d'ailleurs été mises en places. Celles-ci sont plus performantes pour le phosphore que pour l'azote et une tendance à la diminution du rapport N/P est d'ores et déjà observée dans les eaux marines européennes. Le phytoplancton va être impacté par ces changements. L'étude des modifications engendrées par ces perturbations sur la composante phytoplanctonique est nécessaire compte tenu des rôles clefs de ses organismes dans les processus écosystémiques. Peu d'études se sont intéressées aux effets simultanés de plusieurs paramètres environnementaux sur la physiologie phytoplanctonique. Néanmoins ces études mettent en évidence la présence d'interactions entre ces facteurs sur la croissance, la taille des cellules ou encore la production de carbone. Les études qui s'intéressent aux effets de la limitation en sels nutritifs ou aux effets de la température sur le phytoplancton portent bien souvent sur un faible nombre de traits et ne prennent pas en compte toute la complexité des réponses du phytoplancton, limitant ainsi la compréhension de ces réponses et des effets potentiels sur les écosystèmes. Partant de ces observations il paraît intéressant d'étudier les réponses, via une approche multifactorielle, du phytoplancton à différentes conditions de limitations en sels nutritifs à plusieurs températures. Cette approche multifactorielle doit porter sur des traits d'intérêts qui doivent être facilement mesurables, avoir une forte pertinence écologique et surtout doivent en partie contribuer à la définition de la niche écologique de l'organisme étudié. La photosynthèse, la production de carbone et la formation de biomasse, en regroupant tous les critères décrits ci-dessus, sont trois traits phytoplanctoniques qui paraissent adaptés à l'étude des effets des conditions environnementales sur la physiologie planctonique. Enfin, des modifications de la diversité spécifique sont observées à l'échelle mondiale et impliquent des modifications de fonctions écosystémiques. Très peu d'études sur les relations diversité/fonctionnement de l'écosystème ou diversité/productivité ont été réalisées en milieu marin et aucune d'entre elles ne prenait en compte de médiation environnementale. Il semble alors intéressant d'analyser quelles sont les relations productivité/diversité pour différentes communautés phytoplanctoniques sous médiation environnementale, ici traduites par différents rapport N/P.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet ICCARE (pour Impact des Changements Climatiques et Anthropiques sur la biodiversité des pRotistes des Ecosystèmes côtiers) et cherche à répondre, en partant de l'état des connaissances décrits ci-dessus, à cinq grandes questions :

- (1) Quels sont les effets de la concentration en sels nutritifs et de la température sur la physiologie de plusieurs microalgues présentant des traits fonctionnels différents ?
- (2) Existe-t-il des interactions entre ces différents facteurs ?
- (3) Tous les traits phytoplanctoniques répondent-ils de la même manière à la limitation en sels nutritifs, aux différentes températures ou leur interaction?
- (4) Les différentes microalgues, qui présentent des traits différents, vont-elles montrer des réponses similaires aux mêmes conditions environnementales ?
- (5) Quelles sont les tendances des relations diversité/productivité sur des communautés phytoplanctoniques composées d'espèces présentant des traits différents ?
- (6) Le rapport N/P conditionne-t-il ces tendances ?

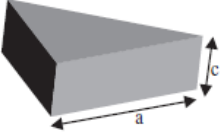
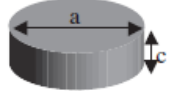

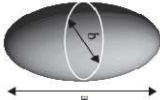
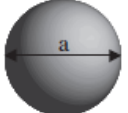
Cette étude a été réalisée sur des espèces microalgales (décrites ci-dessous) présentant des traits différents, en termes de taille et de phénologie en Manche Orientale, via une approche multifactorielle. L'approche a été multifactorielle car les traits étudiés sont multiples (photosynthèse, production de matière carbonée, production de biomasse) mais aussi car elle intègre deux facteurs environnementaux à savoir la limitation en sels nutritifs (azote ou phosphore), la température et leurs interactions.

I.5.1 Espèces d'intérêt

Six espèces ont été sélectionnées dans cette étude. Seules cinq de ces six espèces ont pu être maintenues en culture et étudiées de façon contrôlée et seront présentées dans ce manuscrit. En effet, en dépit de tous nos efforts, la cyanophycée *Synechococcus sp.* n'a pas pu être étudiée de manière optimale. Néanmoins cinq autres espèces appartenant à trois groupes fonctionnels, selon la définition habituellement employée, ont pu être étudiées. Ces espèces, *Hemiselmis rufescens* (Cryptophycée), *Phaeocystis globosa* (Haptophycée), *Skeletonema sp.*, *Thalassiosira rotula* et *Ditylum brightwellii* (toutes trois des diatomées) sont présentes en Manche Orientale, montrent un gradient de taille allant de 3 à 200 μm et ont une phénologie différente en Manche Orientale (tableau I-1). Des suivis à long terme ont permis la mise en évidence de successions phytoplanctoniques en Manche Orientale (Hernández-Fariñas *et al.*,

2013; Lefebvre *et al.*, 2011; Schapira *et al.*, 2008) en relation avec les paramètres physico-chimiques du milieu. Cette succession est caractérisée par une première efflorescence de diatomées qui débute en hiver (à partir de mi-janvier) et se termine au début du printemps où débute une efflorescence massive de *Phaeocystis globosa* suivie par une deuxième efflorescence de diatomée en été (Breton *et al.*, 2000; Schapira *et al.*, 2008). *Thalassioira rotula* est présente en Manche Orientale quand les concentrations en sels nutritifs sont élevées. La diminution de ces sels nutritifs, et principalement le phosphore et la silice, permet le développement rapide de *Phaeocystis globosa* (Peperzak, 2002; Schapira *et al.*, 2008). *Skeletonema sp.* et *Ditylum brightwellii* montrent leur maximum d'abondance entre le maximum d'abondance de *Thalassioira rotula* et celui de *Phaeocystis globosa*. Enfin, *Hemiselmis rufescens* est présente toute une partie de l'année (tableau1) mais ne contribue que faiblement à la biomasse totale des communautés phytoplanctoniques (Breton *et al.*, 2000; Houliez *et al.*, 2013).

Tableau I-1: groupe phylogénétique, taille (μm), colonialité, occurrence principale en Manche Orientale (jour julien), et forme géométrique (d'après Hillebrand *et al.*, 1999) de *Ditylum brightwellii*, *Thalassiosira rotula*, *Skeletonema sp.*, *Hemiselmis rufescens* et *Phaeocystis globosa*

espèces	groupe phylogenetique	taille	colonialité	occurrence principale	forme géométrique
<i>Ditylum brightwellii</i>	diatomées	70-200	chaîne	37-100	prisme base triangle 
<i>Thalassiosira rotula</i>	diatomées	20-40	chaîne	31-86	cylindre 
<i>Skeletonema sp.</i>	diatomées	6-25	chaîne	37-100	cylindre + 2 demi sphères 
<i>Hemiselmis rufescens</i>	Cryptophyta	3-10	isolée	29-110	sphéroïde prolate 
<i>Phaeocystis globosa</i>	Haptophyta	3-10	isolée/formation de colonie	70-160	sphère 

Hemiselmis rufescens (Hr)

Empire Eukaryota

Order Pyrenomonadales

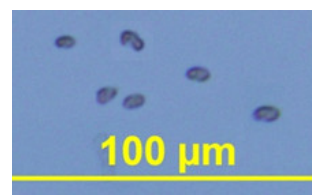
Kingdom Chromista

Family Chroomonadaceae

Phylum Cryptophyta

Genus Hemiselmis

Class Cryptophyceae



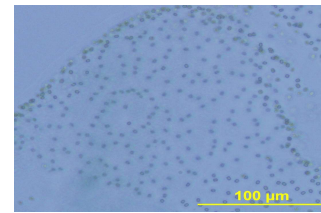
Hemiselmis rufescens (Hr, PLY631) est une microalgae unicellulaire mobile biflagellée de forme ovoïde appartenant au phylum des Cryptophyta dont la longueur est comprise entre 4 et 10 micromètres et la largeur entre 2 et 4 micromètres. La structure de la cellule est caractérisée par la présence d'un sillon contenant une dépression profonde tapissée de trichocystes (ou éjectosomes). Cette espèce présente deux types d'antennes pigmentaires. La première est composée d'un complexe chlorophylle a/c2 tandis que la seconde est composée de biliprotéines et se trouve à l'intérieur des thylakoïdes (Klaveness, 1989; Santore, 1982). Cette espèce est trouvée de fin janvier à fin septembre en Manche Orientale (Tableau1), ne présentant en milieu naturel qu'une faible

proportion de la biomasse phytoplanctonique totale au printemps et en été (Breton *et al.*, 2000; Houliez *et al.*, 2013).

Phaeocystis globosa (Pg)

Empire Eukaryota
Kingdom Chromista
Phylum Haptophyta
Class Prymnesiophyceae

Order Phaeocystales
Family Phaeocystaceae
Genus Phaeocystis

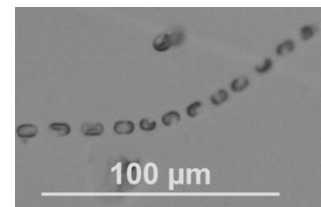


Phaeocystis globosa est une microalgue appartenant au phylum des Haptophyta qui présente un cycle de vie polymorphique. Ce cycle de vie a été beaucoup étudié (et l'est encore aujourd'hui) et est composé de quatre stades, deux diploïdes et deux haploïdes, qui diffèrent par leur taille, leur morphologie mais également de par leur physiologie (Parke *et al.*, 1971; Peperzak *et al.*, 2000; Peperzak and Gäbler-Schwarz, 2012; Rousseau *et al.*, 2013). *Phaeocystis globosa* présente des cellules non flagellées diploïdes, le plus souvent présentes dans des colonies pouvant aller jusqu'à plusieurs millimètres. Il existe également un stade diploïde flagellé, résultant de la syngamie de deux flagellés haploïdes et qui serait à l'origine de la formation des colonies. Ces différents stades sont présents dans nos expérimentations et présentent des caractéristiques physiologiques différentes avec, par exemple, une taille plus petite des cellules flagellées haploïdes (3-6μm) par rapport aux cellules diploïdes (5-10μm) ou encore une activité photosynthétique moindre des cellules coloniale diploïdes (Verity *et al.*, 1991). Une importante efflorescence de cette espèce est observée chaque année en Manche Orientale au printemps (Gypens *et al.*, 2007; Schapira *et al.*, 2008) (tableau 1).

Skeletonema sp. (Ske)

Empire Eukaryota
Kingdom Chromista
Phylum Ochrophyta
Class Bacillariophyceae

Order Thalassiosirales
Family Skeletonemataceae
Genus Skeletonema



Skeletonema sp. (Ske, PLY627) appartient au phylum des Ochrophyta et au groupe des diatomées impliquant la présence d'un frustule siliceux. Cette diatomée centrale est caractérisée par des cellules cylindriques réunies en chaînes étroites. Le diamètre de ces cellules est compris entre 6 et 25 μm et fait de cette espèce la plus petite diatomée utilisée dans nos expérimentations. *Skeletonema sp.* est présente en Manche Orientale, principalement durant l'efflorescence printanière de diatomée (tableau 1) (Lefebvre *et al.*, 2011; Schapira *et al.*, 2008).

Thalassiosira rotula (Tr)

Empire Eukaryota
Kingdom Chromista
Phylum Ochrophyta
Class Bacillariophyceae

Order Thalassiosirales
Family Thalassiosiraceae
Genus Thalassiosira



Thalassiosira rotula (Tr, CCAP1085/20) appartient, elle aussi, au phylum des Ochrophyta et au groupe des diatomées centrales impliquant la présence d'un frustule siliceux. Cette espèce présente des cellules cylindriques

réunies en chaînes pouvant aller jusqu'à 20 cellules. Au sein des chaînes les cellules sont reliées par un funicule muqueux qui donne de la rigidité à l'ensemble (Meunier, 1913; Sar *et al.*, 2011). Les cellules ont une taille allant de 20 à 40 μm , plus grande que *Skeletonema sp.* mais plus petite que *Ditylum brightwellii* (décrite ci-dessous). Cette espèce est présente en Manche Orientale principalement en Février-Mars profitant ainsi du stock hivernal de sels nutritifs.

Ditylum brightwellii (Db)

Empire Eukaryota

Order Lithodesmiales

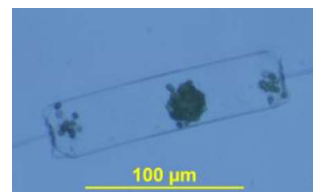
Kingdom Chromista

Family Lithodesmiaceae

Phylum Ochrophyta

Genus *Ditylum*

Class Bacillariophyceae



Ditylum brightwellii appartient, elle aussi, au phylum des Ochrophyta et au groupe des diatomées centrales. Cette espèce possède un frustule siliceux et présente des cellules soit isolées soit coloniales via la formation de chaînes lors de fortes croissances. *Ditylum brightwellii* est caractérisé par la présence de valves triangulaires ou quadrangulaires et de deux prolongements siliceux. Les cellules ont une taille allant de 70 à 200 μm , faisant de cette espèce la plus grande espèce de notre gamme expérimentale. Cette espèce est présente en Manche Orientale principalement au printemps.

I.5.2 Déroulement du manuscrit

Les objectifs de cette thèse sont d'étudier, via des expérimentations en laboratoire, l'effet de la température, de la concentration en sels nutritifs ou de leurs interactions sur cinq espèces de microalgues présentant divers traits de réponse. Les principaux traits de réponses sélectionnés sont, la capacité photosynthétique, la production d'hydrates de carbone particuliers et d'exsudats, la stœchiométrie et la formation de biomasse. Ces études portent sur cinq espèces appartenant à 3 phylums différents qui montrent une gamme de taille allant de 3 à 200 μm (tableau 1).

Les résultats de ces expérimentations sont retranscrits dans ce manuscrit qui s'articule en cinq parties. La première partie (ci-dessus) consiste en un état de l'art général, permettant de poser nos hypothèses de travail et de les placer dans le contexte scientifique actuel. La deuxième présente les résultats d'une étude portant sur les réponses de *Ditylum brightwellii*, *Thalassiosira rotula* et *Phaeocystis globosa*, trois microalgues présentant des traits différents, à un gradient de concentration en phosphore à une température donnée. Le but de cette première étude était de mettre en évidence les effets de la limitation en phosphore sur les différents traits mesurés. Cette étude cherchait également à montrer la présence ou l'absence de patrons de réponse communs des différentes microalgues, dont deux sont des diatomées, à

la limitation en phosphore. Cette première partie est rédigée sous la forme d'un article scientifique actuellement en préparation pour une soumission à *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

Partant des résultats obtenus dans la première étude les conditions expérimentales se sont étoffées par l'ajout de deux espèces, *Skeletonema sp.* une petite diatomée et *Hemiselmis rufescens* une petite cryptophycée, afin d'augmenter le gradient de taille et la diversité de groupes fonctionnels. Deux facteurs environnementaux ont également été ajoutés : la limitation en azote et la température. Ainsi, des expérimentations ont été réalisées afin de mettre en évidence les effets de la limitation en azote ou en phosphore, à 10°C et 14°C, et les interactions potentielles de la température et de la limitation en sels nutritifs sur différents traits de cinq espèces phytoplanctoniques appartenant à des phylums différents et présentant des traits différents.

La troisième partie de ce manuscrit traite de l'effet de ces facteurs environnementaux sur la photosynthèse et la formation de biomasse. Cette étude visait également à montrer la présence ou l'absence d'interaction des paramètres environnementaux sur traits. Cette partie est également écrite sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis à *Marine Ecology Progress Series*.

La quatrième partie s'intéresse davantage aux processus en aval de la photosynthèse que sont la production d'hydrates de carbone et de biomasse. Dans cette partie il s'agit également de voir si les effets des différentes conditions environnementales et de leurs interactions obtenus sur la photosynthèse sont en accord avec ceux obtenus sur la production de matière carbonée.

Enfin, connaissant les réponses spécifiques aux différentes conditions environnementales, des communautés basées sur les microalgues étudiées en monoculture à trois, quatre et six espèces ont été mises en place afin d'étudier les relations diversité/productivité dans trois conditions présentant des rapports N/P différents à une température donnée. De telles expérimentations n'ayant jamais été réalisées en milieu marin, il s'agissait de mettre en évidence d'une part, les relations diversité/productivité de ces trois communautés expérimentales et d'autre part, l'influence de la limitation en sels nutritifs sur ces relations. Les résultats de cette étude sont retranscrits dans le chapitre cinq.

Enfin, une discussion générale vise (1) à comparer les résultats obtenus dans les différents chapitres et (2) à proposer des perspectives de travail basées sur nos résultats en prenant compte les éventuelles limites des différentes études réalisées dans ce travail de thèse.

II. Influence of dissolved inorganic phosphate limitation on several response traits of three marine phytoplankton species

Fabien Dufossé, Valérie Gentilhomme, Fabienne Goulard, Elsa Breton, Sébastien Lefebvre

En preparation pour soumission : *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*

Abstract

Three phytoplanktonic species were exposed to different dissolved inorganic phosphate (DIP) concentration to investigate the effects of phosphorus depletion on several response traits. The prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* (Pg), and the diatoms *Thalassiosira rotula* (Tr), and *Ditylum brightwellii* (Db) were chosen because of their differences in morphological and phenological traits. A multi traits approach was applied with the study of photosynthesis, elemental composition, exudates and biomass formation. In general, Db was less sensitive to DIP limitation than Tr; Pg was intermediate. DIP depletion led to a 22, 7 and 5 fold decrease in biomass production for Tr, Db and Pg, respectively. Db, Pg and Tr showed increasing minimum DIP concentration threshold and specific differences in elemental composition. Moreover, Db photosynthetic capacity did not seem to be affected while Tr showed a physiological change of photosynthesis by its maximum electron transport rate and maximum effective quantum yield modification, and Pg a structural change characterized by a decrease in chlorophyll-a specific absorption coefficient. Finally, dissolved carbohydrate production and particular carbohydrate contents increased in DIP limited treatments depending on species. All the studied traits did not evolve in the same way. As an example, there was a negative relationship between photosynthesis capacity and cellular carbohydrate content, supporting that a multi-traits approach leads to a better understanding of modifications induced by DIP limitation. Moreover, two algae from the same classical functional group (diatoms) react differently to the DIP limitation, emphasizing the importance of size to define the interaction between microalgae and their environment. These observations are of importance to face the increasing occurrence of DIP limitations in European continental shelves, suggesting potential disturbances in phytoplankton abundance and community composition in coastal ecosystems and their associated carbon fluxes.

Keywords: nutrient, interactive effects, phytoplankton response traits, photosynthesis, carbohydrates, biomass

II.1 Introduction

Phytoplankton is an essential primary producer in most aquatic ecosystems and is responsible for approximately half the atmosphere carbon fixation (Field *et al.*, 1998). Through their metabolism, these organisms affect ecosystem processes such as biogeochemical cycles, and are the keystone of a large panel of trophic interactions (Falkowski *et al.*, 1998). Identifying the underlying mechanisms which define phytoplankton community structure, as well as spatial and temporal dynamics under contrasting environments, are then of crucial importance in the understanding of ecosystem processes, such as resource use and productivity (Cornelissen *et al.*, 2003).

Phytoplankton shows great genetic and species diversity involving a multiplicity of traits (Litchman and Klausmeier, 2008). Traits are defined as “any morphological, physiological or phenological features measurable at the species level” (Violle *et al.*, 2007), which largely define the ecological niches of these organisms (Litchman and Klausmeier, 2008). Studying the response traits, i.e the variations of traits in response to environmental changes (Lavorel and Garnier, 2002; Petchey and Gaston, 2006; Violle *et al.*, 2007), is an emerging tool to address phytoplankton’s community structure and dynamics along environmental gradients (Barton *et al.*, 2013; Litchman *et al.*, 2007). It is of growing interest to help understand why similar groups of species may co-exist in various contrasting habitats, while the traditional taxonomic approach alone is limited (Record *et al.*, 2013). The responses on population level can therefore be directly linked to the community level (Litchman *et al.*, 2007). Despite its importance, these response traits have been studied in relatively few cases in marine ecosystems, especially those concerning micro-organisms such as phytoplankton (Behl *et al.*, 2011; Duffy and Stachowicz, 2006; Edwards *et al.*, 2013; Hooper *et al.*, 2005).

Nutrients are one of the most important factors regulating phytoplankton growth, species composition and seasonal succession within communities. In coastal marine temperate ecosystems nitrogen and phosphorus are the most limiting nutrients for phytoplankton (Billen and Garnier, 2007; Tilman *et al.*, 1982; Vitousek and Howarth, 1991). Increased nutrient delivery to the ocean’s coastal areas, largely induced by human activities, is recognized as a major threat to the structure and function of these ecosystems (Cloern, 2001). Traditionally, studies have considered nitrogen as the main limiting factor in coastal waters (Rees *et al.*, 1995; Vitousek and Howarth, 1991). However, as a consequence of the difference in the

efficiency of abatement policies between nitrogen and phosphorus, the reduction in phosphorus has been greater than in nitrogen (Artioli *et al.*, 2008). Consequently, this caused an increase of the N/P ratio in many coastal waters, especially in NW European shelf seas (Billen and Garnier, 2007), inducing an increase of phosphate limitation events (Hernández-Fariñas *et al.*, 2013; Lefebvre *et al.*, 2011; LoebI *et al.*, 2009; McQuatters-Gollop *et al.*, 2007).

Dissolved inorganic phosphate (DIP) concentrations affect phytoplankton at multiple scales from physiological responses to ecosystem functioning (Allen and Polimene, 2011; Slomp and Cappellen, 2007). The synthesis of some energetic molecules like ATP, ADP, or AMP, as well as major biochemical pools (nucleic acids and phospholipids which are a major component of the cell membrane) need phosphorus (Paytan and McLaughlin, 2007). Several studies have shown that photosynthetic parameters are influenced by phosphorus availability resulting in a decrease of photosynthetic activity for a large number of species (Napoléon *et al.*, 2013; Rychter and Rao, 2005; Spijkerman, 2010; Wykoff *et al.*, 1998). This element also influences the production of exudates and the carbohydrate content, resulting in an increase of both parameters when DIP availability is decreased (Alcoverro *et al.*, 2000; Guerrini *et al.*, 2000; MykIestad, 1977).

Some phytoplankton response traits have been recurrently used through experimental or modeling approaches (Cornelissen *et al.*, 2003): biomass kinetics or growth (Cardinale *et al.*, 2004); nutrient affinity and use (Ptacnik *et al.*, 2008; Raffaelli *et al.*, 2003); photosynthetic activity or carbon incorporation (Bruno *et al.*, 2005; Doblin *et al.*, 2011); or carbohydrate production (Vuorio *et al.*, 2005). These traits combined two characteristics: an ecological interest, and an easy measurement. However, most of the trait based approaches take into account only one or two traits simultaneously, and they are not necessary positively correlated (Litchman and Klausmeier, 2008; Wang *et al.*, 2010). Studying several response traits and their trade-offs depending on nutrient conditions, is important to identify functional responses of organisms and to understand species ecology (Duffy and Stachowicz, 2006; Litchman *et al.*, 2007; Petchey and Gaston, 2006; Vuorio *et al.*, 2005). Litchman & Klausmeier (2008) assumed morphological traits (size, shape and coloniality) as master traits because of their link with physiological processes such as photosynthesis, growth, or resource acquisition (Beardall *et al.*, 2009; Finkel *et al.*, 2010b; Talmy *et al.*, 2014; Verdy *et al.*, 2009).

Given the increasing importance of DIP limitation events in European marine coastal waters, the aim of this study was to evaluate the influence of DIP limitation on several response traits of the prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* and the diatoms *Thalassiosira rotula* and *Ditylum brightwellii*, and hence highlighting functional responses of these species. Aside from their common occurrence in the eastern English Channel, these species were chosen for their distinct phenological (seasonal peak timing) and morphological characteristics (size, shape, coloniality), and consequently, their probable distinct ecophysiological response traits. In order to discriminate specific responses to DIP limitation a multi-trait approach was applied and includes photosynthesis, elemental composition and exudates, allowing a better understanding of species responses to DIP limitation. These three species show difference in size, a master trait for phytoplankton physiology, belong to two “traditional” phytoplankton groups highly represented in marine phytoplankton community and succeed each other in the English Channel. Studying the responses to DIP limitation of these species is relevant to understand their physiological change and the potential repercussion on their succession pattern and on associated natural ecosystem processes.

II.2 Material and methods

II.2.1 Species choice

The experiments were carried out using the prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* (Pg), the centric and potentially chain-forming diatoms, *Thalassiosira rotula* (Tr) and *Ditylum brightwellii* (Db). The three species were isolated by pipetting of coastal water of the eastern English Channel. These species were chosen for their common occurrence in the eastern English Channel and their differences from one another in terms of morphology, size, and timing of maximal abundance. In fact, the cells of *Ditylum brightwellii* (Db, 70-200 μm) are much larger than those of both *Thalassiosira rotula* (Tr, 30-40 μm) and *Phaeocystis globosa* (Pg, 3-10 μm). However, Pg may exhibit a large range of sizes as a result of its capacity to form colonial stage of up to few millimetres. In addition, these three species exhibit distinct seasonal timing peaks, succeeding each other between late-winter and late-spring in Eastern English Channel and the southern bight of the North Sea, and as a result they encounter contrasting nutrient conditions. Tr usually peaks in February, before Pg bloom, when nutrient concentrations are relatively high, while Db occurs mainly from mid-February to the end of

March co-occurring with Pg which form a massive bloom from March to May (Table1) (Breton *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2011; Rousseau *et al.*, 2002).

Table II-1: main occurrence and growth phase (julian day), size (μm), coloniality and geometric shape (Hillebrand *et al.*, 1999) of *Thalassiosira rotula*, *Phaeocystis globosa* and *Ditylum brightwellii* observed in Eastern English Channel. Data resumed 13 years of bi-m bi-monthly observations ($50^{\circ}40'75\text{N}$; $1^{\circ}31'17\text{E}$) from SOMLIT (Service d'Observation en Milieu LITtoral-INSU CNRS) network

species	main occurrence	growth phase	size	coloniality	geometric shape
<i>Thalassiosira rotula</i>	31-86	32-54	20-40	chain forming	cylinder
<i>Phaeocystis globosa</i>	70-160	70-92	3-10	spherical/ lobed mucilaginous colony	sphere
<i>Ditylum brightwellii</i>	37-100	47-81	70-200	chain forming	prism on triangle

II.2.2 Experimental design

Prior to the start of any experiments, each species was cultivated in 250 mL flasks of f/20 medium (Guillard and Ryther, 1962) at 12°C and exposed to $250 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and a 12/12 light/dark photoperiod. Cultures in exponential phase were used for inoculation at the start of the experiments. Non axenic algal cultures were grown separately in filtered ($0.2 \mu\text{m}$) autoclaved natural seawater containing f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962) without NaH_2PO_4 , H_2O and NaNO_3 . Tests to check for bacterial contamination in the cultures were performed according to the method of Porter and Feig (1980). The resulting bacterial concentration never exceeded $6 \cdot 10^4 \text{ cells.L}^{-1}$ regardless of the condition, which excludes any significant effect on nutrient kinetics. In order to test the effects of dissolved inorganic phosphate concentrations (DIP) on several response traits, each microalga was cultivated under the following DIP conditions (added as KH_2PO_4): Low (P_{low}); Intermediate (P_{med}); and High concentration (P_{high}) (Table 2). In order to avoid nitrogen limitation, $140 \mu\text{M}$ of KNO_3 were appointed to each treatment. Cultures were conducted in a Minitron (INFORS©) incubation chamber at 12°C , with an average irradiance of $110 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and an orbital shaking frequency of 125 rpm and 70 rpm for the diatoms and *Phaeocystis globosa* respectively. Cultures were carried out in 2 L polycarbonate flasks, in duplicate for each condition. From the beginning of the exponential growth phase, 200 mL were removed each

day (dilution rate of 0.1 day^{-1}), and replaced by fresh medium. Samples were taken daily, two hours after the beginning of the light period, in order to exclude the effect of diurnal patterns.

Table II-2: Dissolved Inorganic Phosphate (DIP) concentration (μM) in the three treatments at the beginning of the experiments for each species.

Species	P _{low}	P _{med}	P _{high}
<i>Ditylum brightwellii</i>	1.04	1.51	6.12
<i>Thalassiosira rotula</i>	1.06	1.86	8.86
<i>Phaeocystis globosa</i>	1.01	1.28	7.83

II.2.3 Phytoplankton counts, and algal biomass measurements

A 10 mL aliquot was removed from the culture subsample and fixed with Lugol's solution for diatoms and glutaraldehyde for *Phaeocystis globosa* for the determination of cell densities, and then settled for at least 8 h in a counting chamber according to the Utermöhl method (Utermöhl, 1931). Abundance of *Thalassiosira rotula*, *Ditylum brightwellii* and *Phaeocystis globosa* were determined under inverted microscopy (Nikon Eclipse TE2000-S). *Phaeocystis globosa* cells embedded in colonial matrix were counted from biovolume measurements according to the method of Rousseau *et al.* (1990). Diatom counts followed the procedure described in HELCOM proceedings (HELCOM, 1988). The algal biomass was estimated using a FluoroProbe (bbe-Moldaenke, Kiel, Germany)- a fluorometer which uses the spectral fluorescence to quantify phytoplankton biomass (expressed in $\text{Eq}\mu\text{g chl a.L}^{-1}$). A sample of 25mL was removed from the culture subsample, placed in the dark for ten minutes and was then analyzed with the FluoroProbe for one minute. In order to avoid the effect of sedimentation, the sample was shaken continuously during measurements.

Growth rate ' μ ' (day^{-1}) was calculated from fluorescence *in vivo* following the equation:

$$\mu = [\ln(F_t) - \ln(F_{t-\Delta t})]/\Delta t + D$$

With: F_t the fluorescence ($\text{Eq}\mu\text{g chl a.L}^{-1}$) on day t , D the dilution rate (0.1 day^{-1}), and Δt the time difference (day) between measurement.

Fluorescence *in vivo* and cell counts showed a linear and highly significant relationship which varied between species ($R^2 > 0.83$, $p < 0.001$). Fluorescence *in vivo* was then used to characterize biomass data.

II.2.4 Nutrient analysis

Nutrients were sampled daily for each treatment before the addition of fresh medium, and were then frozen (-32°C) until analysis, except for NH_4^+ (Koroleff, 1969). Concentrations of Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN, as the sum of $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$), Dissolved Inorganic Phosphate (DIP), and Dissolved Silicate (DSi) were measured on an Alliance Integral Futura Autoanalyser II[®], following Aminot and Kerouel (Aminot and K erouel, 2004). No DIN or DSi limitations were observed (Table 3).

In order to characterize the cell phosphorus quota at time t ($P_{\text{cell } t}$) the following equation was applied:

$$P_{\text{cell } t} = \left[(DIP_0 - DIP_t) + \left(\sum_0^t DIP_0 - \sum_0^t DIP_t \right) D \right] / \left[Cell_t - Cell_0 + \sum_0^t Cell_t D \right]$$

With: DIP_0 the media concentration (μM), DIP_t the culture concentration in the culture at time t (μM), t the time (day), $Cell_t$ the number of cells (cell.L^{-1}), $Cell_0$ the initial number of cells (cell.L^{-1}), and D the dilution rate (day^{-1}).

II.2.5 Elemental analysis

An elemental analyzer (CE instrument Fisons Na 2100) was used to determine the particulate organic Carbon (POC) and Nitrogen (PON) content of phytoplankton. Three measurements, in triplicate, were done during the experiment. The first one was done at the beginning of the exponential growth phase. Then, measurement was done with a two days time step. Samples were immediately filtered onto precombusted Whatman GF/F glass fiber filters under vacuum controlled conditions. POC and PON were measured in an elemental analyzer (CE instrument Fisons Na 2100) using acetanilide as standard, and ultra-pure O_2 and helium as combustive and carrier gas, respectively. Four hours prior to analyses, filters were dried and exposed to HCl vapor in glass desiccators for decarbonation.

II.2.6 Photosynthetic capacity

Photosynthetic capacity of phytoplankton was obtained by measuring sequential steady state light curves (SSLC) using pulse amplitude modulation (PAM) fluorimetry (Phyto-PAM, Heinz Walz GmbH[®], Effeltrich, Germany). Before the start of the SSLC an aliquot of the

culture (3 mL) was incubated in the dark for 15 min. The sample was then dispensed into a 10 mm³ quartz glass cuvette and inserted into the PAM fluorimeter. The maximum quantum yield of photosystems II (F_v/F_m) was obtained by applying a saturating flash and then calculated by dividing the variable fluorescence (F_v), which corresponds to the difference between maximal fluorescence after dark acclimation (F_m) and the minimum fluorescence in the dark (F_0), by F_m . Sequential steady state light curves were generated by applying a sequence of increasing actinic irradiance in 15 preset discrete increments ranging from 22 to 1384 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The duration of irradiance steps was set to 60s in order to reach a stable signal of fluorescence between two saturating flashes. These curves provided detailed information on the saturation characteristics of the electron transport chain together with the overall photosynthetic performance of the microalgae.

The electron transport rate (ETR in $\mu\text{mol e}^- \text{mg chl a}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) was calculated at each level of irradiance as the product of effective quantum yield of PSII $\Delta F/F_m'$, the delivered irradiance E ($\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), and the specific absorption of chlorophyll-a ($a^* \text{ m}^2\cdot\text{mg chl a}^{-1}$).

$$ETR = [(\Delta F)/F_m'] E 0.5 a^*$$

ΔF was determined by applying a saturating flash, and corresponds to the difference between the maximum fluorescence in actinic light during each irradiance step of the SSLCs (F_m') and the stable fluorescence before the saturating flash (F_s). The mathematical factor of 0.5 corresponds to the ratio of photosystems II on total photosystems. The mean chlorophyll-a specific absorption coefficient ($a^* \text{ m}^2\cdot\text{mg chl a}^{-1}$) was determined following the method of Mitchell *et al.* (2003). More specifically, samples of 50 mL from the culture were passed through 47 mm GF/F filters under low pressure. Filters were placed on quartz plates for measurements using a clean filter wetted with ultra-filtered seawater as a reference. Absorption spectra of filtered and de-pigmented particles were recorded between 400 and 800 nm with a 2 nm step using a UV-2450 Shimadzu[®] dual beam spectrophotometer. De-pigmentation of filtered particles was conducted following Tassan & Ferrari (1998) with NaClO and 0.2% of active chlorine. The coefficient a^* was then calculated by subtracting the mean de-pigmented particle absorption spectrum to the mean total filtered particles absorption spectrum, and then normalized to the chlorophyll a concentration.

ETR vs. light curves were fitted using the model of Webb *et al.* (1974) to estimate the maximal light utilization efficiency (α) and the maximum electron transport rate (ETR_{max}),

which corresponded to the initial slope and the asymptote of the curve, respectively. Curve fitting was achieved under Matlab R2008b.

II.2.7 Carbohydrates

From the start of the exponential growth phase, 10 mL samples were collected daily, and put immediately in an ice bath to stop all biochemical reactions. They were then filtered on a GF/C Whatman filter to separate the particulate from the dissolved fraction. Samples were then hydrolyzed in 1M HCl for 24h in order to measure the proportion of total carbohydrates. Next, the carbohydrate content of each (Particulate and dissolved) fraction was measured with the 3-methyl-2-benzo thiazoline hydrazone hydrochloride (MBTH) method, following the protocol described by Parsons *et al.* (1984).

To quantify the specific daily carbohydrate production the following equation was applied:

$$S_p = [((S_t - S_{t-1}) + (S_{t-1} - S_0)D)V]/Cell_t$$

With S_p the carbohydrates production (mg Eqglc.cells⁻¹.day⁻¹), S_t and S_{t-1} the carbohydrate concentration at day t and $t-1$ (mg Eqglc.L⁻¹), S_0 the carbohydrate concentration of fresh media, V the total volume (l), $Cell_t$ the cell concentration at day t (cell.L⁻¹), and D the dilution rate (day⁻¹).

II.2.8 Statistical analyses

The analyses of this study focused on the response to different initial DIP concentrations of: algal biomass; nutrient concentration; maximum electron transport rate (ETR_{max}); maximum light use efficiency (α); the mean specific absorption of chlorophyll-*a* (a^*); maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m); dissolved carbohydrate production; particular carbohydrate content; and stoichiometry. For these, general linear models (GLM) were applied (Minitab15[®]) to test whether the variables depended on DIP concentration, the day of measurement, or their interaction. In addition, a Tukey post-hoc test was applied to qualify the differences in the variable responses according to time, DIP initial concentration, and interaction between these two factors. Normality of residuals and homocedasticity were checked, and when it was necessary, data were Log transformed in order to apply GLM. In order to summarize all three species' responses, and to highlight differences in the response

traits of these species, a Principal Component Analysis (PCA) was processed. This was based on the GLM results using the periods when the variables showed the highest significant difference between treatments.

II.3 Results

One duplicate of the *Tr* P_{med} and *Db* P_{low} treatments did not show any satisfactory growth kinetic, and consequently was not included in these results.

II.3.1 Biomass and nutrient dynamics

Dynamics of biomass followed the same classical scheme for all species (Fig.II-1). After a first phase of acclimation, with the exceptions of *Tr* and *Db* in P_{high}, all developed exponentially until they reached maximum biomass depending on conditions highlighting the effect of dissolved inorganic phosphate (DIP) limitation. Maximum biomass increased with DIP initial concentration. There were significant interactions between time and treatment for biomass for all species (GLM, $p < 0.001$). For *Tr*, the three levels of treatment were significantly different from each other, at D₈ until the end of the experiment (Tukey, $p < 0.05$). Concerning *Pg*, P_{high} between D₁₀ and D₁₂, was significantly different from P_{med} and P_{low} (Tukey, $p < 0.03$), the two latter being identical (Tukey, $p > 0.05$). From D₁₃ to D₁₄, biomass differed between treatments (Tukey, $p < 0.05$). For *Db*, only D₁₁ to D₁₃ showed distinct responses between treatments, with biomass in P_{high} significantly higher than the two others (Tukey, $p < 0.01$). DIP limitation induced a decrease of biomass, whose magnitude depended on the species, showing at the end of the experiment, a fluorescence 22, 7 and 5 times higher (on average) in P_{high} than in P_{low} for *Tr*, *Db*, and *Pg*, respectively.

Except for *Tr* in P_{high}, and *Db* in P_{low} and P_{high}, DIP concentrations decreased throughout the length of the experiment, in all treatments, for all species. In fact, for *Tr*, DIP concentration increased from 2.4 to 3.4 μM from D₈ to the end of the experiment. For *Db*, P_{low} and P_{high} exhibited an increase in DIP concentration between D₈ and D₁₀ (from 0.2 to 0.8 μM), and between D₁₀ and D₁₁ (from 0.4 to 1.6 μM) (Fig.II-1). As observed for biomass, there were significant interactions between time and treatment for all species (GLM, $p < 0.04$). Noticeably, there were no significant differences in DIP concentration between P_{med} and P_{low}, regardless of time or species (Tukey, $p > 0.05$). P_{high} differed significantly from the two other

treatments at D₄ and D₁₁ for Tr, from D₄ to D₁₂ for Pg, and from D₁ to D₇, and D₁₁ to D₁₃ for Db.

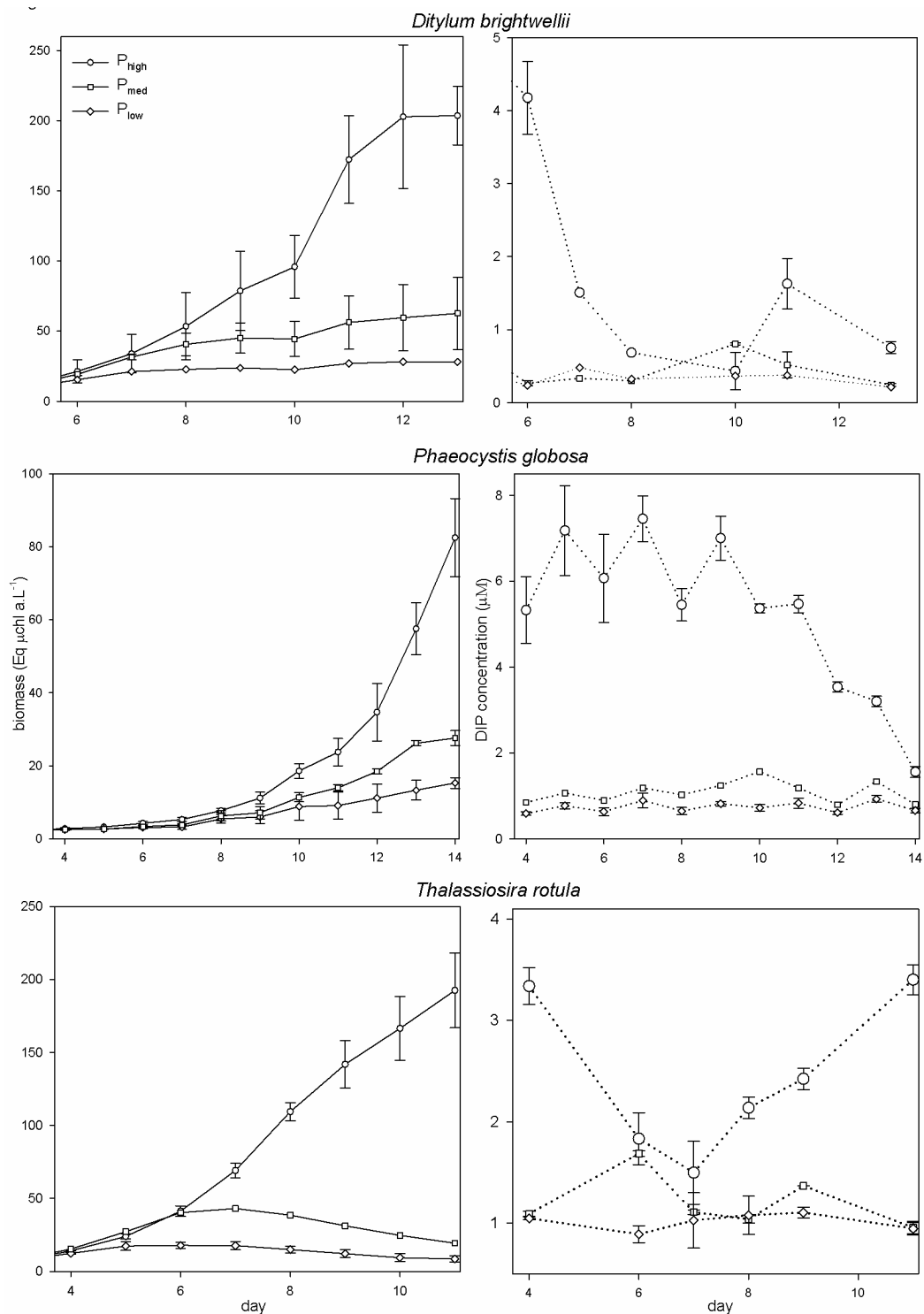


Fig.II-1 : biomass dynamics of *Ditylum brightwellii*, *Phaeocystis globosa* and *Thalassiosira rotula* from *in vivo* fluorescence analysis (left) and changes of Dissolved Inorganic Phosphate (DIP) concentration (right) (μM) in the three P-treatments (Circles: P_{high} , square: P_{med} and diamond: P_{low}). Bars represent standard deviation. Note that only data from the first day of dilution are presented and scales of the figures are different

Minimum DIN, DIP and DSi values are reported in Table II-3. No DIN or DSi limitations were observed during the course of these experiments. Moreover, the minimum value of DIP concentration differed between species (Table II-3), and resulted in a phosphates use efficiency gradient; with Db being the most efficient species, followed by Pg, and Tr.

Table II-3: minimum Dissolved Inorganic Phosphate (DIP), Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN) and Dissolved Silicates (DSi) concentrations (μM) recorded over the course of the experiments for *Thalassiosira rotula*, *Phaeocystis globosa* and *Ditylum brightwelli* under P_{high} , P_{med} and P_{low} treatments.

treatment		<i>Thalassiosira rotula</i>	<i>Phaeocystis globosa</i>	<i>Ditylum brightwelli</i>
P_{high}	DIP	1.28 \pm 0.30	1.47 \pm 0.13	0.25 \pm 0.01
	DIN	8.23 \pm 3.14	42.21 \pm 16.37	16.08 \pm 6.53
	DSi	50.23 \pm 8.32	1002 \pm 1.23	60.51 \pm 6.54
P_{med}	DIP	0.91 \pm nd	0.79 \pm 0.19	0.23 \pm 0.01
	DIN	15.13 \pm nd	101.81 \pm 9.20	120.56 \pm 7.90
	DSi	90.23 \pm nd	998 \pm 5.32	100.25 \pm 2.31
P_{low}	DIP	0.83 \pm 0.05	0.56 \pm 0.04	0.20 \pm nd
	DIN	15.13 \pm 0.01	114.25 \pm 4.03	115.27 \pm nd
	DSi	110.23 \pm 7.23	1005 \pm 4.43	131.02 \pm nd

II.3.2 Photosynthetic capacity

The maximum electron transport rate (ETR_{max}) displayed differences between conditions and species (Fig.II-2). Pg exhibited the highest values (max value=3.24 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{mg chl a}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), Db the lowest (max value=1.4), and Tr intermediate ones (max value=2.2). Regarding Pg, there was a significant positive effect of DIP concentration on ETR_{max} (GLM, $p < 0.001$), while Db showed no significant differences (GLM, $p = 0.352$). There was a marginally significant interaction between time and treatment for Tr (GLM, $p = 0.061$). At D_8 ETR_{max} values decreased with DIP concentration (Tukey, $p < 0.02$), while no significant effect of DIP concentration on ETR_{max} could be highlighted at D_{11} (Tukey, $p > 0.7$). In addition, the ETR_{max} value was 1.8 times higher in P_{high} than in P_{low} for Pg; 1.3 times higher in P_{high} than in P_{low} for Db on D_{13} ; and 2.7 times higher in P_{high} than in P_{low} at D_8 concerning Tr.

The maximum light use efficiency (α) also evolved depending on time and DIP concentration (Fig.II-2) for Pg with the value in P_{high} higher than in the two other treatments (GLM, $p = 0.007$). Although no significant difference was found in response to DIP concentration for Db (GLM, $p = 0.5$), there was a time effect (GLM, $p = 0.02$). There were significant interactions

between time and treatment for Tr (GLM, $p=0.03$). P_{high} differed significantly from the two others treatments at D_8 and D_{11} (Tukey, $p<0.05$), and P_{med} differed from P_{low} only at D_8 (Tukey, $p<0.05$). As observed for ETR_{max} , maximum values of alpha differed between species: Pg exhibited the highest values ($\alpha_{max}=0.022$); Db the intermediate ($\alpha_{max}=0.013$); and Tr the lowest ones ($\alpha_{max}=0.010$).

Calculation of ETR_{max} and α depended on the chlorophyll-a specific absorption coefficient (a^* , see the value in Table II-4), which varied differently in relation to DIP concentration and time, depending on species (Table II-4). a^* did not vary according to DIP concentration for Db and Tr (GLM, $p>0.42$) contrary to a^* for Pg . Concerning Pg , a^* varied depending on treatment and time (GLM, $p=0.03$), there was a positive relationship between DIP concentration and specific absorption of chlorophyll a. Pg exhibited on average the highest a^* values ($18.2 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2 \cdot \text{mg chl a}^{-1} (\pm 3.9)$) compared to $10.2 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2 \cdot \text{mg chl a}^{-1}$ for Db (± 1.85) and $13 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2 \cdot \text{mg chl a}^{-1} (\pm 1.97)$ for Tr , respectively. There was no clear influence of DIP concentration and time on the maximum quantum yield (F_v/F_m) for Db and Pg (GLM, $p>0.2$). Conversely, there were significant interactions between time and treatment on F_v/F_m for Tr (GLM, $p<0.01$). P_{high} differed from P_{low} daily, and from P_{med} at D_{11} (Tukey, $p<0.04$), while P_{med} and P_{low} were identical (Tukey, $p>0.13$).

Table II-4: mean (\pm sd) of chlorophyll-a specific absorption coefficient ($a^* \cdot 10^3 \text{ m}^2 \cdot \text{mg chl a}^{-1}$) and maximum effective quantum yield of PSII (F_v/F_m) treatments of *Thalassiosira rotula*, *Phaeocystis globosa* and *Ditylum brightwellii* under P_{high} , P_{med} and P_{low} treatments depending on time (day) and Dissolved Inorganic Phosphate (DIP) limitations.

<i>Ditylum brightwellii</i>		P_{high}	P_{med}	P_{low}
day				
a^*	8	8.50 \pm 1.80	10.5 \pm 0.80	9.20 nd
	13	13.4 \pm 0.30	10.7 \pm 0.80	8.60 nd
F_v/F_m	8	0.66 \pm 0.06	0.68 \pm 0.01	0.67 nd
	13	0.67 \pm 0.02	0.65 \pm 0.04	0.65 nd
<i>Phaeocystis globosa</i>				
a^*	8	27.7 \pm 4.30	19.4 \pm 0.23	15.1 \pm 3.40
	10	16.3 \pm 4.80	10.2 \pm 0.95	6.20 \pm 3.50
	13	24.5 \pm 3.80	22.3 \pm 1.30	21.7 \pm 5.80
F_v/F_m	8	0.65 \pm 0.04	0.61 \pm 0.02	0.58 \pm 0.05
	10	0.66 \pm 0.03	0.63 \pm 0.04	0.68 \pm 0.02
	13	0.66 \pm 0.01	0.64 \pm 0.03	0.61 \pm 0.02
<i>Thalassiosira rotula</i>				
a^*	8	12.6 \pm 0.90	16.5 nd	11.1 \pm 7.60
	11	11.2 \pm 0.90	13.4 nd	13.0 \pm 3.70
F_v/F_m	8	0.67 \pm 0.01	0.66 nd	0.61 \pm 0.002
	11	0.67 \pm 0.02	0.51 nd	0.48 \pm 0.002

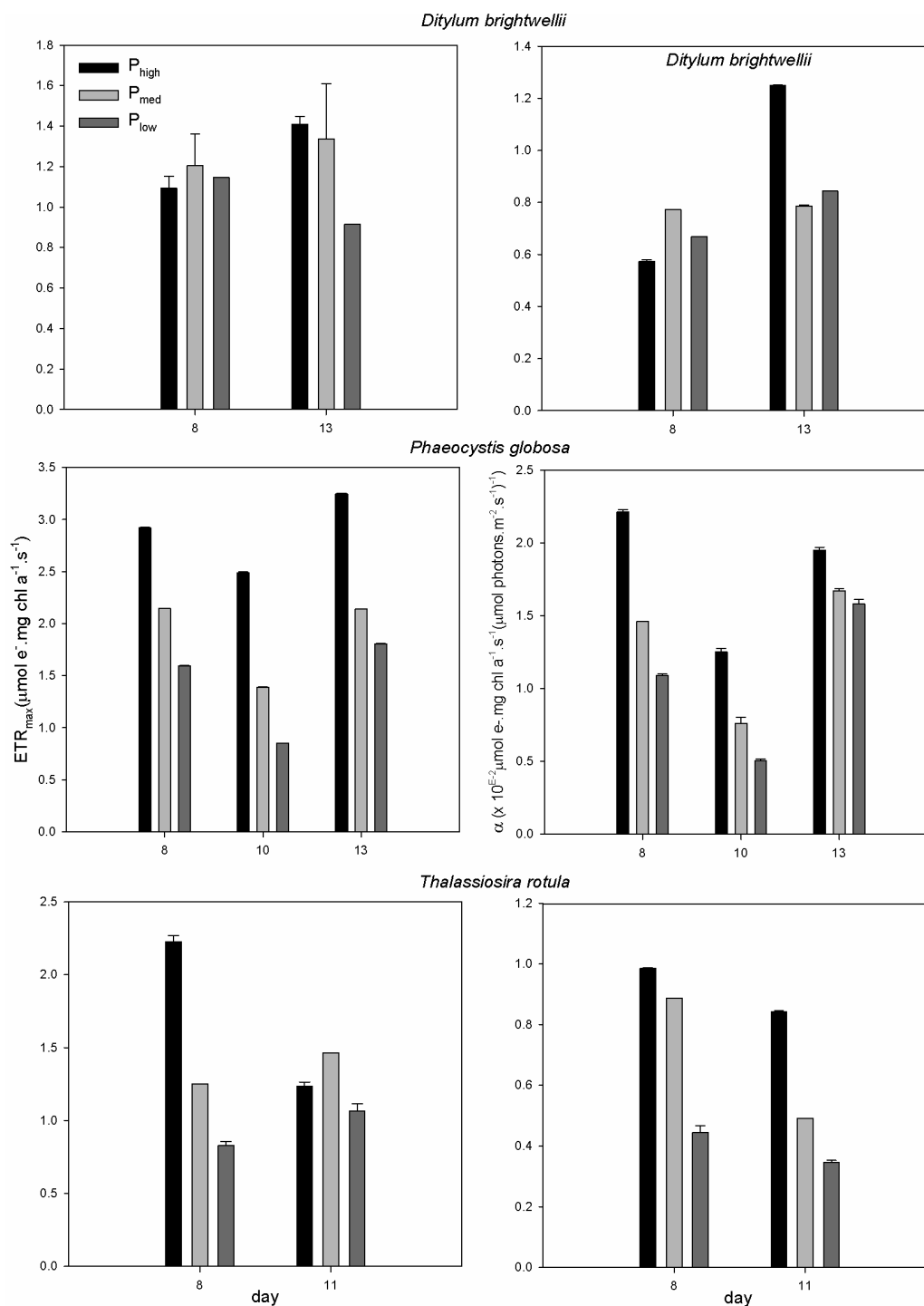


Fig. II-2: maximum electron transport rate (ETR_{max})(left) and maximum light use efficiency (right) values in P_{low} (black), P_{med} (grey) and P_{high} (dark grey) in *Thalassiosira rotula*, *Phaeocystis globosa* and *Ditylum brightwellii*. Error bars denote standard deviation. Note that scales of the figures are different.

II.3.3 Carbohydrates production and content

There was a significant treatment effect on the production of dissolved carbohydrates for Tr (GLM, $p=0.05$) (Fig.II-3). In fact, exudates production was significantly higher in P_{high} than in

P_{low} , while P_{med} and P_{low} showed no significant differences. By contrast, there was no treatment effect on dissolved carbohydrate production concerning Pg and Db (GLM, $p=0.3$), but there was a time effect for Pg, with a production which tended to decrease depending on time in all treatments (GLM, $p=0.001$). At the end of the experiment, cells produced 7, 2 and 4 times less dissolved carbohydrates in P_{high} than in P_{low} for *Tr*, *Pg*, and *Db*, respectively (Fig.II-3).

DIP concentrations also had a notable effect on the carbohydrate content with significant interactions between time and treatment for these species (Fig.II-3) (GLM, $p<0.006$). For the three species, P_{high} concentrations were significantly lower than P_{low} on the last day of the experiment (Tukey, $p<0.05$). The carbohydrate content of *Tr*, *Pg*, and *Db*, was approximately 7, 8 and 16 times higher than in P_{High} , respectively. *Tr* exhibited the maximum values both in term of particular carbohydrate content and extracellular production, while *Pg* and *Db* showed values in the same order of magnitude.

II.3.1 Stoichiometry

Concerning elemental ratios different patterns were observed for each species (Table II-5).

DIP concentration had no effect on N/cell, P/cell and C/cell for *Pg* due to large standard deviations for these parameters. Nevertheless, time had a significant effect on these ratios (GLM, $p<0.05$), which all decreased over time. By contrast, DIP limitation induced modifications of elemental ratios for diatoms. There were significant interactions between time and treatment on P/cell ratio for *Tr* (GLM, $p<0.05$), with a reduction when DIP concentration decreased at D_7 (Tukey, $p<0.05$). Differences between treatments then decreased to become insignificant. For N/Cell ratios, there was a treatment effect with an increase of this ratio in P_{low} and P_{med} . There were also significant interactions between time and treatment on C/cell ratio in *Tr* (GLM, $p=0.037$), with C/cell ratios significantly higher in P_{med} than in P_{low} and P_{high} (Tukey, $p=0.005$), which were identical at the end of the experiment (Tukey, $p=0.060$). *Db* also exhibited changes in elemental ratio in response to treatment effect. In fact, there was significant time and treatment effect on P/cell ratios, which declined with DIP concentration and over time (GLM, $p=0.004$). There was also a significant time effect on C/cell ratio with a strong reduction over time (GLM, $p=0.011$).

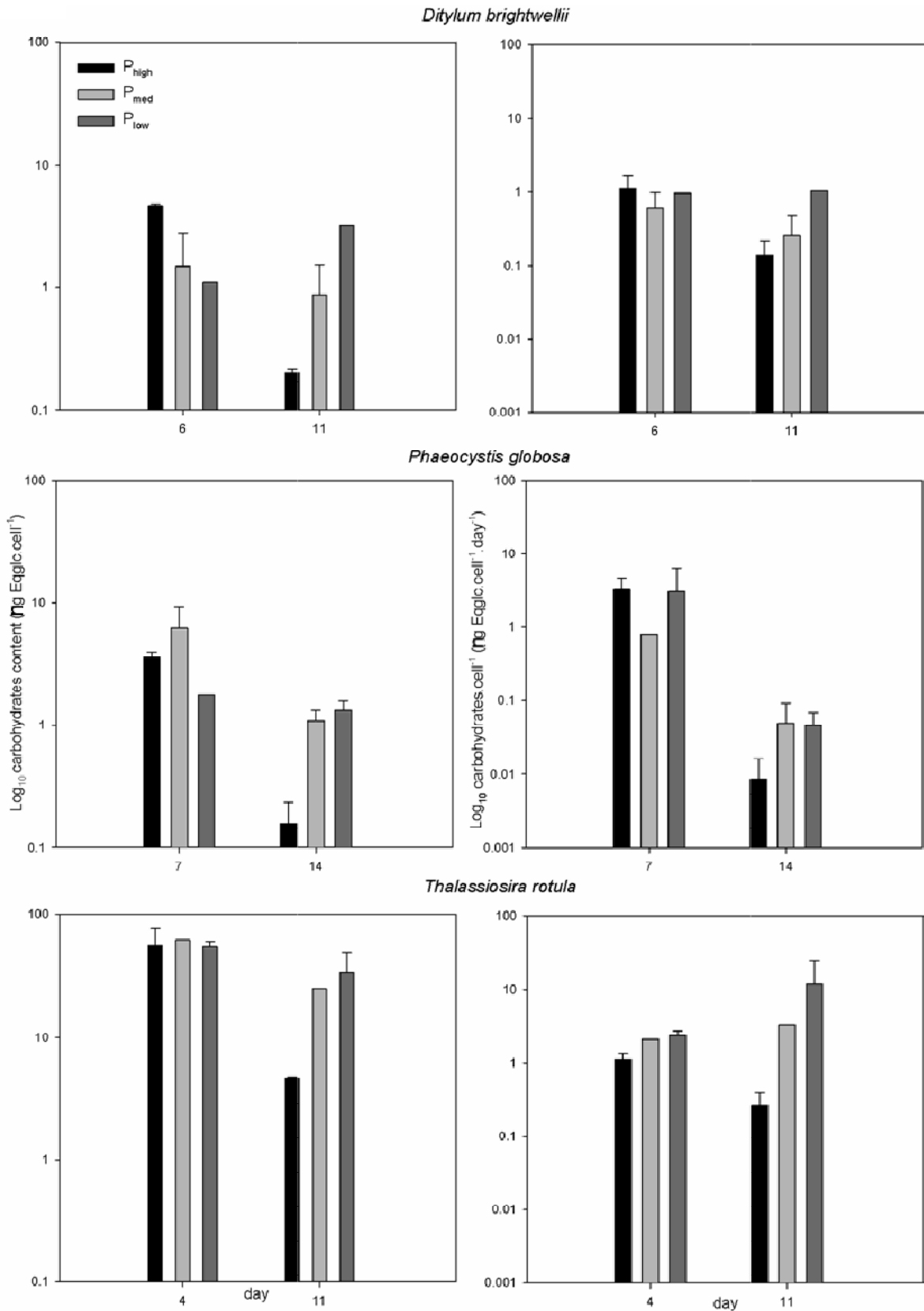


Fig. II-3: daily production of exudates by *Thalassiosira rotula*, *Phaeocystis globosa* and *Ditylum brightwellii* (ng Eqglc.cell⁻¹.day⁻¹) (right) and their carbohydrate content (ng Eqglc.cell⁻¹) (left) under Different Inorganic Phosphate (DIP) concentrations (P_{low}: black, P_{med}: grey, P_{high}: dark grey).

Finally, the three species showed different phosphorus and nitrogen specific content values, where specific phosphorus content in Tr was on average 4 and 16 times higher than in Db and Pg, respectively. As for phosphorus content nitrogen storage in Tr was 78 times and 28 times higher (on average) than in Pg and Db, respectively.

Table II-5: total N/cell ($\times 10^{-6}$ $\mu\text{mol N. cell}^{-1}$), inorganic P/cell ($\times 10^{-7}$ $\mu\text{mol P. cell}^{-1}$) and organic C/cell ($\times 10^{-5}$ $\mu\text{mol C. cell}^{-1}$) ratios for *Tr*, *Pg* and *Db* according to time and P-treatments

<i>Tr</i>	day	P_{high}	P_{med}	P_{low}
N/cell	5	38.43 \pm 8.65	50.57	41.64 \pm 4.68
	11	19.35 \pm 0.61	55.54	38.07 \pm 8.91
P/cell	5	134.37 \pm 31.85	12.26	7.84 \pm 0.45
	11	14.56 \pm 4.70	13.19	7.20 \pm 0.10
C/cell	5	21.94 \pm 4.23	34.80	31.29 \pm 2.53
	11	18.81 \pm 3.26	73.38	27.15 \pm 8.26
<i>Pg</i>				
N/cell	7	15.40 \pm 3.42	6.73 \pm 3.01	13.44 \pm 6.04
	14	0.46 \pm 0.16	0.54 \pm 0.16	0.23 \pm 0.01
P/cell	7	10.03 \pm 5.66	13.08 \pm 16.18	12.37 \pm 16.18
	14	0.60 \pm 0.15	0.88 \pm 0.78	0.13 \pm 0.01
C/cell	7	4.37 \pm 0.73	8.32 \pm 2.71	11.57 \pm 3.28
	14	0.26 \pm 0.09	0.46 \pm 0.09	0.26 \pm 0.02
<i>Db</i>				
N/cell	6	32.08 \pm 3.69	24.62 \pm 11.34	25.83
	11	12.06 \pm 1.33	5.07 \pm 2.02	1.91
P/cell	6	47.00 \pm 5.50	13.68 \pm 6.89	9.03
	11	6.96 \pm 3.76	2.55 \pm 0.65	1.46
C/cell	6	16.52 \pm 2.99	17.35 \pm 11.14	19.14
	11	8.38 \pm 0.17	4.22 \pm 0.84	3.95

II.3.2 Principal Component Analysis

In an attempt to discriminate species based on their physiological traits and to summarize the main significant physiological responses of each species to DIP concentration, PCA analysis was performed using data showing the most significant responses in each experiment (Table

II-6). The two first axes of the PCA explained 67.75% of the variability. Therefore, the analysis of the PCA could be based on the two first axes only. The first axis (45.88%) was characterized by: the photosynthesis parameters, carbohydrate content and exudate production. PCA showed that photosynthesis parameters were negatively related to carbohydrate content and exudate production. The second axis (21.86%) was mainly built by the P/cell content emphasizing, on one hand, the limited availability of DIP, and on other hand, that each species was influenced by DIP limitation (Fig.II-4a). A factorial plan was generated based on the PCA analysis, confirming different response patterns, depending on species to DIP concentration (Fig.II-4b). Tr was strongly influenced by P/cell, with a gradient of P/cell depending on treatments. Moreover, the position of Tr points highlighted an increase of exudate production associated to a decrease of photosynthesis parameters with DIP concentration. Pg responded in the same way, but to a lesser extent than Tr. Finally, Db was located near the centre of the factorial plan, inducing less significant responses to DIP limitation compared to Tr and Pg.

II.4 Discussion

These results show that DIP limitation altered the physiological responses of phytoplankton, and that the intensity of these responses differed between all three species. Disturbances induced by DIP limitation were linked, and resulted from cascade physiological effects from photosynthesis to growth.

II.4.1 Nutrient, biomass and stoichiometry

Our results highlight the fact that phosphate uptake and assimilation by phytoplankton stopped when DIP reached minimum concentration thresholds. Moreover, these thresholds differed between species as a result of their species-specific affinity for DIP. This could be explained in a metabolic way. The uptake of phosphate is an energy dependant process. DIP uptake by phytoplankton leads to a decrease of DIP concentration in the medium up to a threshold value at which (cost is greater than gain) energy is insufficient to drive phosphate uptake (in an active way) (Aubriot *et al.*, 2011). Interestingly, a comparison between species of the minimum DIP concentration reached during the experiments suggests that Db was less sensitive to DIP limitation than Pg and Tr. These observations could be linked to species allometry, which influences the dynamic of phosphorus uptake by phytoplankton (Finkel *et*

These authors have highlighted that the diatom *Skeletonema marinoi* is less efficient than other taxa (*e.g.* flagellate) in the utilization of different form of phosphorus as a result of different enzymatic composition.

Phosphate limitation influenced cell stoichiometry, especially for the two diatom species. In fact, Db showed mainly a decrease of phosphate content as a result of a decrease of DIP concentration. Nevertheless, Db did not show strong physiological responses to phosphate limitation, implying that phosphate content could be even lower under more severe depleted conditions. *Tr* stoichiometry was more affected with a strong decrease of phosphate content in limited treatments, as well as an increase of nitrogen and carbon content as shown by Jahnke *et al.* (1986). The increase of carbon content could be explained by a decrease of cell metabolism and division (Wang *et al.*, 2010) associated to the maintenance of carbon production through photosynthesis. As for carbon, nitrogen content in *Tr* increased under DIP limitation, probably as the result of a metabolism reduction in *Tr* in response to DIP limitation. By contrast to the two diatom species, *Pg* did not show any significant difference in cell stoichiometry. This could have resulted from the great standard deviations of these parameters, which themselves could be a consequence of the dynamic alternation between free living and colonial forms. Besides, *Phaeocystis* genus has been shown to be able to grow on organic phosphorus through phosphatase activity (Veldhuis and Admiraal, 1987).

II.4.2 Photosynthesis

Several studies involving phytoplanktonic species, other than those we cultivated in these experiments, have shown that photosynthetic parameters are influenced by phosphorus availability in different ways depending on species (Napoléon *et al.*, 2013; Rychter and Rao, 2005; Spijkerman, 2010; Wykoff *et al.*, 1998). Our results have highlighted that photosynthetic specifications of *Tr* and *Pg* differed depending on DIP concentration, while Db seemed unaffected. In fact, *Tr* showed a decrease of ETR_{max} (only at D_8), maximum light use efficiency (α), and F_v/F_m , as DIP concentration decreased. These results suggest that a decrease of functional PSII reaction centres, which could have been damaged due to phosphorus limitation, can decrease the capacity of electron transport of algae (Geider *et al.*, 1993; Lippemeier *et al.*, 2001; Wykoff *et al.*, 1998). Moreover, Wykoff *et al.* (1998) highlighted that under nutrient depleted conditions, fewer of the functional reaction centres can rapidly reduce the PQ pool with the formation of PSII Q_b -non reducing centres, which

leads to a decrease of electron transfer between quinones, and therefore involves a loss of photosynthesis efficiency (Wykoff *et al.*, 1998). Finally, chlorophyll-a specific absorption coefficient of Tr was not affected by DIP limitation. Pg also showed a decrease of ETR_{max} and α while F_v/F_m was not affected. Contrary to Tr, the chlorophyll-a specific absorption coefficient (a^*) in Pg decreased when DIP concentration decreased. ETR_{max} and α were directly linked to a^* , consequently the concomitant decline of these two parameters have been reinforced by the decrease of a^* . In contrast to Tr, Pg was subjected to a structural change of its photosynthesis apparatus under DIP limitation. This perturbation was probably due to some modifications of pigment composition or organisation, also called ‘package effect’, due to DIP limitation, as previously observed by Geider *et al.* (1998a), and Napoléon *et al.* (2013). Some authors have shown that a^* of phytoplankton, mostly diatoms, increases under nutrient depleted conditions in order to counteract the decrease of other photosynthetic parameters (Geider *et al.*, 1998a; Geider *et al.*, 1993; Napoléon *et al.*, 2013). In our study however, DIP limitation had no significant effect on a^* in diatoms. In contrast, a^* in Pg decreased, which suggests species-specific responses to DIP limitation. To summarize, Tr exhibited a physiological change in photosynthesis, Pg exhibited a structural change in the photosynthesis apparatus, while neither effect of DIP limitation was observed for Db. Photosynthesis processes are the precursors of carbohydrates formation, but also of biomass formation. The decrease of biomass, with DIP concentration decreased, observed in our study resulted, at least in part for Tr and Pg, of the decrease of photosynthetic capacity. Interestingly, Db showed a decrease of biomass formation in case of limitation without significant effects on photosynthesis. This decrease of biomass for Db resulted from an other mechanism as, the inability to produce phospholipids (Suzumura, 2005). In all, these results have highlighted the relevance of photosynthetic parameters for representing a specific functional response.

II.4.3 Carbohydrates

DIP limitation leads to higher production of exudates and carbohydrate content in accordance with previous works (Alcoverro, 2000; Guerrini *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2011; Magaletti *et al.*, 2004). However these phenomena may be result of different mechanisms.

Claquin *et al.* (2008) highlighted a positive relationship between electron transport rate and exudate production in nutrient depleted experiments. Contrary to this, we observed a negative relationship between photosynthesis and exudate production due to DIP limitation for *Tr*.

Indeed, despite the decrease of photosynthetic efficiency, photosynthetic processes persisted, resulting in an increase of carbohydrate release through photosynthesis. Initially, these carbohydrates are stored, but, as they cannot be associated with phosphorus or used probably due to a lack of ATP, they are excreted, thus achieving an overflow process (Staats *et al.*, 2000). In addition, some authors have highlighted that carbohydrate exudates can function as a polyelectrolyte binding nutrients and therefore could play an important role in nutrient absorption when they are limited, especially under DIP limitation (Admiraal and Werner, 1983; Decho, 1990; Staats *et al.*, 2000). Fukao *et al.* (2010), and Underwood *et al.* (2004), highlighted that exudate production can vary between growth phase and stationary phase, depending on species. Here, a time effect was observed in exudate production with a production significantly higher during growth phase for each species. Associated to a growth effect, these modifications of exudate production could also have resulted from a biogeochemical change of exudates, as shown by Underwood *et al.* (2004). Finally, the considerably higher levels of extracellular material observed here could have been due, at least in part, to a phenomenon of cell lysis (Myklestad, 2000).

The lower growth rate, but the higher carbohydrates content, of cells in P_{med} and P_{low} treatments for the three species confirmed that cells presenting high growth rate (exponential phase) usually contain significantly less carbohydrates than cells growing slowly (Wang *et al.*, 2010). Some authors have shown experimentally that nitrogen or phosphorus limitation usually results in the accumulation of cellular carbohydrate for storage (Beardall *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2011). Moreover, limitation by phosphate can lead to a decrease in catabolism and utilization of store compounds, which results in an increase of this content (Guerrini *et al.*, 2000).

Investigations about dissolved carbohydrate production and carbohydrate content of marine diatoms have highlighted some differences in excretion depending on species, both in terms of quantity and nature (Fukao *et al.*, 2010; Granum *et al.*, 2002; Underwood *et al.*, 2004). Our results suggest that Tr produced more dissolved carbohydrates, and contained more carbohydrates per cell than Pg and Db. This implies that the three species showed different sensitivity to DIP limitation. These differences are of importance since they could have some repercussions on associated trophic webs. In fact, a decrease of cell production associated to an increase of dissolved carbohydrate production may promote the microbial loop (Fajon *et al.*, 1999; Guerrini *et al.*, 2000) instead of higher trophic level.

II.4.4 Interest of multi-traits studies

DIP limitation interacted differently on different response traits depending on species (Table II-7). *Tr* illustrated strong modifications of biomass, carbohydrate production, and stoichiometry, associated to a physiological change of photosynthesis, depending on DIP limitation. Whereas, the same limitation induced a structural change of photosynthetic apparatus associated to a weakest perturbation of carbohydrates and biomass production for *Pg*. Concerning *Db*, photosynthesis processes were not affected by DIP limitation, while carbohydrate production depended on DIP concentration, but to a lesser extent, indicating a lower sensitivity. All the studied traits did not evolve in the same way as Wang *et al.* (2010) showed. Indeed, our results highlight a negative relationship between photosynthesis and cellular carbohydrate content, which leads to an increase of carbohydrate content despite a decrease of photosynthetic activity. The multi-factorial approach leads to a more accurate view, and a better understanding of phytoplankton responses due to DIP limitation as suggested Duffy & Stachowicz (2006). This indicates that focusing on only one trait can lead to misinterpretation about the real consequences of DIP limitation on phytoplankton processes, and the potential repercussions on community. Moreover, this approach gives us a better understanding of physiological processes and their interactions, and allows us to highlight relevant functional responses. In fact *Tr*, *Db*, and *Pg*, showed different sensitivity to DIP limitation, with strong disturbances at multiple scales for *Tr*, while *Db* seemed to have been less affected, *Pg* showing an intermediate pattern (Table II-6) (Fig.II-4b).

Some authors already showed that some physiological processes were size dependent (Beardall *et al.*, 2009; Finkel *et al.*, 2010b; Verdy *et al.*, 2009). In this study, all three species showed some differences in their metabolic rates and storage capacity not necessarily correlated with their size. *Pg* showed the highest values of ETR_{max} and α , suggesting no relationship of these parameters with cell size. However, this kind of relationship needs to be confirmed by cell volume measurement. Finally, F_v/F_m did not vary between species as Finkel *et al.* (2001) already showed. In terms of carbohydrate content and exudates, *Tr* showed the greatest values, while *Db* and *Pg* showed the weakest, thus highlighting no relationship between exudate production, carbohydrate content and cell size. Urbany *et al.* (2005), showed that *Thalassiosira pseudonana* contains and exudates more carbohydrates than other smaller and bigger microalgal species as observed here. The three species here differed also in their nutrient storage capacity. *Tr* and *Db* were in the same range, while *Pg* showed the weakest value. Despite its high storage capacity, *Tr* was the most impacted by DIP limitation.

Although some authors have shown a positive size dependence of the storage capacity (Finkel *et al.*, 2010a; Verdy *et al.*, 2009), this relationship was not observed in this study.

There is an increasing interest in using functional diversity in community ecology studies (Cardinale *et al.*, 2011; Litchman *et al.*, 2007; Litchman *et al.*, 2010). However, a large number of these (experimental, as well as modelling), resume functional diversity to classical functional groups commonly used, such as diatoms, coccolithophorids, cyanobacteria, or others (Anderson, 2005; Behl *et al.*, 2011; Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2002). Here, although Tr and Db belong to the same “classical” functional group, i.e. diatoms, they exhibited strong physiological differences in response to DIP limitation resulting in the potential differentiation of these diatoms into two different functional groups, while Pg formed a third one.

Given the increasing occurrence of DIP limitation in European continental shelves, our results suggest potential modifications in the abundance and composition of phytoplankton community associated to potential effects on carbon fluxes in coastal ecosystems. Indeed, Tr is usually present in eastern English Channel when winter nutrient stock is high. The Tr/Db transition occurs with the decrease of phosphorus associated to a decrease of nitrates and silicates involving, in light of our results, potential changes in the magnitude and/or amplitude of these diatom blooms due to DIP limitation. Furthermore, Pg seems to be relatively unaffected by DIP limitation (Gypens *et al.*, 2007) also resulting in a potential modification of bloom timing and duration. These modifications, at low trophic levels, could have some repercussions on the associated ecosystems, e.g. through trophic webs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fabrice Lizon who provided the Fluoroprobe and the PhytoPAM material. We also thank Nicole Degros, Tiphaine Mille, and Maeva Rincé for their technical assistance and Peter Magee for professional English editing and valuable linguistic corrections (www.englisheditor.webs.com). This study forms part of the PhD thesis of Fabien Dufossé funded by a grant from the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur et le la Recherche”. This study was funded by the regional council of Nord Pas de Calais in collaboration with the research foundation on biodiversity (FRB) through the project “ICCARE”.

Table II-6 : Day chosen for each response trait included into the PCA. ETR_{max} and α are supplementary variables due to their link with chlorophyll-a specific absorption coefficient..

Variable	day		
	<i>Db</i>	<i>Pg</i>	<i>Tr</i>
Biomass	13	14	11
minimal DIP concentration	8	14	7
Yield (F_v/F_m)	13	13	11
a*	13	10	11
<i>ETR_{max}</i>	13	13	8
<i>α (alpha)</i>	13	13	11
exudates	11	14	11
carbohydrates content	11	14	11
C/Cell	11	14	11
P/cell	11	14	11

Table II-7: Synopsis effects of dissolved inorganic phosphate limitation on biomass, photosynthesis and carbohydrates exudates and content for *Thalassosira rotula* (*Tr*), *Phaeocystis globosa* (*Pg*) and *Ditylum brightwellii* (*Db*). 0: no effect, *: significant effect, **: highly significant effect.

	<i>Db</i>	<i>Pg</i>	<i>Tr</i>
Biomass	*	*	**
ETR_{max}	0	*	*
Yield	0	0	*
a*	0	*	0
Exudate production	0	0	*
Carbohydrate content	*	*	**

III. Size-dependence of interactive effects of nutrients and temperature on photosynthetic response traits of five phytoplankton species

Fabien Dufossé, Valérie Gentilhomme, Sébastien Lefebvre

En preparation pour soumission à *Marine Ecology Progress Series*

Abstract

The influence of nitrogen or phosphorus limitations at two temperatures on functional response traits related to photosynthesis, i.e. electron transport rate, cellular chlorophyll *a* and carbon content, and biomass of five phytoplankton species were investigated through laboratory experiments. The small sized species *Phaeocystis globosa* (Pg), *Hemiselmis rufescens* (Hr), *Skeletonema sp* (Ske), the midsized *Thalassiosira rotula* (Tr) and the larger species *Ditylum brightwellii* (Db) were chosen belonging to 3 phyla ranging from 40 to 6000 μm^3 in cell volume. Our experiments highlight first, a size dependence of the responses to nutrient limitation, with an increasing intensity of response with decreasing size. Secondly, our results showed the presence of interactive effects of nutrient with temperature mainly on small sized species. Taken together, these two main results highlight that size is more important than taxonomic affiliation to explain the pattern of responses of photosynthetic capacity in our experimental conditions. Indeed, the larger species (Db), displayed few responses to nutrient limitation. On the contrary the midsized species (Tr), showed a decrease of relative maximum electron transport rate (rETR_{max}) and a higher decrease (1.8-fold) of the maximum relative light use efficiency in P limited treatment compared to the Control. Moreover, biomass as proxied by cell volume were 3 to 5.6 fold lower in nutrient limited treatments compared to the Control for this species. Finally the small size group showed two patterns of nutrient temperature interactions. Pg showed increasing effect of nutrient limitation as temperature decreased on photosynthesis response traits since 10°C is a suboptimal temperature for this species. Contrariwise, Ske and Hr displayed an increasing effect of nitrogen limitation on biomass and photosynthetic response traits as temperature increased, suggesting a strong link between temperature and nitrogen dependent processes for Ske and Hr in our temperature range. This size dependence and the presence of interactive effects are of importance, taking into account the observed and expected modifications of coastal marine natural habitat because of climate change and human pressure.

Keywords: phytoplankton, size scaling, Nitrogen, Phosphorus, temperature, photosynthesis, trait-based approach

III.1 Introduction

Phytoplankton contribute almost half of earth global primary production (Field *et al.*, 1998). These organisms affect ecosystem processes through their metabolism, e.g. biogeochemical cycles, and are keystone of a large panel of trophic interactions (Falkowski *et al.*, 1998). Nutrient concentrations and temperature are considered as essential factors regulating phytoplankton growth and physiology, species composition and seasonal succession within communities.

Dissolved inorganic nitrogen (DIN) and phosphorus (DIP) are considered as main limiting nutrients for phytoplankton in coastal temperate marine ecosystems (Billen and Garnier, 2007; Tilman *et al.*, 1982; Vitousek and Howarth, 1991). Numerous studies highlighted the pivotal role of DIN and DIP on photosynthetic activity (Da Silva *et al.*, 2009; Geider *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 2013; Napoléon *et al.*, 2013; Turpin, 1991; Wykoff *et al.*, 1998) of a large number of phytoplankton taxa and phyla. DIN and DIP affect photosynthesis in different ways. DIN limitation leads to a decrease of the synthesis of nitrogenous pigments (e.g. chlorophyll *a*) and of enzymatic activity and synthesis (Da Silva *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Young and Beardall, 2003) while DIP limitation affects rather the cellular energy transduction (Liu *et al.*, 2013; Wykoff *et al.*, 1998) through, for example, the decrease of ATP synthesis (Gauthier and Turpin, 1997).

As described by Gillooly *et al.* (2001) and later by Brown *et al.* (2004) in the context of the metabolic theory of ecology, temperature plays a central role in the regulation of metabolic processes at cellular level and, *a fortiori*, temperature influences ecological processes at all level of organization. Numerous studies highlighted that temperature increase usually leads to increasing enzymatic activity, photosynthetic processes, nutrient acquisition and growth rate (Bissinger *et al.*, 2008; Claquin *et al.*, 2008; Davison, 1991; Gao *et al.*, 2000; Raven and Geider, 1988; Regaudie-de-Gioux and Duarte, 2012; Toseland *et al.*, 2013) until an optimum value of temperature which is specific and processes dependent (Claquin *et al.*, 2008; Litchman and Klausmeier, 2008).

Phytoplankton photosynthesis, nutrient uptake and use, or whether growth, are both temperature and nutrient dependent. Numerous studies focused on the responses of these processes to nutrient limitation at a given temperature or the reverse at different temperatures in nutrient replete conditions (e.g. Claquin *et al.*, 2008; Davison, 1991; Regaudie-de-Gioux

and Duarte, 2012). However, there are very few experimental studies (Peter and Sommer, 2013; Rhee and Gotham, 1981; Shatwell *et al.*, 2013) which focused on the interactive effects of nutrient limitation and temperature on these processes. In their study, Rhee and Gotham (1981) showed an interactive effect of temperature and nutrient on growth with a reinforced effect of nutrient limitation at sub-optimal temperature. Peter and Sommer (2013) demonstrated experimentally a decrease of mean cell size of natural communities as temperature increased with an interactive effect of nutrient limitation, nutrient limitation effect being larger when temperature increased. Contrary to this, there was no clear effect of the interaction between silicon concentration and temperature in the experiments conducted by Shatwell *et al.* (2013) but different responses depending on species whether considering silicon or temperature effect alone. These experiments highlighted interactive effects of temperature and nutrient concentration on phytoplankton growth, cell size or biomass production but none of them worked on upstream processes as photosynthesis.

Phytoplankton consist of a diverse polyphyletic group of microscopic photosynthetic protists, involving a high diversity of functional traits (Litchman and Klausmeier, 2008). Traits are defined as “any morphological, physiological or phenological features measurable at the species level” (Violle *et al.*, 2007). Cell size is considered as a master trait, playing a key role on nutrient acquisition and use, metabolism and growth, (Finkel *et al.*, 2010a; Hillebrand *et al.*, 1999; Hillebrand *et al.*, 2013; Litchman and Klausmeier, 2008; Marañon *et al.*, 2013; Raven, 1998). This master trait showed a large number of links with nutrients. As example, small cells are considered to be more efficient in nutrient acquisition in case of scarcity due to smaller diffusion boundary layer and higher surface to volume ratio (Ploug *et al.*, 1999; Raven, 1998). They also tend to have higher maximal growth rate (Marañon *et al.*, 2013) representing an advantage in nutrient limited condition (Kriest and Oschlies, 2007). On the other side, larger cells usually showed a higher storage capacity and a nutrient uptake rate equivalent to that of smaller cells (on a volume basis) (Marañon *et al.*, 2013) and consequently, are more competitive in nutrient unbalanced or replete conditions. Cell size and growth rate are strongly linked with, globally, a decrease of growth rate as size increases. Hillebrand *et al.* (2013) showed a decreasing N:P flexibility with increasing growth rate, even if they were not able to show any significant link between cell size and N:P flexibility. Temperature and cell size are also linked. A study on the relationship between size and temperature by Atkinson *et al.* (2003) assumed a 2.5% decrease of cell volume for each 1°C increase.

The knowledge of the state and the efficiency of photosynthetic apparatus is highly important because of their implications in microalgae functioning, production and growth. The measurement of photosynthesis (P) versus irradiance (E) is commonly used to investigate the responses of photosynthesis to nutrient limitation or temperature variation (e.g. Blache *et al.*, 2011; Claquin *et al.*, 2008; Napoléon *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2013), using several techniques. Here we used the PAM method (Pulse Amplitude Modulation) based on the active fluorescence of cells to produce the P/E curves. From P/E curves, the relative maximum electron transport rate ($rETR_{max}$), the relative maximal light utilization efficiency (α) and the light saturation parameter (E_k) can be deduced. The two first parameters give us some information about the electron fluxes which occur on PSII. To complete our understanding of the influence of environmental factors on photosynthesis the variations of pigment composition and packaging is also largely studied, through the chlorophyll *a* specific absorption coefficient. The $rETR_{max}$ and α are currently normalized to a^* to take into account the difference of pigment composition between species (MacIntyre *et al.*, 2002). However $rETR_{max}$ and α are representative of electron fluxes while a^* could be considered as a structural factor representing the photosystem structure. In order to disentangle, the effects of temperature and nutrient limitation on photosystem processes and structure the parameters deduced from the P/E curves and a^* were studied separately in this study. .

As described above, there is limited literature available on the influence of the interactive effect of temperature and nutrient limitation (e.g. Peter and Sommer, 2013; Rhee and Gotham, 1981; Shatwell *et al.*, 2013). This seems surprising considering the importance of these two factors for phytoplankton growth and physiology and, broadly, for ecosystem functioning in the context of global change. Moreover, few of the laboratory experiments which focused on the effects of several environmental factors mainly focused on growth, stoichiometry or biomass, involving a lack of knowledge on the upstream processes such as photosynthesis. While nitrogen was considered as the main limiting nutrient in coastal waters (Rees *et al.*, 1995; Vitousek and Howarth, 1991), there is a growing awareness that phosphorus may be increasingly limiting, such as, but not limited to, in NW European shelf seas (Billen and Garnier, 2007; Hernández-Fariñas *et al.*, 2013; Lefebvre *et al.*, 2011; Loebel *et al.*, 2009; McQuatters-Gollop *et al.*, 2007). On the other side, taking into account the context of climate change and the increased sea surface temperature predicted by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2007), it is obvious that many aspects of biological, physical or chemical characteristics of marine systems could be altered. It is expected that phytoplankton

communities will experience an estimated 1°C to 4°C temperature increase due to climate change (IPCC, 2007) associated to a decrease of nutrient concentrations resulting from the nutrients abatement policies conducted in coastal waters (Artioli *et al.*, 2008). We then investigated the effects of DIN and DIP limitation, temperature or their interactions on five phytoplankton species belonging to 3 phyla with different sizes ranging from 3 to 200 μm . Considering the results of Rhee and Gotham (1981) or Peter and Sommer (2013) on growth and cell size respectively, we expected an effect of the interaction between nutrient and temperature on another process such as photosynthesis. As size is considered as a master trait (Litchman and Klausmeier, 2008), size range of studied species gives us the opportunity to test the size dependence of phytoplankton responses to the nutrient limitation and temperature interactions. In order to have a broad understanding of phytoplankton responses, we focused through laboratory experiments, first on the functional traits related to photosynthesis by studying the electron transport rates, and second, on biomass and cell volume.

III.2 Material and methods

III.2.1 Species choice

The experiments were carried out using the cryptophyceae *Hemiselmis rufescens* (Hr, PLY631), the prymnesiophyceae *Phaeocystis globosa* (Pg), the centric and potentially chain-forming diatoms, *Skeletonema* sp. (Sk, PLY627), *Thalassiosira rotula* (Tr, CCAP1085/20) and *Ditylum brightwellii* (Db). Pg and Db were isolated by pipetting of coastal water of the eastern English Channel, Hr and Sk were obtained from the Plymouth Algal Culture Collection (Marine Biological association, Plymouth, UK) and Tr from the Culture Collection of Algae and Protozoa (Dunstaffnage Marine Laboratory, Scotland, UK). These strains, observed in marine temperate coastal ecosystems, were chosen because they belonged to three phylogenetic algal groups (diatoms, cryptophyceae and prymnesiophyceae) and they showed distinct size range from 3 to 200 μm (TableIII-1). We included diatoms and prymnesiophyceae due to their high contribution to total phytoplankton biomass in temperate waters. Cryptophyceae species are also interesting because few studies get interested about this group, and even if they represent a small part of total phytoplankton biomass in spring and summer, they can contribute to a relatively high part of phytoplankton biomass in fall in the English Channel (Houliez *et al.*, 2013).

Table III-1: main occurrence and growth phase (julian day), size (μm), coloniality and geometric shape (according to Hillebrand *et al.*, 1999) of *Ditylum brightwellii*, *Thalassiosira rotula*, *Skeletonema sp.*, *Hemiselmis rufescens* and *Phaeocystis globosa* observed in Eastern English Channel. Data resumed 13 years of bi-monthly observations (50°40'75N; 1°31'17E) from SOMLIT (Service d'Observation en Milieu Littoral-INSU CNRS) network

species	phylogenetic group	size	coloniality	geometric shape
<i>Ditylum brightwellii</i>	diatom	70-200	chain forming	prism on triangle
<i>Thalassiosira rotula</i>	diatom	20-40	chain forming	cylinder
<i>Skeletonema sp</i>	diatom	6-25	chain forming	cylinder + 2 half spheres
<i>Hemiselmis rufescens</i>	Cryptophyta	3-10	isolated	prolate spheroid
<i>Phaeocystis globosa</i>	Haptophyta	3-10	spherical/ lobed mucilaginous colony	sphere

III.2.2 Experimental design

Prior to the start of any experiment, each species was cultivated in 250 mL batch flasks of f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962) at 12°C and exposed to 250 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and a 12/12 light/dark photoperiod. Cultures in exponential phase were used for inoculation at the start of the experiments. Experiments were then conducted in Minitron (INFORS©) incubation chambers. Cultures were non axenic and were conducted in 35 psu artificial seawater in F/2 medium (Guillard and Ryther, 1962) without NaH_2PO_4 , H_2O and NaNO_3 . Tests to check for bacterial contamination in the cultures were performed according to the method of Porter and Feig (1980). The resulting bacterial concentration never exceeded $6.5 \cdot 10^4$ cells per liter regardless of the treatment, which excludes any significant effect on nutrient kinetics.

In order to test for the effects of dissolved inorganic phosphorus (DIP) or dissolved inorganic nitrogen (DIN) limitations on several functional response traits related to photosynthesis, each culture of microalgae were grown in duplicates in f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962) without NaH_2PO_4 , H_2O and NaNO_3 , DIN and DIP being added respectively as KNO_3 and as KH_2PO_4 to reach three different nutrient concentrations and ratios: 50 $\mu\text{mol.N.l}^{-1}$ and 1 $\mu\text{mol.P.l}^{-1}$ in the P-depleted treatment (P-lim), 2 $\mu\text{mol.N.l}^{-1}$ and 5 $\mu\text{mol.P.l}^{-1}$ in the N-depleted treatment (N-lim), and 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ N and 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ P in the Control treatment. Each experiment was done at 10°C and 14°C. Cultures were carried out in 2 L polycarbonate flasks

under an average irradiance of $110 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a 12/12 light/dark photoperiod and an orbital shaking frequency of 125 and 60 rpm for the diatoms and the flagellates (Hr and Pg) respectively. From the beginning of the experiment until the end of growth phase, cultures were conducted in batch mode and biomass (followed using *in vivo* fluorescence see below) and nutrient concentrations were followed daily. Then 200 ml were removed each day (dilution rate of 0.1 d^{-1}) and renewed by fresh medium related to each treatment, allowing to study biomass proxies and photosynthetic response traits. Samples were taken two hours after the beginning of the light period, in order to exclude the effect of diurnal patterns from one day to another.

III.2.3 Biomass proxies and growth

III.2.3.1 *Cell count and cell volume*

For the determination of cell densities, a 10 ml aliquot was removed daily fixed with Lugol's solution for each species (Menden-Deuer *et al.*, 2001), except for Pg which was fixed with glutaraldehyde (0.5% of final concentration) (Vaulot *et al.*, 1989), and then settled for at least 8 h in a counting chamber according to the Utermöhl method (Utermöhl, 1931). Abundance of each species was determined under inverted microscopy (Nikon Eclipse TE2000-S). *Phaeocystis globosa* cells embedded in colonial matrix were counted from cell volume measurements according to the method of Rousseau *et al.* (1990). Diatom and cryptophyceae counts followed the procedure described in HELCOM proceedings (HELCOM, 1988). Moreover, for each experiment, cell volume was estimated by measuring 30 cells, randomly chosen, following the formulation proposed by Hillebrandt *et al.* (1999).

III.2.3.2 *In vivo fluorescence of the Chl a*

A sample of 5 ml was removed daily from each culture, and placed in the dark for 15 minutes before analysis, in order to estimate *in vivo* fluorescence as a proxy of algal biomass using a laboratory fluorometer Trilogy® (Turner designs).

Fluorescence *in vivo* and cells count show a linear and highly significant relationship which varied between species ($N > 66$, $R^2 > 0.63$, $p < 0.009$). Fluorescence *in vivo* is then used to characterize biomass data

III.2.3.3 *Growth rate*

Growth rate ' μ ' (d^{-1}) was calculated from *in vivo* fluorescence following the equation:

$$\mu = [\ln(F_t) - \ln(F_{t-1})]/\Delta_t + D$$

With: F_t the fluorescence (relative fluorescence units) on day t , D the dilution rate (0.1 d^{-1}), and Δ_t the time difference (day) between measurements.

III.2.4 Dissolved inorganic nutrients

Nutrients were sampled daily for each treatment before the addition of fresh medium, and were then frozen (-32°C), except for ammonium (Koroleff, 1969), until analysis. Concentrations of Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN, as the sum of $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$), Dissolved Inorganic Phosphate (DIP), and Dissolved Silicate (DSi) were measured on an Alliance Integral Futura Autoanalyser II®, following Aminot and Kerouel (2004). As expected, no DSi limitation was observed during the course of experiments, the minimum concentration observed being higher than $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

III.2.5 Particulate organic carbon analysis

An elemental analyzer (CE instrument Fisons Na 2100) was used to determine the particulate organic Carbon (POC) content of phytoplankton. A 50 ml sample was taken three times during the experiments and immediately filtered onto precombusted Whatman GF/F glass fiber filters under vacuum controlled conditions. POC was measured in an elemental analyzer (CE instrument Fisons Na 2100) using acetanilide as standard, and ultra-pure O_2 and helium as combustive and carrier gas, respectively. Prior to analyses, filters were dried and exposed to HCl vapor in glass desiccators for decarbonation for four hours and then 24 hours free of HCl vapor.

III.2.6 Chlorophyll *a*

The chlorophyll *a* concentration (mg.l^{-1}) was measured following the non-acidification method described by Welschmeyer (1994). A 50 ml sample was taken three times during the experiments and filtered onto Whatman GF/F glass fiber filter. Filters were then placed in the

dark and frozen (-80°C) until analysis. Chlorophyll *a* extraction was done using 90% acetone solution during 12 hours at 6°C. After a 5 min. 3000 rpm centrifugation the supernatant was analyzed using a laboratory fluorometer Trilogy® (Turner designs) equipped with the adequate module (Chl a N/A). A 100% chlorophyll *a* (from spinach) standard was used for the fluorometer calibration.

III.2.7 Photosynthetic response traits

At least three time repeated measurements were done in each replicate. First samples were taken two days after the beginning of the dilution and then measurements were done every two days.

Photosynthetic activity of phytoplankton was obtained by measuring sequential steady state light curves (SSLC) using pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry (Water-PAM, Heinz Walz GmbH®, Effeltrich, Germany). Before the start of the SSLC an aliquot of the culture (3 ml) was incubated in the dark for 15 min. The sample was then dispensed into a 10 mm³ quartz glass cuvette and inserted into the PAM fluorometer. The maximum quantum yield of photosystems II (F_v/F_m) was obtained by applying a saturating flash and then calculated by dividing the variable fluorescence (F_v), which corresponds to the difference between maximal fluorescence after dark acclimation (F_m) and the minimum fluorescence in the dark (F_0), by F_m . Sequential steady state light curves were generated by applying a sequence of 8 increasing actinic irradiance selected from 12 preset discrete increments ranging from 22 to 1384 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The duration of irradiance steps was set between 60s and 120s in order to reach a stable signal of fluorescence between two saturating flashes. These curves provided detailed information on the saturation characteristics of the electron transport chain together with the overall photosynthetic performance of the microalgae.

The relative electron transport rate ($rETR$ in $\mu\text{mol e}^{-}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) was calculated at each level of irradiance as the product of effective quantum yield of PSII ($\Delta F/F_m'$), the delivered irradiance E ($\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), and the mathematical factor of 0.5 which corresponds to the proportion of photosystems II on total photosystems.

$$rETR = [(\Delta F)/F_m'] E 0.5$$

ΔF was determined by applying a saturating flash, and corresponds to the difference between the maximum fluorescence in actinic light during each irradiance step of the SSLCs (F_m') and the stable fluorescence before the saturating flash (F_s). ETR vs. light curves were fitted using the model of Webb *et al.* (1974) to estimate the relative maximal light utilization efficiency (α) and the maximum relative electron transport rate ($rETR_{max}$) which corresponded to the initial slope and the asymptote of the curve, respectively. From α and $rETR_{max}$, the light saturation parameter (E_k) can be calculated corresponding to the ratio $rETR_{max}/\alpha$. Curve fitting was achieved using Matlab R2008b. $rETR_{max}$ is representative of the electron fluxes occurring at PSII level and does not take into account any structural component as cellular content and cell volume. In order to consider this structural component ETR_{max}^{cell} ($\mu\text{mol e}^- \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$) was calculated as follows:

$$ETR_{max}^{cell} = \frac{rETR_{max} \times [Chl\ a] \times a^*}{cell}$$

[Chl *a*] correspond to the chlorophyll *a* concentration ($\text{mg Chl } a \cdot \text{l}^{-1}$), a^* is the chlorophyll *a* specific absorption (in $\text{m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) and cell correspond to the number of cells per liter.

The mean chlorophyll *a* specific absorption coefficient (a^* in $\text{m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) was determined following the method of Mitchell *et al.* (2003) using a 50 ml samples filtered through 25 mm Whatman GF/F filters. Filters were placed on an integrating sphere (ISR-240A, Shimadzu) using a clean filter wetted with ultra-filtered water as reference. Absorption spectra of filtered and de-pigmented particles were recorded between 400 and 800 nm with a 2 nm step using a UV-2450 Shimadzu[®] dual beam spectrophotometer. De-pigmentation of filtered particles was conducted following Tassan & Ferrari (1998) with NaClO and 0.2% of active chlorine. The coefficient a^* was then calculated by subtracting the mean de-pigmented particle absorption spectrum to the mean total filtered particles absorption spectrum, and then normalized to the chlorophyll *a* concentration.

III.2.8 Statistical analysis

General linear models (GLM) were applied (Minitab15[®]) to test whether nutrient treatments temperature (and their interaction) and days of experiment impact the algal biomass proxies (*in vivo* fluorescence) photosynthetic parameters ($rETR_{max}$, α), the mean chlorophyll-*a* specific absorption coefficient (a^*), the maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m), the cell

volume and the Carbon:Chl *a* ratios (C:Chl *a*). For all measured variables except *a** the factor days of experiment was not significant showing stable condition for each treatment. For the sake of simplicity, *a** was averaged for each replicates and does not take into account the “time effect” anymore. In addition, a Tukey post-hoc test was applied to range the means of the variable responses according to nutrient treatments, temperature and interaction between these factors. Normality of residuals and homocedasticity were checked, and when it was necessary, data were transformed in order to apply GLM.

Redundancy analysis (RDA) was used to identify the relationship between explanatory variables and explained variables (cell volume, biomass, $rETR_{max}$, α , E_k , yield, *a**, C.cell⁻¹ and C.Chl *a*⁻¹ ratios) which were centred and standardized. Explanatory variables included in the model were selected using a stepwise selection and testing their significance at 5%-level. The procedure was applied until the additional effect of the variable with the highest extra fit was not significant (*p* value >5%). At each step, the variable with the highest extra fit was included in the model. Nutrient treatments (three modalities: N-lim: 1, P-lim: 2 and Control: 3), temperature (two modalities: 10: 1 and 14: 2) and species (five modalities Db: 1, Tr: 2, Ske: 3, Hr: 4 and Pg: 5) were chosen as explanatory variables in accordance with the step forward selection performed on our dataset. RDA extracted synthetic gradients, represented as ordination axes corresponding to a direction which is maximally related to a linear combination of the explanatory variables (Legendre & Legendre; 1998). RDA was performed with R software using Vegan package.

Linear regressions were done in order to characterise the relationship between $rETR_{max}$ and E_k . The regressions were done for each species and each treatment (nutrient + temperature) separately. Then analyses of covariance (ANCOVA) were performed to illustrate if temperature or nutrient treatment influenced the slope and the intercept of linear regressions for each treatment.

The relationships between $rETR_{max}$, ETR_{max}^{cell} and *a** depending on cell volume were also modelled through linear regressions without discriminating species and treatment in order to highlight differences in response magnitude of our species according to their cell volume, and consequently their size. In addition, residuals from regression were extracted, clustered following 2 groups (small size < 3000 μm^3 and large size > 3000 μm^3), and their absolute values were compared through a one way ANOVA to determine the distribution of the residuals according to group.

Lastly, independent samples T-test was applied in order to compare the growth rate during growth phase in batch mode (before limitation) within each species depending on temperature

III.3 Results

A first approach of the results was done using redundancy analysis (RDA) to highlight main trends within the data set. Then, a closer look on response traits was done through the prism of RDA general results.

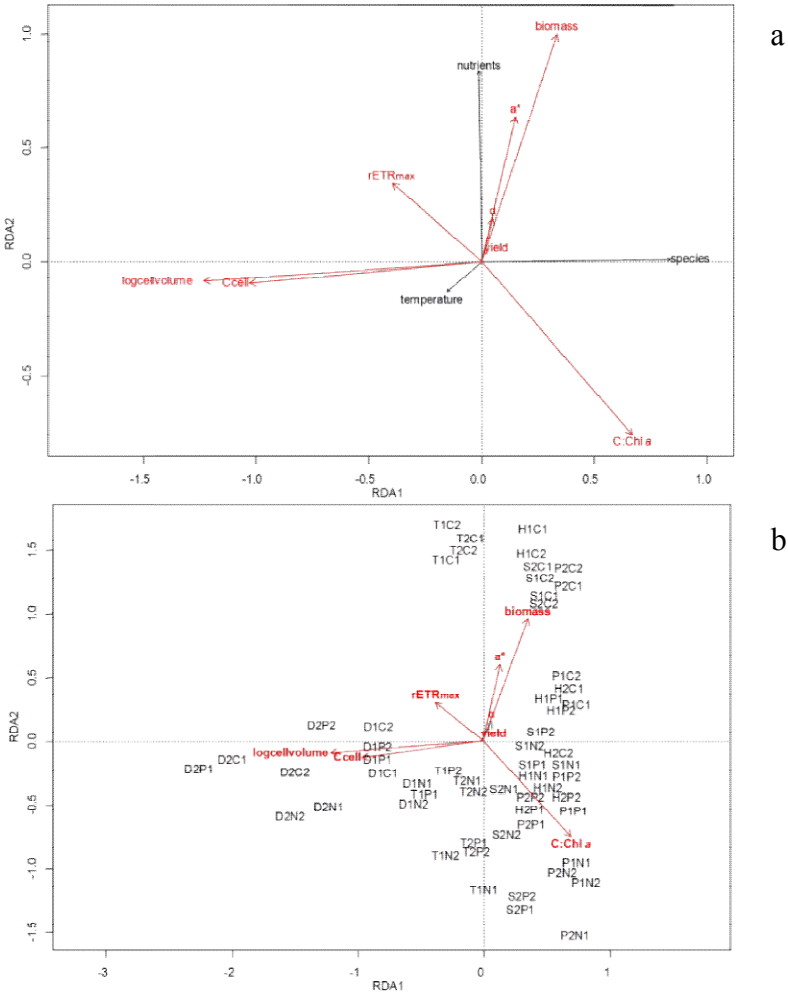
III.3.1 General patterns as revealed by redundancy analysis

RDA displayed 37.7 % of the total variance (F-ratio=10.90; $P < 0.005$) using three axes which accounted for 91.38% of the explained variance using a stepwise procedure (axis 1 = 55.02 %, axis 2= 26.06 % and axis 3= 10.3 %). The explanatory variables, species (F-ratio = 19.88; $P < 0.005$), nutrient (F-ratio = 9.07; $P < 0.005$), and temperature (F-ratio = 3.7; $P < 0.03$) constrained significantly the three axes of the RDA (Fig.III-1). Noticeably, all the interaction terms (temperature \times nutrient, species \times temperature, species \times nutrient and species \times nutrient \times temperature) did not contribute significantly to the model (F-ratio < 1.56 ; $P > 0.1$) meaning that response traits did evolve the same way considering these explained variables or that interaction terms were not significant for all explanatory variables and/or species. Consequently, a linear combination of only species, nutrient and temperature was used to constrain ordination of the axes.

Species was correlated with the first ordination axis (Fig.III-1). By projection of the explained variables on the species vector, one can see that larger cells (as expressed in logarithmic cell volume) have higher cellular carbon quota and to a lesser extent higher relative maximum electron transport rate ($rETR_{max}$) and lower carbon to Chl *a* ratio (C:Chl *a*). The other explained variables were not discriminated by first axis.

Biomass, chlorophyll *a* specific absorption coefficient (a^*) and to a lower extent $rETR_{max}$ and C:Chl *a*, were closely related to the second axis (Fig.III-1), the correlation being positive for the first three ones and negative for the last explained variables. As for the explained variables along the biplot axis 1 axis 2, $rETR_{max}$ and C:Chl *a* were negatively correlated. It is worth noticing that $rETR_{max}$ and C:Chl *a* were equally explained by axis 1 and 2 suspecting an interaction between species and nutrient for this explained variables.

Finally, temperature was correlated with the third axis (Fig.III-1). Noticeably, a^* , the maximum light use efficiency (α) and to a lesser extent C:Chl a ratios were negatively related to this third axis meaning that they are higher at lower temperature. It should be undermined that α , biomass and a^* were not explained by species factor and consequently were not correlated to cell volume. Also, maximum quantum yield was not explained by any of the first three dimensions (and any of the explanatory variables).



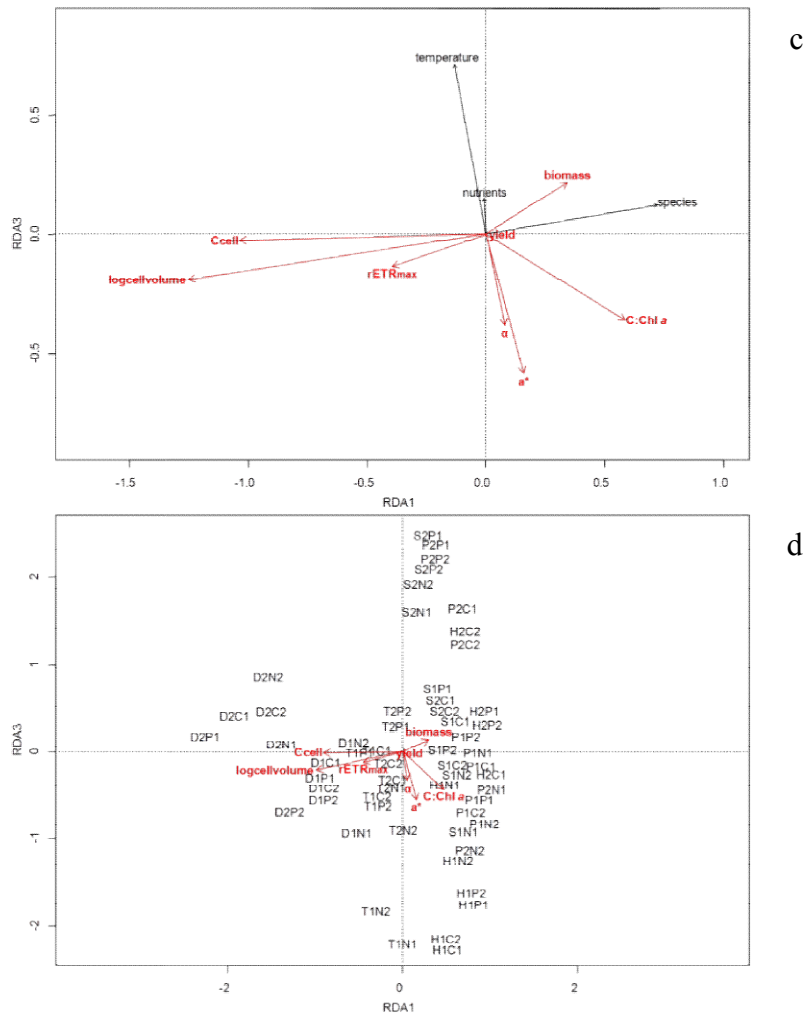


Fig. III-1 : ordination biplot showing the explained variables (grey arrows) in relation to temperature, species and nutrient treatments (explanatory variables, black arrows) for the two first (a) and the first and third (c) axes. As explained variables: *a**: the chlorophyll *a* specific absorption coefficient, biomass: proxy of biomass through fluorescence *in vivo*, α : relative maximum light use efficiency, yield: maximum effective quantum yield of PSII, *rETR*_{max}: relative maximum electron transport rate, C:Chl *a*: Carbon/Chl *a* ratio, Ccell: Carbon per cell and logcellvolume: logarithm of cell volume. Sample ordination biplot for the two first (b) and the first and third (d) axes. Samples are designated following this scheme: “species” (D for *Db*, T for *Tr*, S for *Sk*, P for *Pg* and H for *Hr*), “temperature” (1 for 10°C and 2 for 14°C) “treatment” (N for N-lim, P for P-lim and C for Control) “replicates” (1 and 2).

The biplot rule also applied to samples (Fig.III-1). For axis 1 vs axis 2 biplot, a clear discrimination occurred between the phytoplankton species along the species vector that was correlated to the first axis. Three groups were identifiable considering their cell volume and carbon quota namely *Db*, *Tr* and the three other species (*Ske*, *Hr* and *Pg*) from the larger to the smaller. These three groups were not similarly structured along the second axis i.e. the nutrient factor (which was also best explained by biomass, *a** and α). For *Db*, there was a slight variability along the second axis compared to the other species which spread all along. For the latter ones (all except *Db*), control treatment of nutrient presented higher biomass and

a* compared to nutrient limited treatments which were not distinguishable each other. This means that species (except Db) did not react in the same way facing nitrogen or phosphorus limitation. Finally, $rETR_{max}$ and C:Chl *a* were highly negatively correlated and equally related to axis 1 and 2, offering another perspective. By projection of samples on the $rETR_{max}$ explained variables vector, one can see that control treatments (and bigger cells within nutrient treatments) presented higher $rETR_{max}$ and lower C:Chl *a* ratios. Finally, for axis 3 which is best explained by temperature, the three species groups identified did not spread exactly the same than for axis 2. *Tr* was less variable than the smaller cells (*Ske*, *Hr*, *Pg*) along the temperature factor (axis 3) than for the nutrient factor (axis 2). Generally, a* or alpha were lower at high temperature and the variability was especially strong for small species.

III.3.2 Co-variation of photosynthetic parameters $rETR_{max}$ vs E_k

A significant positive linear relationship between the maximum relative electron transport rate ($rETR_{max}$) and the light saturation parameter (E_k) was revealed. Analysis of covariance (ANCOVA) were done and highlighted that slope and intercept varied according to species. However, the trend was always the same with an increase of E_k with $rETR_{max}$ inducing a covariation of these parameters whatever the temperature and nutrient treatment ($R^2 > 0.49$, $p < 0.05$). E_k displayed a strong variability depending on species and varied between 177 $\mu\text{mol} \cdot \text{photons} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ and 501 $\mu\text{mol} \cdot \text{photons} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for *Ske* and *Tr* respectively. E_k also varied depending on nutrient treatment with, as an example a 2 fold decrease in P-lim compared to Control for *Tr*. Taking into account the high variability of this parameter and the covariation with $rETR_{max}$, E_k is then no more detailed in the rest of the result section.

III.3.3 Closer look on response traits

In accordance with the RDA results, nutrient, temperature and their potential interaction will be discussed along three phytoplankton groups (*Db*, *Tr*, and smaller cells) focusing first on the photosynthetic parameters and then on the other variables (biomass and C:Chl *a* ratios C:cell, cell volume....).

Db (large species)

Nutrient effect alone. Firstly, there was no effect of DIN or DIP on $rETR_{max}$ (GLM, $p=0.25$) for large cells (Db) (Fig.III-2a). Contrary to this, the maximum light use efficiency (α) showed a 1.2-fold decrease in P-lim compared to the two other nutrient treatment at 10°C (TableIII-2). A slight significant increase (1.1-fold) of the maximum effective quantum yield (F_v/F_m) was observed in nutrient limited treatments compared to Control, probably reflecting a lower intensity of non-photochemical quenching in the dark (TableIII-2). In parallel, a lower chlorophyll *a* specific absorption coefficient (a^*) in N-lim ($1.17 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) was observed compared to Control ($1.64 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) while in P-lim ($1.82 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) an increase of a^* was observed, resulting from a package effect. Finally, a significant increase of the carbon per cell in the P-lim treatment at 10°C ($4.73 \text{ ng C} \cdot \text{cell}^{-1}$) and 14°C ($6.21 \text{ ng C} \cdot \text{cell}^{-1}$) was observed compared to the values in Control, namely $2.20 \text{ ng C} \cdot \text{cell}^{-1}$ and $4.60 \text{ ng C} \cdot \text{cell}^{-1}$ at 10°C and 14°C respectively. The maximum biomass (from *in vivo* fluorescence) reached during the experiments was lower in nutrient limited treatments compared to Control (Tukey, $p<0.01$) with up to 2.6 fold decrease depending on limited nutrient (Fig.III-4a). Despite some nutrient effects on photosynthetic capacity, a^* , C:cell and biomass production for this large species, it is important to note that the response intensity was minor compared to the other groups.

Temperature effect alone. Albeit the other species, the maximum growth rate of Db was not different along with temperature (Table III-3) while nutrient did not have any effect on this variable. The carbon per cell (Fig.III-3b), $rETR_{max}$ (Fig.III-2a) and F_v/F_m (Table III-2) were significantly and positively linked to temperature with mean values 1.8-fold, 1.2-fold and 1.02-fold higher at 14°C for carbon per cell, $rETR_{max}$ and yield respectively.

Interactive effects of nutrient and temperature. There was an interactive effect of nutrient and temperature on cell volume for the larger species with cell volumes 1.6-fold higher in nitrogen limited treatment at 14°C compared to Control (Tukey, $p<0.01$) while they showed no difference depending on nutrient treatment at 10°C with the control treatment (Fig.III-5). Concerning biomass as proxied by the total cell volume, value of the P-lim treatment was 1.7-fold lower than control and N-lim at 10°C while it was 1.6-fold higher than control and no different than N-lim treatment at 14°C (Fig.III-4b). A significant 3.4-fold at 10°C and 1.6-fold at 14°C decrease of the Chl *a* content was observed in N-lim compared to the Control (Fig.III-

3a). On the contrary to rETR_{max}, ETR_{maxcell} showed a five-fold decrease in N-lim at 10°C due to a concomitant decrease of the Chl *a* content and of α *

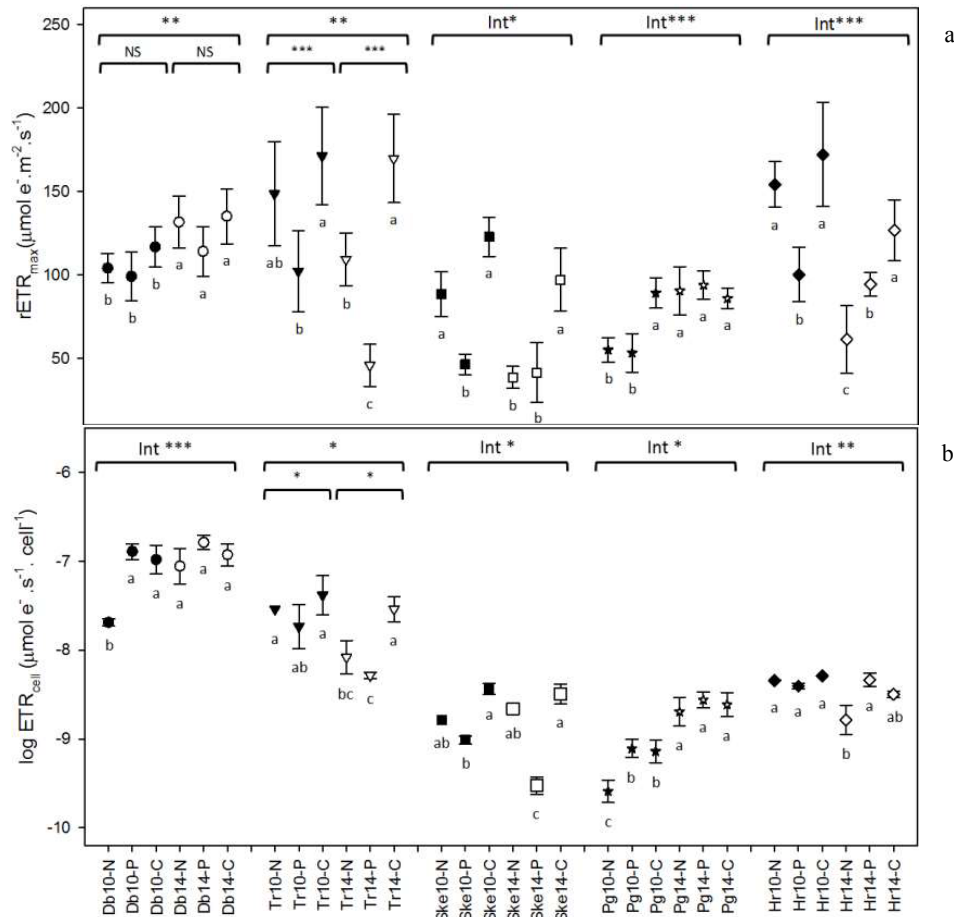


Fig. III-2: temperature (upper bracket), treatment (two lowers brackets) or their interaction (Int) effects on the average maximum relative electron transport rate (rETR_{max}; Fig.a) and logarithmic ETR_{cell}^{max} (Fig.b) for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited (“species”_N), P-limited (“species”_P) and Control (“species”_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at P<0.05). Significant General Linear Model results are indicated by * for p<0.05, ** for p<0.01 and *** for p<0.001. NS Not significant. Bars denote standard deviation.

Tr (midsize species)

Nutrient effect alone. Contrary to the larger, rETR_{max} was significantly negatively affected by DIP limitation for *Tr* compared to Control (Tukey, p<0.001). Furthermore, there was a 1.7 and 3.7-fold decrease of α in phosphorus limited treatment (P-lim) compared to Control at 10°C and 14°C respectively, higher than the one observed for *Db* (Table III-2). A significant 1.6-fold (10°C) and 2.4-fold (14°C) decrease of Chl *a* content was observed in N-lim treatment compared to Control (Tukey, p<0.01) (Fig.III-3a). As observed previously for the larger species, the maximum biomass reached during the experiments decrease in nutrient

limited treatments compared to the Control for Tr but more significantly with observed decrease up to 84-fold (Fig.III-4a). Moreover, there was an increase of cell volume in P-lim 14°C with volume 10% higher compared to Control and a 15% and 25% decrease in N-lim for 10°C and 14°C respectively compared to Control (Tukey, $p < 0.05$) (Fig.III-5).

Temperature effect alone. Tr showed the opposite pattern than the larger species concerning rETRmax with a mean 1.6-fold decrease of the values as temperature increase in nutrient limited treatments (Fig.III-2a). Besides, the maximum biomass reached through the experiment increased with temperature for Tr in the nutrient limited treatments only, mean values at 14°C being 50% higher than those measured at 10°C while control stayed stable (no significant interactions however; Fig.III-4a). The Chl a content decreased significantly while temperature increased (Fig.III-3a). Finally, there was an increase of the maximum growth rate with 1.7-fold higher value at 14°C.

Interactive effects of nutrient and temperature. Concerning mid-sized species there was an interaction between temperature and nutrient on a^* and Fv/Fm. A higher value of a^* was observed in Control ($2.40 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl a}^{-1}$) compared to N-lim ($2.14 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl a}^{-1}$) and P-lim ($1.83 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl a}^{-1}$) at 10°C. Lastly, a 1.2-fold decrease of Fv/Fm was observed in P-lim at 10°C compared to Control (Table III-2) (Tukey, $p = 0.016$). There was an increase of the carbon content in nutrient limited treatments compared to control but with N-lim being higher than P-Lim at 10°C and the reverse at 14°C giving a significant interaction (Fig.III-3b). Finally, biomass (as proxied by the total cell volume) was significantly up to 5-fold lower in nutrient limited treatments compared to control, the lowest being either the N-Lim or P-lim treatments depending on temperature giving a significant interaction (Fig.III-4b).

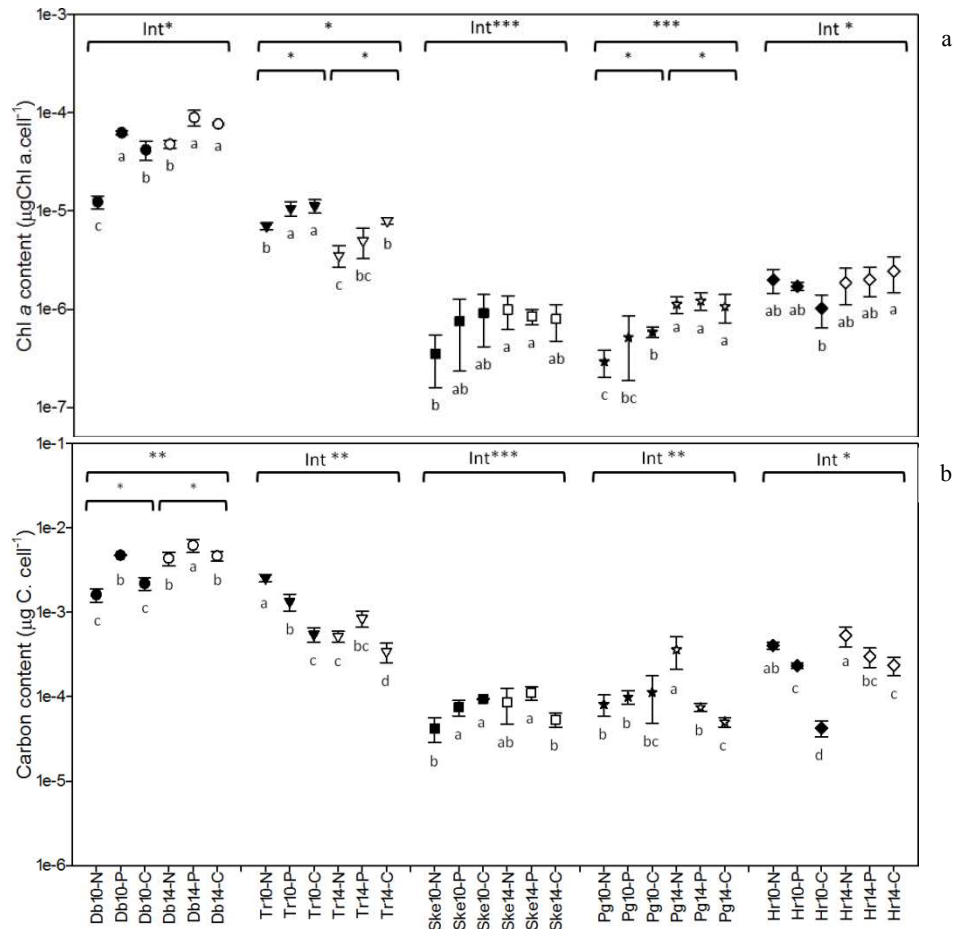


Fig. III-3: temperature (upper bracket), treatment (two lowers brackets) or their interaction (Int) effects on the average Carbon:cell ($\mu\text{C}\cdot\text{cell}^{-1}$) and Chl *a*:cell ($\mu\text{Chl } a\cdot\text{cell}^{-1}$) ratios for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited ("species"_N), P-limited ("species"_P) and Control ("species"_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$). Significant General Linear Model results are indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. NS Not significant. Bars denote standard error. Note those ordinate axes are Log-transformed.

Small cells group

Within smaller cells (namely *Ske*, *Pg* and *Hr*), effects of nitrogen and phosphorus limitations are generally stronger and, contrary to the larger species (*Db* and *Tr*), largely resulted from interactive effects of nutrient and temperature, thus leading to different responses depending on treatment and species. Patterns were different for *Ske* and *Hr* compared to *Pg*, reason why there are split into two groups below.

Pg was the only species presenting nutrient or temperature effect alone (except μ_{max} which increased significantly with temperature for all the small sized species (Table III-3)). There was a strong significant nutrient effect alone on biomass (as proxied by *in vivo* fluorescence)

for Pg with 5 and 30 fold lower values in N-lim than in Control at the two levels of temperature, P-lim being intermediate (Fig.III-4a) (Tukey, $p < 0.001$). The Chl *a* content was 2-fold lower in N-lim compared to Control at 10°C (Fig.III-3a). Finally, temperature influenced α and the Chl *a* content for Pg with higher values (1.1-fold and 2.4-fold respectively) as temperature increased (Table III-2).

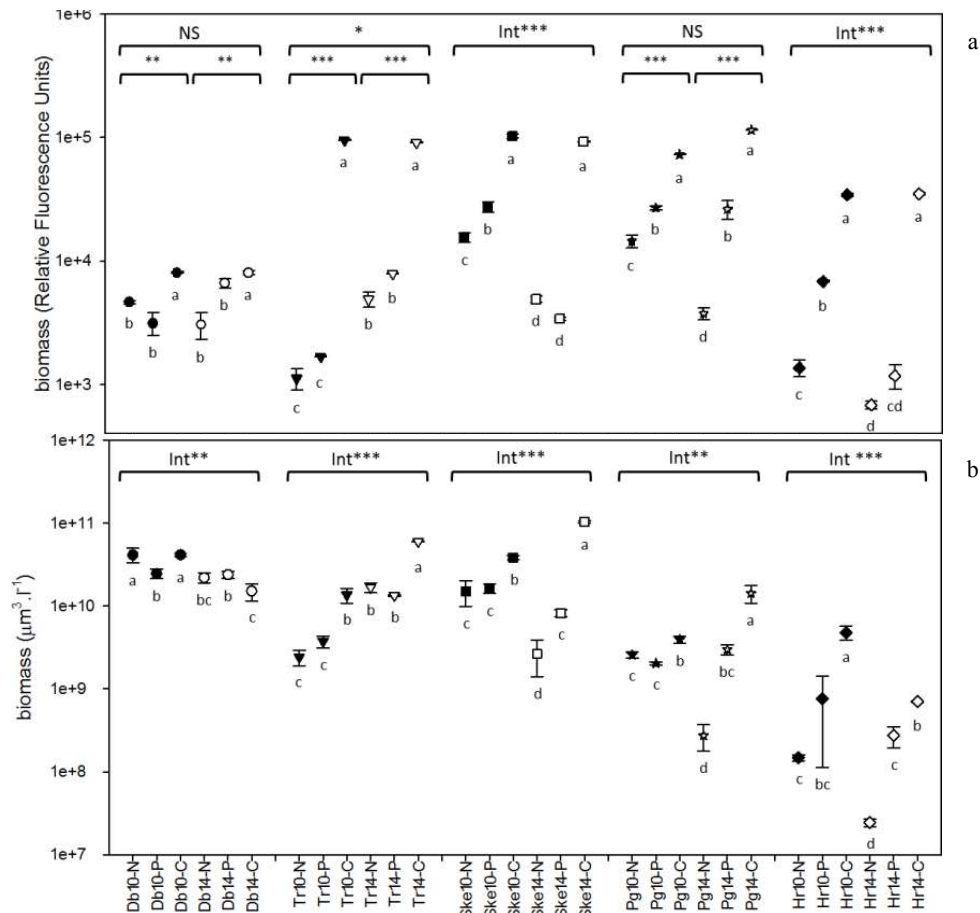


Fig. III-4: temperature (upper bracket), treatment (two lower brackets) or their interaction (Int) effects on the average maximum biomass from in vivo fluorescence (Fig.a) and proxies as cell volume (Fig.b) reached during the experiments for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited (“species”_N), P-limited (“species”_P) and Control (“species”_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$). Significant General Linear Model results are indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. NS Not significant. Note those ordinate axes are Log-transformed. Bars denote standard error.

Interactive effects of nutrient and temperature for Pg. These interactive effects lead to decrease of the overall photosynthetic capacity ($rETR_{\text{max}}$, α , and $ETR_{\text{max}}^{\text{cell}}$) at 10°C for *Pg*, while there was no more effect of nutrient limitation at 14°C (Fig.III-2). Indeed, there was a 1.6-fold and a 1.1-fold significant decrease of $rETR_{\text{max}}$ (Fig.III-2a) and F_v/F_m (Tukey, $p < 0.001$) associated to a marginally significant effect on α (Tukey, $p < 0.1$) in nutrient limited treatment only at 10°C (Table III-2). The carbon content was 7.2 and 1.5-fold higher in N-lim

and P-lim at 14°C compared to the control (Tukey, $p < 0.01$) (Fig.III-3b). The biomass (as proxied by the total cell volume) did not differ between treatment at 10°C but was significantly 52.2 and 4.8-fold lower in N-lim and P-lim compared to Control at 14°C (Fig.III-4b). Finally, no significant effect was observed for a^* as well as cell volume.

Interactive effects of nutrient and temperature for Ske and Hr. Contrary to Pg, Ske and Hr responded to the interactive effect of nutrient and temperature with a stronger effect of nutrient limited treatments in general as temperature increased, bearing in mind that they did not react necessarily the same for each trait. A highly significant decrease of $rETR_{max}$ (2.5-fold for Ske and up to 1.7-fold for Hr) was observed in P-lim, whatever the temperature, and a 2.6-fold decrease in N-lim at 14°C for both species (Fig.III-2) (Tukey, $p < 0.001$). The same trend as the one obtained for $rETR_{max}$ was observed for α but not as clearer (Table III-2) (Tukey, $p < 0.08$). There were strong interactive effects of nutrient and temperature on F_v/F_m (GLM, $p < 0.001$) which showed a different pattern for Ske and Hr. There was a 1.03 and 1.3-fold decrease of F_v/F_m in N-lim, at 10°C and 14°C respectively, and values 1.1-fold lower in P-lim at 14°C for Ske while Hr showed a decrease of F_v/F_m in P-lim (1.2-fold) and N-lim (1.3-fold) at 10°C and 14°C respectively. There was also an interactive effect of nutrient and temperature on a^* with lower values 2.7 and 4.2 fold lower, in N-lim and P-lim respectively, compared to Control at 14°C for Ske while Hr showed a 1.4-fold decreased value in N-lim treatment at 10°C and a 1.5-fold higher value in P-lim at 14°C compared to the Control (Table III-2). There was no significant effect of nutrient treatment on Chl *a*:cell despite the interaction for both species (Fig.III-3a). A 2.2-fold decrease in N-lim at 10°C and a 2.1-fold increase of carbon content were observed in P-lim at 14°C for Ske. On the other side, Hr showed a 9.5 and 5.5-fold increase of carbon content compared to Control at 10°C and a 2.2-fold increase of this content in N-lim at 14°C (Tukey, $p < 0.05$). As outlined here, Hr and Ske showed strong variations of their photosynthetic parameters due to the interactive effect of nutrient and temperature. The observed interactive effect observed for Ske and Hr led to a complex pattern of responses compared to those observed for the other species. This results from the different responses to nutrient and temperature of variables related to structure namely, a^* , carbon, Chl *a* content or cell volume on one side and related to electron fluxes on the other side.

Regarding maximum biomass, from *in vivo* fluorescence as well as cell volume, there were interactive effects of nutrient and temperature for Hr and Ske, which showed the same responses. Minimum values were observed in N-lim at 10°C, P-lim being intermediate while

values in Control were identical at 14°C (Fig.III-4a) (GLM, $p < 0.001$). Finally, cell volumes showed a 2.7-fold increase in P-lim treatment compared to Control for Ske associated to a 1.6-fold decrease in Control at 14°C compared to 10°C for Ske and Hr (Fig.III-5).

Table III-2: mean values (\pm standard error) of the maximum effective quantum yield of PSII (F_v/F_m , dimensionless), mean values of the maximum light use efficiency (α , $\mu\text{mol e}^- \cdot \mu\text{mol photons}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and chlorophyll *a* specific absorption coefficient (a^* , $\times 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) at the end of the experiments in N-lim, P-lim and Control treatments at 10°C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$).

		N-lim		P-lim		Control	
		10°C	14°C	10°C	14°C	10°C	14°C
<i>Ditylum brightwellii</i>	a^*	1.17 \pm 0.02 ^c	1.40 \pm 0.02 ^c	1.82 \pm 0.06 ^a	2.18 \pm 0.31 ^a	1.64 \pm 0.38 ^{ab}	1.50 \pm 0.12 ^b
	F_v/F_m	0.60 \pm 0.01 ^a	0.62 \pm 0.02 ^a	0.61 \pm 0.01 ^a	0.61 \pm 0.03 ^a	0.57 \pm 0.02 ^b	0.59 \pm 0.03 ^b
	α	0.33 \pm 0.03 ^a	0.33 \pm 0.04 ^a	0.26 \pm 0.03 ^b	0.28 \pm 0.05 ^a	0.31 \pm 0.04 ^a	0.29 \pm 0.05 ^a
<i>Thalassiosira rotula</i>	a^*	2.14 \pm 0.01 ^b	2.54 \pm 0.10 ^a	1.83 \pm 0.02 ^c	2.49 \pm 0.16 ^a	2.39 \pm 0.17 ^{ab}	2.60 \pm 0.02 ^a
	F_v/F_m	0.69 \pm 0.05 ^{ab}	0.62 \pm 0.02 ^{cd}	0.59 \pm 0.04 ^d	0.63 \pm 0.01 ^{bcd}	0.71 \pm 0.05 ^{ab}	0.66 \pm 0.04 ^{abc}
	α	0.31 \pm 0.03 ^a	0.32 \pm 0.04 ^a	0.24 \pm 0.04 ^b	0.19 \pm 0.02 ^b	0.39 \pm 0.03 ^a	0.34 \pm 0.03 ^a
<i>Skeletonema sp.</i>	a^*	2.20 \pm 0.22 ^b	0.97 \pm 0.43 ^c	2.36 \pm 0.43 ^b	0.64 \pm 0.00 ^c	2.23 \pm 0.26 ^b	2.70 \pm 0.14 ^a
	F_v/F_m	0.65 \pm 0.01 ^b	0.53 \pm 0.02 ^c	0.66 \pm 0.01 ^{ab}	0.62 \pm 0.02 ^b	0.67 \pm 0.00 ^a	0.67 \pm 0.00 ^a
	α	0.33 \pm 0.02 ^a	0.13 \pm 0.05 ^c	0.26 \pm 0.03 ^b	0.21 \pm 0.02 ^b	0.37 \pm 0.01 ^a	0.35 \pm 0.03 ^a
<i>Phaeocystis globosa</i>	a^*	1.70 \pm 0.33 ^{NS}	1.97 \pm 0.67 ^{NS}	2.18 \pm 0.22 ^{NS}	2.07 \pm 0.91 ^{NS}	2.27 \pm 0.17 ^{NS}	2.51 \pm 0.48 ^{NS}
	F_v/F_m	0.57 \pm 0.02 ^b	0.68 \pm 0.07 ^a	0.59 \pm 0.03 ^b	0.69 \pm 0.06 ^a	0.65 \pm 0.01 ^a	0.67 \pm 0.03 ^a
	α	0.26 \pm 0.02 ^b	0.29 \pm 0.04 ^{ab}	0.28 \pm 0.02 ^b	0.28 \pm 0.03 ^{ab}	0.30 \pm 0.03 ^{ab}	0.35 \pm 0.03 ^a
<i>Hemiselmis rufescens</i>	a^*	1.94 \pm 0.20 ^b	1.40 \pm 0.02 ^c	2.91 \pm 0.03 ^a	2.18 \pm 0.31 ^b	2.82 \pm 0.08 ^a	1.50 \pm 0.12 ^c
	F_v/F_m	0.71 \pm 0.02 ^a	0.51 \pm 0.03 ^d	0.64 \pm 0.03 ^{bc}	0.69 \pm 0.02 ^{ab}	0.74 \pm 0.05 ^a	0.64 \pm 0.00 ^c
	α	0.41 \pm 0.03 ^{ab}	0.25 \pm 0.05 ^c	0.39 \pm 0.02 ^b	0.34 \pm 0.04 ^b	0.47 \pm 0.03 ^a	0.39 \pm 0.01 ^a

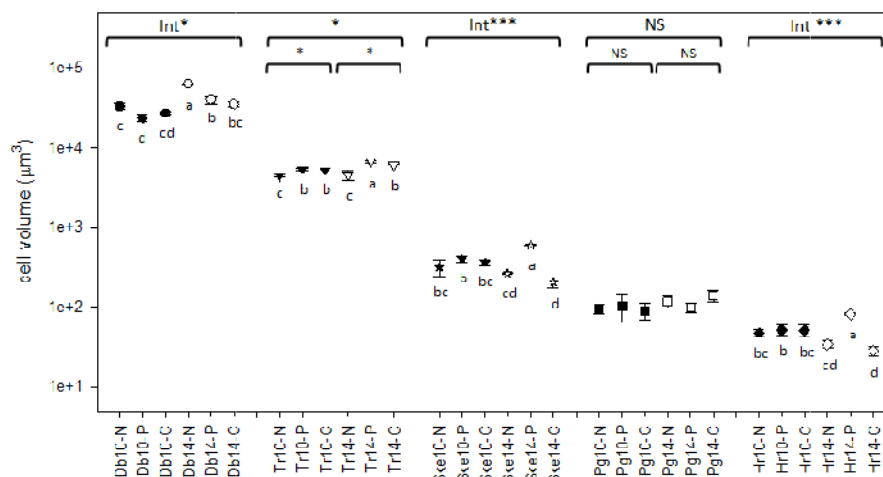


Fig. III-5: Temperature (upper bracket), treatment (two lower brackets) or their interaction (Int) effects on the average cell volume for *Db*, *Tr*, *Sk*, *Hr* and *Pg* in N-limited (“species”_N), P-limited (“species”_P) and Control (“species”_C) treatments at 10° C and 14°C. For each species, means not sharing a common superscript are significantly different (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$). Significant General Linear Model results are indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. NS Not significant. Note that ordinate axis is Log-transformed. Bars denote standard error.

Table III-3: maximum relative growth rate (day^{-1}) depending on species and temperature. P value indicates the significance of the growth rate difference according to temperature and N the number of measured growth rates used for the analysis.

	temperature	growth rate	p value	N
<i>Db</i>	10	0.40 \pm (0.17)	0.9	20
	14	0.41 \pm (0.25)		19
<i>Tr</i>	10	0.33 \pm (0.19)	0.001	26
	14	0.56 \pm (0.21)		27
<i>Sk</i>	10	0.55 \pm (0.26)	0.035	33
	14	0.71 \pm (0.28)		28
<i>Hr</i>	10	0.35 \pm (0.22)	0.024	31
	14	0.52 \pm (0.26)		21
<i>Pg</i>	10	0.49 \pm (0.25)	0.029	38
	14	0.75 \pm (0.24)		25

III.3.3.1 *Size dependence of photosynthesis responses to nutrient limitation*

Finally, in order to capture more efficiently the observed photosynthetic response traits depending on cell volume, the relationship between $r\text{ETR}_{\text{max}}$ versus cell volume for all the five species in all treatments was analysed (Fig.III-6a). This allows us to highlight, first, a positive linear relationship between these two parameters ($R^2=0.34$, $p<0.05$) and second, the dispersion variability of the responses around the regression depending on cell volume. Analysis of this dispersion showed that the smaller cells had more variable responses than larger cells (Anova, $p<0.001$) resulting from a strong effect of nutrient and temperature on the small size cells. The same pattern was observed for $\text{ETR}_{\text{max}}^{\text{cell}}$ (Fig.III-6b) with a significant positive relationship with cell volume ($R^2=0.70$, $p<0.001$). Taking into account structural parameter gave a better fitting of the relationship. As observed for $r\text{ETR}_{\text{max}}$, the variance analysis highlighted a higher variability for smaller cell groups compared to the others (Anova, $p<0.001$)

Following the same method, the relationship between a^* versus cell volume was also analysed and showed a negative linear relationship between the two parameters ($R^2=0.25$, $p<0.05$) associate to a higher variability of responses to nutrient limitation as observed for $r\text{ETR}_{\text{max}}$ (Anova, $p<0.05$) (Fig.III-7).

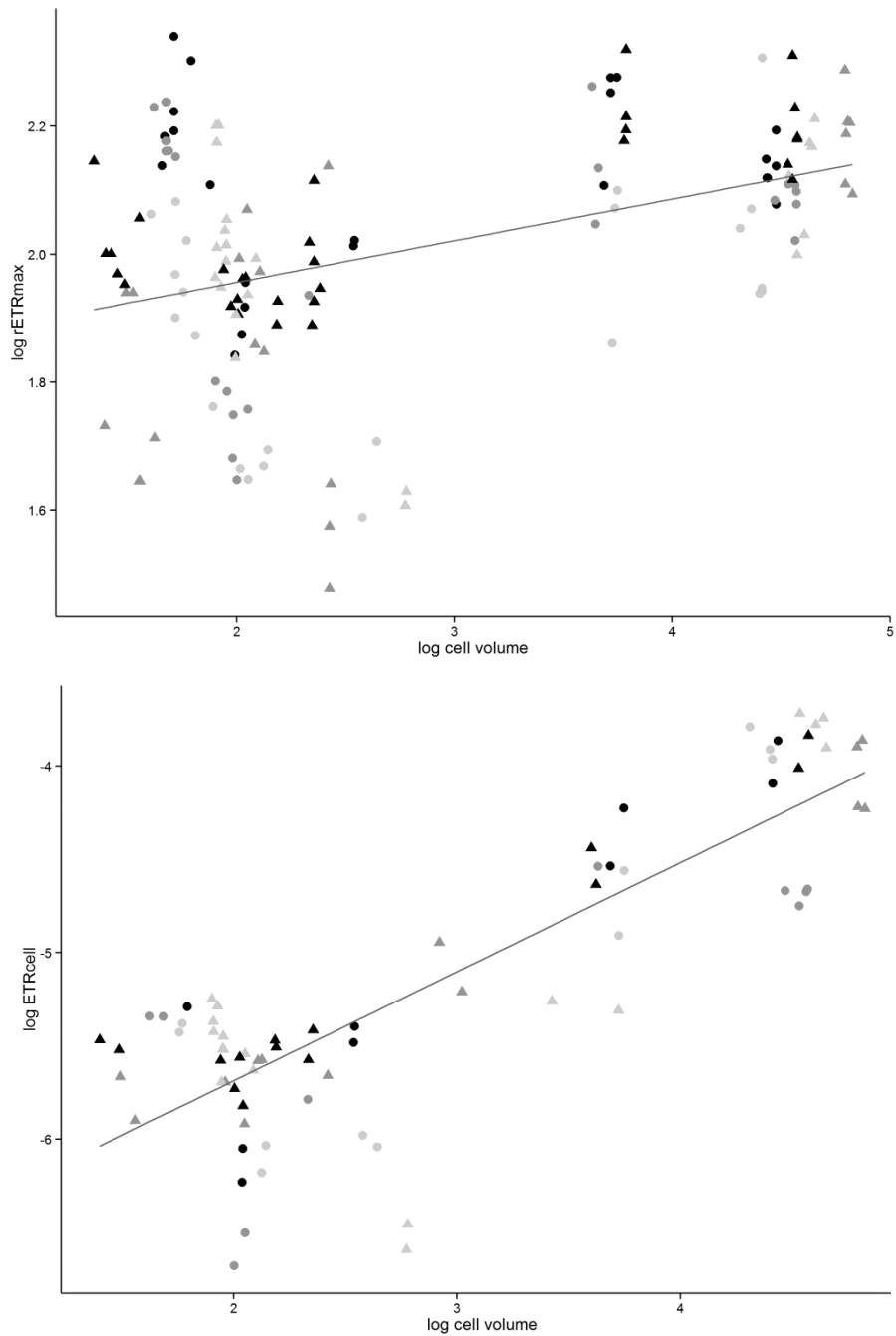


Fig. III-6: relationship between the logarithmic relative maximum electron transport rate (fig a; $rETR_{\max}$ $\mu\text{mol e}^{-}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and logarithmic ETR_{\max}^{cell} (fig b; $\mu\text{mol e}^{-}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$) versus logarithmic cell volume (μm^3) in P-lim (light grey), N-lim (dark grey) and Control (black) treatments at 10°C (circle) and 14°C (triangle).

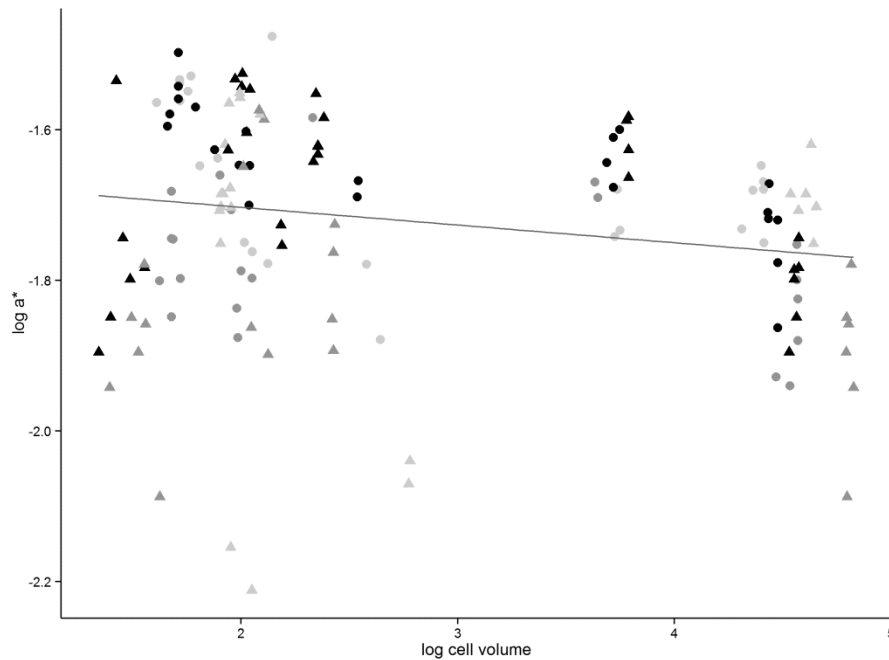


Fig. III-7 : relationship between the logarithmic chlorophyll a specific absorption coefficient (a^* , $\text{m}^2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$) depending on logarithmic cell volume (μm^3) in P-lim (light grey), N-lim (dark grey) and Control (black) treatments at 10°C (circle) and 14°C (triangle).

III.4 Discussion

By conducting laboratory experiments on five phytoplankton cultures grown under DIN depleted, DIP depleted and nutrient replete treatments at two temperatures, all other conditions being similar, we obtained significant results on several response traits, and particularly on photosynthetic capacity which varied differently depending on cell size and or species.

First of all, despite the presence of several interactions between temperature and nutrients, our study suggests that phytoplankton responses were mainly affected by nutrient limitation, which explained more variability than temperature, as previously shown by Peter and Sommer (2013) or Marañón *et al.* (2014) and Roleda *et al.* (2013) on other parameters. This could be explained in a physiological way. Previous studies showed that several traits, as photosynthetic activity or growth usually increase with temperature (Claquin *et al.*, 2008; Raven and Geider, 1988) until a specific threshold. This increase results from an enhancement of enzymatic activity with temperature. However, nutrient limitations lead to a decrease of

substrate and consequently, affect enzymatic activity upstream of temperature. Furthermore, our results highlight, compared to the larger species, that the effects of nitrogen and phosphorus limitation were higher for the midsized and small species.

Secondly, interactions between nutrient limitation and temperature occurred mainly for small sized species according to two patterns: a decrease in the intensity of the interaction when temperature increased for Pg while it is the opposite for Hr and Ske.

We will then first discuss the observed nutrient and temperature effects on functional traits related to photosynthesis, carbon content, cell volume and biomass. Second, we will focus on the interactive effects of nutrient and temperature depending on traits and species. Finally, we will highlight the pivotal role of size in our study explaining why, and in what extent, the cell size leads to different responses depending on treatment and traits.

III.4.1 Nutrient and temperature separate effects

Although they lead to a decrease of photosynthetic efficiency, DIN and DIP depletions act differently on photosynthetic processes. In our study, the photosynthetic response traits in terms of electron fluxes, namely $rETR_{max}$ and α , of four species except Pg were mainly affected by DIP limitation while Chl *a* content depends on DIN concentration. Hillebrand *et al.* (2013) highlighted differences in the optimal N/P ratios depending on phytoplankton groups with lower value of this ratio for diatoms compared to Prymnesiophyceae, involving a higher sensibility to DIP limitation for diatoms. Pg was effectively more impacted by nitrogen limitation compared to the other species on $rETR_{max}$, ETR_{max}^{cell} or whether biomass. This could result first, from its capacity to use organic phosphorus through phosphatase alkaline or second, from the formation of colonies under DIP limitation, which allows it to concentrate nutrients at a small spatial scale as previously shown Veldhuis & Admiraal (1991) for this genus. However, the small sized species also showed decrease of photosynthetic activity but resulting from an interactive effect of temperature and nutrient limitation (see below).

Previous studies showed that DIN limitation causes a decrease in nitrogenous pigment synthesis associated to a decrease of amino acid and protein synthesis, and consequently, less production of the enzymes involved in photosynthetic carbon metabolism, e.g. RubisCO, resulting in a lower photosynthetic efficiency in accordance with our results (Falkowski *et al.*, 1998; Geider *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 2013; Turpin, 1991). Furthermore a decrease of D1

protein, which reflects the number of PSII reaction centres was already observed due to nitrogen limitation (Geider *et al.*, 1993), leading to a decrease efficiency of photochemical processes of microalgae. Finally, a decline of the reactions involved in the Calvin cycle due to nitrogen limitation lead to a decreasing requirement of ATP (Lippemeier *et al.*, 2001). This implies an elevated fluorescence quenching, through the increase of transthylakoidal pH gradient, and a downregulation of electron transport of PSII.

For its part, DIP limitation usually leads to a decrease in photosynthetic efficiency through the inability of phospholipid production (Suzumura, 2005) and ATP synthesis (Paytan and McLaughlin, 2007). This decrease of ATP synthesis induces a reduced need for proton and so, as observed in case of nitrogen limitation, an increase in pH gradient at the thylakoid level (Gauthier and Turpin, 1997). In Addition, DIP limitation results in a decrease of the functional reaction centres which can rapidly reduce the PQ pool with the formation of PSII Quinone_b-non reducing centres thus leading to a decrease of electron transfer between quinones, and therefore involves a loss of photosynthesis efficiency (Wykoff *et al.*, 1998). Altogether the repercussions of DIP limitation induced a decrease of electron flow at PSII level as observed here (Geider *et al.*, 1993; Lippemeier *et al.*, 2001; Wykoff *et al.*, 1998). There is few data concerning the effects of nutrient and temperature on photosynthesis for *Db* and *Tr* (Krawiec, 1982; Lopez-Sandoval *et al.*, 2014; Staehr *et al.*, 2002), especially regarding the processes which occurs at PSII level. Our results showed a weak sensitivity of these processes to phosphorus limited treatment for *Db*, and no effect of nitrogen as already shown by Lopez-Sandoval *et al.* (2014) while *Tr* showed higher responses which globally result in a decrease of these processes. The relationship between environmental factors and photosynthesis had been more largely studied for *Ske*. As observed here, Liu *et al.* (2013) highlighted a decrease of photosynthesis efficiency in N-lim and P-lim treatments for *Skeletonema costatum*, using O₂ evolution method, and an effect of nutrient limitation on genetic level leading to a decrease of *rbcL* mRNA content necessary for RubisCO production.

To our best knowledge, there is no literature concerning the nutrient limitation and temperature effects on *Hemiselmis rufescens* photosynthesis. Nevertheless studies on cryptophyceae under nitrogen limitation reveal several properties of this species group. Nitrogen limitation leads to a decrease of photosynthetic efficiency (Da Silva *et al.*, 2009), as observed here, due to the loss of phycoerythrin antenna during nitrogen starvation. Moreover, a study by Litchlé (1979) showed several cells and photosynthetic apparatus transformation, e.g. changes in plastid ultrastructure, in case of nitrogen starvation which also induced some

perturbations in photosynthetic processes. Regarding P_g , we have not found any consistent literature on the effects of nutrient limitation on the photosynthetic efficiency while temperature dependence of photosynthesis is more knowledgeable (see below).

Some authors suggest that a^* of phytoplankton could increase under nutrient depleted conditions in order to counteract the decrease of photosynthetic efficiency (Geider *et al.*, 1998b; Geider *et al.*, 1993; Napoléon *et al.*, 2013). Db was the only species which showed an increase of a^* in P limited treatment whatever the temperature probably in order to counteract the decrease of other photosynthetic parameters. A study by Staehr *et al.* (2002) did not show this increase of a^* for *Ditylum brightwellii* in P limited treatments, even if a^* values observed here are in the same order of magnitude.

Many physiological and biochemical processes being interconnected an alteration in one process, e.g. photosynthesis, is likely to cause cascade responses affecting other parameters as biomass production. For all our species, a slight decrease of biomass in nutrient limited treatment for the larger species, a stronger one for the midsized species and an intermediate for P_g were observed while the other small species showed a decrease of biomass which result from an interactive effect of nutrient and temperature. This decrease of biomass in nutrient limited treatments is in agreement with previous studies (Da Silva *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Staehr *et al.*, 2002). In addition to the effects of upstream processes on biomass production, the decrease of biomass could also be due to the inability for limited phytoplankton to produce phospholipids and consequently new cells, especially in P limited treatment (Suzumura, 2005). Despite the decrease of photosynthetic efficiency an increase of Carbon content in P-lim was observed for Db Tr, Hr (10°C) and P_g and Ske at 14°C and in N-lim for Tr, Hr and P_g (14°C only). Indeed, despite their decrease, photosynthetic processes persist and lead to the production of Carbohydrates which cannot be used due to the lack of phosphorus and then are stocked in the intracellular compartment (Alcoverro, 2000; Guerrini *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2011; Magaletti *et al.*, 2004). These carbohydrates are stored until a maximum threshold depending on species, but, as they cannot be associated with nutrient or used probably due to a lack of ATP, they could be excreted, thus achieving an overflow process (Staats *et al.*, 2000).

It is widely accepted that photosynthetic efficiency increases with temperature until a specific threshold (Claquin *et al.*, 2008; Davison, 1991), resulting at least in part from higher enzymatic activity. For example, Cloern (1978) showed the dependence between temperature

and photosynthesis emphasizing on the increase of photosynthesis efficiency with temperature for Ske. This pattern was observed on F_v/F_m and on $rETR_{max}$ for *Db* and on $rETR_{max}$ and α for *Pg*. Indeed, Verity *et al.* (1991) highlighted an increase of photosynthesis efficiency of *Pg* as temperature increased between 10°C and 20°C, which is consistent with our results

This weak influence of temperature on our studied variables could be explained by the strong effect of nutrient limitations which affect enzymatic activity upstream of temperature leading to a decrease of the temperature effect, except for *Pg*. Nevertheless, an increase of growth rate with temperature was observed here in accordance with previous studies (Baumert and Petzoldt, 2008; Bissinger *et al.*, 2008; Raven and Geider, 1988), except for *Db*. This lack of responses could be due to the structural characteristics of *Db*, namely large cell, high storage capacity and low growth rate compared to the other species (Marañón *et al.*, 2013) or in the other side, to a closeness optimal temperature in our experiments for this *Db* strain.

III.4.2 Interactive effect of nutrient and temperature for small species

In this study the cell size had some significant effect on the observed responses. First, an interactive effect of nutrient and temperature was observed mainly for the small size species on photosynthesis, biomass production, cell volume and to a lesser extent C:cell and Chl *a*:cell ratios. This pattern remains true but declines when a structural component, as a^* or cell volume, is taking into account. This implies some differences about the effects of nutrient and temperature on photosynthetic function as $rETR_{max}$, F_v/F_m or wether α , on one side and in the other side, on the structure of photosystems (pigment composition and arrangement), carbon cell content and cell volume. Secondly, an increase of response variability was observed for the smaller species.

Our study showed two different patterns of interactions. The first one concerned *Pg*. At 10°C, *Pg* showed a decrease of $rETR_{max}$, ETR_{max}^{cell} , a^* , F_v/F_m and to a lesser extent α in nutrient limited treatments. Riegman and Van Boekel (1996) showed that five different ecotypes of *Pg* exist. These ecotypes differ in their ecophysiological properties and, more particularly, in their optimum temperature. They defined, based on previous studies, three groups which differ in their optimum temperature: 4°C, 8°C and 15°C. Our *Pg* strain was isolated on the eastern English Channel during late spring, belonging to the blooming pool frequently observed in this area when temperature usually varied between 9 and 19 °C (Schapira *et al.*, 2008). Related to the fact that, *Pg* blooms never start below 9°C according Riegman and Van

Boeckel (1996), there is evidence to suggest that our strain belongs to the 15°C optimum temperature strain, implying that 14°C is near the optimum of temperature for this species, in accordance with the conclusions of Peperzak (2002). Consequently, the decrease of photosynthetic efficiency observed at 10°C could be the result, of a suboptimal temperature which could lead to an increase of nutrient requirements according to Rhee & Gotham (1981) and so, a reinforced effect of nutrient limitation. Indeed, in a previous work, Rhee and Gotham (1981) showed an interactive effect of temperature and nitrogen and phosphorus limitation on the growth rate of *Scenedesmus sp.* and *Asterionella formosa* highlighting that the combined effect of these two factors was greater than the sum of individual effect. They also highlighted an increase of nutrient requirements at suboptimal temperature. The decrease of photosynthetic activity at 10°C is especially true for nitrogen since prymnesiophytes present a higher N/P ratio (Hillebrand *et al.*, 2013).

The second pattern concerned both Hr and Ske. Indeed, while there was a significant effect of phosphorus limitation on $rETR_{max}$, a^* , F_v/F_m , α and biomass (for *in vivo* fluorescence as well biomass proxied by cell volume) for Ske and Hr, it is noticeable that an interactive effect of temperature and nutrient, which lead to a strong decrease of these traits in N-lim, emerged at 14°C. There was also a strong decrease of a^* in P-lim as temperature increased for *Ske*. A recent study by Fiori and Pistocchi (2014) on the sensitivity to terbuthylazine (a herbicide) and effect of temperature on *Skeletonema marinoi* physiology showed a strong additive effect of temperature and herbicide, e.g. an increasing effect of herbicide on photosynthesis as temperature increased, highlighting the key role of temperature on photosynthesis processes for this species. Nevertheless, despite the large number of studies done on the responses of *Skeletonema sp.* photosynthesis, this reinforcement of nitrogen limitation as temperature increases has never been demonstrated. The presence of the increase of interactive effects of nutrient when temperature increased on photosynthetic response traits was therefore surprising when referring to the work of Rhee and Gotham (1981) and our results on Pg. These interactive effects on photosynthesis concerned the nitrogen limited treatments only for Ske and Hr mainly on variables not proxied by a structural component, as $rETR_{max}$, F_v/F_m or whether α , leading to a more pronounced effect of nitrogen limitation at 14°C. Indeed, except for biomass and a^* for Hr and Ske there was no effect of temperature on the different variables measured in P-lim, highlighting a stronger dependence between nitrogen dependent processes and temperature.

This interactive effects of nutrient and temperature could result from different processes. First, nitrogen limitation leads to a decrease of enzyme involved in photosynthesis and nitrogenous content resulting in a decrease of photosynthetic efficiency (Geider *et al.*, 1998b; Turpin, 1991). Moreover, the increase of temperature results in the increase of enzymatic dependent processes like nutrient absorption (Reay *et al.*, 2001), which includes nitrate reduction as well as the cost of carbon skeletons needed for formation of amino acids, constituting high energy cost processes (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Foyer *et al.*, 1994; Touchette and Burkholder, 2000). This increase of the rate of biochemical processes, in addition to the increase of cellular production observed here through growth rate, implies a faster and more important effect of nitrogen depletion. Secondly, Toseland *et al.* (2013) suggest that temperature plays a critical role in resource allocation and marine phytoplankton stoichiometry with, as an example, a greater investment in biosynthesis at low temperature, whereas under high temperatures more resources are invested in photosynthesis. This implies higher nutrient requirement for photosynthetic pathways as temperature increases consistent with our observations for Hr and Ske. They also highlight an increase of N/P ratios with temperature, inducing an increasing dependence to nitrogen, consistent with our results for Hr and Ske.

Even if the interactive effects of nutrient and temperature concerned the small sized species there was a specific interactive effect on cell volume for all species. Indeed, there was a decrease of cell volume for Ske and Hr as temperature increase in Control with approximately 25% decrease for *Db* and 40% decrease for Hr and Ske. On the contrary, Pg and Tr did not show any difference of cell volume between 10°C and 14°C in Control. These observations differed from those obtained by Atkinson *et al.* (2003) who predicted a linear decrease of 2.5% of cell volume for each one degree increase.

III.4.3 Various responses to a same limitation: size matters

In addition to the presence of an interactive effect of nutrient and temperature, small size species were characterized by a high variability in their responses compared to midsized and large cells. Due to this implication in growth rate, nutrient uptake or photosynthesis, cell size is consider as a master traits which largely defines the ecological niches of phytoplankton (Litchman and Klausmeier, 2008). Interestingly, there were few interactive effects of nutrient and temperature on *Db* and *Tr*, our large and midsized species. There were also different

pattern due to these interactions for the smaller species, highlighting a species dependence of interactive effects as shown Shatwell *et al.* (2013) on two diatoms.

In our study Db was the larger cell inducing high storage capacity associated to a reduction in volume-specific nutrient requirements (Marañon *et al.*, 2013). There is a positive link between size and the density of nutrient transport sites which implies, associate to the increasing storage capacity with size, an advantage to be large in nutrient fluctuating conditions (Finkel *et al.*, 2010a; Litchman *et al.*, 2007; Marañon *et al.*, 2013). Our experimental design, which included a daily uptake of cultures and a daily renewal of fresh medium, then could favour large species by the addition of nutrient in small quantities but in sufficient amount through fresh medium (Jouenne *et al.*, 2007). Contrary to this, being a “small size” cell is assumed to be of interest in low nutrient condition because of a better capacity of resource absorption, through diffusion processes, and use. However, this advantage is related to a small storage capacity. Furthermore, being small induces a decrease of the resource costs of photon transformation into chemical energy (Geider *et al.*, 1998b) which is interesting in low nutrient condition (Raven, 1998). In our study larger are the better, at least regarding their responses variability in case of nutrient unbalanced condition, showing less perturbations of photosynthetic capacity due to nutrient depletion as size increases. This includes also the variation of size depending on nutrient limitation and temperature for Hr and Ske. There was an increasing effect, e.g. on $rETR_{max}$, or α , in nitrogen limited treatment for these species as temperature increased while no interaction with temperature were detected in phosphorus limited treatments which showed a strong increase of cell volume. This pattern could result from a strong relationship between nitrogen dependent photosynthetic process and temperature, as stated above, or from the attenuation of nutrient and temperature effects due to higher cell volume. This could be linked to the physiological properties arising from size characteristics, namely, the increasing storage capacity, a reduction in volume-specific nutrient requirements as size increases, and a large amount of Chl *a* per cell which implies a high number of photosynthetic reaction centers. Finally, Hillebrand *et al.* (2013) highlighted that cells which have high growth rates had a lower flexibility of N/P ratios. However, they did not highlight any link between size and the flexibility of nitrogen and phosphorus stoichiometry even if, size and growth rate were strongly linked. Finally, Marañon *et al.* (2013) suggest an increase of nitrogen requirements as size decreases for diverse phytoplankton species. Altogether, this lack of flexibility and the higher nitrogen requirement related to the temperature effect, which acts as a second disruptive factor, could explain the

interactive effects of nutrient and temperature observed for the smaller species. In our experiments, nutrient had a stronger effect compared to temperature on our different studied parameters has already shown by Peter & Sommer (2013) or whether Roleda *et al.* (2013) and Marañón *et al.* (2014). Moreover, a decreasing effect of temperature compared to nutrient on our different variables with increasing size was observed.

Finally, we observed a negative relationship between a^* and cell volume in accordance with previous studies (Fujiki and Taguchi, 2002; Morel and Bricaud, 1981). On the opposite, a strong positive link between electron transport rate and cell size has been demonstrated in our study. This relationship, which has never been demonstrated to our knowledge, fits better for ETR_{\max}^{cell} which takes into account the pigment composition and arrangement as well as the number of cells. We stated above a link between $rETR_{\max}$ and the quantity of chlorophyll *a*. The strong relationship observed here between ETR_{\max}^{cell} and size highlights that the increase of electron transport rate does not depend only on this quantity but also suggests a strong efficiency of electron transport rate in large cells.

III.5 Conclusions

In this study, we described the influence of temperature, nutrient concentration or their interactions on several photosynthesis response traits, and also on carbon: cell, cell volume and biomass. In addition to the effects of nutrient and temperature on these parameters, we have shown that size is a fundamental cell property which defines, both quantitatively and qualitatively, the physiological responses of phytoplankton. Indeed, even if the five studied species showed different ecological requirements and belong to different functional groups, the best way to group these species for maximizing the understanding of observed responses was to cluster them depending on three size classes. If one thinks no longer in terms of species but rather through a size approach, our results highlighted a size effect on the observed responses with the presence of interactive effects of temperature and nutrient on small size species only, associate to an increase of response amplitude as size decreases. The increasing occurrence of interactive effect as size decreases illustrates a mitigated effect of temperature compared to nutrient on cell physiology as size increases. These results are of interest given the already observed but also future changes of nutrient stoichiometry and temperature in marine waters through global change. Indeed, an increase of water temperature combined with an increase of N:P ratios are expected. This increase could have a strong

negative effect on small and medium sized diatoms while *Phaeocystis globosa* seems to be less affected by the increase of N:P ratio, according to Hillebrand *et al.* (2013), who showed higher optimum N:P for prymnesiophyceae compared to diatoms. Secondly, the increase of temperature apparently influences negatively some traits of small diatoms while *Phaeocystis globosa* and the large diatom were positively affected by the rising temperature. So, the increase of N:P ratio and an increase of temperature might change first, the composition of diatom communities which may present a shift towards larger cells, and second, could influence the diatoms/*Phaeocystis* succession promoting *Phaeocystis globosa* instead of diatoms. Consequently, these changes could result in the modification of trophic interactions in natural waters and on the large panel of processes directly or indirectly linked to phytoplankton.

IV. Dépendance taxonomique des effets de la limitation en sels nutritifs, de la température et de leur interaction sur la production d'hydrates de carbone

Fabien Dufossé, Fabienne Goulard, Valérie Gentilhomme, Sébastien Lefebvre

Résumé

La limitation en sels nutritifs et la température vont influencer la production d'hydrates de carbone particuliers et l'excrétion de ces hydrates de carbone à l'extérieur de la cellule. L'étude des effets des conditions environnementales sur la formation et l'exsudation d'hydrates de carbone par le phytoplancton sont deux processus d'intérêt. Les quantités d'hydrates de carbone formés et exsudés sont représentatives de l'état physiologique des cellules phytoplanctoniques et ont un rôle dans les réseaux trophiques marins. Notre étude expérimentale porte sur les effets de la limitation en sels nutritifs, de la température et de leur interaction sur la quantité d'hydrates de carbone intracellulaires et dissoutes formée par cinq espèces phytoplanctoniques présentant des volumes cellulaires différents.

Notre étude met en évidence un effet de la limitation en sels nutritifs plus fort que l'effet température sur la quantité d'hydrates de carbone produits, excepté pour *Ditylum brightwellii*. De plus, cette étude montre que les réponses, en termes de production d'hydrates de carbone particuliers et dissous, observées en fonction de la limitation en sels nutritifs et de la température vont être spécifiques et dépendent du taxon considéré plutôt que du volume cellulaire. Pour *Ditylum brightwellii*, la quantité d'hydrates de carbone ne varie pas en fonction de la limitation en sels nutritifs mais augmente avec la température. De son côté, *Phaeocystis globosa* montre de fortes variations de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers, probablement liées à l'alternance rapide de formes flagellées ou non flagellées, qui présentent des différences physiologiques et particulièrement concernant la formation d'hydrates de carbone. *Hemiselmis rufescens* montre un effet fort de l'azote, et moindre du phosphore, avec une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous par cellule en cas de limitation. Enfin, concernant *Thalassiosira rotula* (Tr) et *Skeletonema sp.* (Ske) des effets interactifs de la limitation en sels nutritifs avec la température sont observés. Chez Tr cette interaction se traduit par une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers par cellule par rapport au témoin, qui est accentuée à 14°C. Chez Ske aucun effet de la limitation en sels nutritifs n'est constaté à 10°C sur la quantité d'hydrates de carbone par cellule tandis qu'à 14°C des quantités d'hydrates de carbone particuliers plus élevées sont observées dans les conditions limitées. Le même schéma est observé pour les hydrates de carbone dissous. De plus, pour ces deux espèces, une forte diminution de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers par cellule est observée dans le témoin quand la température augmente du fait d'un taux de croissance élevé à 14°C.

Bien que les réponses des différentes espèces ne dépendent pas du volume cellulaire, il existe une relation significative positive entre le volume cellulaire et la quantité d'hydrates de carbone par cellule. Une relation négative est observée entre le volume et la quantité d'hydrates de carbone ramenée à une unité volumétrique avec une diminution de la quantité d'hydrates de carbone par unité de volume quand la température augmente. Par ailleurs, la proportion d'hydrates de carbone exsudés ne montre pas de relation avec le volume cellulaire mettant ainsi en évidence que le processus d'exsudation ne dépend pas simplement de la taille des cellules. Enfin, notre étude met en évidence une relation hautement significative, même sans distinction d'espèce ou de condition, entre la quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous. Cela implique, contrairement à ce qui est fréquemment observé sur les espèces benthiques, que l'exsudation est forcément associée à une augmentation des hydrates de carbone particulaires.

Mots clefs : phytoplancton, limitation azote, limitation phosphore, température, hydrates de carbone, exsudats

IV.1 Introduction

L'étude des effets des conditions environnementales sur la formation et l'exsudation d'hydrates de carbone par le phytoplancton sont deux processus d'intérêt, d'une part car elles caractérisent l'état physiologique des cellules phytoplanctoniques et d'autre part, du fait de leur rôle dans les réseaux trophiques marins. La limitation en azote et en phosphore aboutit généralement à une augmentation du contenu en hydrates de carbone ainsi qu'à une augmentation de l'exsudation (Mykkestad, 2000), et ce, dans plusieurs groupes phytoplanctoniques comme les prymnesiophyceae (Alderkamp *et al.*, 2007), les cryptophyceae (Da Silva *et al.*, 2009), et les diatomées (e.g. Granum *et al.*, 2002; Guerrini *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 1990; Mykkestad, 2000). Cette augmentation résulte d'une moindre utilisation des hydrates de carbone qui continuent à être produits par les processus photosynthétiques qui, bien qu'ils puissent être eux-mêmes affectés, aboutissent encore à la formation de glucides. La cellule va alors engager toute une série de réactions, se servant des hydrates de carbone en tant qu'énergie ou comme base carbonée, pour la respiration, la production d'acides aminés, de lipides ou encore de nouvelles cellules. Certains éléments, tels l'azote et le phosphore, vont alors être indispensables pour l'utilisation des hydrates de carbone produits qui en cas de limitation ne vont plus pouvoir être couplés à ces éléments devenus limitants. L'absence de ces éléments nutritifs aboutit alors à une baisse du métabolisme (e.g. assimilation d'azote, production d'acides aminés, production de lipides) et une production moindre de nouvelles cellules. Si la quantité d'hydrates de carbone produits dépasse les besoins nécessaires à la respiration et la synthèse de cellules, ceux-ci peuvent s'accumuler dans la cellule jusqu'à un certain seuil puis être exsudés (Berman-Frank and Dubinsky, 1999). Cette concentration dans le compartiment cytoplasmique peut servir de base carbonée en cas de renouvellement de l'élément limitant, permettant alors à la cellule de disposer d'un stock de substrat et de reprendre au mieux ses activités métaboliques.

Associé à l'augmentation de la concentration en hydrates de carbone par cellules en cas de limitation, des changements de qualité des hydrates de carbone dans des conditions limitées en sels nutritifs ont été mis en évidence avec, par exemple, une augmentation de la proportion de glucanes chez *Phaeocystis sp.* (Alderkamp *et al.*, 2007) et *Skeletonema costatum* (Granum *et al.*, 2002; Mykkestad, 1977). Toutes les espèces ne vont pas montrer les mêmes caractéristiques quant au contenu, à la production ou encore l'exsudation des hydrates de carbone, et ce, même en l'absence de stress environnemental comme l'a montré Mykkestad

sur 9 espèces de diatomées (Myklestad, 1974). En présence de limitation en sels nutritifs, des réactions spécifiques existent et aboutissent à des différences de réponses à la limitation en sels nutritifs quant à la production d'hydrates de carbone, et ce, même entre taxons d'un même groupe. Urbani *et al.* (2005), par exemple, mettent en évidence des différences de réponses à la limitation en phosphore chez trois diatomées avec des changements dans la nature des hydrates de carbone produits et dans la quantité d'hydrates de carbone exsudés en fonction de l'espèce. Guerrini *et al.* (2000), quant à eux, observent une augmentation du contenu en hydrates de carbone chez *Achnantes brevipes* (diatomée) dans N-lim et P-lim associée à une augmentation de la production d'exsudats dans P-lim uniquement. Ce patron n'est pas observé chez *Skeletonema costatum* (Myklestad, 1977) qui ne présente pas de modification en cas de limitation de phosphore de sa production d'exsudats, ce qui implique des réponses spécifiques face à une même limitation.

Une exsudation des hydrates de carbone produits est observée chez de nombreuses espèces phytoplanctoniques et est souvent renforcée en cas de stress environnemental. Cette augmentation du phénomène d'exsudation peut provenir d'un phénomène de lyse cellulaire, dû à un mauvais état général des cellules stressées, ou de cellules saines qui envoient à l'extérieur de la cellule les hydrates de carbone présents dans le compartiment intracellulaire (Myklestad, 2000; Staats *et al.*, 2000). L'excrétion d'hydrates de carbone peut représenter plusieurs avantages. Les hydrates de carbone exsudés peuvent servir en tant que polyélectrolytes sur lesquels se lient les sels nutritifs, facilitant ainsi leur absorption en condition limitée (Decho, 1990; Staats *et al.*, 2000). Ces hydrates de carbone excrétés à proximité de la cellule peuvent également former de la matière accessible au compartiment bactérien qui, en utilisant cette matière carbonée, peut reminéraliser des éléments nutritifs limitants (Rooney-Varga *et al.*, 2005). Toutes ces modifications du contenu et de l'exsudation en hydrates de carbone vont avoir, en plus des répercussions au niveau individuel, plusieurs répercussions à l'échelle des communautés notamment au travers des réseaux trophiques. Le phytoplancton, en tant que producteur primaire, se situe à la base des réseaux trophiques. Une modification de la stœchiométrie du phytoplancton, dont les ratios C :N et C :P ont tendance à augmenter en cas de limitation en DIN et DIP, va donc avoir des conséquences sur les niveaux trophiques supérieurs via des modifications de qualité nutritionnelle du phytoplancton. Cet excès de carbone va se répercuter sur les organismes des niveaux trophiques supérieurs qui vont devoir gérer l'excès de carbone et la diminution des éléments limitants, aboutissant à des perturbations du métabolisme de ces consommateurs (pour une

synthèse voir Hessen and Anderson, 2008). D'autre part, une augmentation de l'exsudation, attendue en cas de limitation en sels nutritifs, va favoriser la composante bactérienne qui utilise ce carbone organique dissous comme source primaire de croissance (Bell, 1983). Néanmoins, l'utilisation de cette source de carbone par les bactéries se fait via l'utilisation d'un cortège enzymatique consommateur de DIN et DIP. En cas de limitation en ces éléments, les bactéries ne pourront pas utiliser efficacement cette source de carbone. De plus l'activité bactérienne risque de diminuer la part de DIN ou DIP disponible pour le phytoplancton aboutissant à un phénomène de compétition pour ces éléments entre la composante bactérienne et phytoplanctonique (Hessen and Anderson, 2008; Obernosterer and Herndl, 1995).

La température va influencer la cellule phytoplanctonique à plusieurs niveaux notamment via l'accélération des processus enzymatiques, aboutissant à une accélération du métabolisme général des cellules. Par ailleurs, Toseland *et al.* (2013) suggèrent que la température va influencer l'allocation des ressources, à savoir l'azote et le phosphore, avec une allocation plus forte pour les processus photosynthétiques quand la température augmente alors qu'à faible température la biosynthèse (e.g. la synthèse d'ARN) sera davantage favorisée.

Une augmentation de la production de TEP (Transparent Exopolymeric Particles) est souvent observée quand la température augmente et ce jusqu'à un certain seuil au-delà duquel cette production diminue (Claquin *et al.*, 2008). Cependant ces auteurs mettent en avant le fait que ce patron ne fonctionne pas pour toutes les espèces, avec une absence de relation pour *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) et *Lepidodinium chlorophorum* (Dinophyceae). Sayegh et Montagnes (2011) démontrent, quant à eux, une absence de relation entre la température et le contenu en hydrates de carbone chez *Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis sp.* Aucun lien clair n'est donc fait sur la relation entre la température et la production/le contenu en hydrates de carbone particuliers chez les microalgues. Concernant les hydrates de carbone dissous, une augmentation de la proportion des hydrates de carbone exsudés avec la température est constatée dans diverses études (Borchard and Engel, 2012; Engel *et al.*, 2011; Wohlers *et al.*, 2009). Cette forte production d'hydrates de carbone exsudés associée à une augmentation de la température va favoriser la composante bactérienne qui utilise ces hydrates de carbone comme source de carbone et qui voit ses réactions physiologiques s'accélérer grâce à l'augmentation de température. L'effet de la température se manifeste plus rapidement sur le métabolisme des bactéries que sur le celui des organismes

phytoplanctoniques accroissant alors l'efficacité de la boucle microbienne (Von Scheibner *et al.*, 2014).

De nombreuses études ont porté sur les effets de la température ou de la limitation en sels nutritifs sur les paramètres biochimiques du phytoplancton, comme par exemple le métabolisme carboné, mais peu d'entre elles se sont intéressées à l'effet interactif de ces stress environnementaux sur le contenu et le devenir des produits carbonés (Borchard and Engel, 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013). Des effets interactifs de la température et de la limitation en sels nutritifs existent et ont déjà été mis en évidence sur d'autres paramètres comme la croissance (Rhee and Gotham, 1981) ou encore la taille des cellules (Peter and Sommer, 2013). La présence d'interactions entre la température et les sels nutritifs n'est pas étonnante compte tenu du rôle essentiel de la température et de la disponibilité en sels nutritifs sur le métabolisme phytoplanctonique. Des effets interactifs de ces paramètres environnementaux sur le métabolisme carboné ont d'ailleurs été avancés dans les études menées par Borchard & Engel (2012) et Vidyarathna et Granéli (2013). En effet, des contenus en hydrates de carbone plus forts sont observés à température sub-optimale dans l'expérimentation de Vidyarathna and Granéli (2013). Borchard *et al.* (2012), quant à eux, montrent un renforcement de l'augmentation de la quantité d'exsudats dans les conditions limitées en azote quand la température augmente pour *Emiliana huxleyi*.

Concernant le facteur taille, peu d'études se sont intéressées à la relation taille/hydrates de carbone du phytoplancton (Hitchcock, 1982; Lopez-Sandoval *et al.*, 2014). Néanmoins, López-Sandoval *et al.* (2014) ont mis en évidence une relation positive significative entre la production de Carbone dissous et la taille des cellules phytoplanctoniques. Par ailleurs, ces auteurs montrent une absence de relation entre la proportion de Carbone exsudés (PER), qui correspond à la production de carbone dissous divisée par la production totale de carbone (particulaire plus dissous), et la taille, excluant ainsi l'hypothèse d'une exsudation des hydrates de carbone uniquement via un phénomène de diffusion. Bien qu'il soit acquis que la quantité de carbone intracellulaire (ramenée au nombre de cellule) augmente avec la taille, dû à un squelette carboné plus grand, et que la quantité de carbone ramenée à une unité volumétrique diminue avec la taille (Moal *et al.*, 1987; Mullin *et al.*, 1966), il n'existe que peu d'informations quant à l'évolution du contenu en hydrates de carbone en fonction de la taille, et particulièrement en présence de stress environnementaux. Comme exemple, nous pouvons citer les travaux de Hitchcock (1982) et de Moal *et al.* (1987) qui mettent en évidence une diminution de la quantité d'hydrates de carbone par unité de volume et des différences de

contenus entre groupes phytoplanctoniques en l'absence de stress. Enfin, l'étude des réponses du phytoplancton (en termes de contenu et production d'hydrates de carbone) à des stress environnementaux, comme la température et la limitation en sels nutritifs, prenant en compte des cellules de tailles et de groupes différents n'a que très peu été étudiée. Nous disposons en effet que d'une seule publication sur ce sujet. Celle-ci concerne l'évolution de la fraction dissoute en condition limitée en azote pour 22 taxons présentant un large gradient de taille (Lopez-Sandoval *et al.*, 2013).

Les objectifs de cette étude expérimentale sont multiples. Tout d'abord, nous nous proposons d'étudier les effets de la limitation en azote et en phosphore inorganique dissous, de la température, et de leurs interactions sur la production et le contenu en hydrates de carbone du phytoplancton. Un indicateur de la capacité photosynthétique et un indicateur de la formation de biomasse seront également étudiés afin de mieux appréhender les réponses obtenues sur les hydrates de carbone. Deuxièmement, en travaillant sur cinq taxons présentant des caractéristiques de tailles différentes et appartenant à trois phylums différents, nous cherchons à mettre en évidence des réponses spécifiques aux mêmes conditions expérimentales. Enfin, compte tenu du manque d'information qui ressort de notre revue de la littérature, nous vérifierons la présence ou l'absence de relation entre la taille et la nature des réponses obtenues dans les différentes conditions expérimentales.

IV.2 Matériels et méthodes

IV.2.1 Espèces étudiées

Les caractéristiques principales des espèces étudiées sont décrites dans le chapitre 1 (Section I.5.1). Nos cinq espèces d'intérêt sont la cryptophyceae *Hemiselmis rufescens* (Hr, PLY631), la prymnesiophyceae *Phaeocystis globosa* (Pg) et trois diatomées centriques : *Skeletonema sp.* (Ske, PLY627), *Thalassiosira rotula* (Tr, CCAP1085/20) et *Ditylum brightwellii* (Db). Ces espèces appartiennent à des groupes phytoplanctoniques différents (trois diatomées, une cryptophyceae et une haptophyceae), sont présentes en Manche Orientale et montrent un patron de taille allant de 3 µm pour la plus petite à 200 µm pour la plus grande (Tableau I.1).

IV.2.2 Dispositif expérimental

Afin de servir d'inoculum dans nos expérimentations, chaque espèce était conservée dans des bouteilles en verre de 250 ml contenant du milieu F/2 (Guillard and Ryther, 1962) sur lesquelles était posé un bouchon en silicone stérile empêchant la pénétration des bactéries présentes dans l'air (Hirschmann©, bouchons Silicosen) mais perméable à l'air. Ces inocula étaient placés dans une enceinte thermorégulée à 12°C, sous une intensité lumineuse de 250 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avec un cycle nyctéméral de 12 h. Durant leur phase exponentielle de croissance un volume déterminé de ces cultures souches a été prélevé pour lancer les expérimentations.

Les expérimentations ont été réalisées dans des enceintes thermorégulées Minitron (INFORS©) sous une lumière de 110 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et un cycle jour/nuit de 12h/12h. Afin d'étudier les effets de la limitation en phosphore inorganique dissous (DIP) et azote inorganique dissous (DIN) sur différents traits de réponse, à savoir la biomasse, le taux de transfert d'électrons du PSII, le contenu et la production en hydrates de carbone dissous et particuliers, des cultures monospécifiques furent mises en place dans des bouteilles de 2 L contenant de l'eau de mer artificielle (35 PSU) dans laquelle était ajouté du milieu F/2 (Guillard and Ryther, 1962) sans azote ni phosphore. Le DIN et DIP ont alors été ajoutés sous forme de KNO_3 et KH_2PO_4 afin d'obtenir les concentrations suivantes : 50 $\mu\text{mol-N.l}^{-1}$ et 1 $\mu\text{mol-P.l}^{-1}$ dans la condition limitée en phosphore (P-lim), 2 $\mu\text{mol-N.l}^{-1}$ et 5 $\mu\text{mol-P.l}^{-1}$ dans la condition limitée en azote (N-lim) et 50 $\mu\text{mol-N.l}^{-1}$ et 5 $\mu\text{mol-P.l}^{-1}$ dans la condition Témoin (Control). Afin de tester l'influence de la température chaque expérience a été menée à 10°C et à 14°C. Une agitation orbitale de 125 et 60 rpm, respectivement pour les diatomées et les flagellés (*Hr* et *Pg*) était appliquée pour minimiser le phénomène de sédimentation. Jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance les cultures étaient maintenues en batch, la biomasse (en tant que comptages cellulaires et fluorescence *in vivo*) et la concentration en sels nutritifs étaient prélevées quotidiennement. A partir de la fin de cette phase, qui marque l'entrée en phase de limitation, 200 ml de cultures étaient prélevés chaque jour et remplacés par du milieu neuf. Ces 200 ml nous permettent alors d'étudier les concentrations en hydrates de carbone, acides aminés, carbone organique total (COT), sels nutritifs, ainsi que les paramètres photosynthétiques et la biomasse phytoplanctonique et bactérienne (ces paramètres étant détaillés ci-dessous). Durant l'expérimentation, les prélèvements étaient effectués deux heures après le début de la photophase.

Les cultures étaient non axéniques. Afin de mesurer la concentration bactérienne dans nos cultures, des prélèvements réguliers (tous les trois jours) étaient effectués. Le dénombrement des bactéries a été effectué au microscope à épifluorescence (Leitz DMRB©, g x1000) selon la méthode décrite par Porter & Feig (1980). La concentration bactérienne variait selon les cultures et conditions mais n'a jamais dépassé $6,5 \times 10^4$ cellules par litre, excluant tout effet significatif des bactéries dans nos cultures. Ce paramètre ne sera alors pas davantage exploité dans cette étude.

IV.2.3 Suivi de biomasse

IV.2.3.1 *Comptage cellulaire et mesure de volume cellulaire:*

10 ml sont prélevés chaque jour pour l'estimation du nombre de cellules et les mesures de volume cellulaire. Ce prélèvement était fixé par l'ajout d'une solution de lugol (1% de concentration finale), sauf pour Pg qui était fixé par l'ajout de glutaraldéhyde (1% de concentration finale) (Vaulot *et al.*, 1989) et conservé hermétiquement à 4°C en attente d'analyse. Les préparations pour le comptage furent réalisées selon la méthode décrite par Utermöhl (1931), en plaçant les échantillons dans des cuves de sédimentation durant au minimum 8 h. Les comptages étaient effectués au microscope inversé (Nikon Eclipse TE2000-S), suivant les procédures décrites par la « Baltic Marine Environment Protection Commission - Helsinki Commission » (HELCOM, 1988). Le nombre de cellules coloniales de *Phaeocystis globosa* est estimé suivant la méthode décrite par Rousseau *et al.* (1990). Enfin l'estimation du volume cellulaire moyen était réalisée en mesurant 30 cellules, sélectionnées de façon aléatoire, en appliquant la méthode et les formulations décrites par Hillebrand *et al.* (1999).

IV.2.3.2 *Mesure de fluorescence in vivo :*

Un échantillon de 5 ml était prélevé quotidiennement pour l'analyse de la fluorescence *in vivo*. Cet échantillon était placé à l'obscurité durant 15 minutes avant d'être analysé avec un fluorimètre Trilogy© (Turner Designs).

IV.2.4 Concentration en sels nutritifs

Deux prélèvements quotidiens de 10 ml destinés à l'étude de la concentration en sels nutritifs (N, P et Si) inorganiques dissous ont été effectués et placés à -32°C en attente d'analyse, sauf pour l'ammonium (Koroleff, 1969). Les concentrations en azote inorganique dissous (DIN, en tant que somme de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$), en phosphate inorganique dissous (DIP) et en silicate dissous (DSi) ont été mesurées sur un auto-analyseur Alliance (Alliance Futura Autoanalyser II©) selon la méthode décrite par Aminot et Kérouel (2004). La concentration minimale mesurée en DSi était de $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$, toutes expérimentations confondues, impliquant l'absence de limitation en silice.

La concentration en ammonium a également été mesurée quotidiennement, sur des prélèvements de 10 ml non congelés, en appliquant la méthode colorimétrique décrite par Koroleff (1969).

IV.2.5 Hydrates de carbone dissous et particulaires

Trois prélèvements destinés à l'analyse des hydrates de carbone dissous et particulaires sont effectués durant l'expérimentation. Le premier est effectué trois jours après l'entrée en phase de limitation puis un prélèvement est effectué tous les deux jours. Un prélèvement de 10 ml de culture est placé dans un bain de glace afin de stopper les réactions et éviter les modifications liées au stress résultant du prélèvement. Rapidement, ce prélèvement est centrifugé à 4400 rpm durant 15 minutes afin de séparer les fractions particulaires (culot) et dissoute (surnageant). Les échantillons sont ensuite placés à -32°C en attente d'analyse.

Avant dosage, les hydrates de carbone particulaires sont placés au surgélateur (-82°C) puis lyophilisés durant 24 h. Ces hydrates de carbone lyophilisés sont tout d'abord extraits dans 2 ml d'eau douce ultra pure et placés dans un bain à ultrason (280 Watts) à 30°C durant dix minutes. L'échantillon est ensuite centrifugé dix minutes à 4400 rpm et le surnageant est mis de côté en attente de dosage. Le culot, quant à lui, subit une deuxième extraction au Na-EDTA 0,1M pendant 4 h à température ambiante.

Le dosage des hydrates de carbone, dissous comme particulaires, s'effectue séparément pour les monosaccharides et les polysaccharides qui nécessitent une hydrolyse acide (HCl, 1M) de 24 h à 100°C. Le dosage s'effectue selon la méthode décrite par Parson *et al.* (1984) utilisant le 3-methyl-2-benzo thiazoline hydrazone hydrochloride (MBTH), qui produit un complexe

coloré absorbant à 635 nm. L'absorbance ainsi mesurée est alors comparée à celles d'une gamme étalon de glucose. Les résultats sont exprimés en mg Eqglc.l⁻¹.

Le calcul de la production d'hydrates de carbone par jour et par cellule se fait par l'application de la formule suivante :

$$S = [(S_t - S_{t-1}) + (S_{t-1} - S_0)D]V / Cell_t$$

Avec S la production d'hydrates de carbone (mg Eqglc.cells⁻¹.day⁻¹), S_t et S_{t-1} la concentration d'hydrates de carbone aux jours t et $t-1$ (mg Eqglc.l⁻¹), S_0 la concentration d'hydrates de carbone du milieu neuf, V le volume total (l), $Cell_t$ la quantité de cellules au jour t (cell.l⁻¹), et D le taux de dilution (day⁻¹).

Le calcul du PER (Percentage Extracellular Release) est basé sur la production d'hydrates de carbone dissous (S_d) et particulaires (S_p) :

$$PER = 100 \times \frac{S_d}{(S_p + S_d)}$$

IV.2.6 Mesure du carbone organique particulaire (COT)

Des prélèvements de 50 ml ont été réalisés trois fois durant l'expérience, les mêmes jours que ceux effectués pour l'étude des hydrates de carbone, et immédiatement filtrés sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/F, préalablement chauffés à 450°C pendant 4 h, pour l'étude du carbone organique particulaire total (COT). Ce COT a été mesuré sur un analyseur CHN (CE instrument Fisons Na 2100) en utilisant de l'acétanilide comme standard carboné, de l'O₂ ultra pur comme gaz de combustion et de l'hélium en tant que gaz de transport. Avant d'être analysés, les filtres ont été séchés et exposés à des vapeurs d'HCl durant 4h à des fins de décarbonatation. Le carbone organique particulaire total (COT) sera utilisé dans notre étude comme indicateur de biomasse.

IV.2.7 Chlorophylle a

La concentration en chlorophylle a a été mesurée selon le protocole décrit par Welshmeyer *et al.* (1994) sans acidification. Un échantillon de 50 ml a été prélevé trois fois durant l'expérimentation, filtré sur filtre GF/F (à l'obscurité) et placé au surgélateur (-82°C) en attente d'analyse. L'extraction de chlorophylle est réalisée en broyant les filtres dans 8 ml

d'acétone 90%. L'échantillon était alors placé durant 12 h à 6°C et à l'obscurité. Une fois la chlorophylle extraite, l'échantillon est centrifugé à 3000 rpm pendant cinq minutes pour séparer la fraction particulaire, constituée de nombreux débris de filtre, et la fraction dissoute contenant la chlorophylle *a*. La concentration de chlorophylle *a* était alors mesurée à l'aide d'un fluorimètre TRILOGY (Turner Designs) équipé du module « Chl-a N/A ». Un standard de chlorophylle pur a été utilisé pour la réalisation de la gamme étalon.

IV.2.8 Paramètres photosynthétiques

Afin de faire le lien entre la quantité d'hydrates de carbone et leur source, les réponses de la photosynthèse, ici en tant que taux de transfert d'électrons au niveau du PSII, sont étudiées. Les protocoles expérimentaux et méthodes de calcul ont été décrits dans le chapitre précédent (section matériels et méthodes). Pour cette étude nous nous concentrerons sur le taux de transfert d'électrons estimé dans des conditions lumineuses équivalentes à celles de nos expérimentations : ETR_{110}^{cell} . Le calcul de ce taux de transfert d'électrons à $110 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ est possible à partir du taux de transfert relatif des électrons ($rETR_{max}$, $\mu\text{mol e}^{-}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), de l'efficacité maximale relative d'utilisation de la lumière (α , $\mu\text{mol e}^{-}\cdot\mu\text{mol photons}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), de la quantité de lumière (E , ici $E=110 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), de la concentration en chlorophylle *a* (Chl *a*, $\text{mg Chl}\cdot\text{l}^{-1}$), du nombre de cellule ($cell$, en cellules. l^{-1}) et du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (a^* , $\text{m}^2\cdot\text{mg Chl}\cdot\text{l}^{-1}$) en appliquant la formule suivante :

$$ETR_{110}^{cell} = rETR_{max} \times \left(1 - e^{\frac{-\alpha E}{rETR_{max}}} \right) \times a^* \times \frac{Chl\ a}{cell}$$

IV.2.9 Analyses statistiques

Afin de tester l'effet de la température, des sels nutritifs (N-lim ou P-lim) ou de leurs interactions sur la quantité d'hydrates de carbone par cellule, la production d'hydrates de carbone par cellule, le taux de transfert d'électrons à $110 \mu\text{mol photons}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (ETR_{110}) et la biomasse carbonée (POC), des modèles linéaires généraux (GLM) sont appliqués. Les données utilisées correspondent aux mesures effectuées durant la phase stationnaire de croissance pour les conditions limitées en sels nutritifs. Cette phase stationnaire est choisie car elle marque la présence d'une limitation en sels nutritifs. De plus, les différentes variables utilisées pour la GLM ne montraient pas d'évolution en fonction du temps. Ces données sont

comparées aux valeurs du témoin qui, quant à eux, montrent des variations en fonction du temps du fait de l'épuisement (pour certaines expérimentations) des sels nutritifs en toute fin d'expérience. Les données représentatives du témoin ont donc été prises durant la phase de croissance exponentielle, en absence de limitation. Afin de satisfaire les conditions d'applications, les données ont été normalisées (si besoin) via des transformations de type Box-Cox (Box and Cox, 1964). Une fois les effets de la température, des sels nutritifs ou de leur interaction identifiés par les GLM, un test post hoc de Tukey était appliqué pour qualifier statistiquement la présence ou l'absence de différence significative entre les traitements en fonction des conditions environnementales et de leur interaction.

Des régressions linéaires ont été effectuées afin de définir les relations entre la quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous, dans les différents traitements aux deux températures sans distinction de l'espèce. Ces régressions, réalisés par traitement et par température, sont toutes significatives ($R^2 > 0.65$, $p < 0.001$). Une ANCOVA a ensuite été réalisée pour tester si la température ou la limitation influençaient la pente de la régression et l'ordonnée à l'origine.

IV.3 Résultats

IV.3.1 Quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous

Les réponses de la concentration en hydrates de carbone dissous et particulaires totaux par cellule en fonction de la limitation en sels nutritifs, de la température ou de leurs interactions ont été étudiées. Les résultats mettent en évidence des réponses spécifiques aux différentes conditions environnementales. Les résultats seront donc décrits par espèce dans un premier temps. Dans une seconde partie nous décrirons les relations entre la taille et le contenu ou la production de ces hydrates de carbone.

Ditylum brightwellii (Db)

Aucun effet lié à la limitation en sels nutritifs n'a été observé chez Db en ce qui concerne la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires totaux par cellule. Cependant, la température influence ces deux paramètres, des valeurs plus fortes ayant été observées à 14°C comparativement à 10°C (GLM, $p < 0,001$). Toutes conditions confondues, les valeurs étaient

en moyenne 2,2 et 2,9 fois supérieures à 14°C respectivement pour les hydrates de carbone dissous et les hydrates de carbone particuliers (Fig.IV-1).

Thalassiosira rotula (Tr)

Le patron de réponse chez *Thalassiosira rotula* (Tr) présente des effets interactifs des sels nutritifs et de la température sur les hydrates de carbone dissous et particuliers (Fig.IV-1). Ces interactions aboutissaient à des valeurs 3 et 2,4 fois plus élevées dans N-lim et P-lim par rapport au témoin à 10°C et 4 et 6,3 plus élevées dans N-lim et P-lim comparé au témoin à 14°C (Tukey, $p < 0,05$) en ce qui concerne les hydrates de carbone dissous. Cette plus forte différence entre le témoin et les conditions limitées à 14°C s'explique par une diminution de la concentration en hydrates de carbone dissous par cellule dans le témoin à 14°C (0,09 ng Eqglc.cell⁻¹) en comparaison des valeurs du témoin à 10°C (0,29 ng Eqglc.cell⁻¹) (Fig.IV-1a). Le même patron que celui observé pour les hydrates de carbone dissous par cellule était observé pour les hydrates de carbone particuliers avec des valeurs plus élevées en condition limitée que dans les témoins. En effet, des contenus en hydrates de carbone particuliers 3 et 2,5 fois plus élevés que dans le témoin étaient observés dans N-lim et P-lim à 10°C. A 14°C, la différence est plus marquée avec des valeurs 5,8 et 12,3 fois plus élevées dans N-lim et P-lim par rapport au témoin. Là encore ce patron résulte d'une diminution du contenu en hydrates de carbone particuliers dans le témoin à 14°C (0,27 ng Eqglc.cell⁻¹) comparativement au contenu à 10°C (1,16 ng Eqglc.cell⁻¹) (Fig.IV-1b).

Skeletonema sp. (Ske)

Ske montrait également des effets interactifs de la température et des sels nutritifs sur les quantités d'hydrates de carbone dissous et particuliers ramenées au nombre de cellules (GLM, $p < 0,01$). Aucune différence dans la quantité d'hydrates de carbone dissous n'était observée à 10°C tandis qu'à 14°C les conditions limitées présentent des valeurs d'hydrates de carbone dissous 1,4 fois supérieures au témoin (Fig.IV-1). Les valeurs observées à 14°C dans les conditions limitées ne diffèrent pas significativement de celles observées à 10°C. La différence observée à 14°C résulte d'une diminution de la quantité d'hydrates de carbone dissous dans le témoin à 14°C tout comme pour Tr (Tukey, $p < 0,05$).

Les hydrates de carbone particuliers présentent quelques différences dans leur patron de réponse face aux interactions sels nutritifs/température. Tout d'abord, comme observé pour les hydrates de carbone dissous, il n'y avait aucune différence dans le contenu en hydrates de

carbone par cellules à 10°C en fonction de la condition. A 14°C, les cellules contenaient davantage d'hydrates de carbone dans les conditions limitées que dans le témoin, avec des contenus 4 fois plus élevés en conditions limitées. De plus dans P-lim ces valeurs étaient supérieures à celles observées à 10°C (Tukey, $p < 0,05$). Enfin, comme observé pour Tr, le témoin à 14°C présente un contenu moyen en hydrates de carbone inférieur à celui observé à 10°C avec une diminution de l'ordre de 4 fois. Des différences plus fortes entre les conditions limitées et le témoin sont observées à 14°C comparativement à 10°C pour *Ske* (Fig.IV-1).

Phaeocystis globosa (Pg)

Pg est marquée par l'absence d'interactions sels nutritifs/température associée à de fortes variabilités de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires ramenée au nombre de cellules. Du fait de cette variabilité aucun effet sels nutritifs ou température n'est observé sur les hydrates de carbone dissous (Fig.IV-1a). Concernant les hydrates de carbone particulaires, un effet sels nutritifs et température est observé à 14°C tandis qu'à 10°C les contenus en hydrates de carbone particulaires ne diffèrent pas quel que soit le traitement ou la température (Fig.IV-1b). A 14°C, Pg montrait des valeurs d'hydrates de carbone particulaires par cellule dans le milieu N-lim 6,5 fois plus élevées que dans le témoin. Cette valeur est également significativement plus élevée que celles observées à 10°C quelle que soit la condition (Tukey, $p < 0,05$).

Hemiselmis rufescens (Hr)

Tous les paramètres relatifs à la quantité d'hydrates de carbone ramenée au nombre de cellules répondaient à un effet température et sels nutritifs, et ce, sans interaction entre ces deux conditions environnementales (GLM, $p < 0,001$). Premièrement, une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone dissous était observée dans les conditions N-lim à 10°C (0,18 ng Eqglc.cell⁻¹) et dans les conditions N-lim (1,22 ng Eqglc.cell⁻¹) et P-lim (0,55 ng Eqglc.cell⁻¹) à 14°C comparativement aux valeurs relevées dans les conditions témoin à 10°C (0,02 ng Eqglc.cell⁻¹) et 14°C (0,07 ng Eqglc.cell⁻¹) (Fig.IV-1a). De plus, une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone dissous avec la température était observée. Deuxièmement concernant les hydrates de carbone particulaires, une augmentation, avec des valeurs 11 et 14 fois supérieures, dans la condition N-lim à 10°C et 14°C comparativement au témoin était observée (Fig.IV-1b). L'effet température est toujours le même quel que soit le paramètre d'intérêt avec une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone par cellules quand la température augmente, comme observé pour Db et pour la condition N-lim chez Pg.

IV.3.1 Effet taille

Il existe une relation linéaire positive significative entre la taille et la quantité d'hydrates de carbone dissous et la quantité d'hydrates de carbone particuliers par cellule (Fig.IV-2) ($R^2 > 0,40$, $p < 0,001$), et ce, même en l'absence de distinction de traitement et de température. Les mêmes relations étaient observées pour la production d'hydrates de carbone par cellule, en $\text{ng Eqglc. cell}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ ($R^2 > 0,31$, $p < 0,001$). Aucune relation significative n'a été trouvée concernant la proportion d'hydrates de carbone exsudés, communément appelée PER (Percentage Extracellular Release), en fonction du volume de la cellule. Cette absence de relation due à une forte variabilité, implique des réponses différentes de nos espèces indépendamment de la taille, même au sein du groupe des diatomées (Fig.IV-3).

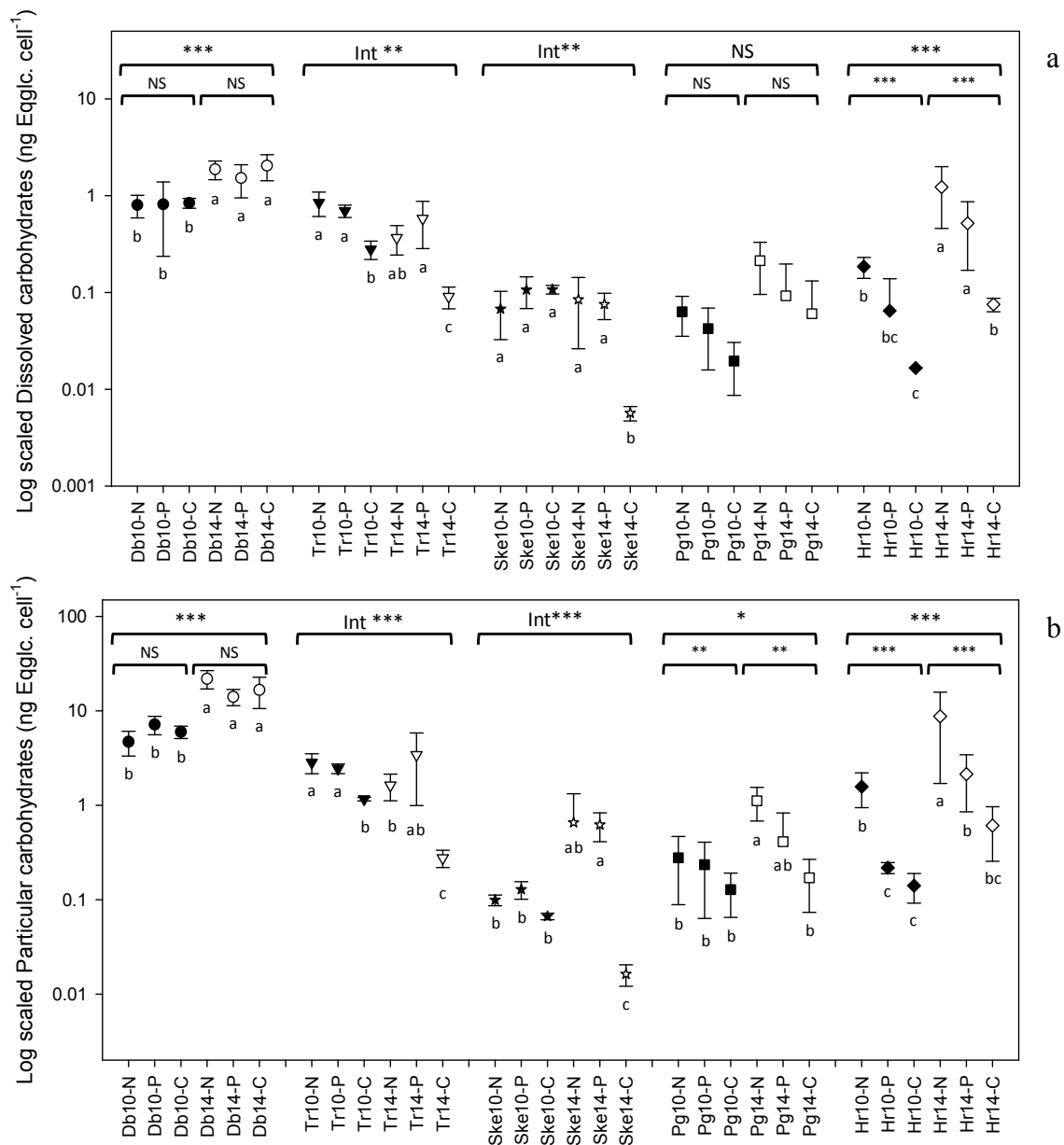


Fig. IV-1 : effets de la température (crochet supérieur), de la limitation en sels nutritifs (crochets inférieurs) ou de leur interaction (Int) sur la quantité d'hydrates de carbone dissous (a) et particulaires (b) totaux par cellule pour *Db*, *Tr*, *Sk*, *Pg* et *Hr* dans les conditions limitées en azote ('espèce'-N), en phosphore ('espèce'-P) ou dans le témoin ('espèce'-C) à 10°C et 14°C. Pour chacune des espèces, les moyennes ne montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test post-hoc de Tukey <0,05). Les résultats du modèle linéaire général significatifs sont indiqués de la manière suivante : * pour $p<0,05$, ** pour $p<0,01$, *** pour $p<0,001$ et NS quand les différences sont non significatives. Les barres représentent les écarts types.

Si la relation entre le contenu en hydrates de carbone et le volume de la cellule n'est plus abordée en quantité d'hydrates de carbone par cellule mais ramenée à une unité volumétrique le patron observé n'est plus le même. En effet, une relation linéaire significative négative entre la quantité d'hydrates de carbone dissous par unité de volume et la taille était présente (Fig.IV-4a ; $R^2=0,56$, $p<0,001$). Une relation similaire était observée entre la taille et le contenu en hydrates de carbone particulaires (Fig.IV-4b ; $R^2=0,43$, $p<0,001$). Les mêmes relations étaient observées pour la production d'hydrates de carbone par unité de volume, en $\text{ng Eqglc} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{jour}^{-1}$ ($R^2>0,23$, $p<0,001$). Il apparaît que le contenu et la production d'hydrates de carbone par cellule sont élevés chez *Hr* compte tenu de sa taille, *Hr* présentant à 14°C les plus grandes quantités d'hydrates de carbone par unité de volume. Cela influençait la régression en apportant de la variabilité et un écart à la régression (Fig.IV-4).

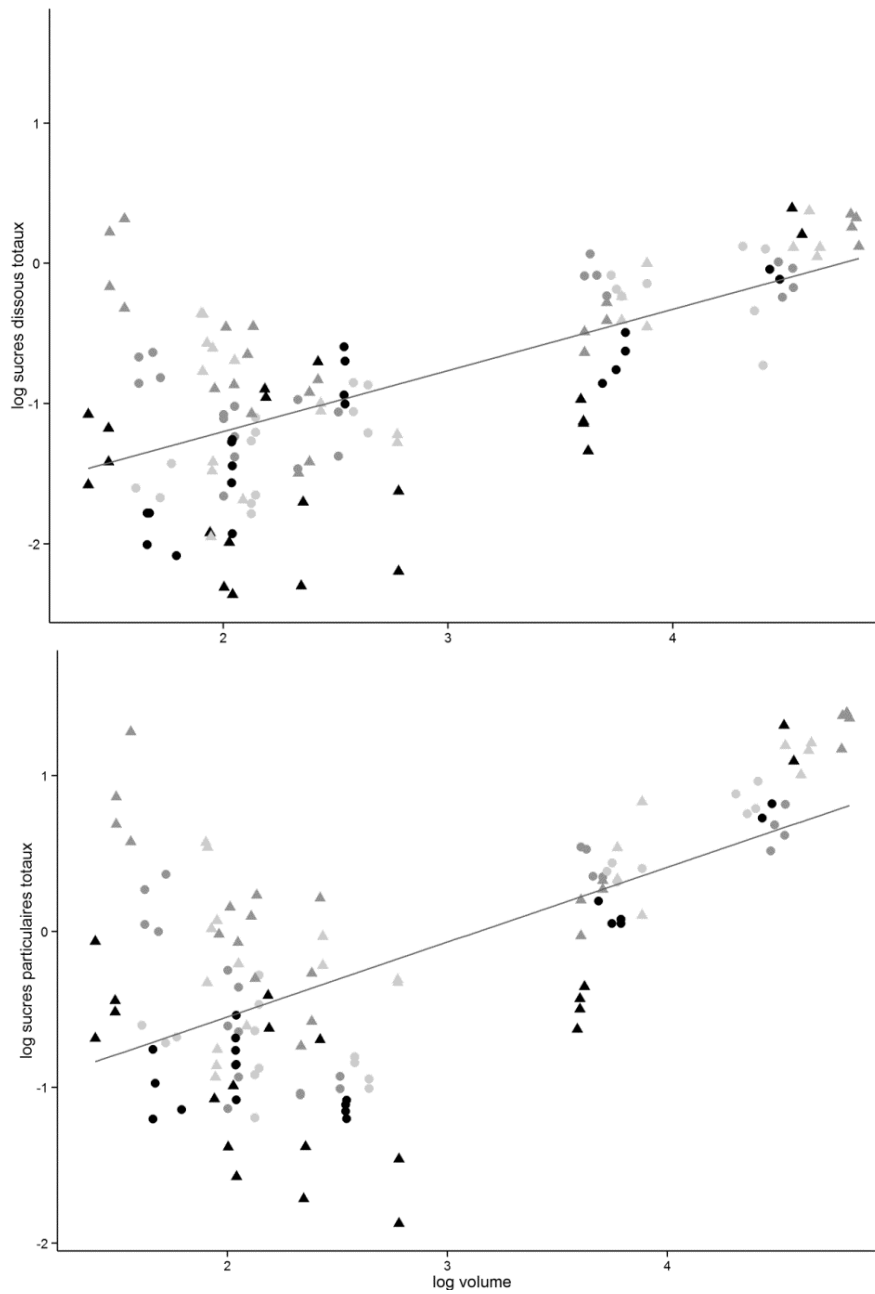


Fig. IV-2 : Evolution du logarithme de la quantité d'hydrates de carbone dissous (a) et particulaires (b) totaux ($\text{ng Eqglc.cell}^{-1}$) par cellule en fonction du logarithme du biovolume (μm^3) dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle)

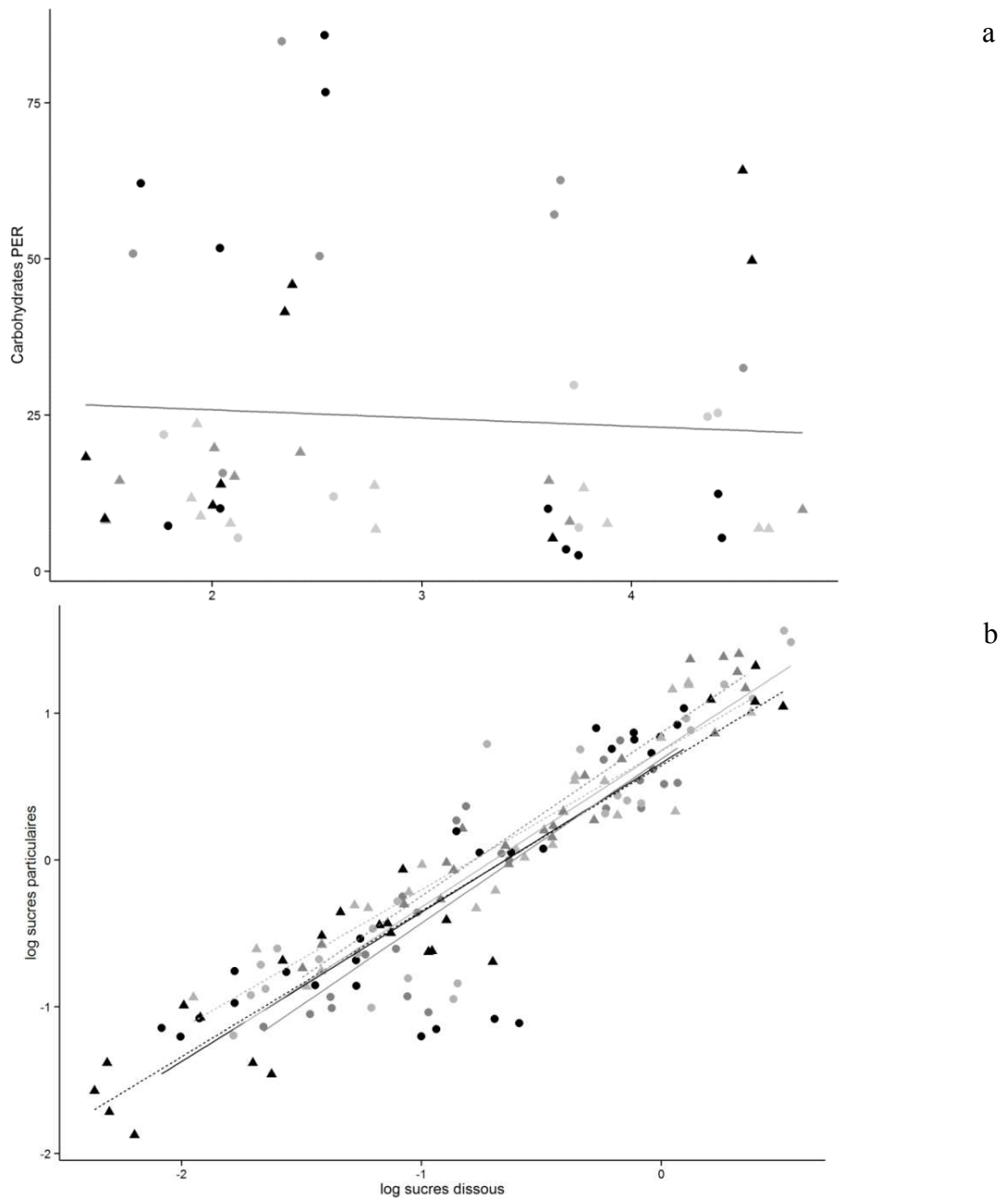


Fig. IV-3: Pourcentage d'hydrates de carbone exsudés (PER) en fonction du logarithme du biovolume (μm^3) (a) dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle). (b) Evolution de la quantité d'hydrates de carbone particulaires en fonction de la quantité d'hydrates de carbone dissous pour Db, Tr, Ske, Pg et Hr dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle). Les régressions linéaires suivent le même code couleur que les conditions. En trait plein les différentes conditions à 10°C. En pointillé les différentes conditions à 14°C

IV.3.2 Relation hydrates de carbone particulaires/hydrates de carbone dissous

Des régressions linéaires ont été tracées, pour chaque condition à chaque température, afin de qualifier les relations entre la quantité d'hydrates de carbone particulaires et la quantité d'hydrates de carbone dissous. Quel que soit le traitement ces deux variables sont

positivement corrélés, la quantité d'hydrates de carbone particulaires augmente avec la quantité d'hydrates de carbone dissous ($R^2 > 0,65$, $p < 0,001$). Les analyses de covariance (ANCOVA) indiquent que la température et la condition de sels nutritifs n'influencent ni la pente des régressions, ni l'ordonnée à l'origine (ANCOVA, $p > 0,05$). L'évolution de la quantité d'hydrates de carbone particulaires par rapport aux hydrates de carbone dissous est donc la même quelle que soit la condition (Fig. IV-3).

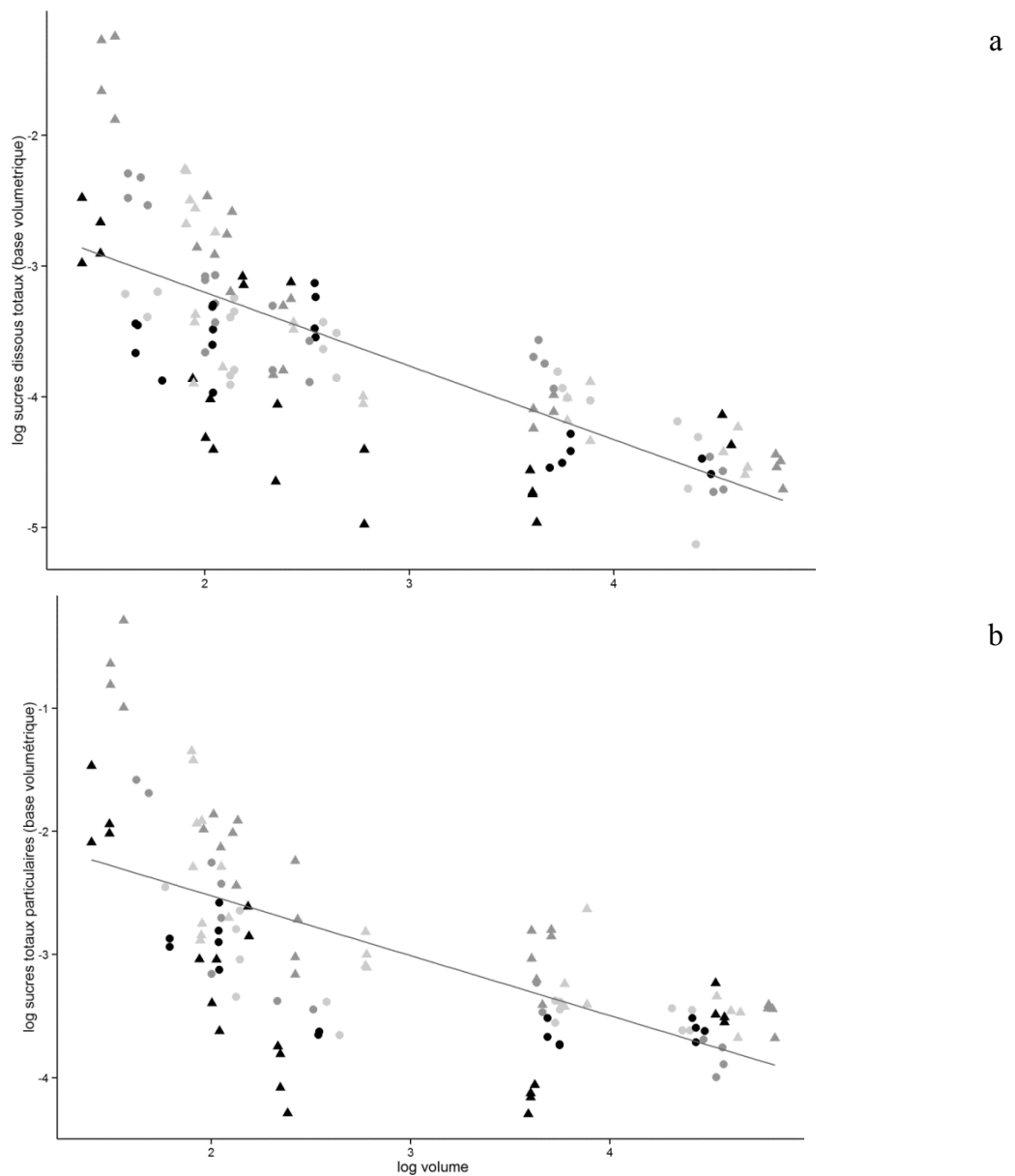


Fig. IV-4: Evolution du logarithme de quantité d'hydrates de carbone dissous totaux (a, $\text{ng Eqglc.jour}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) et du contenu en hydrates de carbone particulaires (b, $\text{ng Eqglc} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) par unité de biovolume en fonction du logarithme du biovolume (μm^3) dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir) à 10°C (cercle) et 14°C (triangle).

IV.3.3 Photosynthèse

La production d'hydrates de carbone dépend directement de l'activité photosynthétique des cellules algales. Les effets de la limitation en sels nutritifs, de la température ou de leurs interactions sur le taux de transfert d'électrons du PSII (ETR_{110}^{cell}), sous une intensité lumineuse de $110 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, calculé selon le modèle de Webb *et al.* (cf chapitre précédent), sont étudiés (Fig.IV-5). Ce taux de transfert d'électrons diminue dans les conditions N-lim pour *Db* selon l'interaction de la température et des sels nutritifs. Un effet plus fort est observé à 10°C avec des valeurs 4,1 fois et 1,2 fois inférieures au témoin à 10°C et 14°C . Un effet sels nutritifs aboutit à une diminution de ETR_{110}^{cell} dans les conditions limitées pour *Tr* et *Ske*. De plus les valeurs observées dans les conditions limitées à 14°C sont significativement plus basses que celles rencontrées à 10°C montrant, à l'inverse de *Db*, un renforcement de l'effet sels nutritifs à 14°C . Un effet interactif amène à une diminution de ETR_{110}^{cell} dans la condition N-lim à 10°C pour *Pg* tandis qu'à 14°C aucun effet significatif n'est observé. Enfin *Hr*, présentait un effet interactif des sels nutritifs et de la température avec une diminution significative de ETR_{110}^{cell} uniquement dans N-lim ($4,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1}$) à 14°C comparativement au témoin ($4,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

IV.3.1 Carbone organique particulaire total (COT)

Le carbone organique particulaire (COT) est ici utilisé en tant qu'indicateur de biomasse carbonée. Ce COT, qui résulte de la photosynthèse, variait de manière spécifique en réponse à la limitation en sels nutritifs, à la température ou à leurs interactions.

Db présentait dans la condition N-lim des valeurs de COT 1,4 fois inférieures à celles observées dans le témoin à 10°C et 14°C (Tukey, $p < 0,05$) (Fig.IV-6), les conditions P-lim et témoin ne différant pas entre elles (Tukey, $p > 0,05$). De plus une diminution du COT avec la température était observée (GLM, $p < 0,001$). Concernant *Tr*, un effet interactif sels nutritifs/température était observé et résultait en la diminution de la quantité de carbone dans les conditions limitées en sels nutritifs comparé aux témoins quelle que soit la température (Tukey, $p < 0,05$). A 10°C , des valeurs 4,1 et 6,1 fois inférieures à celles du témoin étaient observées dans N-lim et P-lim. Ces derniers ne différant pas entre eux.

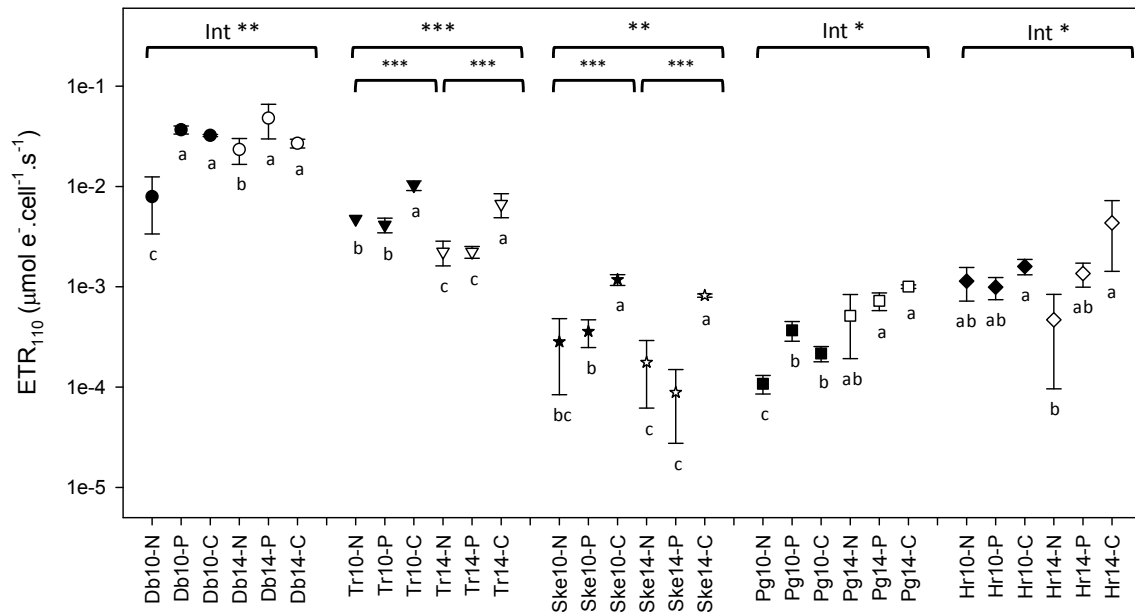


Fig. IV-5: effets de la température (crochet supérieur), de la limitation en sels nutritifs (crochets inférieurs) ou de leur interaction (Int) sur le taux de transport d'électron (ETR_{110}^{cell} , $\mu\text{mol e}^{\cdot}\text{.cell}^{-1}\text{.s}^{-1}$) à la lumière d'exposition de l'expérimentation ($110 \mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$) pour *Db*, *Tr*, *Sk*, *Pg* et *Hr* dans les conditions limitées en azote ('espèce'-N), en phosphore ('espèce'-P) ou dans le témoin ('espèce'-C) à 10°C et 14°C. Pour chacune des espèces, les moyennes ne montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test post-hoc de Tukey $<0,05$). Les résultats du modèle linéaire général significatifs sont indiqués de la manière suivante : * pour $p<0,05$, ** pour $p<0,01$, *** pour $p<0,001$ et NS quand les différences sont non significatives. Les barres représentent les écarts types.

A 14°C, une diminution de 5,2 et 3 fois a été mesurée dans le N-lim et P-lim comparé au témoin. La biomasse carbonée dans P-lim étant, cette fois-ci significativement supérieure à N-lim (Tukey, $p<0,05$). Des interactions ont également été constatées sur le COT chez Ske, avec des valeurs inférieures au témoin dans les conditions limitées, tandis qu'il n'y avait aucune différence entre N-lim et P-lim à une même température. A 10°C, une diminution du COT de 3,2 dans la condition N-lim et 2,2 fois dans P-lim était mesurée tandis qu'à 14°C les valeurs dans les conditions limitées étaient 4,5 fois inférieures à celle du témoin (Tukey, $p<0,05$). Enfin, la biomasse carbonée était plus faible à 14°C qu'à 10°C. Un effet sels nutritif et un effet température, sans interaction, a été observé chez Pg avec une diminution du COT de 2,8 et 2 fois dans les conditions N-lim et P-lim par rapport au témoin à 10°C et de 4,2 et 2,5 fois dans les conditions N-lim et P-lim à 14°C (Fig.IV-6). Comme observé pour Ske, une diminution de la biomasse carbonée était observée à 14°C (GLM, $p<0,001$). Concernant Hr, le COT répondait à l'interaction entre les sels nutritifs et la température (GLM, $p<0,01$). La condition N-lim montrait des valeurs 2,7 et 2,1 fois inférieures à celles du témoin respectivement à 10°C et 14°C. La condition P-lim ne montrait pas de différences avec le

témoin à 10°C tandis qu'à 14°C le COT dans P-lim était 1,2 fois inférieure à celles du témoin (Tukey, $p < 0,05$) (Fig.IV-6).

Les effets de la limitation en sels nutritifs n'aboutissent qu'à un effet moindre chez Db comparativement aux autres espèces, soulignant encore une fois la faible réponse de cette espèce à la limitation en sels nutritifs.

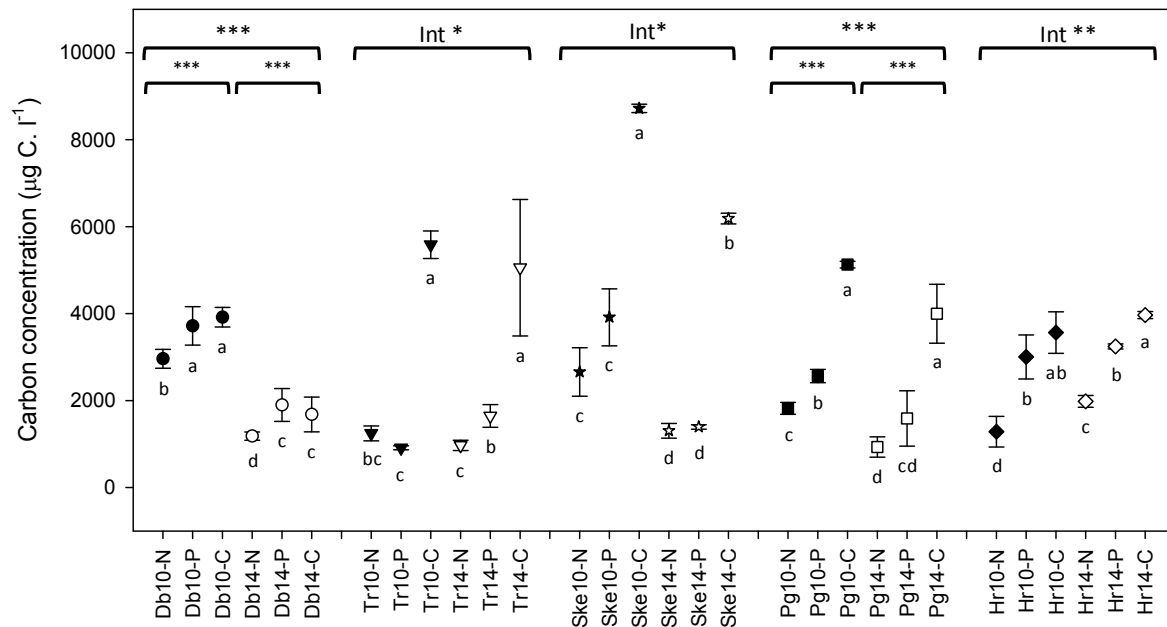


Fig. IV-6: effets de la température (crochet supérieur), de la limitation en sels nutritifs (crochets inférieurs) ou de leur interaction (Int) sur biomasse carbonée ($\mu\text{g C.l}^{-1}$) pour Db, Tr, Sk, Pg et Hr dans les conditions limitées en azote ('espèce'-N), en phosphore ('espèce'-P) ou dans le témoin ('espèce'-C) à 10°C et 14°C. Pour chacune des espèces, les moyennes ne montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test post-hoc de Tukey $< 0,05$). Les résultats du modèle linéaire général significatifs sont indiqués de la manière suivante : * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$, *** pour $p < 0,001$ et NS quand les différences sont non significatives. Les barres représentent les écarts types.

IV.4 Discussion

Notre étude fait apparaître d'intéressants patrons de variations spécifiques de la production d'hydrates de carbone en réponse à la température, la concentration en sels nutritifs et leurs interactions. En effet, Db montre une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires à 14°C tandis que la quantité d'hydrates de carbone est indépendante de la concentration en sels nutritifs pour cette espèce. Tr, Ske, Pg et Hr présentent des variations spécifiques de leur quantité d'hydrates de carbone particulaires et/ou dissous différentes selon l'élément nutritif limitant, la température voire leurs interactions.

Contrairement à la production d'hydrates de carbone chez Db, Hr et Tr sur lesquelles il existe un manque de connaissance du fait de l'absence de littérature, les effets des conditions environnementales sur la production d'hydrates de carbone chez Pg et Ske sont davantage connus. Néanmoins les patrons de réponse observés chez ces espèces diffèrent quelque peu des observations de nos prédécesseurs.

La limitation en sels nutritifs et la température vont influencer la physiologie de la cellule à plusieurs niveaux, en amont et en aval de la production d'hydrates de carbone, qui se révèlent interdépendants. Par ailleurs, contrairement aux résultats décrits dans le chapitre précédent sur la photosynthèse qui montrait un patron de réponse tributaire de la taille des cellules en fonction des différentes conditions expérimentales, la production d'hydrates de carbone va davantage dépendre du taxon étudié que du volume de la cellule. Nous aborderons donc nos résultats en détaillant tout d'abord les réponses de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires, du taux de transfert d'électrons et de la concentration en COT à la limitation en azote et phosphore. Puis nous nous intéresserons à l'effet de la température sur ces mêmes paramètres. Enfin nous verrons quelles sont les conséquences de l'interaction sels nutritif-température, quand elle existe, sur ces différents niveaux d'études. Dans une deuxième partie, nous discuterons des relations entre le contenu et la production d'hydrates de carbone tout d'abord en fonction de la taille puis en fonction du taxon.

IV.4.1 Effet de la température, de la limitation en azote ou en phosphore ou de leurs interactions

IV.4.1.1 Effet de la concentration en sels nutritifs sur la quantité d'hydrates de carbone

Les effets de la limitation en sels nutritifs sont étudiés à trois niveaux : la quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous, la photosynthèse via le taux de transfert d'électrons à 110 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($\text{ETR}_{110}^{\text{cell}}$) et enfin la biomasse carbonée (COT) qui résulte de l'intégration de ces hydrates de carbone particulaires pour la production de cellules. Ces trois niveaux d'études sont interdépendants et leur étude simultanée nous permet de mieux comprendre les variations observées sur les hydrates de carbone particulaires et dissous. Il n'y a pas de patron de réponse commun quant à l'évolution de la quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous en réponse aux limitations en DIN et DIP. En effet, ce patron de réponse varie selon l'espèce considérée.

Concernant Ske, une diminution de ETR_{110}^{cell} et de la biomasse carbonée était observée dans les conditions limitées quelle que soit la température. Concernant la quantité d'hydrates de carbone, à 10°C aucun effet de la limitation en azote ou phosphore n'était observé sur les hydrates de carbone particuliers alors qu'à 14°C une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone par cellule dans les conditions limitées en azote et en phosphore était observée, en accord avec les observations de Granum *et al.* (2002) et Mykkestad (1977) pour l'effet azote et Urbani *et al.* (2005) pour l'effet phosphore chez *Skeletonema costatum*. A 10°C le métabolisme est fortement ralenti, la température optimale pour la production carbonée de *Skeletonema costatum* et *Skeletonema marinoi* se situant davantage aux alentours de 20°C (Claquin *et al.*, 2008; Hitchcock, 1980). Cela implique une production moindre d'hydrates de carbone, associée à une production moindre de cellule, et donc, que la production d'hydrates de carbone n'excède pas les besoins métaboliques des cellules à 10°C, du fait d'un métabolisme global plus lent. Les études précédemment menées sur *Skeletonema costatum* ont été réalisées à des températures supérieures à 10°C, à savoir 13°C par Granum *et al.* (2002) et Mykkestad (1977) et 18°C pour Urbani *et al.* (2005). Ces différences de température peuvent être à l'origine des différences observées entre nos études respectives. Concernant les hydrates de carbone dissous, Ske est connue pour ne pas excréter davantage d'hydrates de carbone dans des conditions de limitation en sels nutritifs (Granum *et al.*, 2002; Mykkestad, 1977; Urbani *et al.*, 2005). Nous observons la même réponse à 10°C. À 14°C une différence significative existe entre les conditions limitées en azote et phosphore et le témoin qui présente des quantités d'hydrates de carbone dissous nettement inférieures. Cette différence entre les conditions limitées et le témoin peut soit (1) résulter d'une augmentation de l'exsudation en condition limitées, ou (2) dépendre du taux de croissance fort des cellules dans le témoin à 14°C qui, par conséquent, présentent une quantité d'hydrates de carbone par cellule plus faible (Wang *et al.*, 2010). La quantité d'hydrates de carbone particuliers dans le témoin montre la même tendance, renforçant l'hypothèse basée sur le taux de croissance.

En ce qui concerne Pg, une augmentation des hydrates de carbone particuliers dans la condition N-lim est observée à 14°C, en concordance avec la littérature (Mari *et al.*, 2005; Van Rijssel *et al.*, 1997), alors que dans les autres conditions le patron observé dérive de celui attendu. En effet, aucun effet significatif de la limitation en azote (à 10°C) et en phosphore (quelle que soit la température) n'est observé sur la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers par cellules. L'augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers dans N-lim à 14°C est liée à une diminution de l'investissement dans la formation de

biomasse alors que la production d'hydrates de carbone via la photosynthèse perdure. Concernant les hydrates de carbone dissous à 10°C et 14°C, et les hydrates de carbone particuliers à 10°C, l'absence de réponse à la limitation en sels nutritifs est due à de forts écarts types, probablement liés au cycle de vie de Pg. En effet cette espèce montre dans nos expériences, selon les conditions et parfois même les réplicas, une alternance rapide des formes flagellées et coloniales qui présentent des caractéristiques physiologiques différentes (Verity *et al.*, 1991). Malgré l'absence de réponse au niveau des hydrates de carbone, une diminution de ETR^{cell}_{110} dans N-lim ainsi qu'une diminution de biomasse sont observées à 10°C dans les milieux limités en sel nutritifs résultant de l'effet de ces limitations.

Il n'existe, à notre connaissance, pas de littérature sur l'effet de la limitation en DIN ou DIP sur la production d'hydrates de carbone chez Db, Tr et Hr. Ces trois espèces présentent des patrons de réponse différents aux mêmes limitations. En effet, aucun effet de la limitation en sels nutritifs sur la production d'hydrates de carbone chez *Db* n'est ici mis en évidence. Malgré l'absence de réponse quant à la production d'hydrates de carbone, une diminution de ETR^{cell}_{110} associée à une diminution de biomasse carbonée sont observées dans la condition N-lim. Un effet négatif de la limitation en azote est alors observé en amont et en aval de la production d'hydrates de carbone qui, elle, ne diffère pas selon les conditions. Cela peut résulter d'une utilisation des hydrates de carbone en continu, au fur et à mesure de leur production, conduisant à l'absence d'accumulation d'hydrates de carbone. La quantité d'hydrates de carbone produits n'excéderait pas les besoins des cellules en condition limitée en azote quelle que soit la température. Cela se répercute également sur la quantité d'hydrates de carbone dissous. Cette observation pourrait également être liée à la taille des cellules, *Db* montrant les plus grandes cellules dans notre étude. Les réponses observées ici qui peuvent être liées à la taille seront détaillées plus loin dans la discussion.

Tr montre un patron de réponse, plus en accord avec celui largement observé chez diverses diatomées, qui se traduit par l'augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous par cellule dans les conditions limitées en azote et en phosphore comme l'ont déjà observé, par exemple, Mykkestad (1974, 1977) et Urbani *et al.* (2005) sur d'autres Thalassiosirales. Cette augmentation de la quantité d'hydrates de carbone par cellule est associée à une biomasse carbonée et un ETR^{cell}_{110} moindres. Chez Hr, une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers est observée dans la condition N-lim en accord avec les observations qu'avaient fait Da Silva *et al.* (2009) chez une autre cryptophyceae. Cette augmentation d'hydrates de carbone particuliers est suivie par une augmentation de la

quantité d'hydrates de carbone dissous dans la condition N-lim. Le phosphore a une influence moindre que l'azote sur la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaire. En effet, seule une augmentation d'hydrates de carbone dissous à 14°C est observée pour Hr dans les conditions limitées en phosphore.

IV.4.1.2 Effets de la température

La température est un paramètre environnemental d'importance sur la physiologie du phytoplancton compte tenu de la dépendance à la température des processus enzymatiques (Brown *et al.*, 2004; Gillooly *et al.*, 2001). La littérature montre que, dans une gamme de températures favorables, l'activité photosynthétique des microalgues a tendance à augmenter avec la température, et ce jusqu'à une température optimale à partir de laquelle la capacité photosynthétique diminue (Davison, 1991). Il en est de même pour le taux de croissance (Gillooly *et al.*, 2001; Raven and Geider, 1988). Le taux de croissance et la quantité d'hydrates de carbone particulaires étant négativement corrélés, une diminution de la quantité d'hydrates de carbone par cellule quand la température augmente est en théorie attendue en absence d'autre stress.

De ce que nous en savons, il n'y a pas d'études qui traitent de l'effet température sur la production d'hydrates de carbone pour Db, Tr, Pg et Hr et, comparativement aux sels nutritifs, peu d'études se sont intéressées à l'évolution de la quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous en fonction de la température. De plus, ces études n'ont pas nécessairement été réalisées dans la même gamme de température que nos expérimentations, compliquant alors la comparaison des résultats obtenus ici à ceux des autres études. Toutefois, ces études mettent en évidence l'existence de relations spécifiques entre la température et la production d'hydrates de carbone. En effet, Claquin *et al* (2008) en étudiant la production de TEP (Transparent Exopolymeric Particles), qui représentent une fraction de nos hydrates de carbone particulaires dans cette étude, ont mis en évidence des réponses spécifiques en fonction de la température avec une augmentation de la quantité de TEP quand la température augmente jusqu'à une température optimale pour les diatomées tandis que *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) et *Lepidodinium chlorophorum* (Dinophyceae) ne montraient pas de lien clair entre production de TEP et température. En s'intéressant à la relation hydrates de carbone/température chez une diatomée, deux cryptophycées et une prymnesiophycée, Renaud *et al.* (2002) ont également mis en évidence que cette relation était espèce dépendante

avec une cryptophycée qui produisait davantage d'hydrates de carbone à 33°C comparativement à 25, 27 et 30°C, tandis que les trois autres espèces ne montraient pas de patron clairement défini. Une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous par cellule avec la température est observée chez Db et Hr comme l'avaient observé Claquin *et al.* (2008) sur la production de TEP de diatomées et Renaud *et al.* (2002) sur *Rhodomonas sp.* (cryptophyceae). Néanmoins les autres paramètres étudiés n'évoluent pas de la même façon pour Db et Hr. Concernant Db, l'augmentation d'hydrates de carbone par cellule s'accompagne d'une quantité de biomasse carbonée moindre à 14°C comparée à 10°C, la photosynthèse ne montrant pas de variations en fonction de la température dans les conditions P-lim et Control tandis que dans la condition N-lim un renforcement de l'effet sels nutritifs est observé à 10°C. Cette diminution de l'investissement des hydrates de carbone dans la formation de biomasse à 14°C conduit à une quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous plus forte à 14°C. D'un autre côté pour Hr, la biomasse carbonée est peu impactée, le taux de transfert d'électrons ne varie pas en fonction de la température tandis que les quantités d'hydrates de carbone sont supérieures à 14°C pour les conditions limitées en comparaison de celles observées à 10°C. Cette augmentation pourrait résulter d'une plus forte allocation des ressources (DIN ou DIP) vers les processus photosynthétiques quand la température augmente comme le suggèrent Toseland *et al.* (2013) ou encore Parker and Armbrust (2005), impliquant une plus forte production d'hydrates de carbone. La même tendance est observée pour les hydrates de carbone dissous avec, en plus, une augmentation pour le témoin avec la température, renforçant ainsi l'hypothèse d'une plus forte allocation des ressources à 14°C pour la photosynthèse. Cette hypothèse est également envisageable pour Db.

Un autre patron de réponse est observé pour Tr et Ske. Une diminution de la quantité d'hydrates de carbone particuliers quand la température augmente dans la condition témoin est observée conformément à ce qui avait été mis en évidence par Hitchcock (1980) chez *Skeletonema costatum* en l'absence de limitation. La même réponse à la température est mise en évidence sur les hydrates de carbone dissous. Enfin, contrairement à Tr, Ske montre une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers par cellule dans les conditions limitées quand la température augmente. Cette augmentation est associée à la diminution de la production de biomasse carbonée et de la capacité photosynthétique qui sont représentatives d'un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire dans les conditions limitées qui est renforcé par l'augmentation de la température. Cette observation pourrait résulter, d'une part,

de l'augmentation de la vitesse des réactions des enzymes jouant un rôle dans la production d'hydrates de carbone quand la température augmente, et d'autre part, d'un investissement plus fort des sels nutritifs dans la photosynthèse (Parker and Armbrust, 2005; Toseland *et al.*, 2013). Ces deux processus augmentent la sensibilité de la photosynthèse et la production d'hydrates de carbone à la limitation en sels nutritifs quand la température augmente.

Enfin, concernant Pg, une augmentation du contenu en hydrates de carbone particuliers est observée dans N-lim quand la température augmente. Cela résulte d'une part, d'une augmentation du taux de transfert d'électrons dans cette condition à 14°C et d'autre part, d'un investissement moindre dans la production de cellules aboutissant à une diminution de la biomasse carbonée.

Nous observons donc des réponses spécifiques quant à la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers en fonction de la température. De plus, l'effet de la température sur ces paramètres est plus faible que l'effet sels nutritifs, comme nous l'avons déjà montré sur la capacité photosynthétique (chapitre 2) et comme l'ont montré Borchard et Engel (2012) sur l'exsudation d'hydrates de carbone d'*Emilinia huxleyii*, Marañon *et al.* (2014) sur le taux de croissance ou encore Peter et Sommer (2013) sur la taille des cellules. Néanmoins un effet température est observé sur toutes les espèces considérées.

Concernant plus spécifiquement la proportion d'hydrates de carbone exsudés, une augmentation de l'exsudation d'hydrates de carbone est attendue avec l'augmentation de température (Borchard and Engel, 2012; Engel *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2006; Wohlers *et al.*, 2009). Cette tendance n'est pas observée dans notre étude, le pourcentage d'hydrates de carbone exsudés n'étant relié ni à la température, ni à la limitation en sels nutritifs mais est davantage dépendant de l'espèce considérée et de la quantité d'hydrates de carbone particuliers.

IV.4.2 Effets de l'interaction sels nutritifs/température

Les effets simultanés de plusieurs stress environnementaux (température, lumière, sels nutritifs) sur la physiologie algale existent du fait de l'implication de ces facteurs sur les fonctions physiologiques comme la photosynthèse, la production d'hydrates de carbone ou encore la croissance. Ces facteurs environnementaux vont influencer ces paramètres physiologiques via des voies d'actions différentes. Des études se sont intéressées aux effets

interactifs de la température et de l'intensité lumineuse (e.g. Morgan and Kallf, 1979; Smith and Morris, 1980; Sorokin and Krauss, 1962) ou encore aux interactions entre la limitation en sels nutritifs et l'intensité lumineuse (e.g. Cloern *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 1974) mais, comme le soulignent Juneja *et al.* (2013), peu d'études se sont attachées à décrire les interactions sels nutritifs/température sur la physiologie des microalgues et particulièrement sur la production d'hydrates de carbone (Borchard and Engel, 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013). L'effet interaction entre la température et les sels nutritifs se traduit par une différence de l'effet de la limitation en sels nutritifs dans une condition donnée quand la température change et qui aboutit à un patron de réponse différent à 10°C et 14°C, ou à des différences davantage marquées. Borchard et Engel (2012) ont mis en évidence la présence d'effets interactifs de la température et de la limitation en phosphore sur la production d'exsudats chez *Emilinia huxleyi* (une prymnesiophyceae) avec une augmentation de l'exsudation et de la proportion d'hydrates de carbone exsudés dans les conditions limitées en phosphore à 18°C tandis qu'à 14°C ces variables montraient les mêmes valeurs que le témoin. Nous n'avons pas observé cet effet sur la quantité d'hydrates de carbone dissous pour Pg qui ne présentait aucune différence en fonction du traitement ou de la température. Par ailleurs, Vidyarathna et Granéli (2013), en travaillant sur les effets de la température et de la limitation en DIN et DIP, ont montré un effet interactif de ces paramètres environnementaux sur le contenu en sucre chez *Ostreopsis ovata* (Dinoflagellé). Le contenu en hydrates de carbone de ce dinoflagellé augmente et montre des différences en cas de limitation en sels nutritifs à température sub-optimale. Nous observons un effet interactif température-sels nutritifs sur la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires par cellule chez deux diatomées : Tr et Ske. Concernant Tr, ces effets se traduisent par une forte diminution de la quantité d'hydrates de carbone par cellule dans le témoin, comparativement aux conditions limitées. Il existe une différence en fonction de la température pour le témoin, dû au taux de croissance plus fort dans le témoin à 14°C qui aboutit à une moindre quantité d'hydrates de carbone particulaires et dissous par cellule (Wang *et al.*, 2010) et conduit à une différence plus marquée entre les conditions limitées et le témoin. Concernant Ske une diminution de la quantité d'hydrates de carbone est également observée sur le témoin à 14°C. À 10°C, il n'y avait aucune différence entre les traitements tandis qu'à 14°C une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particulaires par cellule est observée dans les conditions limitées en sels nutritifs. L'effet interaction résulte donc (1) d'une augmentation des hydrates de carbone particulaires et dissous à 14°C dans les conditions limitées associée à (2) une diminution de ces hydrates de carbone dans le témoin résultant probablement d'une dynamique de division cellulaire forte.

Le fait qu'une différence entre les conditions limitées et le témoin existe à 14°C pourrait résulter d'une sensibilité plus forte à la limitation en sels nutritifs des processus enzymatiques impliqués dans la production d'hydrates de carbone quand la température augmente. Ces deux espèces présentent des effets interactifs des sels nutritifs et de la température aboutissant à des réponses différentes, mettant en évidence, en accord avec d'autres études (Borchard and Engel, 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013), le caractère spécifique de la réponse à ces facteurs environnementaux.

Enfin les études menées par Borchard et Engel (2012) et Vidyarathna et Granéli (2013) mettent en évidence le fait que tous les paramètres étudiés pour une même espèce ne réagissent pas de la même façon aux différentes conditions environnementales, comme nous l'observons dans notre étude. En effet, notre étude révèle que les effets de la température et de la concentration en sels nutritifs ne sont pas les mêmes selon les paramètres étudiés, des effets interactifs étant observés sur la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires chez Tr et Ske, sur ETR^{cell}_{110} chez Db, Pg et Hr et sur la biomasse carbonée pour Tr, Ske et Hr.

IV.4.3 Relation entre la quantité d'hydrates de carbone et la taille des cellules

Alors que la quantité d'hydrates de carbone, particulaires comme dissous, par cellule augmente avec la taille, ces mêmes paramètres ramenés non plus par cellule mais par unité de volume montrent le patron inverse. En effet, une diminution de la quantité d'hydrates de carbone par unité de volume quand la taille augmente est observée, en accord avec les résultats de Hitchcock (1982) et Moal *et al.* (1987). Néanmoins contrairement aux études citées ci-dessus notre étude intègre des conditions de limitation en azote et phosphore à deux températures différentes qui, bien qu'elles apportent de la variabilité dans la distribution, ne remettent pas en cause les relations observées. Contrairement à la capacité photosynthétique qui montrait un patron de réponse clair aux différentes conditions environnementales en fonction de la taille des cellules, les réponses de la quantité d'hydrates de carbone aux différentes conditions expérimentales dépendent davantage du taxon considéré.

Hr présente des quantités d'hydrates de carbone, par cellule ou par biovolume, forte par rapport aux autres espèces compte tenu de sa taille. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par Moal *et al.* (1987) sur d'autres cryptophycées. La présence d'une quantité d'hydrates de carbone par unité de volume qui augmente quand la taille diminue est directement liée à la présence et la taille de la vacuole au sein des cellules. Les hydrates de

carbone particulières sont soit situés dans le « squelette » de la cellule lorsqu'ils sont combinés avec d'autres éléments, soit stockés au sein du cytoplasme. Chez les diatomées, le cytoplasme est limité à une fine couche de 1 à 3 μm d'épaisseur tandis que la vacuole occupe davantage d'espace. De plus la paroi des diatomées est siliceuse et pourrait contenir moins de carbone que les organismes à paroi organique (Moal *et al.*, 1987). Ceci explique pourquoi les grandes cellules de notre étude, qui appartiennent au groupe des diatomées, contiennent moins d'hydrates de carbone que les petites cellules qui appartiennent au groupe des haptophytes ou cryptophytes. Enfin, la proportion de carbone représentée sous forme d'hydrates de carbone varie entre espèces. En général les hydrates de carbone représentent 20 à 30% du carbone total chez les diatomées alors que les cryptophytes montrent des proportions beaucoup plus variables allant de 1% jusque 70% (Moal *et al.*, 1987). Cette proportion peut augmenter en cas de limitation en sels nutritifs chez de nombreuses espèces (e.g. Granum *et al.*, 2002). La relation positive entre la quantité d'hydrates de carbone par cellule et la taille s'explique par la présence d'un squelette carboné plus grand et d'un volume plus grand. En effet, même si la quantité de sucre par unité de volume est plus faible quand la taille augmente, le fait d'avoir davantage de ces unités de volume aboutit à une quantité d'hydrates de carbone par cellule plus grande.

La relation hydrates de carbone particuliers par unité de volume en fonction de la taille se retrouve pour les hydrates de carbone dissous, ceux-ci provenant soit de l'exsudation des hydrates de carbone particuliers soit d'un phénomène de lyse cellulaire (Myklestad, 2000). Dans notre étude, les réponses observées sur les hydrates de carbone particuliers le sont également sur les hydrates de carbone dissous. Il existe des relations positives significatives concernant la quantité d'hydrates de carbone particuliers en fonction de la quantité d'hydrates de carbone dissous, qui ne diffèrent pas quelle que soit la condition en sels nutritifs et quelle que soit la température. Cela indique une bonne corrélation entre la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers ; plus une cellule possède d'hydrates de carbone particuliers plus la quantité d'hydrates de carbone dissous sera donc grande. Ce patron entre en contradiction avec celui observé et décrit par Staats *et al.* (2000) qui présentait sur *Cylindrotheca closterium*, une diatomée épipélique, une augmentation de l'exsudation sans augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers en cas de limitation en azote et phosphore. Cela peut s'expliquer par l'utilisation différente des exsudats pour les diatomées benthiques qui, contrairement aux diatomées pélagiques, utilisent les hydrates de carbone exsudés pour s'attacher au sédiment, pour stabiliser ce dernier ou encore se mouvoir au sein

du sédiment (pour une synthèse voir Consalvey *et al.*, 2004). La relation hydrates de carbone particuliers/hydrates de carbone dissous met aussi en évidence la présence d'excrétion, dans toutes les conditions, même dans le cas où le contenu en hydrates de carbone est faible. Ce maintien de l'excrétion, même quand le contenu en hydrates de carbone est faible, pourrait servir au maintien de la phycosphère dont la fonction principale est la reminéralisation bactérienne à proximité immédiate des cellules phytoplanctoniques (Rooney-Varga *et al.*, 2005).

La proportion d'hydrates de carbone produits excrétés par rapport à la production totale (PER) est souvent utilisée afin de quantifier l'excrétion des cellules. Cette exsudation a longtemps été considérée comme résultant principalement d'un phénomène de diffusion (Granum *et al.*, 2002; Mykkestad, 2000). La capacité de diffusion d'une cellule phytoplanctonique est dépendante du rapport surface/volume de cette cellule, plus ce rapport est grand et plus la diffusion est facilitée. Ce ratio surface/volume augmente quand le volume de la cellule diminue, impliquant alors une plus grande capacité d'échange par diffusion des petites cellules par rapport aux plus grandes (Litchman and Klausmeier, 2008). Contrairement à Malinsky-Rushansky et Legrand (1996) qui mettaient en évidence des valeurs de PER décroissantes avec une augmentation de la taille des cellules, nos résultats, qui englobent une gamme de taille plus large, montrent que les valeurs de PER ne dépendent pas de la taille mais plutôt de l'espèce, comme l'ont également montré sur l'exsudation de carbone avec une autre méthode (méthode au ^{14}C) López-Sandoval *et al.* (2013). Cela implique un phénomène d'excrétion indépendant de la taille de la cellule et donc ne résultant pas d'un simple phénomène de diffusion. Cette absence de lien entre taille et PER pourrait également résulter de stratégies spécifiques en fonction de la température et de la limitation en sels nutritifs. La proportion d'hydrates de carbone produits excrétés (PER) varie en fonction de l'espèce et est fréquemment plus forte en cas de limitation en sels nutritifs (Granum *et al.*, 2002; Mykkestad, 2000; Obernosterer and Herndl, 1995) ou lors d'une augmentation de température (Verity, 1981). Nos résultats ne suivent pas nécessairement ces tendances, en fonction de l'espèce, et il apparaît difficile de discerner des patrons de réponse à la limitation en sels nutritifs, la température ou leurs interactions. De plus il est difficile de situer nos résultats par rapport à la littérature compte tenu de l'utilisation de méthodes différentes. En effet les autres études portaient davantage sur l'excrétion de carbone via des méthodes au carbone 14 alors que nous nous intéressons à l'excrétion des hydrates de carbone dosés spécifiquement (Parson *et al.*, 1984). À notre connaissance, c'est la première fois que cette méthode est utilisée pour étudier

la relation entre le PER et la taille. De même la présence d'une relation linéaire hautement significative, qui ne varie pas en fonction des conditions de sels nutritifs et de la température, entre la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires chez nos espèces pélagiques n'avait, d'après ce que nous en savons, jamais été démontrée.

IV.4.4 Dépendance taxonomique des réponses observées

Malgré les relations significatives qui existent entre la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires, par cellule ou par unité de volume, l'évolution de ces quantités en fonction des conditions expérimentales ne semble pas dépendre du facteur taille, mais plutôt de l'espèce considérée. Des différences existent toujours, même si on regroupe nos espèces en différents groupes selon des critères phylogénétiques (en regroupant les diatomées par exemple). Néanmoins, les réponses observées ici peuvent être reliées à la taille pour Db et au cycle de vie pour Pg.

Db ne montre pas de réponse quant à la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires par cellule en fonction de la limitation en sels nutritifs. Cependant, une augmentation de la quantité de ces hydrates de carbone est constatée avec la température. *Db* est la seule à ne pas présenter de différences de la quantité d'hydrates de carbone par cellule en fonction de la concentration en sels nutritifs. Comme observé précédemment sur d'autres paramètres (chapitre 2), *Db* montre peu de variations de sa capacité photosynthétique, de sa formation de biomasse et ici de la quantité d'hydrates de carbone par cellule et semble pouvoir faire face aux conditions de limitation en sel nutritifs. Cela pourrait résulter de la grande taille des cellules de cette espèce qui lui procure une plus grande capacité de stockage dans la vacuole (Finkel *et al.*, 2010; Litchman *et al.*, 2007), une capacité d'absorption des ressources forte du fait de la présence de nombreuses enzymes et une augmentation de la différence entre le quota minimal en sels nutritifs et la capacité d'absorption quand la taille augmente (Marañon *et al.*, 2013). Ces trois caractéristiques confèrent aux cellules de grande taille un avantage en cas d'ajout épisodique de sels nutritifs, comme réalisé lors de nos expériences avec l'ajout quotidien de milieu « neuf ». Enfin, ces cellules présentent un faible taux de croissance comparé aux autres espèce étudiées, traduisant un métabolisme plus lent et une augmentation du découplage entre la photosynthèse, l'utilisation d'hydrates de carbone et la production de biomasse qui pourrait conduire au patron que nous observons (Berman-Frank and Dubinsky, 1999).

Pg, quant à elle, montre beaucoup de variabilité de la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous par cellule. Ceci résulte de la succession des différentes phases du cycle de vie de cette espèce. En effet, Pg possède un cycle de vie polymorphique caractérisé par la présence de petits flagellés haploïdes, de flagellés de plus grande taille diploïdes et de cellules non flagellées diploïdes formant des colonies entourées d'un mucilage riche en hydrates de carbone (Mari *et al.*, 2005; Peperzak and Gäbler-Schwarz, 2012). Ces différentes formes ont des caractéristiques physiologiques différentes. En effet, les cellules flagellées ont une activité photosynthétique supérieure aux cellules coloniales qui, cependant, produisent et sécrètent davantage de matière carbonée (Chin *et al.*, 2004; Verity *et al.*, 1991). La présence de ces différentes formes apporte une forte variabilité du signal observé, et ce, aussi bien sur les hydrates de carbone dissous que particuliers.

IV.5 Conclusion

L'étude de la production d'hydrates de carbone en présence de stress environnementaux sur les espèces pélagiques marine est relativement peu documentée comparativement aux espèces benthiques. Cela semble surprenant vu (1) le rôle essentiel de ces espèces dans les réseaux trophiques et leurs effets sur les cycles biogéochimiques et (2) les modifications environnementales observées et attendues dans le cadre de l'anthropisation et du changement global.

Notre étude montre que l'effet de la limitation en sels nutritifs et de la température sur la production d'hydrates de carbone des espèces phytoplanctoniques ne suit pas une règle généralisable à toutes les espèces mais montre un patron complexe. En effet, nous observons des réponses spécifiques de la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous à la limitation en sels nutritifs à deux températures différentes de cinq espèces phytoplanctoniques cultivées dans les mêmes conditions expérimentales. Contrairement au patron de réponse observé sur la capacité photosynthétique dans le chapitre 2 qui mettait en avant la présence d'interactions sels nutritifs/température associées à une réponse plus forte sur les petites cellules, les réponses de la quantité d'hydrates de carbone en fonction des paramètres environnementaux dépendent non plus de la taille des cellules mais des taxons considérés. Nous n'avons pas trouvé d'études portant sur la production d'hydrates de carbone en cas de limitation en sels nutritifs ou à des températures différentes sur Db, Tr et Hr. Concernant Ske et Pg, nos observations diffèrent partiellement de celles précédemment décrites. Ces

différences peuvent provenir de différences dans les conditions expérimentales (température). Tout comme sur les autres paramètres considérés, l'effet sels nutritifs semble avoir plus d'impact que la température sur la production d'hydrates de carbone, hormis pour *Db* qui ne présente qu'une augmentation du contenu en hydrates de carbone quand la température augmente. Les 4 autres espèces présentent 4 patrons de réponses différents. Notre étude a également révélé une corrélation positive hautement significative entre la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous qui ne diffère pas en fonction de la concentration en sels nutritifs et de la température. Cette relation implique que l'augmentation de l'exsudation résulte d'une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone particuliers, contrairement au schéma décrit sur les espèces benthiques (e.g. Staats *et al.*, 2000). Enfin, comme l'ont montré López-Sandoval *et al.* (2013) sur l'exsudation de matière carbonée, nous observons une absence de relation entre la proportion d'hydrates de carbone exsudée (PER) et la taille révélant (1) que cette exsudation ne résulte pas simplement de phénomènes de diffusion et (2) que l'exsudation est un phénomène espèce dépendant, même si globalement la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers sont corrélés.

**V. Etude de la relation diversité/productivité de communautés
microalgales sous influence environnementale**

Fabien Dufossé, Valérie Gentilhomme, Fabienne Goulard, Sébastien Lefebvre

Résumé

L'érosion de la diversité observée dans les écosystèmes terrestres et aquatiques à l'échelle globale peut conduire à des perturbations des fonctions écosystémiques. Plusieurs études, expérimentales, modélisatrices ou *in situ*, se sont intéressées aux relations qui existent entre la diversité des producteurs primaires et le fonctionnement et la productivité des écosystèmes. Ces études principalement menées en milieu terrestre ou dulcicole ont, dans la plupart des cas, mis en évidence une tendance à l'augmentation de la productivité avec la diversité.

Nous nous intéressons dans cette étude aux relations productivité/diversité de trois communautés composées de trois, quatre et six espèces phytoplanctoniques limitées en azote, en phosphore ou non limitées. Pour cela, l'efficacité d'absorption de sels nutritifs, de la lumière, le taux de transfert relatif maximum d'électrons, la formation d'hydrates de carbone, de carbone organique, d'azote total et le biovolume total des communautés ont été comparés aux valeurs de ces mêmes paramètres en monoculture.

En fin d'expérience, nos trois communautés sont principalement composées de *Skeletonema sp.*, *Ditylum brightwellii* et *Phaeocystis globosa* dans des proportions variables selon la communauté et la condition expérimentale. *Skeletonema sp.* domine largement les communautés à 3 et 6 espèces, et co-domine avec *Ditylum brightwellii* la communauté à 4 espèces. La limitation en sels nutritifs influence la composition des communautés. En effet, *Phaeocystis globosa* n'est que très peu représentée dans les conditions limitées en azote, aboutissant alors à une diminution de l'indice de diversité de Shannon. Les communautés apparaissent plus efficaces dans l'absorption des sels nutritifs et de la lumière que les monocultures en raison d'un phénomène de complémentarité entre espèces. Cependant, la productivité de ces communautés (hydrates de carbone, carbone organique, azote total et biovolume total) est globalement inférieure à celles des monocultures résultant soit d'une compétition entre espèces, d'un effet sélection fort ou d'une allocation des ressources absorbées vers d'autres processus (non mesurés) que la formation de biomasse (e.g. stockage intracellulaire, respiration). Quoiqu'il en soit aucune relation claire entre la productivité et la diversité de nos communautés (indice de Shannon) n'est ici dégagée. Cette étude met tout de même en évidence l'importance de la diversité sur l'absorption de sels nutritifs, et donc le rôle essentiel de cette diversité sur le cycle des sels nutritifs en milieu naturel.

Mots clefs : microalgues, relation diversité/productivité, approche multifactorielle, limitation azote, limitation phosphore

V.1 Introduction

Les activités anthropiques affectent les écosystèmes marins à l'échelle globale. Cette influence se traduit, comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, par des perturbations des apports en sels nutritifs et des modifications de la température à la surface du globe terrestre mais aussi, que ce soit de façon directe ou indirecte (via les processus suscités), par des modifications de la répartition des producteurs primaires et une diminution de la biodiversité marine (Sala and Knowlton, 2006). Cette perte de diversité a été extrêmement rapide ces cinquante dernières années (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Partant de ce constat, de nombreux auteurs se sont intéressés aux relations entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes afin de comprendre et quantifier les effets de l'érosion globale de la biodiversité sur les processus écosystémiques, et, pour combler le manque de compréhension sur la relation entre biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes (Stachowicz *et al.*, 2007). Cette érosion de biodiversité est plus évidente en milieu terrestre et moins évidente concernant le phytoplancton marin. En effet, selon Hallegraeff (2010) les principaux effets des différents facteurs du changement global seront (1) d'augmenter la zone de répartition des espèces d'eaux chaudes vers les pôles, (2) de modifier l'abondance et la phénologie de certaines espèces, (3) d'avancer (dans le temps) l'initiation des efflorescences phytoplanctoniques et (4) d'influencer les réseaux trophiques associés au phytoplancton. Cette étude prévoit alors des changements de communautés (et donc de diversité) sans pour autant avancer l'hypothèse d'une érosion de diversité. Par ailleurs, Olli *et al.* (2014) ont mis en évidence une augmentation de la diversité phytoplanctonique en mer Baltique (depuis 1968) associée à une meilleure capacité des communautés diversifiées pour l'absorption d'azote et de phosphore. Cette étude contraste l'érosion de diversité attendue mais permet de montrer l'importance des changements de diversité sur les processus écosystémiques. Les études biodiversité/fonctionnement de l'écosystème et biodiversité/productivité ont porté majoritairement sur les écosystèmes terrestres (Diaz and Cabido, 2001; Fry *et al.*, 2014; Hooper and Vitousek, 1997; Loreau *et al.*, 2001), dulcicoles (Behl *et al.*, 2011; Ptacnik *et al.*, 2008) et, dans une moindre mesure, marins (Duffy, 2002; Norberg, 2000; Stachowicz *et al.*, 2002). En effet, une revue de la littérature réalisée par Balvanera *et al.* (2006) met en évidence le faible nombre d'études portant sur ce sujet en milieu marin (32 études réalisées, dont 21 *in situ*) en comparaison des milieux dulcicoles (68 études réalisées) et terrestres (301 études réalisées). Les études sur la relation diversité/productivité et diversité/fonctionnement de l'écosystème mettent en évidence qu'en moyenne les communautés diversifiées (que ce soit

en termes de diversité génétique, spécifique, ou fonctionnelle) produisent davantage de biomasse et consomment davantage de ressources (sels nutritifs, lumière) que les populations ou les communautés moins diversifiées (Cardinale *et al.*, 2013; Cardinale *et al.*, 2006; Duffy, 2009). Ce patron est observé dans des études portant sur des espèces, des niveaux trophiques et des écosystèmes différents mais n'est pas nécessairement généralisable.

Le phytoplancton constitue un groupe polyphylétique très diversifié qui a un rôle central dans le fonctionnement des écosystèmes marins. La diversité spécifique élevée de ce groupe implique une forte diversité de traits fonctionnels ; les espèces vont donc interagir différemment avec leur environnement et vont avoir des fonctions différentes dans les processus écosystémiques (Litchman and Klausmeier, 2008). Une modification (qu'elle soit positive ou négative) de biodiversité rapide a été observée ces dernières années dans les écosystèmes terrestres et aquatiques et implique des changements potentiels de fonctions qui influencent les écosystèmes. En effet, des études réalisées sur le phytoplancton ont permis de mettre en évidence différents types de relation entre productivité et diversité que ce soit lors d'expérimentations en laboratoire ou lors d'observations sur le terrain (Ptacnik *et al.*, 2010). Divers auteurs ont mis en évidence une relation positive entre la richesse spécifique et la production de biomasse chez des microalgues d'eau douce (Behl *et al.*, 2011; Power and Cardinale, 2009). Il est important de remarquer que l'essentiel des expérimentations réalisées s'intéressaient à la production principalement via des stocks de biomasse (carbone, nombre de cellule ou chlorophylle *a*), qui constituent le processus final d'utilisation de la ressource. Néanmoins, des études récentes se sont intéressées à l'étude de flux comme la production d'O₂ (Power and Cardinale, 2009), l'absorption et l'assimilation de sels nutritifs (Olli *et al.*, 2014; Ptacnik *et al.*, 2008) ou l'absorption de la lumière (Behl *et al.*, 2011). D'un autre côté Schmidtke *et al.* (2010), en travaillant sur des communautés expérimentales composées de différentes combinaisons de huit espèces appartenant à 4 groupes fonctionnels différents, ont mis en évidence la présence de sous-rendements de biomasse et ce, même dans des communautés diversifiées. Des rendements peuvent en effet être calculés afin de comparer la production d'une communauté à celle de monoculture en divisant la production de la communauté par la production attendue de l'assemblage des monocultures ; un rendement inférieur à 1 traduisant alors une plus faible productivité en communauté. De cette façon Schmidtke *et al.* (2010) ont mis en évidence une relation négative entre la diversité et la productivité, la productivité de la communauté diminuant quand la diversité augmentait. Tandis que l'augmentation de la productivité avec la diversité s'explique par des effets de

sélection ou de complémentarité entre espèce (Cardinale *et al.*, 2009), l'effet de sélection observé dans l'expérience de Schmidke *et al.* (2010) résulte de la dominance d'une espèce peu productive dans les différentes communautés expérimentales et donc à des rendements observés plus faibles en communauté. Enfin, Gamfeldt *et al.* (2005) ont étudié trois espèces phytoplanctoniques d'eau douce, avec et sans la présence de prédateurs. Ces auteurs n'ont pas mis en évidence de relation entre la diversité des microalgues et la production de biomasse en absence de prédateurs, probablement du fait de compétition pour la ressource entre les espèces. L'augmentation de productivité avec la diversité n'est donc pas une règle générale et va dépendre des conditions expérimentales et des espèces sélectionnées.

En plus du faible nombre d'études sur les relations diversité/productivité en milieu marin, aucune étude n'a porté sur ces relations sous médiations de différentes concentrations en sels nutritifs (Hillebrand *et al.*, 2014). La prise en considération de la concentration en sels nutritifs et du rapport azote/phosphore (N/P) est pourtant d'importance compte tenu du rôle essentiel de ces éléments sur la physiologie et la productivité du phytoplancton. Malgré les efforts de mitigation engagés depuis des années, un apport significatif d'azote en milieu côtier est encore observé. Cette apport est associé à une diminution de l'apport en phosphore dû à des politiques d'abattelements plus efficaces pour cet élément (Artioli *et al.*, 2008) entraînant ainsi une augmentation des rapports N/P. Au sein d'une communauté les individus peuvent entrer en compétition pour l'accès à une ressource lorsque celle-ci devient limitante, favorisant ainsi l'espèce la plus efficace pour l'absorption de cette ressource au détriment des autres espèces présentes. Cette compétition pour la ressource est un facteur capital dans l'explication de la structure des communautés (Tilman *et al.*, 1982). La concentration en sels nutritifs et les rapports entre ces différents sels influencent la biodiversité des communautés. En effet, Interlandi et Kilham (2001) ont mis en évidence, en milieu dulcicole, une forte corrélation entre la diversité spécifique et le nombre de ressources limitantes, la plus forte diversité étant observé quand le nombre de ressources limitantes augmente. Une corrélation négative entre diversité et concentration en sels nutritifs est souvent constatée, résultant simplement du fait que l'augmentation de la concentration d'une ressource va aboutir à l'augmentation de la probabilité qu'une autre ressource devienne limitée, renforçant alors la compétition pour celle-ci (Hillebrand *et al.*, 2014). Enfin, il n'y a à notre connaissance jamais eu d'étude expérimentale sur les relations diversité/productivité en présence de contraintes environnementales sur le phytoplancton marin. Ces études sont alors d'intérêt pour

comprendre quels seront les impacts des modifications de diversité sur la productivité et le fonctionnement des écosystèmes.

Partant du contexte et de l'état de l'art décrit ci-dessus, nous nous proposons d'étudier les relations entre la productivité, l'utilisation de la ressource et la diversité spécifique de communautés de trois, quatre ou six espèces appartenant à des groupes différents (diatomées, prymnesiophycées et cryptophycées) et présentant différents traits fonctionnels. Une approche multifactorielle, basée à la fois sur des paramètres de flux et de stock, est réalisée afin d'estimer d'une part l'efficacité des différentes communautés pour l'absorption des sels nutritifs et de la lumière et, d'autre part, la production des communautés via la capacité photosynthétique, la quantité d'hydrates de carbone et d'exsudats, le stock de carbone et d'azote organique et le nombre de cellules. Afin de rendre compte du rôle de la concentration en sels nutritifs, ces expérimentations ont été réalisées à trois rapports N/P différents correspondant à une limitation en azote, une limitation en phosphore ainsi qu'un témoin.

V.2 Matériels et méthodes

Nos expérimentations ont porté sur six espèces de microalgues : *Ditylum brightwellii* (Db), *Thalassiosira rotula* (Tr), *Skeletonema sp.* (Ske), *Phaeocystis globosa* (Pg), *Hemiselmis rufescens* (Hr) et *Synechococcus sp.* Ces espèces appartiennent à des groupes fonctionnels différents et présentent un gradient de taille allant de 1 (*Synechococcus sp.*) à 200 μm (Db).

V.2.1 Dispositif expérimental

Afin de servir d'inoculum dans nos expérimentations, chaque espèce était cultivée dans des bouteilles en verre de 250 ml contenant du milieu F/2 (Guillard and Ryther, 1962) sur lesquelles était posé un bouchon stérile en silicone empêchant la pénétration des bactéries présentes dans l'air (Hirschmann©, bouchons Silicosen) mais perméable à l'air. Ces inocula étaient placés dans une enceinte thermorégulée à 12°C, sous une intensité lumineuse de 250 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avec un cycle nyctéméral de 12 h. Durant leur phase exponentielle de croissance un volume déterminé de ces cultures souches a été prélevé pour lancer les expérimentations. Un inoculum commun contenant une quantité définie de chacune des espèces est préparé à partir des souches. Cet inoculum est alors homogénéisé puis réparti dans trois conditions expérimentales chacune en dupliqua. Afin de démarrer avec la même quantité

de biomasse carbonée, un inoculum correspondant à $1 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \cdot \text{l}^{-1}$ a servi de base à nos expérimentations, chaque espèce contribuant à une même proportion du biovolume total (Tableau V-1).

Tableau V-1 : biovolumes totaux spécifiques ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{l}^{-1}$) inoculés en début d'expérimentations dans les communautés à 6 (Comm6), 4 (Comm4) et 3 espèces (Comm3).

	<i>Db</i>	<i>Tr</i>	<i>Ske</i>	<i>Pg</i>	<i>Hr</i>	<i>Sy</i>	total
Comm3	3.33E+07	absent	3.33E+07	3.33E+07	absent	absent	1.00E+08
Comm4	2.50E+07	absent	2.50E+07	2.50E+07	2.50E+07	absent	1.00E+08
Comm6	1.67E+07	1.67E+07	1.67E+07	1.67E+07	1.67E+07	1.67E+07	1.00E+08

Quatre communautés expérimentales ont été réalisées successivement. La première contenait nos six espèces d'intérêt. Bien qu'initialement présente dans la Comm6 *Synechococcus sp.* a rapidement décliné en terme de proportion du biovolume total dans nos expérimentations et ne sera pas utilisée dans nos analyses. La Comm4, contenant *Db*, *Ske*, *Pg* et *Hr*, a été menée afin de maximiser le nombre de groupes fonctionnels tout en ayant une large gamme de taille de cellules. Basé sur les résultats des deux premières communautés, la Comm3 a été réalisée et été composée des trois espèces principalement présentes dans les Comm4 et 6. Enfin une Comm5 a également été réalisée, contenant toutes les espèces sauf *Synechococcus sp.* Des difficultés méthodologiques rencontrées durant l'expérimentation empêchent l'exploitation des résultats de cette communauté.

Afin de pouvoir les comparer aux monocultures, les conditions expérimentales abiotiques étaient les mêmes en communauté et en monoculture. Les expérimentations ont été réalisées dans des enceintes thermorégulées Minitron (INFORS©) à 10°C sous une lumière de $110 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les cultures ont été réalisées dans des bouteilles en polycarbonate de 2 L contenant de l'eau de mer artificielle (35 PSU) dans laquelle était ajouté du milieu F/2 (Guillard and Ryther, 1962) sans azote ni phosphore. Le DIN et DIP ont alors été ajoutés en tant que KNO_3 et KH_2PO_4 afin d'obtenir les concentrations suivantes : $50 \mu\text{mol-N} \cdot \text{l}^{-1}$ et $1 \mu\text{mol-P} \cdot \text{l}^{-1}$ dans la condition limitée en phosphore (P-lim), $2 \mu\text{mol-N} \cdot \text{l}^{-1}$ et $5 \mu\text{mol-P} \cdot \text{l}^{-1}$ dans la condition limitée en azote (N-lim) et $50 \mu\text{mol-N} \cdot \text{l}^{-1}$ et $5 \mu\text{mol-P} \cdot \text{l}^{-1}$ dans la condition Témoin (Control). Une agitation orbitale de 60 rpm était appliquée pour minimiser le phénomène de sédimentation sans pour autant perturber la croissance des cellules flagellées. Jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance les cultures étaient maintenues en batch, la biomasse (abondance cellulaire et fluorescence *in vivo*) et la concentration en sels nutritifs étaient prélevées quotidiennement (Tableau V-2). A

partir de la fin de cette phase, qui marque l'entrée en phase de limitation, 200 ml de cultures étaient prélevés chaque jour et remplacés par du milieu neuf. Ces 200 ml nous permettent alors d'étudier les concentrations en hydrates de carbone, carbone organique particulaire (POC), azote organique particulaire (PON), sels nutritifs, ainsi que les paramètres photosynthétiques et la biomasse phytoplanctonique et bactérienne (Tableau V-2) (ces paramètres étant détaillés ci-dessous). Chaque jour, les prélèvements étaient effectués deux heures après le début de la photophase.

Les cultures étaient non axéniques. Afin de mesurer la concentration bactérienne dans nos cultures, des prélèvements réguliers (tous les trois jours) étaient effectués. Le dénombrement des bactéries a été effectué au microscope à épifluorescence (Leitz DMRB©, g x1000) selon la méthode décrite par Porter & Feig (1980). La concentration bactérienne variait selon les cultures et conditions mais n'a jamais dépassé 7.9×10^4 cellules par litre, excluant tout effet significatif des bactéries dans nos cultures. Ce paramètre ne sera alors pas davantage exploité dans cette étude.

Tableau V-2: Séquence de prélèvements des paramètres mesurés durant les expérimentations

jour 0	fluorescence <i>in vivo</i> hydrates de carbone (20ml)	comptage (10ml) Bactéries (10ml)	sels nutritifs (20ml)
jour 1	fluorescence <i>in vivo</i>	comptage (10ml)	sels nutritifs (20ml)
jour n	fluorescence <i>in vivo</i>	comptage (10ml)	sels nutritifs (20ml)
limitation constatée			
limitation +1	fluorescence <i>in vivo</i> extraction chlorophylle a (50ml)	comptage (10ml) PAM (10ml)	sels nutritifs (20ml) a* (100 ml)
limitation +2	fluorescence <i>in vivo</i> POC et PON (50 ml)	comptage (10ml) Hydrates de carbone (20 ml)	sels nutritifs (20ml) Bactéries (10ml)
limitation +3	fluorescence <i>in vivo</i> extraction chlorophylle a (50ml)	comptage (10ml) PAM (10ml)	sels nutritifs (20ml) a* (100 ml)
limitation +4	fluorescence <i>in vivo</i> POC et PON (50 ml) extraction chlorophylle a (50ml)	comptage (10ml) Hydrates de carbone (20ml)) PAM (10ml)	sels nutritifs (20ml) a* (100 ml) pigments HPLC

V.2.2 Paramètres étudiés

La séquence de prélèvement (Tableau V-2) et les analyses réalisées se font selon les mêmes protocoles que ceux décrits dans les chapitres précédents (section matériels et méthodes). Seules seront détaillées les analyses ne figurant pas auparavant dans ce manuscrit.

V.2.3 Carbone organique et azote total particulaire

Des prélèvements de 50 ml ont été réalisés trois fois durant l'expérience, les mêmes jours que ceux effectués pour l'étude des hydrates de carbone, et immédiatement filtrés sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/F préalablement chauffés à 450°C pendant 4h, pour l'étude du carbone organique et de l'azote total particulaire. Ces paramètres ont été mesurés sur un analyseur CHN (CE instrument Fisons Na 2100) en utilisant de l'acétanilide comme standard, de l'O₂ ultra pur comme gaz de combustion et de l'hélium en tant que gaz de transport. Après filtration et juste avant d'être analysés, les filtres ont été séchés et exposés à des vapeurs d'HCl durant 4h à des fins de décarbonatation.

V.2.4 Paramètres photosynthétiques

Le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (*a**) et le taux de transfert d'électrons à 110 μmol photons.m⁻².s⁻¹ (ETR₁₁₀, μmol e⁻.mg chl*a*⁻¹.s⁻¹.l⁻¹) seront ici utilisés pour retranscrire la capacité d'utilisation de la lumière en monoculture et en communauté.

L'étude et l'estimation des paramètres photosynthétiques utilisés dans l'équation ci-dessous sont décrites dans le chapitre 2 (Matériels et Méthodes, « photosynthetic response traits »)

ETR₁₁₀, utilisé comme indicateur de l'activité photosynthétique est calculé à partir du modèle de Webb *et al.* (1974) suivant l'équation suivante :

$$ETR_{110} = rETR_{max} \cdot \left[1 - e^{-\left(\alpha / rETR_{max} \cdot E\right)} \right] \cdot a^*$$

ETR₁₁₀ correspond au taux de transfert d'électrons à 110 μmol photons.m⁻².s⁻¹ (μmol e⁻.mg chl*a*⁻¹.s⁻¹.l⁻¹), rETR_{max} le taux de transfert d'électrons maximum relatif au niveau du PSII (μmol e⁻.m⁻².s⁻¹), α l'efficacité maximale relative d'utilisation de la lumière (μmol e⁻.μmol photons⁻¹), E l'intensité lumineuse (ici 110 μmol photons.m⁻².s⁻¹) et *a** le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (m².mg chl*a*⁻¹).

V.2.5 Analyses mathématiques : calcul de rendements

Afin de comparer les résultats obtenus en monoculture et dans les communautés, des rendements ont été calculés selon la méthode décrite par Hector *et al.* (2002), sur la concentration en DIN, DIP, POC, PON, hydrates de carbone particuliers et dissous, mais

aussi sur le a^* et les biovolumes totaux, tous représentatifs de paramètres de stock. Ces mêmes rendements ont également été mesurés sur un paramètre de flux d'électrons (ETR_{110}).

$$\text{rendement} = \frac{\text{pro des communautés}}{\text{estimation pro des mono}}$$

La productivité des monocultures était estimée à partir de la production de chaque espèce cultivée individuellement associée à la proportion de chacune des espèces observée dans la communauté. Lorsque le ratio est supérieur à 1, la communauté était plus productive que la monoculture (sur-rendement).

Par ailleurs, afin d'estimer les différences de biovolume totaux par espèce en communauté par rapport aux monocultures des rendements spécifiques ont également été calculés en suivant la formulation décrite par Schmidtke *et al.* (2010) :

$$r \quad \text{spé fique} = \log_s \frac{b \quad \text{spé fique}_{\text{comm}}}{b \quad \text{spé fique}_{\text{mono}}}$$

avec S le nombre d'espèces dans la communauté, $b_{\text{spé fique}_{\text{comm}}}$ le biovolume d'une espèce obtenu en communauté ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{l}^{-1}$) et $b_{\text{spé fique}_{\text{mono}}}$ le biovolume de cette même espèce en monoculture ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{l}^{-1}$). Ce calcul a été réalisé pour chaque espèce dans chaque condition en prenant le biovolume total maximum en communauté et en monoculture. Un rendement spécifique inférieur à -1 met en évidence une production de biovolume total inférieur en communauté qu'en monoculture pour une espèce donnée.

V.2.6 Indice de diversité : l'indice de Shannon

La détermination de la biomasse (exprimée en biovolume total = abondance cellulaire * volumes cellulaires spécifiques) permet de mesurer la diversité et la répartition des espèces présentes dans chaque échantillon. Cette diversité est calculée au moyen de l'indice de Shannon (1948) :

$$H = - \sum_{i=1}^n p_i \log p_i$$

où p_i est la proportion de l'espèce i dans une communauté
 $(p_i = \frac{n_i}{N})$

Les valeurs de l'indice de Shannon sont toujours positives. L'indice de Shannon (Shannon, 1948) est un indice mathématique qui permet d'exprimer la diversité en tenant compte d'une part du nombre d'espèces et, d'autre part, de l'abondance des individus au sein de chacune de ces espèces. De ce fait, une communauté dominée par une seule espèce aura un coefficient moindre qu'une communauté dont toutes les espèces sont représentées dans les mêmes proportions. La valeur de l'indice est proche de 0 quand une espèce domine très nettement les autres et augmente quand les différentes espèces sont présentes dans des proportions plus équilibrées.

V.2.7 Analyses statistiques

Des modèles linéaires généraux ont été utilisés pour comparer les biovolumes totaux de chaque espèce en fonction de la condition expérimentale dans chacune des communautés. Les biovolumes totaux dans les conditions limitées ne variaient pas en fonction du temps après la fin de croissance exponentielle. Dans ces conditions, les biovolumes totaux utilisés dans nos analyses regroupent tous les biovolumes totaux mesurés après la fin de la croissance exponentielle. En ce qui concerne le témoin, seuls les points finaux (sans limitation) ont été utilisés représentant les biovolumes totaux maximaux. Afin de satisfaire les conditions d'applications, les données ont été normalisées (si besoin) via des transformations de type Box-Cox (Box and Cox, 1964). Un test post hoc de Tukey était appliqué pour qualifier statistiquement la présence ou l'absence de différence significative entre les traitements en fonction des conditions environnementales.

Une analyse en composante principale a également été réalisée pour visualiser simultanément l'évolution de l'abondance de Db, Ske, Hr et Pg et de la concentration en DIP et DIN dans toutes les communautés. Le rapport N/P apparaît en tant que variable supplémentaire car son calcul dépend directement des valeurs de DIN et DIP. Enfin les abondances ont été Log-transformées du fait de la forte différence observée des valeurs entre espèces. Les valeurs mesurées après la fin de la phase de croissance ont été utilisées.

V.3 Résultats

Les résultats présentés dans la partie ci-dessous concernent les communautés à trois, quatre et six espèces (voir tableau V-1). La communauté à 6 espèces (Comm6) ne montrait rapidement plus que quatre espèces : Db, Ske, Pg et, dans une moindre mesure, Hr. Les deux autres espèces, à savoir *Thalassiosira rotula* et *Synechococcus sp.* déclinaient rapidement dès les premiers jours d'expérimentation jusqu'à atteindre des abondances trop faibles pour être déterminées de manière fiable avec nos méthodes de comptage. Ces espèces, faiblement présentes comparativement aux autres espèces, n'ont donc pas joué de rôle au sein des communautés et ont été exclues des analyses dont les résultats sont détaillés ci-dessous.

V.3.1 Structure des communautés

Les quatre communautés réalisées présentaient des résultats contrastés. Les trois espèces principalement représentées étaient *Skeletonema sp.* (Ske), *Phaeocystis globosa* (Pg) et *Ditylum brightwellii* (Db). Le biovolume total, qui correspond à la somme de l'abondance des espèces multiplié par leur volume respectif, est utilisé comme indicateur de biomasse. Les conditions témoins atteignaient des biovolumes totaux plus forts que les conditions limitées (Tukey, $p < 0,05$), excepté dans la Comm4 où il n'y avait aucune différence entre la condition N-lim et le témoin (tableau V-3). L'effet de la concentration en sels nutritifs sur le biovolume total était spécifique et variait selon les communautés considérées. Ske par exemple montrait un biovolume total inférieur dans les conditions limitées comparativement au témoin uniquement dans la Comm6 (Tukey, $p < 0,05$). Db présentait, de son côté, une diminution du biovolume total dans la condition N-lim pour les Comm6 et Comm3 et dans la condition P-lim pour la Comm3 (Tukey, $p < 0,05$). Dans la Comm4, aucun effet de la limitation en sels nutritifs n'est observé sur le biovolume total de cette espèce. Enfin, Pg présente un patron de réponse plus clair avec un plus faible biovolume total dans la condition N-lim quelle que soit la communauté et dans la condition P-lim uniquement dans la Comm3 (Tukey, $p < 0,05$) (Tableau V- 3).

Tableau V-3: Biovolume totaux moyen en μm^3 (\pm écart type) de *Db*, *Ske*, *Hr* et *Pg* dans les différentes conditions (P-lim, N-lim et témoin) et communautés expérimentales. Pour chacune des espèces, les moyennes ne montrant pas d'attributs en commun sont significativement différentes (Test *post-hoc* de Tukey <0.05)

		P-lim	N-lim	Témoin
Comm6	<i>Db</i>	5.90E+07 (3.61E+07) b	1.80E+08 (1.02E+08) a	6.71E+07 (2.99E+07) ab
	<i>Ske</i>	1.56E+09 (5.27E+08) b	3.62E+09 (8.03E+08) b	6.28E+09 (1.72E+09) a
	<i>Hr</i>	7.63E+07 (2.47E+07) a	2.31E+07 (1.76E+07) a	6.90E+07 (3.60E+07) a
	<i>Pg</i>	3.64E+08 (2.68E+08) a	9.96E+06 (1.65E+07) b	1.35E+09 (8.78E+08) a
	<i>total</i>	2.06E+09 (8.55E+08) b	3.84E+09 (9.39E+08) b	7.76E+09 (2.67E+09) a
Comm4	<i>Db</i>	2.88E+09 (6.26E+08) a	3.12E+09 (5.92E+08) a	2.89E+09 (1.00E+09) a
	<i>Ske</i>	3.47E+09 (1.93E+09) a	2.25E+09 (1.16E+09) a	5.24E+09 (1.84E+09) a
	<i>Hr</i>	1.17E+07 (1.27E+06) a	8.42E+06 (6.10E+06) b	3.67E+07 (1.25E+07) a
	<i>Pg</i>	3.04E+07 (1.70E+07) a	7.97E+06 (1.03E+07) b	4.67E+07 (2.23E+07) a
	<i>total</i>	6.40E+09 (1.01E+09) ab	5.38E+09 (8.02E+08) b	8.21E+09 (1.76E+09) a
Comm3	<i>Db</i>	1.05E+08 (1.59E+07) b	2.52E+07 (1.02E+07) c	5.10E+08 (2.10E+08) a
	<i>Ske</i>	1.08E+09 (5.35E+08) a	1.25E+09 (3.55E+08) a	4.45E+09 (3.23E+09) a
	<i>Pg</i>	3.59E+08 (1.75E+08) b	1.17E+08 (6.75E+07) c	1.69E+09 (2.76E+08) a
	<i>total</i>	1.55E+09 (7.54E+08) b	1.39E+09 (3.23E+08) b	6.65E+09 (2.33E+09) a

La figure V-1 recense également les biovolumes totaux mais exprimés en proportion afin de mieux visualiser la participation de chacune des espèces à la composition de chaque communauté. En premier lieu, il est important de remarquer que *Hemiselmis rufescens* (*Hr*) ne contribuait au maximum, en terme de biovolume total, qu'à 3% du biovolume total de la communauté dans la Comm6 (Fig.V-1, tableau V-3). Bien que présente en proportions égales aux autres en début d'expérimentation, la proportion représentée par cette espèce a rapidement décliné quelle que soit la communauté du fait de la limitation en sels nutritifs (compétition) et/ou d'interactions négatives possibles avec les autres espèces (allélopathie). *Ske* était l'espèce la plus représentée dans toutes les communautés et toutes les conditions, excepté Comm4 dans la condition N-lim où elle ne représentait que 44% du biovolume total (Fig.V-1). Concernant *Pg* et *Db*, les proportions sont variables en fonction des communautés et des conditions. *Pg* était en proportion plus abondante dans la condition P-lim et le témoin où elle contribuait jusqu'à 21% du biovolume total dans Comm3 et Comm6 tandis qu'elle ne représentait jamais plus de 2% dans la comm4 (Fig.V-1). Les proportions représentées par cette espèce étaient plus faibles dans le milieu N-lim que dans les deux autres conditions (Fig.V-1, tableau V-3).

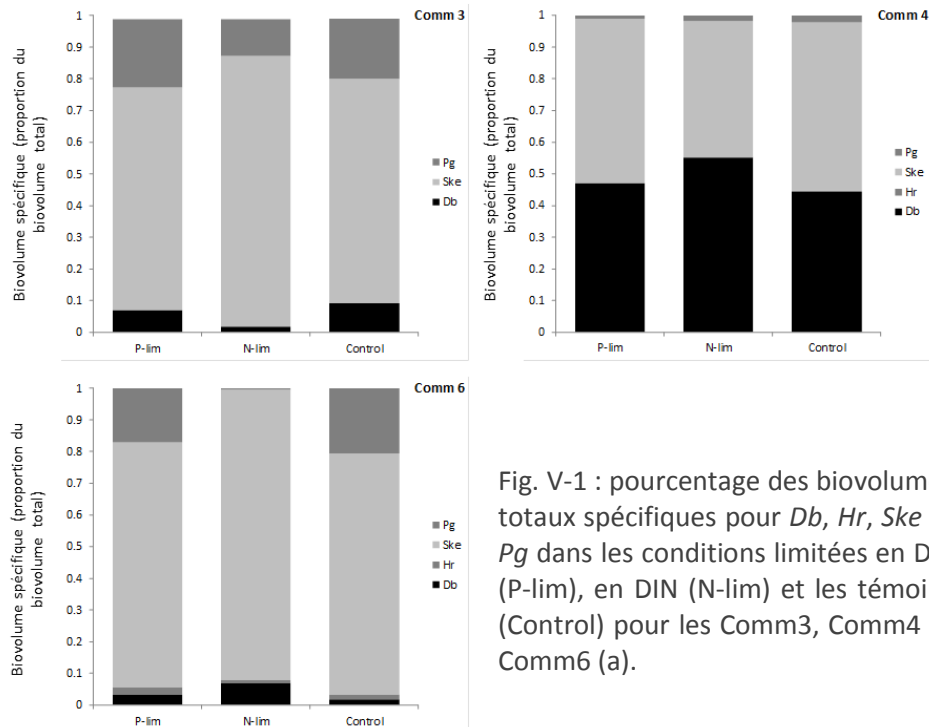


Fig. V-1 : pourcentage des biovolumes totaux spécifiques pour *Db*, *Hr*, *Ske* et *Pg* dans les conditions limitées en DIP (P-lim), en DIN (N-lim) et les témoins (Control) pour les Comm3, Comm4 et Comm6 (a).

Ces proportions qui diffèrent en fonction de la communauté et de la limitation en sels nutritifs aboutissaient à des indices de Shannon très variables (Fig.V-2). Un impact négatif de la limitation en azote était observé sur cet indice dans les communautés à 3 et 6 espèces. Cette diminution résultait d'une forte représentation de *Ske* dans ces communautés dans les conditions limitées en azote. La Comm4 présentait des indices moins variables, du fait de la co-dominance de *Ske* et *Db* dans toutes les conditions pour cette communauté (Fig.V-1, Fig.V-2).

V.3.1 Relations avec les sels nutritifs

Afin de mettre en évidence de manière globale les relations entre les concentrations en DIN, en DIP et l'abondance de chaque espèce une ACP a été réalisée (Fig.V-3). Les trois premières dimensions de l'ACP expliquent 81,74% de la variance. Les paramètres entrés dans cette analyse sont le logarithme de l'abondance cellulaire (cellules.l⁻¹) de *Db*, *Ske*, *Hr* et *Pg*, la concentration en azote et la concentration en phosphore (μmol.l⁻¹). Le logarithme du ratio N/P figure en tant que variable supplémentaire.

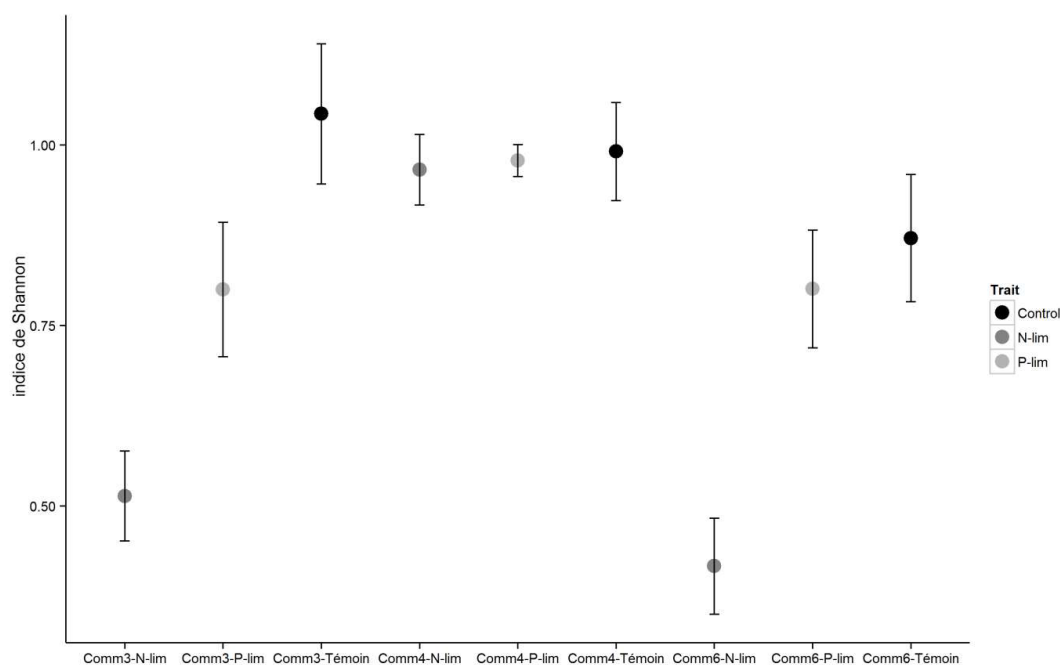


Fig. V-2: Valeur moyenne de l'indice de Shannon relevée pour les Comm3, Comm4 et Comm6 dans les conditions N-lim (gris foncé), P-lim (gris clair) et Témoin (noir).

L'abondance cellulaire de Pg et Db et la concentration en DIP et en DIN sont bien corrélées avec la première composante qui explique 34.16% de la variance. La deuxième composante (29,63%) est reliée à l'abondance de Ske et Hr. Enfin, la troisième composante explique 17,95% de la variance et est fortement corrélée avec l'abondance cellulaire de Db ($\cos^2=0,51$). L'ACP met en évidence une corrélation négative entre l'abondance de Pg et la concentration en DIP. Cela signifie que Pg était abondante quand la concentration en DIP était faible. De plus une corrélation négative est également observée entre le nombre de cellules de Db et Pg.

Une corrélation positive entre l'abondance de Db et la concentration en DIP est observée. Cependant cette relation n'est pas forte, Db étant principalement corrélée avec la troisième composante (Fig.V-2b). Enfin, l'abondance cellulaire de Ske et de Hr semble ne pas dépendre directement de la concentration en sels nutritifs.

La projection des individus sur les deux premières composantes (Fig.V-3c) met en évidence qu'une forte concentration d'azote est observée dans les conditions P-lim et, inversement, qu'une plus forte quantité de phosphore est mesurée dans la condition N-lim. Par ailleurs, la Comm4 (représentée par des triangles) s'isole partiellement des deux autres communautés. Une faible concentration en DIN et en DIP était mesurée dans la condition P-lim pour cette

communauté (Fig.V-3c). Sur la troisième composante, la Comm4 se distingue des deux autres du fait de la forte abondance de Db et Ske et d'une abondance moindre de Pg (Fig.V-3d).

L'ACP nous donne une vision globale des corrélations qui existent entre l'abondance cellulaire des différentes espèces dans toutes les communautés et les concentrations en sels nutritifs. Hormis pour Pg, il n'y a pas de lien clair entre la concentration en sels nutritifs et l'abondance cellulaire. En utilisant une approche plus directe, à savoir en faisant des régressions linéaires, des relations apparaissent entre l'abondance cellulaire et le rapport N/P (Fig.V-3). Des relations positives significatives entre l'abondance de Pg et le rapport N/P sont observées dans les Comm4 et 6 ($R^2 > 0,12$, $p < 0,05$) (Fig.V-4a). Des relations significatives existent également dans la Comm3 et la Comm6 pour Ske avec, contrairement à Pg, une diminution du rapport N/P quand l'abondance de Ske augmente ($R^2 > 0,12$, $p < 0,05$) (Fig.V-4b). Db présente également des relations significatives dans les Comm3 et 6, avec une augmentation de l'abondance avec le rapport N/P dans la Comm3 et une relation inverse entre ces deux facteurs dans la Comm6 (Fig.V-4c).

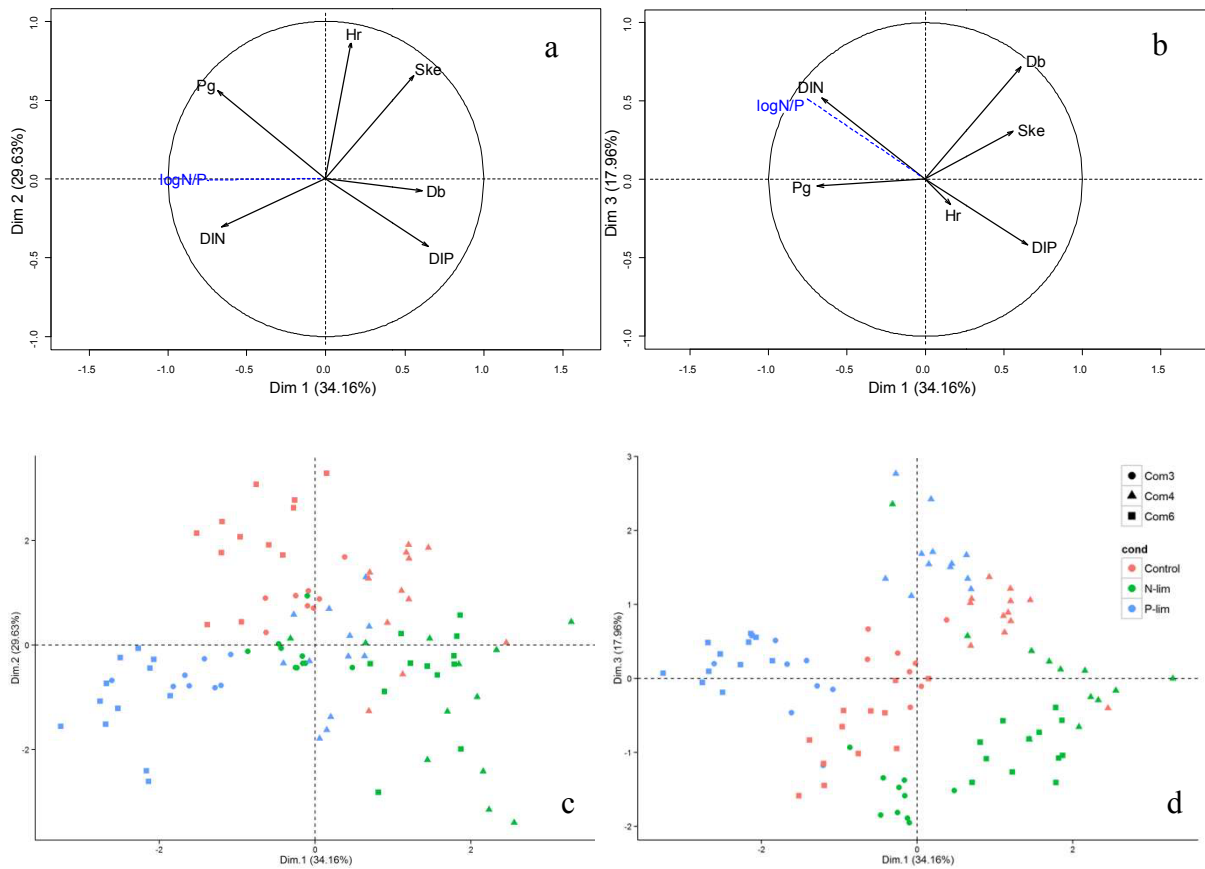


Fig. V-3: Cercle des corrélations pour les deux premières composantes (a) et les composantes 1 et 3 (b). Les variables d'intérêt sont : le logarithme de l'abondance de *Db* (Db , en cellules.l⁻¹), de *Ske*, de *Hr* et de *Pg*, la concentration en azote inorganique dissous (*DIN*, $\mu\text{mol.l}^{-1}$) et en phosphore inorganique dissous (*DIP*, $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Le logarithme du rapport N/P est intégré en tant que variable supplémentaire. Projection des individus sur les deux premières composantes (c) et les composantes 1 et 3 (d) des individus de la Comm3 (rond), Comm4 (triangle) et de la Comm6 (carré) dans les conditions P-lim (bleu), N-lim (vert) et Témoin (rouge).

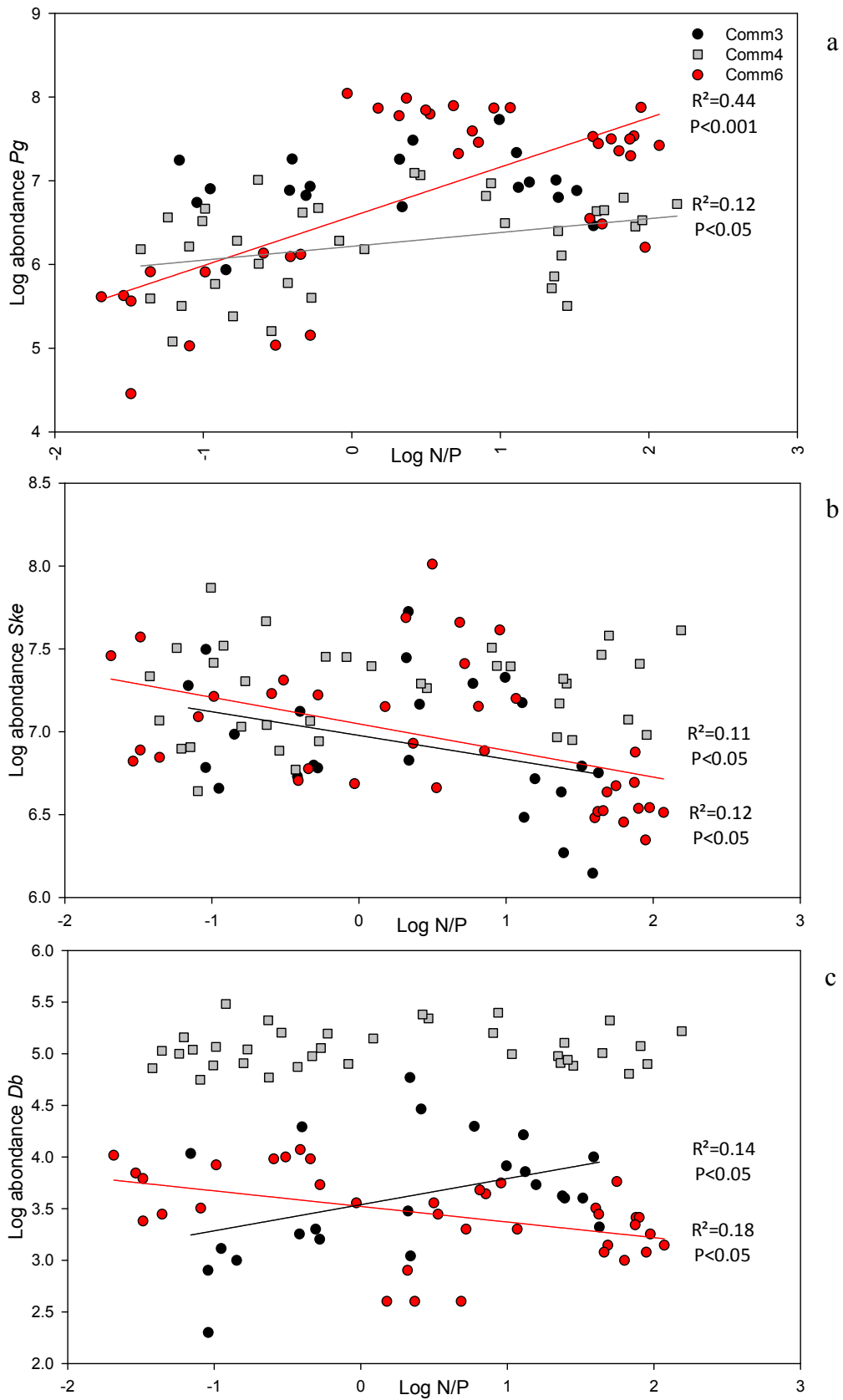


Fig. V-4: logarithme de l'abondance cellulaire (en cellules.l⁻¹) en fonction du logarithme du rapport N/P pour Pg (a), Ske (b) et Db (c). Les regressions linéaires significatives sont tracées par communauté sans distinction de condition expérimentale. Légende : Comm3 (rond noir, trait noir), Comm4 (carré gris, trait gris), Comm6 (rond rouge, trait rouge).

V.3.2 Comparaison des rendements en monoculture et en communauté

Dans cette partie nous nous intéressons aux relations entre la diversité et l'efficacité de différents processus physiologiques, à savoir l'absorption des ressources et l'assimilation de ces ressources pour la photosynthèse, la production d'hydrates de carbone, d'azote total et de carbone organique et la production de biomasse.

V.3.2.1 *Effets spécifiques de la mise en communauté*

Le rendement spécifique a été calculé pour les biovolumes totaux afin de savoir si une espèce donnée a, pour une condition donnée, un biovolume total plus grand en communauté qu'en monoculture. Hormis Hr et Ske dans la condition N-lim et Hr et Pg dans le témoin de la Comm6, toutes les espèces présentaient des rendements inférieurs à -1, mettant en évidence des rendements de biomasse spécifique plus faibles en communauté qu'en monoculture quelle que soit la condition (Fig.V-5). Les conditions abiotiques étant les mêmes qu'en monoculture cette observation traduit la présence de compétition entre les différentes espèces et la présence d'un effet de sélection plutôt que de complémentarité.

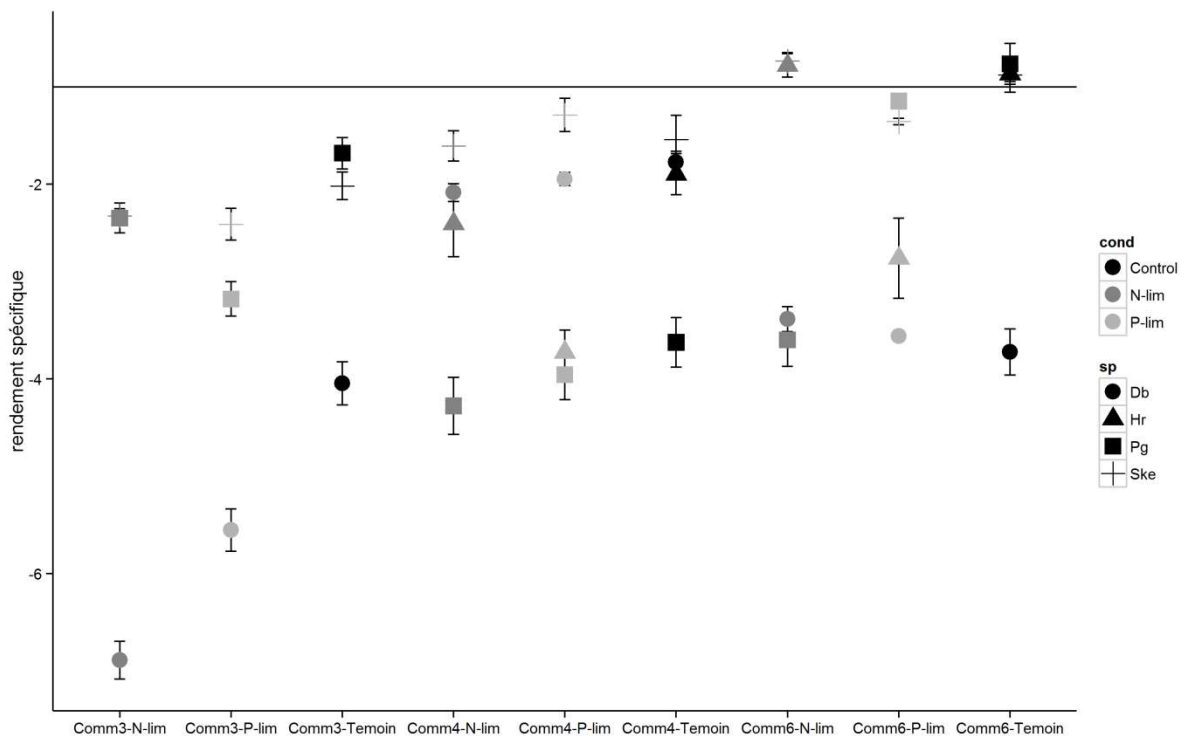


Fig. V-5: rendement spécifique du biovolume total Chez Db (rond), Ske (croix), Hr (triangle) et Pg (carré) dans les communautés à 6, 4 et 3 espèces dans les conditions P-lim (gris clair), N-lim (gris foncé) et témoin (noir). -1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture

Ske montrait les rendements spécifiques les plus hauts dans toutes les communautés et semblait la moins impactée par les relations biotiques interspécifiques. Par ailleurs, hormis dans la communauté à 4 espèces ou Db présentait des rendements spécifiques autour de -2, Db était fortement affectée par la présence des autres espèces dans les comm3 et 6 (Fig.V-5). Enfin, Hr présentait un sur-rendement du biovolume total dans la condition N-lim et le témoin de la Comm6. Cependant, cette espèce ne représentait jamais plus de 3% du biovolume total des communautés mettant alors en évidence la faible productivité de Hr.

V.3.2.2 *Etude comparative de l'absorption de la ressource. Les communautés surpassent-elles les monocultures ?*

Trois ressources principales au développement des microalgues ont été suivies dans nos expérimentations: l'azote inorganique dissous (DIN), le phosphore inorganique dissous (DIP) et la lumière.

Concernant le DIN et le DIP les rendements étaient majoritairement supérieurs à 1 (Fig.V-6) indiquant un sur-rendement et donc une meilleure absorption de ces ressources par les communautés. La Comm4 se démarquait en présentant des rendements très élevés, allant jusqu'à 3,6 pour le DIP et 45,5 pour le DIN (Fig.V-6). Ces fortes valeurs coïncidaient avec la forte proportion de Db dans cette expérimentation (Fig.V-1). Des sous-rendements ont néanmoins été observés. Le premier était constaté dans la condition P-lim dans la Comm6 pour l'absorption de DIP et le deuxième dans la condition N-lim dans la Comm3 pour l'absorption de DIN (Fig.V-6). En cas de limitation, l'absorption de ressource limitante était moindre dans la communauté que dans la monoculture pour ces deux expérimentations. Enfin, il n'existe aucune relation significative entre l'indice de Shannon et ces deux rendements. Les deux ressources limitantes, à savoir le DIN et le DIP, sont globalement plus absorbées dans les communautés que dans les monocultures.

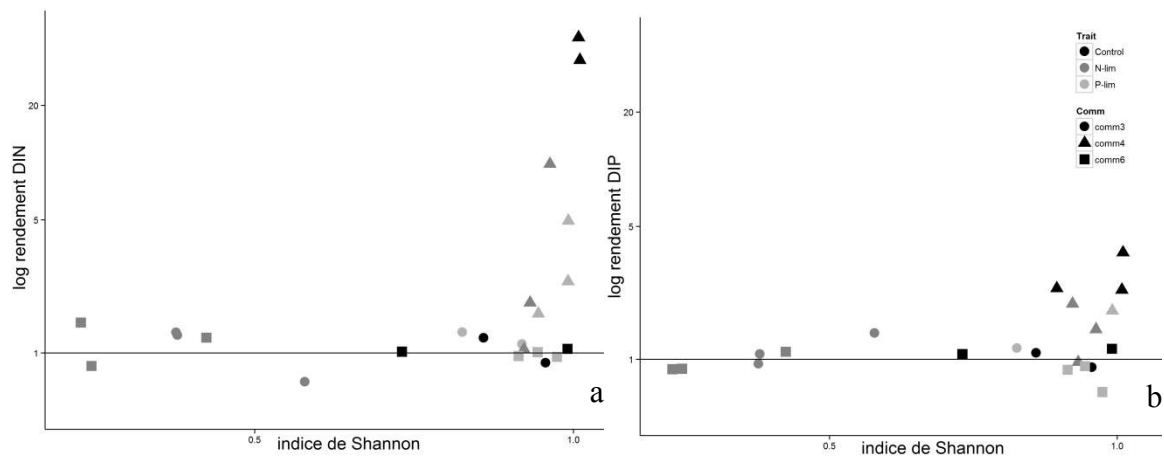


Fig. V-6: rendement de l'absorption de DIN (a) et DIP (b) dans les conditions limitées en DIN (N-lim, gris foncé), en DIP (P-lim, gris clair) et témoin (Control, noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture.

Concernant l'absorption de lumière, nous disposons de deux paramètres : le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle a (a^*) et, le taux de transfert d'électrons sous une lumière de $110 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ (ETR_{110}). Tout d'abord, nos résultats mettent en évidence l'absence de relation significative entre la diversité spécifique (indice de Shannon) et les valeurs de rendement pour a^* et ETR_{110} (Fig.V-7). Ensuite, un sur-rendement était très largement observé sur le a^* avec seulement un sous-rendement pour ce paramètre dans la condition limitée en DIP de la Comm6 (Fig.V-7) ; cette même condition présentait un sous-rendement sur l'utilisation du DIP (Fig.V-6). Les rendements pour ETR_{110} montraient globalement la même tendance que pour le a^* , mais davantage de conditions présentaient des sous-rendements modérés ($0.83 < \text{yield} < 1$) excepté pour un témoin dans la Comm6. Comme observé sur le rendement de l'utilisation de DIN et de DIP, la Comm4 présente les rendements les plus forts et ne présente que des sur-rendements dans toutes les conditions (Fig.V-7).

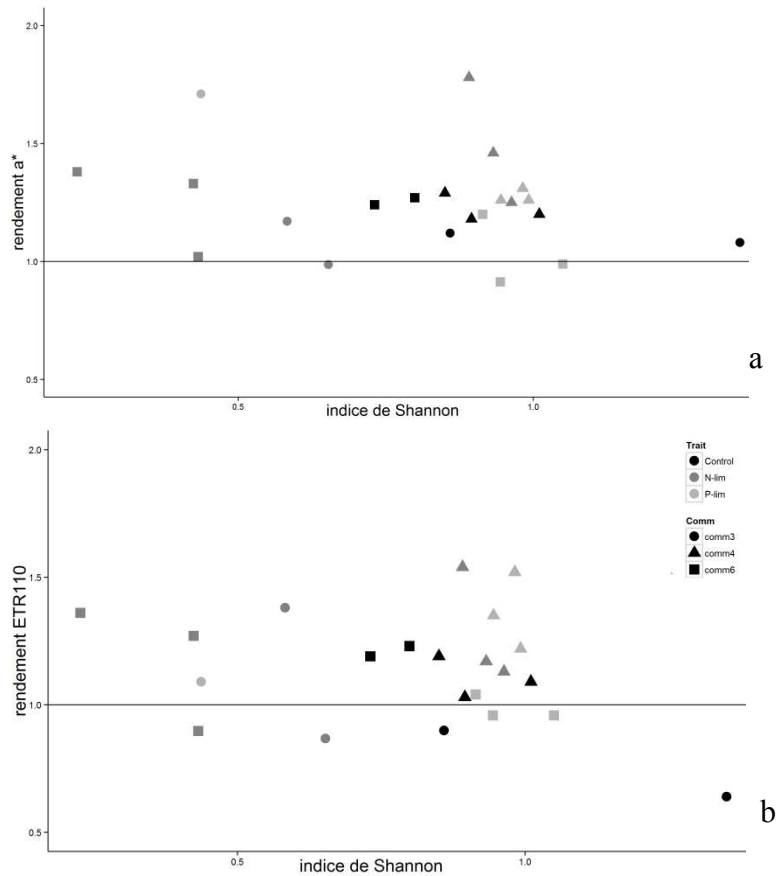


Fig. V-7: rendements du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle a (a, a^*) et du taux de transfert d'électrons (b, ETR_{110}) dans les conditions limitées en DIN (gris foncé), en DIP (gris clair) et témoin (noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). Le a^* était exprimé en $\text{mg Chl}a.l^{-1}$ et ETR_{110} en $\mu\text{mol } e^{-}. \text{mg Chl}a^{-1}. \text{s}^{-1}$ pour les cultures mono et plurispécifiques. 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture.

V.3.2.3 Utilisation de la ressource. La présence de plusieurs espèces favorise-t-elle la productivité de la communauté?

Plusieurs paramètres peuvent rendre compte de l'assimilation de la ressource absorbée. Nous nous consacrerons à la formation de carbone organique et d'azote total (respectivement POC et PON), à la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous ainsi qu'à la production de biomasse (biovolume total).

Les communautés produisaient moins d'hydrates de carbone que les monocultures, un sous-rendement a en effet été constaté pour toutes les expérimentations pour les hydrates de carbone dissous (Fig.V-8a). Ces effets étaient variables en fonction de la communauté et de la limitation en sels nutritifs, la Comm4 par exemple présentait des rendements allant jusque 0,89 dans la condition P-lim.

En ce qui concerne les hydrates de carbone particuliers, des rendements plus élevés que ceux observés pour les hydrates de carbone dissous, étaient constatés même si les communautés produisaient moins que les monocultures ; excepté pour la condition N-lim dans la comm6 qui présentait un faible sur-rendement (Fig.V-8b). Les hydrates de carbone particuliers représentent une partie du contenu en carbone organique particulaire (POC). L'étude de ce POC met en évidence la diminution du contenu en carbone organique dans les communautés par rapport aux monocultures dans la Comm6 (rendements<1), qui présentait les rendements les plus faibles. La Comm4 et la Comm6 présentaient des rendements plus variables, allant de 0,48 (sous-rendement) à 1,26 (sur-rendement) (Fig.V-8c).

La quantité d'azote total (PON) montrait des résultats un peu différents. En effet, dans la Comm4 la quantité de PON était plus forte dans les communautés que les monocultures (rendement >1). Par ailleurs la Comm3 montre des rendements compris entre 0,86 et 1,22, correspondant principalement à un sous-rendement sauf pour un point dans N-lim. Enfin, comme observé sur le POC, la Comm6 présentait les rendements les plus faibles, compris entre 0,51 et 0,82 (Fig.V-8d).

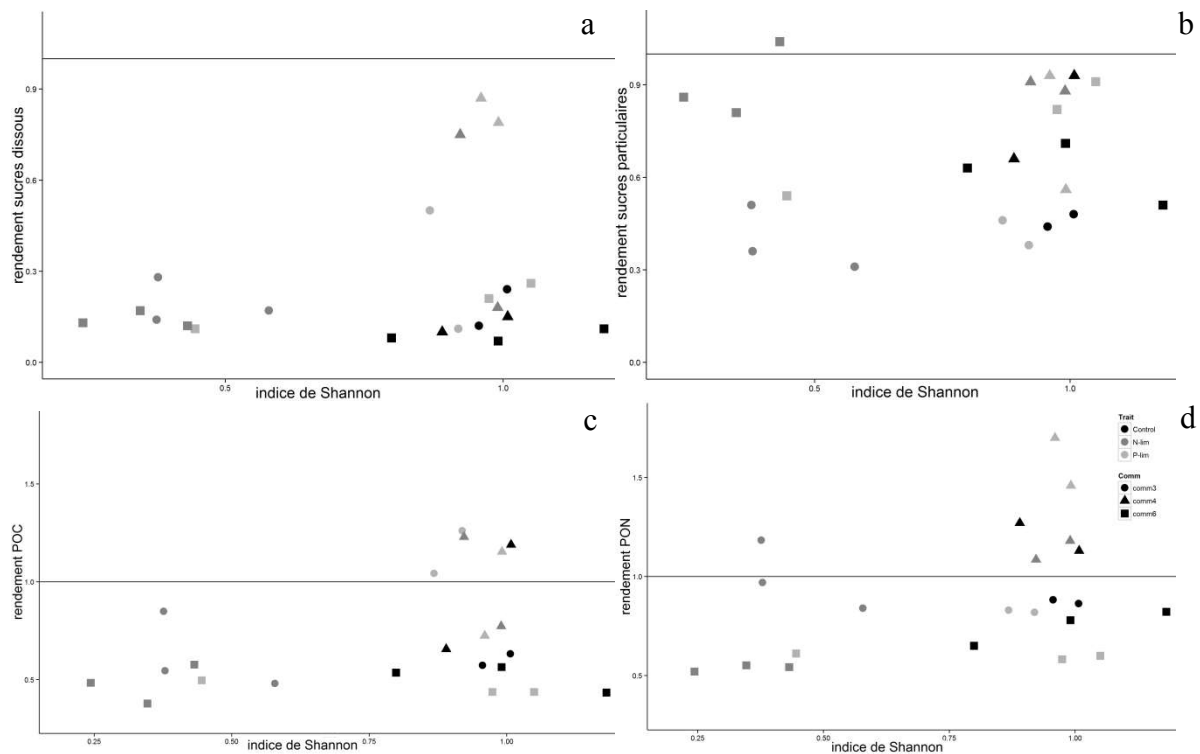


Fig. V-8:rendement du contenu en hydrates de carbone dissous (a) et particuliers (b), et en carbone organique particulaire (c) et en azote organique total (d) dans les conditions limitées en DIN (gris foncé), en DIP (gris clair) et témoin (noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). La quantité d'hydrates de carbone était exprimée en $\mu\text{gEq glc. cell}^{-1}$, le POC et le PON en $\mu\text{g C.cell}^{-1}$ et $\mu\text{g N.cell}^{-1}$ pour les cultures mono et plurispécifiques. 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture

Les ressources sont absorbées et assimilées par le phytoplancton pour la production de biomasse. Malgré une meilleure absorption de ces ressources, la production de biomasse, ici exprimée en biovolume total, était globalement inférieure en communauté qu'en monoculture. En effet, dans toutes les communautés des rendements compris entre 0.15 et 0.55 étaient observés dans les conditions limitées en sels nutritifs (Fig.V-9). Les témoins montraient également des rendements moins élevés en communauté dans les Comm4 et Comm3, malgré des valeurs plus fortes qu'en condition limitées. Seule la Comm6 possède, dans le témoin, des biovolumes totaux supérieurs en communautés qu'en monoculture (Fig.8). Il n'existait aucune relation significative entre les différents paramètres de productivité observés et l'indice de diversité de Shannon (Fig.8 et Fig.9).

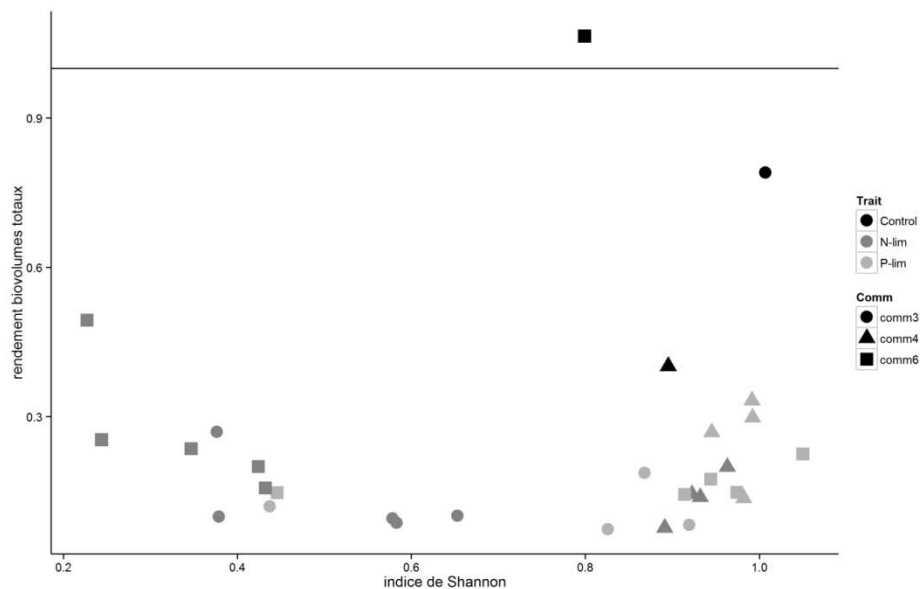


Fig. V-9:rendement du biovolume total dans les conditions limitées en DIN (gris foncé), en DIP (gris clair) et témoin (noir) pour les Comm6 (carré), Comm4 (triangle) et Comm3 (rond). Le biovolume total était exprimé en $\mu\text{m}^3.\text{l}^{-1}$ pour les cultures mono et plurispécifiques. 1 représente la valeur seuil à partir de laquelle le rendement de l'espèce en communauté équivaut à celui en monoculture

V.4 Discussion

Les trois communautés réalisées montrent des résultats contrastés. Tout d'abord bien que trois espèces soient principalement présentes dans les communautés, les proportions de chacune de ces espèces diffèrent en fonction de l'expérimentation. En effet, dans la Comm4 une co-dominance de Ske et Db est observée alors que Db n'est présente qu'en faible proportion dans les deux autres communautés. Dans l'ensemble, la concentration en sels nutritifs a eu un effet structurant sur les communautés (Comm3 et 6) et a aussi influencé la productivité de ces cultures plurispécifiques. Aucun lien clair n'est observé entre la productivité et l'indice de diversité, que ce soit sur des paramètres de stock (Hydrates de carbone, Carbone et Azote organique, biovolume totaux, abondance cellulaire) ou de flux (photosynthèse).

Afin d'appréhender l'ensemble des réponses observées dans toute leur complexité nous traiterons d'abord de la structure de chacune des communautés en fonction des conditions expérimentales. Puis nous aborderons, en lien avec la composition des communautés et les conditions expérimentales, les rendements de chacune des communautés en comparaison des monocultures.

V.4.1 Structure des communautés expérimentales

V.4.1.1 *Skeletonema sp : une espèce compétitive*

Dans toutes les expérimentations réalisées Ske a dominé, ou co-dominé (Comm4), les communautés en représentant au minimum 44% du biovolume total dans la Comm4 et jusqu'à 92% dans la Comm6. Cette espèce était abondamment présente dans toutes les conditions, et donc à des concentrations en sels nutritifs variées. De ce fait, l'analyse en composante principale ne nous permet pas de faire de lien direct entre la concentration en sels nutritifs et la biomasse produite par Ske. Cette capacité à dominer les communautés est liée à la taille de cette espèce et les conséquences qui en découlent. En effet, Ske est une diatomée de petite taille ce qui induit tout d'abord un fort taux de croissance (Marañon *et al.*, 2013), comme nous l'avons déjà observé en monoculture (Tableau III-3), mais aussi un rapport surface/volume élevé impliquant une meilleure capacité d'absorption des sels nutritifs par diffusion (Marañon *et al.*, 2013; Raven, 1998). Cette espèce va donc rapidement croître et s'octroyer une grande partie des sels nutritifs disponibles, limitant alors la croissance des autres espèces, ou masquant leur croissance effective du fait d'une capacité de croissance plus forte. Cette

espèce se comporte alors comme une super-espèce, au sens de Schmidtke *et al.* (2010) et Ptacnik *et al.* (2010).

Néanmoins, malgré la forte proportion de Ske, Db et Pg sont présentes dans des proportions variables dans toutes les communautés. Pg et Db pouvait représenter respectivement jusqu'à 21% et 55% du biovolume total. Contrairement à ce qui a été observé pour Ske, la concentration en sels nutritifs va influencer la production de cellules chez Pg. En effet, cette espèce est peu représentée dans la condition N-lim traduisant une plus forte sensibilité de la production de biomasse à la limitation en azote qu'en phosphore. De plus une relation significative et positive entre Pg et le rapport N/P est observée, en accord avec les résultats de Schoemann *et al.* (2005) et de Hillebrand *et al.* (2013) qui mettent en évidence des rapports N/P optimaux plus élevés pour les prymnesiophycées que pour les diatomées, et donc une plus forte sensibilité à la limitation en azote. De plus cette espèce est potentiellement capable d'utiliser d'autres sources de phosphore de par la présence de la phosphatase alcaline (Van Boekel and Veldhuis, 1990), limitant alors les effets d'une carence en DIP.

Enfin, la troisième espèce fortement représentée dans nos communautés est Db. Cette espèce de grande taille est peu sensible à la limitation en sels nutritifs comme nous l'avons mis en évidence dans les chapitres précédents. Néanmoins, cette espèce est de grande taille et présente donc des taux de croissance plus faibles que Ske et Pg. Ske va, de par son taux de croissance rapide, rapidement consommer les sels nutritifs. Db étant peu sensible à la limitation va pouvoir croître, même à des concentrations en DIN et DIP faibles, et produire de la biomasse. Nos résultats ne montrent pas de lien clair entre le rapport N/P et l'abondance de cette espèce, ces deux paramètres étant positivement corrélés dans la Comm3, négativement dans la Comm4 et ne présentant pas de lien significatif dans la Comm6. Toutefois, l'analyse en composante principale met en évidence des concentrations en DIP qui augmentent avec l'abondance de Db. Ceci résulte, d'une part, de la présence de Db dans les conditions N-lim qui présentent de fortes concentrations en DIP et, d'autre part, d'une forte consommation d'azote dans la Comm4 qui aboutit à une forte concentration en DIP qui est peu consommé par rapport à l'azote. Cette forte consommation d'azote dans la Comm4 explique également la forte proportion de Db au détriment de Pg qui se retrouve limitée dans toutes les conditions expérimentales pour ces communautés. L'analyse en composante principale met également en évidence des relations négatives entre l'abondance de Db et de Pg. Cela s'explique par la présence de Db dans les conditions N-lim, où Pg est peu présente, mais peut également

traduire la compétition potentielle entre ces deux espèces pour l'élément phosphore dans les conditions P-lim et les témoins.

Nous disposons de peu de données pour Tr et Hr et ne pouvons pas, par conséquent, mettre en évidence une relation entre la proportion de Tr, Hr et la concentration en sels nutritifs dans nos communautés. La proportion de biovolume de Tr décline rapidement dans toutes les conditions. Cette espèce semble être fortement affectée par la présence d'autres espèces, via soit une compétition interspécifique pour la ressource, soit un phénomène d'allélopathie. Hr, de son côté, avait un rendement de biovolume total plus fort en communauté qu'en monoculture dans les conditions N-lim et témoins de la Comm6. Pourtant Hr ne représente jamais plus de 3% du biovolume total dans la Comm6 mettant en évidence la faible productivité, en terme de biovolume total, de cette espèce en comparaison de Db, Ske et Pg. Hr entre dans la composition des communautés de cryptophycées observées en Manche Orientale. Houliez *et al.* (2013) ont mis en évidence la présence de ces communautés durant toute l'année dans le détroit du Pas-de-Calais avec une proportion de biomasse très faible en comparaison de la totalité de la biomasse phytoplanctonique (en accord avec nos résultats) entre Février et Juillet, période durant laquelle sont observées dans cette zone géographique des efflorescences de diatomées (composées pour partie de Db, Tr et Ske) et de *Phaeocystis globosa* (Hernández-Fariñas *et al.*, 2013; Schapira *et al.*, 2008).

Nos résultats sont caractérisés par de fortes variations de l'indice de Shannon au cours du temps. Les conditions initiales sont caractérisées par une égale répartition des espèces et donc un indice de Shannon proche du maximum. Au cours du temps cet indice a tendance à diminuer consécutivement à un changement de distribution des différentes espèces. Dans les Comm3 et Comm6 cet indice est tributaire de la condition expérimentale. En effet, l'indice de Shannon était plus faible dans la condition N-lim que dans les deux autres conditions du fait du fort impact de la limitation en azote sur la production de biomasse des espèces algales et tout particulièrement sur Pg. Dans la Comm4, l'indice de Shannon est élevé et ne varie pas en fonction de la condition expérimentale. Cette communauté est, en termes de biovolume total, composée presque à 50% de Db qui est une espèce peu sensible à la limitation en sels nutritifs, et dont la biomasse ne varie pas ou peu dans les différentes conditions expérimentales. Cette variabilité de l'indice de Shannon a également été mise en évidence sur le phytoplancton en milieu naturel (Napoléon *et al.*, 2014). L'utilisation de cet indice, bien que courant dans les études diversité/productivité, ne semble pas optimal dans notre cas. En effet, un indice, basé sur les aspects fonctionnels (ici prenant compte de la taille), mériterait

d'être développé pour représenter les relations entre productivité et un indice de diversité, non plus spécifique, mais fonctionnelle.

V.4.2 Analyse des rendements : les communautés sont-elles plus productives que les monocultures ?

Afin de rendre compte de l'efficacité quant à l'utilisation des ressources et la production des communautés par rapport aux monocultures, des rendements sont calculés sur différents stocks : la concentration d'azote (DIN), de phosphore (DIP), d'hydrates de carbone particuliers et dissous, de POC, de PON, le a^* et le biovolume total. Les rendements sur un paramètre de flux, le taux de transfert d'électrons (ETR_{110}) sont également estimés.

V.4.2.1 *Meilleure efficacité des communautés pour l'utilisation des ressources*

❖ Absorption des sels nutritifs

Comme l'ont également montré Ptacnik *et al.* (2008), Hillebrand et Lehmpful (2011) pour le phytoplancton dulcicole ou encore Olli *et al.* (2014) pour le phytoplancton marin, les communautés sont plus efficaces pour l'absorption de DIN et de DIP que les monocultures, par comparaison avec ce que l'on devrait observer si les individus en communautés se comportaient comme dans les monocultures. Cette meilleure efficacité dans l'absorption des sels nutritifs est due à la présence d'un effet de complémentarité ; les communautés étant composées de différentes espèces qui présentent des affinités différentes pour ces sels nutritifs. En effet, Schoemann *et al.* (2005) et Hillebrand *et al.* (2013) ont mis en évidence des rapports N/P optimaux globalement plus élevés pour les prymnesiophycées que pour les diatomées. Cette meilleure efficacité dans l'absorption des ressources n'avait, à notre connaissance, jamais été montrée expérimentalement sur le phytoplancton marin et met en évidence le rôle prépondérant du phytoplancton et de la diversité des microalgues sur la régulation de la concentration en azote et en phosphore, comme l'ont très récemment mis en évidence Olli *et al.* (2014) en mer Baltique.

❖ Utilisation de la lumière disponible

Le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (a^* en $m^2 \cdot mg \text{ chl}a^{-1}$) est utilisé comme un indicateur de l'efficacité d'absorption de la lumière. Un a^* plus grand implique une meilleure absorption de lumière. Ce coefficient varie en fonction de l'espèce et de la

condition en sels nutritifs en monoculture comme nous l'avons montré dans le Chapitre 2 et 3. Les rendements concernant ce paramètre sont supérieurs ou égaux à 1 (sauf pour une observation où il est égal à 0,83) indiquant que les communautés ont parfois une aussi bonne mais souvent meilleure capacité d'utilisation de la lumière que les monocultures. Comme en ce qui concerne l'absorption de DIN et de DIP, cette meilleure capacité d'absorption de la lumière est due à un effet de complémentarité entre espèces. Les espèces étudiées possèdent des arrangements et compositions pigmentaires différents augmentant alors la capacité d'utilisation de la ressource lumineuse comme l'ont mis en évidence Behl *et al.* (2011) et Stockenreiter *et al.* (2013) sur des communautés phytoplanctoniques d'eau douce.

Associé à cette augmentation du rendement pour le a^* , nous observons la même tendance pour le taux de transfert d'électrons (ETR_{110}) qui correspond au flux d'électrons au niveau des photosystèmes II. En effet, 73% des observations présentent un sur-rendement pour ce paramètre. En plus de la meilleure absorption observée via le a^* , ce rendement élevé met en évidence une meilleure utilisation de la lumière vers la photosynthèse là aussi résultant d'un effet de complémentarité. La capacité photosynthétique des microalgues a tendance à diminuer en cas de limitation en sels nutritifs (e.g. Turpin, 1991; Wykoff *et al.*, 1998), comme nous l'avons montré dans le Chapitre 2. Le fait d'avoir des rendements supérieurs à 1 dans tout type de condition implique un moindre effet de la limitation en sels nutritifs sur la capacité photosynthétique des cellules en communautés ou un effet complémentarité plus fort que l'effet limitation.

V.4.2.2 *Assimilation des ressources absorbées*

Nous venons de mettre en évidence une meilleure absorption de la ressource des communautés par rapport aux monocultures. Ces ressources, une fois absorbées, vont être assimilées par les cellules algales dans diverses voies que nous étudierons à travers l'évolution de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires, la quantité de carbone (POC) et d'azote total (PON) et le biovolume total.

Des sous-rendements sont constatés sur les hydrates de carbone dissous et particulaires (sauf un point en Comm6 N-lim) de toutes les communautés dans toutes les conditions. Cette quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires est directement liée à l'état physiologique des cellules. Tout d'abord, il existe une corrélation négative entre le taux de croissance et le contenu en hydrates de carbone des cellules (Wang *et al.*, 2010). D'un autre

côté, une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires par cellule est régulièrement observée en cas de limitation en sels nutritifs. Ces hydrates de carbone sont produits par la photosynthèse et ne vont pas pouvoir être couplés à de l'azote ou du phosphore devenus limitant, ce qui empêche leur utilisation (Granum *et al.*, 2002; Mari *et al.*, 2005; Mykkestad, 2000; Urbani *et al.*, 2005). Cette réponse est néanmoins espèce dépendante (Granum *et al.*, 2002; Urbani *et al.*, 2005). La présence de sous-rendements résulte alors, soit d'une plus forte division cellulaire, d'une production de biomasse plus faible ou alors d'un impact moindre de la limitation en sels nutritifs dans les conditions limitées.

Les quantités d'azote total et de carbone organique particulaire (PON et POC) montrent, comme pour les hydrates de carbone, une tendance globale au sous-rendement avec toutefois la présence de sur-rendements principalement dans la Comm4. Ces sous-rendements en POC indiquent une quantité de carbone organique particulaire plus faible dans les communautés qu'en monoculture. Le POC est principalement composé de lipides, hydrates de carbone et acides aminés tandis que le PON est composé à plus de 70% de protéines. La quantité de PON et POC par cellule va dépendre de l'espèce et de l'état physiologique des cellules (Collos and Berges, 2004; Fernandez-Reiriz *et al.*, 1989; Mykkestad, 1974). La présence de sous-rendements concernant ces paramètres peut résulter d'une production de biomasse faible. En effet, le POC et le PON sont directement reliés au nombre de cellules, une production de cellules moindre implique une moindre quantité de POC et PON. D'autre part, la quantité de POC par cellule a tendance à augmenter en cas de limitation en sels nutritifs (Alderkamp, 2006; Guerrini *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 1990), tandis que la quantité de PON a tendance à diminuer en cas de limitation en DIN (Bi *et al.*, 2012; Hecky and Kilham, 1988; Lynn *et al.*, 2000). La Comm4 montre des sur-rendements concernant la quantité de PON et de POC mettant en évidence une quantité plus grande de POC et PON comparée à celle attendue si les individus se comportaient comme en monoculture. Associé à ce fort rendement, la Comm4 présentait les plus forts rendements concernant l'absorption des éléments nutritifs. Cette communauté était la seule à présenter une forte proportion de Db dans toutes les conditions et montrait une forte absorption de sels nutritifs qui aboutit à la formation accrue de POC et PON.

L'absorption des sels nutritifs et leur assimilation sont réalisées par le phytoplancton pour, au final, produire de nouvelles cellules. Nous nous sommes intéressés ici à la production de biomasse à travers l'étude du biovolume total. Concernant la production de biomasse par espèce, des sous-rendements sont observés dans 85% des cas. Cela signifie que chacune des

espèces montre un biovolume total inférieur en communauté qu'en monoculture. Cela résulte d'une compétition pour la ressource entre les différentes espèces en présence dans une même communauté. Les 15% de cas de sur-rendements observés le sont dans la Comm6 et ne concernent jamais Db, qui semblait être davantage affectée par un effet de compétition. Ce sur-rendement est très léger et indique que Hr et Ske ont des biovolumes totaux un peu plus importants dans la condition limitée en azote de la Comm6 qu'en monoculture. Le même résultat est observé dans le témoin sur Hr, Ske et Pg. La présence de sur-rendement implique une absence de compétition associée à un effet complémentarité dans ces conditions (Hillebrand and Matthiessen, 2009).

Enfin, concernant le biovolume total non plus spécifique mais des communautés, un rendement inférieur à 1 est observé dans toutes les communautés et toutes les conditions (excepté le témoin de la Comm6), indiquant une plus faible production de biovolume total des communautés par rapport aux monocultures. La limitation en sels nutritifs semble influencer ce rendement, les conditions témoin montrent des rendements plus forts que les conditions limitées. La présence de sous-rendements associée à l'absence de relation entre quantité de biomasse et diversité entre en contradiction avec le patron de réponse régulièrement observé (Behl *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2013; Power and Cardinale, 2009; Ptacnik *et al.*, 2010). Néanmoins, Schmidtke *et al.* (2010) observaient un patron de réponse similaire qu'ils attribuaient à un fort effet sélection. En effet leurs expérimentations étaient rapidement dominées par *Monoraphidium minutum*, une espèce qui s'avérait peu productive en monoculture, ce qui avait pour effet d'influencer négativement la productivité des communautés. Dans nos expérimentations, Ske représentait la plus large proportion des communautés. Cette espèce montrait de forts biovolumes totaux en monoculture quelle que soit la condition en comparaison de Db et Pg. Les sous rendements observés ici ne semblent pas pouvoir s'expliquer par la forte proportion de Ske mais semblent davantage résulter d'un fort effet de la limitation en sels nutritifs sur ce paramètre.

Les communautés présentaient une forte capacité d'absorption des ressources mais une faible capacité de transformation de celles-ci en biomasse. La quantité de DIN et DIP absorbés peut alors soit être stockée au sein de la cellule, soit être utilisée pour un autre processus que la production de biomasse que nous n'aurions pas mesuré comme par exemple la respiration.

V.5 Conclusion et intérêt de l'approche multifactorielle

Contrairement à ce qui a été observé dans de nombreuses études portant sur la relation diversité/productivité nous n'observons pas de relation positive entre la productivité de nos communautés et la richesse spécifique (Behl *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2013; Cardinale *et al.*, 2006; Duffy, 2009; Power and Cardinale, 2009). Balvanera *et al.* (2006) ont recensé différents niveaux de complexité dans les expérimentations portant sur les relations productivité/diversité et distinguent trois grands groupes d'expérimentations : celles présentant des diversités spécifiques faibles (nombre d'espèces < 10), intermédiaires (entre 11 et 20 espèces) et fortes (nombre d'espèces >20). Ces auteurs mettent en évidence l'importance du nombre d'espèces utilisées dans la conclusion de l'expérimentation. Notre étude appartient à la catégorie « faible diversité spécifique », en travaillant sur 6 espèces (dont certaines n'influencent pas l'expérimentation) et 4 groupes fonctionnels, et est marquée par un effet de sélection fort, limitant les possibilités d'observation d'éventuels effets de complémentarité. D'autres auteurs travaillant également à faible diversité spécifique ont cependant montré une relation positive entre diversité et productivité (Behl *et al.*, 2011; Power and Cardinale, 2009).

En comparaison d'autres études portant sur les relations entre la diversité et la productivité ou le fonctionnement de l'écosystème (Byrnes *et al.*, 2014) notre étude intègre de nombreux paramètres, de l'absorption des ressources à la formation de biomasse. De plus notre étude intègre à la fois des paramètres de stocks (quantité d'hydrates de carbone, de carbone, d'azote, de cellules) et de flux (ETR₁₁₀). Cette approche multifactorielle nous permet d'appréhender les réponses des communautés à plusieurs niveaux et de mieux comprendre les réponses observées. En ne mesurant que la production de biomasse, ce qui est fréquemment réalisé, nous n'aurions pu mettre en évidence le caractère particulier de la Comm4 qui présente des sur-rendements concernant le POC et le PON et serions ainsi passé à côté de l'importance de Db dans les réponses observées. Par ailleurs, cette approche multifactorielle a permis de mettre en évidence un décalage entre l'absorption des sels nutritifs qui est meilleure en communauté, résultant d'un phénomène de complémentarité, et la formation de biomasse qui est globalement inférieure en communauté, traduisant alors un phénomène de compétition ou de sélection. Néanmoins, les trois communautés présentent des résultats contrastés.

VI. Synthèse générale

Dans le contexte du changement global, des modifications des concentrations et des ratios en sels nutritifs sont observées en milieu naturel et sont concomitantes à l'augmentation des températures des eaux océaniques. Cette étude permet de mettre en évidence certaines réponses écophysiological des microalgues à ces changements environnementaux et de discuter de l'évolution des processus écosystémiques qui en dépendent. Par la mise en place d'études expérimentales, des effets de la limitation en sels nutritifs (azote et phosphore), de la température et de leurs interactions ont été mis en évidence sur différents traits de réponse phytoplanctoniques à savoir : le taux de transfert maximum relatif et absolu d'électrons du PSII, l'efficacité d'utilisation maximale de la lumière, le rendement quantique maximum, la quantité de chlorophylle *a*, le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a*, la quantité de carbone organique particulaire, la quantité d'azote total particulaire, la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous, le taux de croissance des cellules, le volume cellulaire et la formation de biomasse (à travers plusieurs indicateurs).

Les facteurs environnementaux expérimentés (sels nutritifs et température) influencent différemment les traits de réponses, mais les patrons de réponses diffèrent également par espèces ou groupes d'espèces. Dans cette synthèse générale des travaux effectués, les principaux effets de la limitation en azote et en phosphore sur les différents traits étudiés seront tout d'abord présentés. Puis, les effets température et leurs interactions avec les sels nutritifs seront détaillés. Dans une deuxième partie nous discuterons de l'aspect fonctionnel des réponses aux variations environnementales en insistant d'abord sur le lien entre la taille et les réponses observées et ensuite sur les réponses spécifiques qui ne peuvent être simplement liées à un facteur morphologique mais plutôt à d'autres caractéristiques spécifiques. Dans une troisième partie, les relations diversité/productivité seront décrites. Enfin diverses perspectives d'études, basées sur nos résultats, seront discutées. Cette synthèse présente volontairement un plan différent de celui du corps principal du manuscrit afin d'offrir au lecteur un autre angle de vue.

VI.1 Des réponses contrastées aux différentes conditions environnementales des traits mesurés

→ Effet sels nutritifs

La limitation en sels nutritifs va aboutir à des modifications à plusieurs niveaux des traits étudiés. Bien que la résultante de la limitation en azote et en phosphore soit la même, à savoir

une diminution de la biomasse produite pour toutes nos espèces, et ce, à travers tous les indicateurs de biomasse utilisés (sauf le biovolume total pour Db), les effets observés sur les traits de réponses diffèrent en fonction des sels nutritifs. En effet, concernant les paramètres relatifs à la capacité photosynthétique l'azote va avoir un effet négatif sur la quantité de chlorophylle *a* par cellule et le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (a^*). Ces effets peuvent être accompagnés d'une diminution du taux de transfert d'électrons maximum au niveau du PSII, de l'efficacité maximale d'absorption de la lumière et du rendement quantique maximum. La limitation en phosphore va, quant à elle, aboutir à la diminution des processus photosynthétiques à savoir le taux de transfert maximum d'électrons relatif, l'efficacité d'utilisation de la lumière ou encore le rendement quantique maximum, indépendamment de l'aspect structurel des photosystèmes et sans diminution de la quantité de chlorophylle *a* par cellule. En effet, la limitation en phosphore n'aboutit jamais à la diminution de la quantité de chlorophylle par cellule mais peut aboutir à des modifications du a^* , représentatif de l'arrangement pigmentaire. La chlorophylle est un pigment azoté (Turpin, 1991), de formule $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$, la limitation en phosphore, contrairement à la limitation en azote, n'influence donc pas directement sa synthèse. Cependant des variations du a^* sont observés et sont représentatives soit d'un réarrangement des pigments entre-eux, soit de la modification de la quantité de pigments non chlorophylliens (Bricaud *et al.*, 1995) en cas de limitation en phosphore. Par ailleurs, la limitation en azote et en phosphore aboutit globalement à une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone et de carbone organique par cellule {comme l'ont, par exemple, mis en évidence \Harrison, 1990 2007 #129; Granum, 2002 #86 sur divers taxons}. Ces résultats soulignent le fait qu'une même limitation influence différemment les traits étudiés. En effet, d'un côté la limitation en sels nutritifs conduit à la diminution de différents indicateurs de l'activité photosynthétique (comme l'ont observé sur divers taxons Da Silva *et al.*, 2009; Geider *et al.*, 1993; Lippemeier *et al.*, 2001; Turpin, 1991; Wykoff *et al.*, 1998) et d'un autre côté à l'augmentation de la quantité d'hydrates de carbone par cellule (en accord avec Granum *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2011; Mari *et al.*, 2005; Mykkestad, 1977). Cela résulte du fait que malgré la diminution de l'activité photosynthétique, processus précurseur de la production d'hydrates de carbone, la production d'hydrates de carbone perdure. Ces hydrates de carbone ne pouvant être couplés à de l'azote ou du phosphore et se retrouvant en excès par rapport aux besoins métaboliques de l'individu, vont se retrouver stockés au sein de la cellule. Enfin, dans les communautés expérimentales réalisées, la limitation en azote aboutit à une diminution des valeurs de l'indice de diversité de Shannon, du fait d'une forte sensibilité à l'azote de *Phaeocystis*

globosa (comparativement au phosphore) (Riegman and Van Boekel, 1996) qui ne produit que peu de biomasse en cas de limitation azotée. Les réponses décrites ci-dessus dessinent bien les réponses globales aux limitations en sels nutritifs (Fig.VI-1). Néanmoins un fort effet spécifique, décrit dans la section 2 de cette partie, va nuancer les patrons de réponse détaillés ci-dessus.

Ces résultats mettent en évidence la complexité des effets des sels nutritifs sur les traits de réponses phytoplanctoniques. Par ailleurs, ils montrent l'intérêt d'étudier le phytoplancton à travers plusieurs traits de réponses. En effet, les effets diffèrent selon les traits, et en conséquence, des conclusions différentes pourraient être formulées en fonction du trait étudié. La diminution de la capacité photosynthétique associée à la diminution de biomasse observée en cas de limitation en sels nutritifs laisse envisager des effets négatifs sur les réseaux trophiques associés au phytoplancton. Les organismes consommateurs de phytoplancton, comme les copépodes, auront moins de proies disponibles et pourraient alors décliner ou changer de cibles préférentielles en s'attaquant davantage aux ciliés aboutissant alors à un véritable basculement du régime alimentaire (Breteler *et al.*, 1999; Edwards and Richardson, 2004). Dans le même temps, le fait qu'une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone par cellules et de la quantité d'hydrates de carbone exsudés soit constatée pour les mêmes espèces en présence de limitation implique une potentielle meilleure valeur nutritive des microalgues pour les niveaux trophiques supérieurs et une activité plus forte de la boucle microbienne (Obernosterer and Herndl, 1995). De plus, Von Scheibner *et al.* (2014) ont récemment mis en évidence un impact positif de l'augmentation de la température sur la boucle microbienne, qui répond fortement et plus rapidement que le phytoplancton à l'augmentation de température. Des études multifactorielles des réponses du phytoplancton à la limitation en sels nutritifs augmentent alors la compréhension des réponses spécifiques mais aussi des répercussions possibles sur les communautés associées.

→ Effets température, quels liens avec les effets de la limitation en sels nutritifs ?

Comme l'ont décrit Gillooly *et al.* (2001) ou encore Brown *et al.* (2004) la température influence la physiologie des organismes à l'échelle individuelle impliquant alors des répercussions à l'échelle des populations et des communautés. Chez les microalgues marines une augmentation de température a tendance à aboutir à une augmentation des réactions enzymatiques, de l'activité photosynthétique, de l'absorption des sels nutritifs ou encore du taux de croissance dans une gamme de température donnée (Bissinger *et al.*, 2008; Claquin *et*

al., 2008; Davison, 1991; Raven and Geider, 1988; Regaudie-de-Gioux and Duarte, 2012; Toseland *et al.*, 2013). Nos expérimentations ont été réalisées à deux (10°C et 14°C) voire trois températures différentes (12°C pour Db, Tr et Pg en condition limitée en phosphore et témoin). Ces températures entrent dans la gamme de température rencontrée par ces microalgues en Manche Orientale. Dans nos expériences, la température influence les différents traits de réponse selon trois principales modalités (Fig.VI-1).

Premièrement, la température seule influence les traits de réponse. La température influence le taux de croissance pour toutes les espèces, sauf *Ditylum brightwellii*, qui augmente avec la température en accord avec les résultats de Raven et Geider (1988). Concernant les autres paramètres que le taux de croissance, *Ditylum brightwellii* est la seule espèce sur laquelle est observé cet effet température seul qui se traduit par des taux de transfert d'électrons et une quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires par cellules plus forts à 14°C qu'à 12°C et 10°C (Tukey, $p < 0.05$), les valeurs à 12°C et 10°C ne différant pas entre elles.

Deuxièmement, l'effet température peut s'ajouter à l'effet sels nutritifs aboutissant à une variation de « l'intensité » de l'effet des sels nutritifs. En ce cas, la nature de l'effet de la limitation est la même quelle que soit la température mais la variation de l'effet observé est dépendante de la température. Cet effet est observé sur la quantité de carbone par litre chez *Ditylum brightwellii*, *Skeletonema sp.* et *Phaeocystis globosa* pour lesquelles une diminution de la quantité de carbone est observée dans les conditions limitées en sels nutritifs (qui ne diffèrent pas entre elles) avec un renforcement de cet effet quand la température augmente. Ce type d'effet est également observé sur la production de biomasse, estimée par fluorescence *in vivo*, chez *Thalassiosira rotula* avec un effet sels nutritifs moins fort à 14°C qu'à 10°C.

Enfin, un effet interaction entre les sels nutritifs et la température est souvent observé, se traduisant par des différences de réponses à la limitation en azote et en phosphore aux différentes températures d'étude. Cet effet interaction est le plus communément observé et concerne tous les paramètres mais de façon spécifique. De plus, un effet interaction sur un trait de réponse n'implique pas forcément un effet interaction sur les autres traits, même si ceux-ci sont fortement interdépendants, mettant en évidence les différences de réponse individuelle de chacun des traits aux mêmes conditions environnementales. De tels effets interactifs entre la limitation en sels nutritifs et la température ont déjà été mis en évidence sur la croissance (Rhee and Gotham, 1981), le volume cellulaire (Peter and Sommer, 2013) ou la production d'hydrates de carbone (Borchard and Engel, 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013)

sur d'autres taxons phytoplanctoniques. Dans nos expérimentations, cet effet d'interaction est notamment remarqué sur le taux de transfert d'électrons, l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière et le rendement quantique maximal de nos espèces à faible volume cellulaire, Ske, Pg et Hr. Pour Pg, cette interaction se traduit par la diminution de ces traits dans les conditions limitées à 10°C tandis qu'aucun effet n'est observé à 14°C. La température optimale pour notre souche de Pg semble être 15°C, d'après les études menées par Riegman et Van Boeckel (1996). L'interaction traduit alors les effets d'une température sub-optimale pour Pg, en accord avec les observations de Rhee et Gotham (1981) sur la croissance d'autres taxons. A l'inverse, l'interaction entre les sels nutritifs et la température sur ces paramètres photosynthétiques chez Ske et Hr se traduit par une augmentation de l'effet de la limitation en azote quand la température augmente (Fig.III-2 et tableau III-3). Ces effets pourraient résulter d'une diminution de la production d'enzymes (qui ont des structures moléculaires azotées), dont de nombreuses sont impliquées dans l'activité synthétique, en cas de limitation en azote (Turpin, 1991). Une augmentation de température va avoir pour effet direct d'augmenter les vitesses de réactions métaboliques (e.g. enzymatiques) (Gillooly *et al.*, 2001) qui se traduit par une formation de cellules plus importante (Raven and Geider, 1988; Regaudie-de-Gioux and Duarte, 2012). La cellule va alors chercher à produire davantage et va avoir des réactions enzymatiques plus rapides ce qui peut augmenter sa sensibilité à la limitation en azote. Par ailleurs, Toseland *et al.* (Toseland *et al.*, 2013) suggèrent que la température peut influencer l'allocation des ressources (ici l'azote et le phosphore) et la stœchiométrie du phytoplancton en favorisant un investissement plus fort de ces ressources pour la photosynthèse quand la température augmente. Cette hypothèse implique alors une demande de ressources plus forte pour l'activité photosynthétique quand la température augmente. Ils ont également montré une augmentation du rapport N/P des cellules avec l'augmentation de température mettant en évidence une augmentation de la sensibilité à la limitation en azote quand la température augmente. Ces hypothèses concordent bien avec les effets interactifs de la limitation en sels nutritifs et la température observés sur l'activité photosynthétique chez Ske et Hr.

Bien que la température et la concentration en sels nutritifs aient toutes deux des effets sur la majorité des espèces et des traits mesurés il apparaît que la concentration en sels nutritifs dirige davantage les variations des traits de réponses que la température (Fig.VI-1), en accord avec Marañon *et al.* (2014), Staehr et Sand-Jensen (2006), Tadonlécé (2010), Marinov *et al.* (2010) ou encore Peter et Sommer (2013). En effet, Peter et Sommer (2013) ont mis en évidence une diminution du volume cellulaire de 46% par degrés Celsius d'augmentation en

cas de limitation sévère en sels nutritifs tandis que cette diminution n'était plus que de 4.7% en cas de limitation moins prononcée, montrant alors l'importance de l'effet sels nutritifs. Par ailleurs, Marañon *et al.* (2014) ont montré, via l'étude de production de biomasse et de fixation de carbone mesurées dans des zones polaires, tempérées et tropicales, que les réponses de ces paramètres de production ne dépendent pas de la température mais bien de la présence de limitation en sels nutritifs. Cette dominance de l'effet sels nutritifs par rapport à l'effet température a une base physiologique très simple. En effet, comme il est décrit par ailleurs dans ce manuscrit, le principal effet de la température sur les organismes phytoplanctoniques va être d'accélérer les réactions enzymatiques qui interviennent dans la plupart des processus physiologiques. Pour fonctionner une enzyme a besoin de substrat et réalise son activité via l'utilisation et la transformation de ce substrat. En cas de limitation en sels nutritifs ce substrat sera présent en quantité limitée ce qui contraint les réactions enzymatiques en amont de l'effet température.

VI.2 Des réponses spécifiques et fonctionnelles

→ La taille des cellules conditionne les réponses aux conditions environnementales...

En accord avec d'autres travaux, notre étude confirme que la taille des organismes phytoplanctoniques est un trait fonctionnel clef qui influence de nombreux traits de réponse (Litchman and Klausmeier, 2008). Notre étude a permis de mettre en évidence dans toutes les conditions la présence d'une relation positive et significative entre le taux de transfert d'électrons, ramenés à une unité de structure ou non (quantité de cellule, quantité de chlorophylle *a*, *a**), et la taille des cellules (Fig.III-6). Les cellules de grande taille de par la présence de plus de PSII présentent des taux de transfert d'électrons plus fort que les cellules de petites tailles. Bien que le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* (*a**) diminue avec la taille (Fig.III-7) (Morel and Bricaud, 1981), la relation entre le taux de transfert d'électron et la taille reste vraie même si le *a** et la concentration de chlorophylle *a* entrent en ligne de compte. La relation positive observée entre le taux de transfert d'électrons et la taille reflète bien une augmentation de ce processus quand la taille augmente mais qui ne dépend pas que du nombre de photosystèmes II présents dans la cellule mais aussi de leur efficacité.

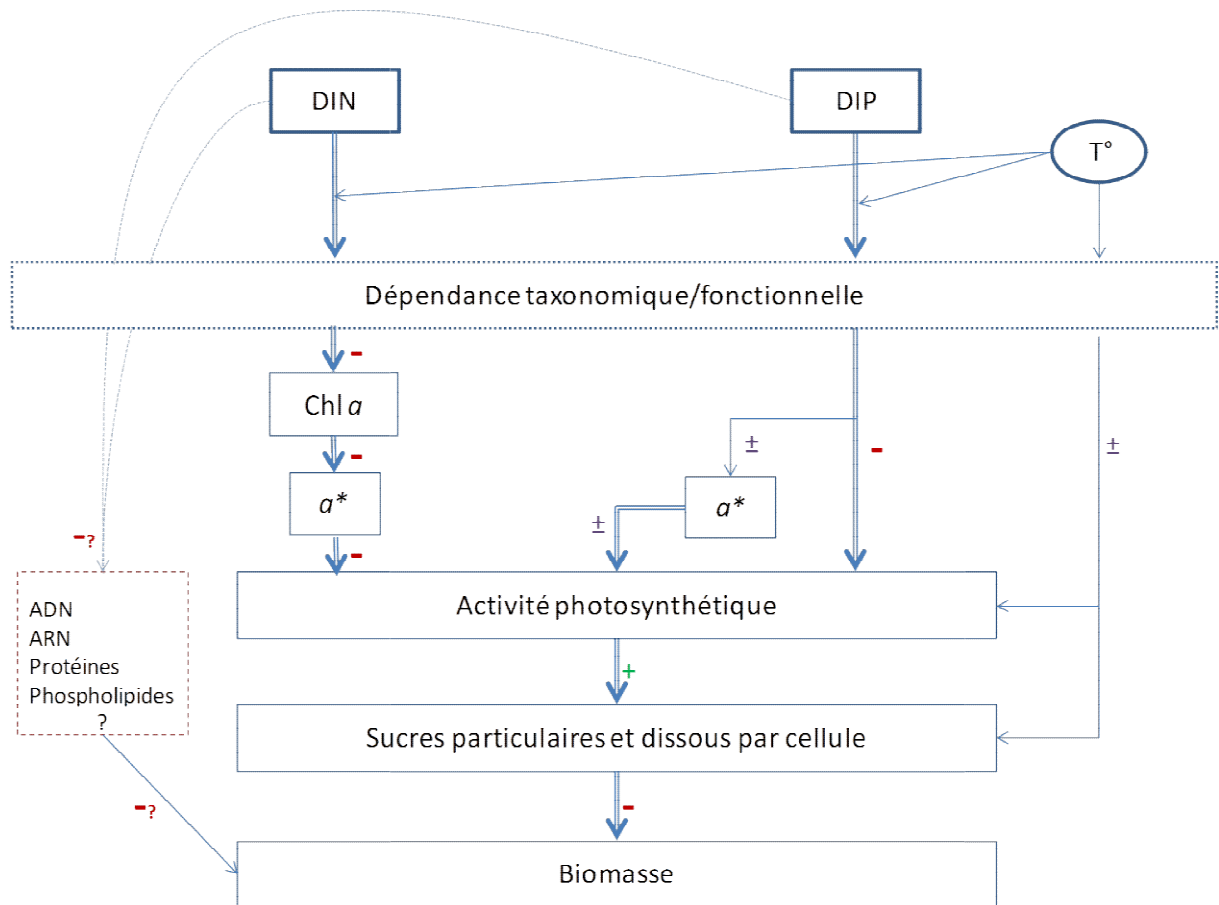


Fig. VI-1 : schéma conceptuel reprenant les principaux effets de la limitation en azote (DIN), en phosphore (DIP), de la température (T°) et de leur interaction sur l'activité photosynthétique, la quantité d'hydrates de carbone par cellule et la quantité de biomasse. Les flèches symbolisent la présence d'effet entre les deux compartiments visés. La largeur de ces flèches augmente avec l'importance de cet effet. Les effets peuvent se traduire par une augmentation (+), une diminution (-) ou un effet dépendant de l'espèce (\pm) du processus ou de la quantité relatifs au compartiment visé. Les influences non mesurés dans notre étude apparaissent en pointillés. Ce schéma représente une vue globale des effets observés et il important de garder à l'esprit que les effets ont une dépendance spécifique ou fonctionnelle forte.

Moal *et al.* (1987) et Hitchcock (1982) ont mis en évidence, en l'absence de limitation, une relation positive entre la quantité d'hydrates de carbone particuliers par cellule et la taille. Dans notre étude, une relation positive entre la taille et la quantité d'hydrates de carbone par cellule est également observée, et ce, dans toutes les conditions. Une relation similaire est mise en évidence entre la quantité d'hydrates de carbone dissous et la taille des cellules (Fig.IV-2). De plus, il existe une corrélation positive entre la quantité d'hydrates de carbone dissous et particuliers (Fig.IV-3). Cette relation ne diffère pas en fonction de la condition expérimentale. Contrairement aux diatomées benthiques qui peuvent présenter une exsudation forte sans augmentation de la quantité d'hydrates de carbone intracellulaires (Staats *et al.*, 2000), ce résultat met en évidence que l'exsudation des hydrates de carbone des diatomées

pélagiques est précédée par une augmentation d'hydrates de carbone à l'intérieur de la cellule, et que cette exsudation existe même quand la quantité d'hydrates de carbone par cellule est faible. Le maintien de cette exsudation peut être utile au maintien de la phycosphère (Rooney-Varga *et al.*, 2005) et résulter d'un processus actif ou passif (diffusion) (Lopez-Sandoval *et al.*, 2013; Mykkestad, 2000). Enfin, il a longtemps été considéré que l'exsudation résultait d'un phénomène de diffusion à travers la membrane cellulaire (Mykkestad, 2000). Dans notre étude, la proportion d'hydrates de carbone exsudés n'est pas reliée à la taille indiquant que ce processus d'exsudation n'est pas uniquement dû à un phénomène de diffusion cellulaire (Fig.IV-3), concordant avec les résultats de Lopez-Sandoval *et al.* (2013) qui montraient l'absence de relation entre l'exsudation de carbone (mesuré par l'utilisation de méthode au ^{14}C) et la taille de diverses microalgues.

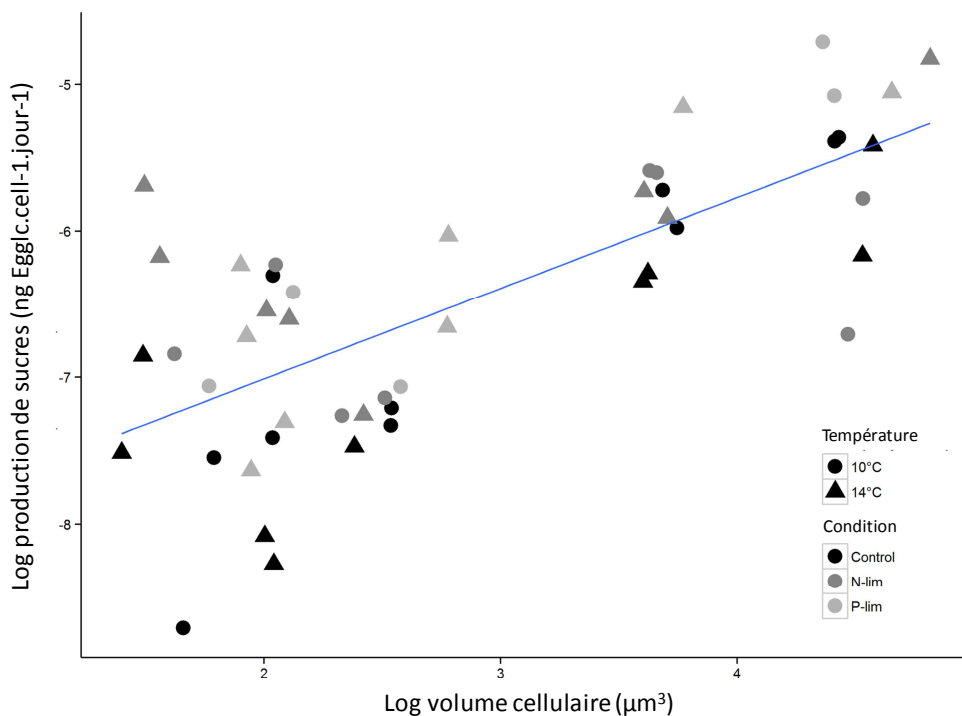


Fig. VI-2: logarithme de la production d'hydrates de carbone particulaire en fonction du logarithme de biovolume à 10°C (rond) et 14°C (triangle) dans les conditions limitées en phosphore (P-lim, gris clair), en azote (N-lim, gris foncé) et témoin (Control, noir)

La production d'hydrates de carbone particulaire par cellule et par jour augmente également avec la taille de la cellule (Fig.VI-2, $R^2=0.51$, $p<0.001$) quelles que soient la condition et la température. Le taux de transfert d'électrons et la production d'hydrates de carbone augmentent avec la taille dans toutes les conditions expérimentales mettant alors en avant une meilleure production de matière carbonée par cellule indépendamment de la limitation en sels nutritifs ou de la température au fur et à mesure que la taille augmente.

De plus il apparait que, la taille va, tout du moins en partie, conditionner la réponse de nos espèces aux différentes conditions environnementales (Fig.VI-3). Tout d'abord, *Ditylum brightwellii* ne montre que peu de variations de ses différents traits en réponse à la limitation en azote et en phosphore. En effet, cette espèce ne montre qu'une diminution du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* associée à une diminution de la quantité de chlorophylle *a* par cellule dans la condition limitée en azote ainsi qu'une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone et de carbone par cellules dans la condition limitée en phosphore. Ces effets, significatifs mais de faibles intensités, se traduisent par une diminution de biomasse, elle aussi significative mais de faible intensité comparativement aux autres espèces, dans les conditions limitées en sels nutritifs. Ce résultat peut directement être lié à la grande taille des cellules de *Ditylum brightwellii* qui lui confère une capacité de stockage forte, une grande quantité de sites de transport de sels nutritifs ainsi que des besoins en sels nutritifs plus faibles pour la production d'une unité de volume (Marañón *et al.*, 2013). Ces trois caractéristiques procurent alors un avantage lors d'un apport régulier de sels nutritifs, et ce, même quand les concentrations en sels nutritifs apportés et dans le milieu sont faibles, comme c'est le cas dans notre étude. Un patron de réponse aux différentes conditions environnementales, que l'on peut relier à la taille, est observé sur différents processus relatifs à l'activité photosynthétique à savoir le taux de transfert relatif d'électrons, l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière mais aussi le rendement quantique maximum. En effet, Db ne présente qu'une faible diminution de l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière dans les conditions limitées en phosphore. Au contraire les cellules de petites tailles, Ske, Pg et Hr montrent la présence d'effets interactifs de la limitation en sels nutritifs sur ces paramètres qui se traduisent différemment selon l'espèce. Un effet sels nutritifs fort est observé à 10°C pour Pg tandis qu'un renforcement de l'effet de la limitation en azote est observé à 14°C pour Hr et Ske. Cette relation avec la taille n'est valide que sur les processus photosynthétiques en l'absence de considération de paramètres de stocks tels que la concentration en chlorophylle *a* ou encore le coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a*. Enfin, Tr, de taille intermédiaire, présente une réponse intermédiaire à celles observées pour Db d'un côté, et les espèces de petite taille de l'autre.

En outre, la variabilité du taux de transfert relatif d'électrons, du taux de transfert absolu d'électrons par cellule et du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* aux différentes conditions de limitation augmente au fur et à mesure que la taille diminue (Fig.III-6 et 7). Ce résultat implique une sensibilité plus forte des espèces de petite taille aux

conditions de limitation et à la température. Ces observations sont d'importance lorsque l'on considère les changements observés et à venir des systèmes naturels. En effet, une tendance à l'augmentation des rapports N/P est attendue au niveau des côtes Européennes et pourraient davantage impacter les cellules de petites tailles que de grande taille. De plus les interactions observées entre les sels nutritifs et la température ne sont pas en faveur des petites cellules. Un changement dans la composition spécifique des communautés aurait alors des répercussions sur les réseaux trophiques associés. Il faut néanmoins rester très prudent vis-à-vis de ces extrapolations. En effet, nous travaillons dans des conditions de simplification extrêmes des processus observés à l'échelle écosystémique. De nombreux autres facteurs tels que la turbulence, la prédation ou encore l'apport irrégulier de sels nutritifs (via des précipitations par exemple) vont complexifier les processus en milieu naturel.

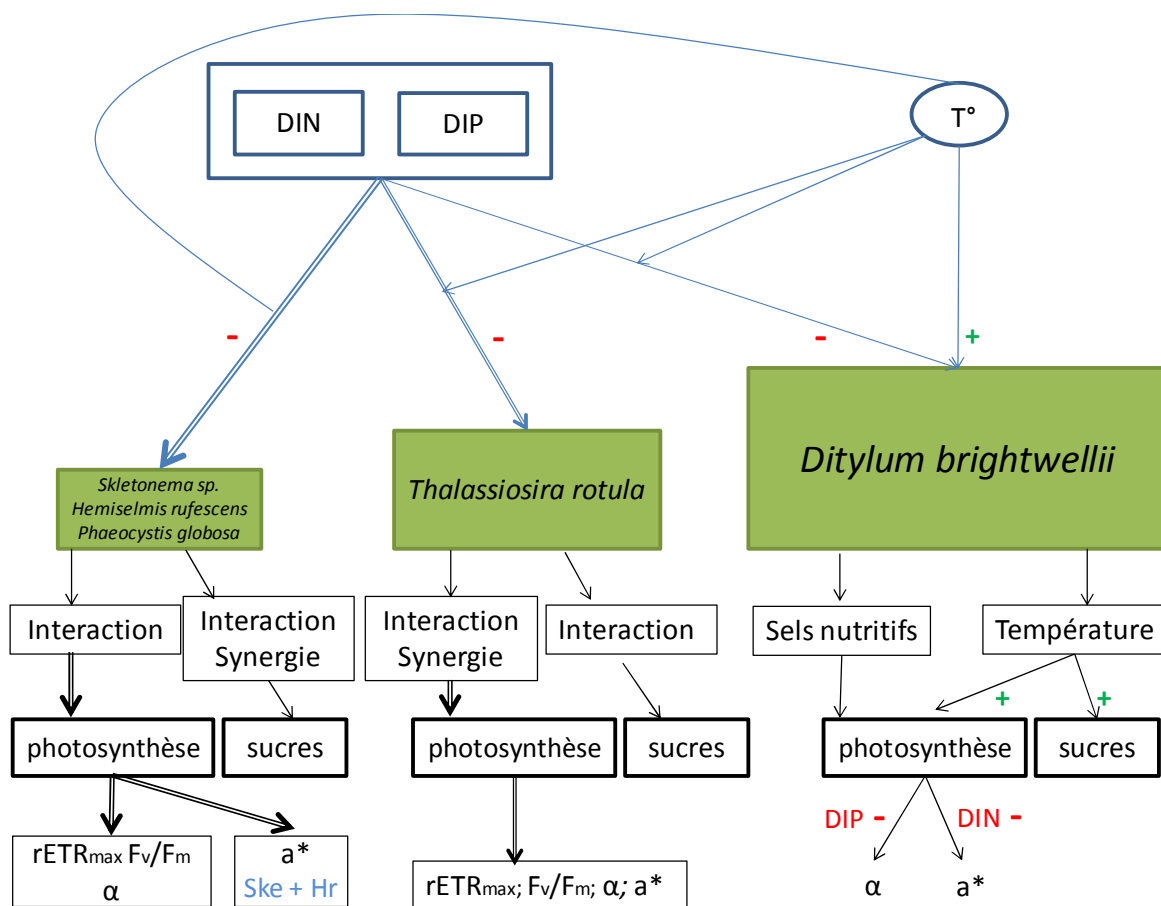


Fig. VI-3:Schéma conceptuel des effets de la limitation en azote (DIN), en phosphore (DIP), de la température et de leur interaction en fonction de la taille des cellules (taille croissante de la gauche vers la droite). La largeur des flèches augmente avec l'intensité des effets. Les effets négatifs (-) et positif (+) de la limitation en sels nutritifs et/ou de la température sont représentés. Pour chaque gamme de taille est dénommée la nature de l'effet (à savoir effet sels nutritifs, température, d'interaction ou de synergie entre sels nutritifs et température) sur la photosynthèse (Les traits de réponses développés sont ceux influencés) et la formation d'hydrates de carbone. Ce schéma vise à récapituler les principaux liens entre la taille et les réponses aux conditions environnementales.

→ ... mais la phylogénie reste tout de même un paramètre essentiel.

Bien que la taille puisse conditionner toute une gamme de réponse, certaines réponses sont davantage dépendantes de l'espèce ou du groupe taxonomique étudié que de la taille des cellules. En effet, contrairement aux réponses observées sur la photosynthèse, les réponses en termes de contenus en hydrates de carbone particuliers ou de quantité d'hydrates de carbone dissous par cellule aux différentes conditions environnementales sont espèces dépendantes. *Skeletonema sp.* ne présente pas de différence significative d'exsudation entre les différentes conditions. Cette observation est caractéristique de cette espèce comme l'avaient par ailleurs déjà mis en évidence Granum *et al.* (2002). Une différence de la quantité d'hydrates de carbone dissous est néanmoins observée mais résulte d'un fort taux de croissance dans le témoin qui implique une quantité d'hydrates de carbone par cellules plus faible (Wang *et al.*, 2010) et qui tire vers le bas ces valeurs de quantité d'hydrates de carbone. Par ailleurs, *Ditylum brightwellii* ne montrait qu'un effet température sur les quantités d'hydrates de carbone dissous et particuliers par cellule. Enfin, malgré la bonne relation qui existe entre la quantité d'hydrates de carbone par cellule et la taille il apparait que *Hemiselmis rufescens* dévie de cette relation en présentant une quantité d'hydrates de carbone par cellule forte compte tenu de sa taille. Ce caractère semble être commun à d'autres cryptophycées (Moal *et al.*, 1987).

Phaeocystis globosa montre également des réactions spécifiques induites par des propriétés physiologiques indépendantes de la taille. Notre souche a été isolée à partir de prélèvements réalisés dans le détroit du Pas-de-Calais à la mi-avril et appartient à la population qui forme une efflorescence observée chaque année dans cette zone géographique à cette période. Selon Riegman et Van Boeckel (1996) il existe différents écotypes de *Phaeocystis globosa* qui diffèrent entre autres de par leur température optimale de croissance (4°C, 8°C et 15°C). La gamme de température pendant laquelle l'efflorescence de *Phaeocystis globosa* est habituellement observée dans le détroit du Pas-de-Calais est comprise entre 9°C et 19°C (Schapira *et al.*, 2008). Il est alors fort possible que notre souche appartienne à l'écotype dont la température optimale de croissance est 15°C. En accord avec cette hypothèse, nos résultats montrent un gradient de réponse en fonction de la température sur le taux de transfert d'électrons. Ce taux est fortement affecté par la limitation en azote et en phosphore à 10°C mais pas à 14°C. La première expérimentation sur l'effet phosphore réalisée à 12°C met en évidence un effet de la limitation en phosphore à cette température. Les valeurs de taux de transfert d'électrons sont néanmoins supérieures et diffèrent significativement de celles

mesurées à 10°C (Tukey, $p=0.044$) mais ne diffèrent pas de façon significative à celles mesurées à 14°C (Tukey, $p=0.26$). Par ailleurs, *Phaeocystis globosa* montre une sensibilité accrue à la limitation en azote en comparaison de la limitation en phosphore. Cela se traduit par la diminution de la capacité photosynthétique, de la formation de biomasse, par les perturbations fortes d'autres traits (carbone, hydrates de carbone) en cas de limitation en azote ainsi qu'une quasi absence de cette espèce dans les différentes communautés en cas de limitation en cet élément. La présence d'une enzyme permettant l'utilisation de phosphore organique, la phosphatase alcaline, induit vraisemblablement une limitation moindre par le phosphore chez cette espèce (Van Boekel and Veldhuis, 1990). Enfin, cette espèce présentait de fortes variabilités des paramètres a^* et de la quantité d'hydrates de carbone qui sont dues à la présence d'un cycle de vie complexe pour cette espèce. En effet, *Phaeocystis globosa*, a montré dans nos expériences une alternance rapide de phase coloniale et isolées (flagellées ou non) qui possèdent vraisemblablement des caractéristiques photosynthétiques et de métabolisme des hydrates de carbone particulières, comme l'ont montré Verity *et al.* (1991) sur *Phaeocystis pouchetii*.

Notre étude révèle un effet fort de la limitation en phosphore chez les diatomées *Thalassiosira rotula* et *Skeletonema sp.* tandis que *Phaeocystis globosa* est davantage impactée par la limitation en azote. Hillebrand *et al.* (Hillebrand *et al.*, 2013) ont mis en évidence une différence dans les rapports N/P optimaux pour les diatomées et les haptophycées (dont fait partie *Phaeocystis globosa*) avec des rapports plus faibles pour les diatomées que les haptophycées. Ces rapports indiquent des besoins en phosphore plus forts et des besoins en azote plus faibles pour les diatomées que pour les haptophycée, en accord avec nos résultats. Par ailleurs, le modèle MIRO (Lancelot *et al.*, 2005), qui est un modèle biogéochimique, a été utilisé pour décrire, en lien avec les concentrations et apports en sels nutritifs, les efflorescences de diatomées et de *Phaeocystis globosa* dans la partie sud de la mer du Nord et de comprendre la variabilité de ces efflorescences en rapport avec les conditions environnementales. Une des projections de ce modèle, figurant dans le tableau VI-1, prévoit un effet accru de la limitation en azote sur *Phaeocystis globosa* et de la limitation en phosphore sur les diatomées (Gypens *et al.*, 2007), en concordance avec nos résultats.

Tableau VI-1: effet de la réduction en sels nutritifs de la Seine et du Scheldt sur la biomasse annuelle (exprimée en %) des diatomées (diatoms) et de *Phaeocystis* de la zone côtière Belge selon les prévisions du modèle MIRO (Gypens *et al.*, 2007). Les années pluvieuses (wet) sont distinguées de moins humides (dry) du fait de l'importance de la pluviométrie sur l'apport de sels nutritifs.

	PO ₄ reduction		NO ₃ reduction		PO ₄ +NO ₃ reduction	
	Diatoms	<i>Phaeocystis</i>	Diatoms	<i>Phaeocystis</i>	Diatoms	<i>Phaeocystis</i>
1990 (dry)	-20	-11	-9	-43	-20	-41
1994 (wet)	-40	-6	-22	-38	-37	-36
1996 (dry)	-24	-11	14	-43	-11	-31
1999 (wet)	-31	-2	-22	-34	-32	-34

VI.3 Des relations productivité/diversité non établies

→ Effet de la concentration en sels nutritifs sur la composition des communautés

Trois communautés ont été réalisées dans les mêmes conditions environnementales et ont présenté des résultats contrastés concernant leur composition spécifique. En effet, les communautés à 3 et 6 espèces sont largement dominées par *Skeletonema sp.* tandis que la communauté à 4 espèces est co-dominée par *Skeletonema sp.* et *Ditylum brightwellii*. *Phaeocystis globosa* est la troisième espèce fortement représentée dans toutes les communautés.

Les sels nutritifs vont conditionner la composition des communautés. Nos résultats mettent en évidence la faible proportion de biomasse de *Phaeocystis globosa* dans les conditions limitées en azote, du fait de la faible compétitivité de cette espèce pour l'azote. *Thalassiosira rotula* décline très vite et ce même dans le témoin. Enfin *Hemiselmis rufescens* ne représente qu'une faible (<3%) proportion de la biomasse totale dans les communautés expérimentales. Sommer (1983) a mis en évidence la faible compétitivité des cryptophycées pour le phosphore quand cet élément est en faible concentration. *Hemiselmis rufescens* présente des rendements de biomasse totale spécifique faibles dans la limitation en phosphore et semble davantage affectée qu'en limitation en azote et dans le témoin où elle montre une production de biomasse plus forte en culture plurispécifique qu'en monoculture. La présence de sur-rendement en communauté associé à la faible contribution de cette espèce à la biomasse totale traduit alors la faible productivité de cette espèce en comparaison de *Ditylum brightwellii*, *Skeletonema sp.* et *Phaeocystis globosa*.

→ Une meilleure efficacité des communautés pour l'absorption des ressources...

Globalement les communautés atteignent des concentrations en azote et en phosphore minimum plus faibles qu'en monoculture traduisant une meilleure absorption des sels nutritifs dans ces communautés. Cette meilleure efficacité est due à un phénomène de complémentarité entre espèces qui résulte soit d'une différenciation de niche soit d'interactions positives entre espèces pour l'absorption de ressource (Cardinale *et al.*, 2007; Loreau and Hector, 2001). Cette complémentarité s'explique ici en partie par les différences de besoins en sels nutritifs entre *Phaeocystis globosa* (Haptophycée) qui présente des rapports N/P optimaux plus élevés que les diatomées (Hillebrand *et al.*, 2013), ce qui augmente alors le potentiel d'absorption de la ressource des communautés par rapport aux monocultures, comme l'ont également montré sur des communautés phytoplanctoniques dulcicoles Behl *et al.* (2011), Ptacnik *et al.* (2008) ou encore Hillebrand et Lehmpful (2011).

En parallèle les communautés présentent des sur-rendements du coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a*. Ce coefficient dépend de la composition pigmentaire et de l'arrangement de ces pigments et est calculé à partir du spectre d'absorption des microalgues. Les communautés présentent une capacité d'absorption de la lumière plus grande que les monocultures qui résulte, tout comme pour les sels nutritifs, d'un phénomène de complémentarité. Les différentes espèces possèdent des caractéristiques pigmentaires différentes augmentant alors la capacité d'utilisation de la ressource lumineuse, en accord avec les observations de Behl *et al.* (2011) et de Stockenreiter *et al.* (2013).

→ ...n'implique pas une meilleure productivité

Les études portant sur la relation diversité/productivité des producteurs primaires terrestres et aquatiques ont mis en évidence que cette relation est souvent positive (e.g. Behl *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2013; Cardinale *et al.*, 2007). Cette assertion n'est pourtant pas généralisable comme l'ont mis en évidence Schmidtke *et al.* (2010) ou encore Gamfeldt *et al.* (2005) sur des communautés phytoplanctoniques. Notre étude révèle une productivité moindre des communautés, en comparaison des monocultures, et une absence de relation entre la productivité et la diversité (spécifique et fonctionnelle).

Malgré une meilleure absorption des ressources, des sous-rendements sont constatés sur la quantité d'hydrates de carbone dissous et particulaires, la quantité d'azote et de carbone particulaires et la formation de biomasse dans les communautés à 3 et 6 espèces. La communauté à 4 espèces montre des sur-rendements sur le carbone organique particulaire et l'azote organique particulaire, un sur-rendement concernant le biovolume total (utilisé comme

indicateur de biomasse) est également constaté dans la condition témoin pour la communauté à 6 espèces. Quoi qu'il en soit, dans la plupart des cas une meilleure absorption de la ressource aboutit à une productivité moindre des communautés en comparaison aux monocultures. Cela implique que les sels nutritifs absorbés sont dirigés vers une voie que nous n'avons pas prise en compte dans notre design expérimental. Le découplage entre absorption et production peut résulter d'un stockage dans la cellule des sels nutritifs sous forme inorganique pour l'azote ou sous forme inorganique ou organique pour le phosphore (Morel, 1987; Smayda, 1997). Il peut également résulter de l'utilisation de ces sels nutritifs pour un processus que nous ne mesurons pas (comme par exemple la photorespiration) et qui varie entre les communautés et les monocultures.

La composition spécifique et les proportions de chacune des espèces influencent les réponses des communautés. En effet, la communauté à 4 espèces co-dominée par *Skeletonema sp.* et *Ditylum brightwellii* montrait les sur-rendements les plus forts sur l'absorption des sels nutritifs et de la lumière ainsi que des sur-rendements concernant la quantité d'azote et carbone organique particulaire. Les autres communautés sont largement dominées par *Skeletonema sp.* qui contribuait de 70% à 92% du biovolume total. Un effet sélection fort est donc observé sur ces communautés. Cet effet sélection est régulièrement observé dans les études portant sur les relations diversité/productivité et peut aboutir à :

- des communautés aussi productives que les monocultures si l'espèce la plus productive en monoculture domine la communauté (Loreau and Hector, 2001)
- à un effet négatif sur la productivité si l'espèce dominante en communauté n'est pas la plus productive en monoculture (Schmidtke *et al.*, 2010) ou produit moins suite à un phénomène de compétition.

Les réponses observées dans les communautés à 3 et 6 espèces sont en grande partie tributaires de la physiologie de *Skeletonema sp.* qui semble être ici moins productive en communauté qu'en monoculture.

Ces observations mettent en évidence que les communautés phytoplanctoniques diversifiées et présentant une répartition équilibrée des espèces seront plus efficaces dans l'absorption des ressources mais aussi plus productives. Contrairement aux autres études traitant des relations diversité/productivité nous avons inclus une contrainte environnementale, à savoir une limitation en azote et en phosphore (Hillebrand *et al.*, 2014). Hormis, sur la formation de biomasse, dont les rendements diminuent en présence de limitation, la limitation en sels

nutritifs ne va pas influencer les différents rendements mesurés. La limitation en azote influence toutefois la composition des communautés et aboutit à une diminution de l'indice de diversité de Shannon dans les communautés à 3 et 6 espèces du fait de la faible proportion de *Phaeocystis globosa* dans cette condition.

VI.4 Perspectives

Ce travail met en évidence tout un panel de résultats intéressants notamment concernant la pertinence de l'approche fonctionnelle et de l'utilisation de plusieurs traits pour l'étude des réponses du phytoplancton à différentes conditions environnementales mais aussi la présence d'interactions entre ces conditions. Nous nous sommes ici intéressés à trois modalités, à savoir la limitation en azote, la limitation en phosphore et une modification de la température, (et à l'interaction sels nutritifs/température) en se basant sur les changements observés et attendus des milieux naturels dans le cadre du changement global. La démarche effectuée dans cette étude est une simplification forte de la réalité des systèmes naturels. Ces expérimentations et les résultats associés constituent néanmoins un bon point de départ à la mise en place d'expérimentations plus complexes intégrant davantage de facteurs susceptibles d'influencer la physiologie et le rôle du phytoplancton au sein des écosystèmes. Deux facteurs essentiels peuvent être envisagés.

Le premier concerne la concentration en silice qui est un élément nutritif indispensable à la croissance des diatomées et qui va donc réguler la physiologie de ce groupe d'espèces. Une augmentation des rapports Si :P pourrait aboutir à une diminution de l'efflorescence des diatomées fortement silicifiées, comme celles présentes en hiver en Manche Orientale, laissant alors davantage de place aux diatomées peu silicifiées ou aux espèces n'ayant pas besoin de silice pour leur métabolisme comme par exemple *Phaeocystis globosa* (Brzezinski, 1985; Rousseau *et al.*, 2002). L'efflorescence hivernale de diatomée pourrait alors être plus courte et/ou moins importante tandis que l'efflorescence de *Phaeocystis globosa* pourrait gagner en intensité et/ou en durée. La limitation en silice a d'ailleurs déjà été envisagée pour expliquer la succession diatomée/*Phaeocystis* en Mer du Nord (Peperzak *et al.*, 1998). Par ailleurs, les changements de stœchiométrie des ressources (N :P :Si) pourraient influencer la structure de taille des communautés microalgales. Ces changements pourraient complètement remodeler le fonctionnement des écosystèmes via les réseaux trophiques ou par des impacts sur les cycles biogéochimiques. Le deuxième facteur d'importance est la présence d'un ou

plusieurs niveaux trophiques supplémentaires. En effet, les résultats obtenus dans nos expérimentations ne proviennent que d'un contrôle bottom-up résultant de la limitation en sels nutritifs. L'ajout d'un effet top-down via la mise en place de prédateurs du phytoplancton, qui ont un fort pouvoir régulateur, permettrait de prendre en compte le rôle de ces prédateurs sur la structure des communautés (Terseleer, 2014). Compte tenu de nos résultats et de la mise en évidence récente d'interactions possibles entre la prédation et la température sur le phytoplancton (Lewandowska *et al.*, 2014), la mise en place d'expérimentations plus complexes prenant en compte les interactions entre différents facteurs de contrôle peut être envisagée.

Notre étude met en évidence non seulement que la taille est reliée à de nombreux traits, comme le taux de transfert d'électrons, mais aussi qu'elle doit être prise en compte pour comprendre les variations de ces paramètres à la limitation en sels nutritifs à différentes températures. Nous avons ici travaillé sur cinq espèces dont trois diatomées. Le phytoplancton présente une large diversité d'espèces présentant des traits fonctionnels différents et appartenant à des groupes différents. Afin de pouvoir généraliser nos observations il paraît alors important d'augmenter l'effort consacré à la diversité fonctionnelle en intégrant davantage d'espèces appartenant à divers groupes (chlorophycées, cyanophycées, dynophycées) et, si possible, présentant au sein de chaque groupe des différences de taille.

Les variations des traits phytoplanctoniques ou de la composition des communautés naturelles en fonction des facteurs environnementaux peuvent également être étudiées via une approche modélisatrice plutôt qu'expérimentale. Divers modèles se sont intéressés à l'influence de l'environnement sur la physiologie et le développement du phytoplancton (e.g. Geider *et al.*, 1998b; Gypens *et al.*, 2007; Huppert *et al.*, 2005; Lancelot *et al.*, 2005; Talmy *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2014). Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'importance de la taille des cellules et l'existence d'interactions entre les facteurs environnementaux mais ces paramètres ne sont que peu considérés dans les approches modélisatrices actuelles. En effet, les modèles s'attachant aux réponses à l'échelle individuelle (physiologie) (Talmy *et al.*, 2014) ou des communautés (Ward *et al.*, 2014) à plusieurs variations environnementales prenant en compte la taille des cellules sont très récents. De plus, ces travaux mettent en évidence que bien que la taille de l'organisme joue un rôle majeur dans la structuration des communautés planctoniques son impact sur le métabolisme et la photophysologie du phytoplancton reste encore mal connu.

Enfin nous avons mis en place des cultures plurispécifiques, formées de trois combinaisons différentes d'un ensemble de cinq cultures préalablement étudiées, dans des conditions limitées en azote ou en phosphore. Les études portant sur les relations diversité/productivité du phytoplancton marin sont rares surtout en présence de contraintes expérimentales, comme le soulignent Hillebrand *et al.* (2014). Effectuer toutes les combinaisons possibles nous permettrait, dans un premier temps, de renforcer nos conclusions sur les relations diversité/productivité. Ensuite il semble intéressant d'augmenter le nombre d'espèce étudiées, préférentiellement en augmentant la diversité fonctionnelle plutôt que spécifique. En effet, Balvanera *et al.* (2006) démontrent qu'augmenter le nombre d'espèces prises en compte permet de mieux mettre en évidence les relations biodiversité/fonctionnement des écosystèmes et suggèrent la mise en place de communautés composées de plus de 10 espèces.

VII. Références bibliographiques

Admiraal, W., Werner, D., 1983. Utilization of limiting concentrations of orthophosphate and production of extracellular organic phosphates in cultures of marine diatoms. *Journal of plankton research* 5, 459-513.

Aguilera, J., Gordillo, F.J.L., Karsten, U., Figueroa, F.L., 2000. Light quality effect on photosynthesis and efficiency of carbon assimilation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Journal of Plant Physiology* 157, 86-92.

Alcoverro, T., 2000. Production of mucilage by the epipelagic adriatic diatom *Cylindrotheca closterium* under nutrient limitation. *Journal of phycology* 37, 1086-1095.

Alcoverro, T., Conte, E., Mazzella, L., 2000. Production of mucilage by the adriatic epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *Journal of Phycology* 36, 1087-1095.

Alderkamp, A.C., 2006. Carbohydrate production by phytoplankton and degradation in the marine microbial food web, Department of Marine Biology and Department of Microbial Ecology University of Groningen, Groningen, p. 123.

Alderkamp, A.C., Buma, A.G.J., Van Rijssel, M., 2007. The carbohydrates of *Phaeocystis* and their degradation in the microbial food webs. *Biogeochemistry* 83, 99-118.

Allen, J.I., Polimene, L., 2011. Linking physiology to ecology: towards a new generation of plankton model. *Journal of plankton research* 33, 989-997.

Aminot, A., K erouel, R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses. Ifremer.

Anderson, T.R., 2005. Plankton functional type modelling: running before we can walk? *Journal of plankton research* 27, 1073-1081.

Anning, T., MacIntyre, H.L., Pratt, S.M., Sammes, P.J., Gibb, S., Geider, R.J., 2000. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnology and Oceanography* 45, 1087-1817.

Anwaruzzaman, Sawada, S., Usuda, H., Yokota, A., 1995. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation by inorganic phosphate through stimulating the binding of the activator CO₂ to the activation sites. *Plant and Cell Physiology* 36, 425-433.

Artioli, Y., Friedrich, J., Gilbert, A.J., McQuatters-Gollop, A., Mee, L.D., Vermaat, J.E., Wulff, F., Humborg, C., Palmeri, L., Pollehne, F., 2008. Nutrient budgets for European seas: A measure of the effectiveness of nutrient reduction policies. *Marine pollution bulletin* 56, 1609-1617.

Atkinson, D., Ciotti, B.J., Montagnes, D.J.S., 2003. Protist decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% °C⁻¹. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 2605-2611.

Aubriot, L., Bonilla, S., Falkner, G., 2011. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. *FEMS microbiology ecology* 77, 1-16.

Balvanera, P., Pfisterer, A.B., Buchmann, N., He, J.-S., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., Schmid, B., 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology Letters* 9, 1149-1156.

Barton, A.D., Pershing, A.J., Litchman, E., record, N.R., Edwards, K.F., Finkel, Z.V., Kjørboe, T., Ward, B.A., 2013. The biogeography of marine plankton traits. *Ecology Letters* 16, 522-534.

Baumert, H.Z., Petzoldt, T., 2008. The role of temperature, cellular quota and nutrient concentrations for photosynthesis, growth and light-dark acclimation in phytoplankton. *Limnologia* 38, 313-326.

Beardall, J., Allen, D., Bragg, J., Finkel, Z.V., Flynn, K.J., Quigg, A., Rees, T.A.V., Richardson, A., Raven, J.A., 2009. Allometry and stoichiometry of unicellular, colonial and multicellular phytoplankton. *New Phytologist* 181, 295-309.

Beardall, J., Roberts, S., Raven, J.A., 2005. Regulation of inorganic carbon acquisition by phosphorus limitation in the green alga *Chlorella emersonii*. *Canadian Journal of Botany* 83, 859-864.

Beardall, J., Young, E., Roberts, S., 2001. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic sciences* 63, 44-69.

Beaugrand, G., Edwards, M., Legendre, L., 2010. Marine biodiversity, ecosystem functioning, and carbon cycles. *Proceedings of the national academy of sciences* 107, 10120-10124.

Behl, S., Donval, A., Stibor, H., 2011. The relative importance of species diversity and functional group diversity on carbon uptake in phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography* 56, 683-694.

Bell, W.H., 1983. Bacterial utilization of algal extracellular products. The specificity of algal-bacterial interaction. *Limnology and Oceanography* 28, 1131-1143.

Berman-Frank, I., Dubinsky, Z., 1999. Balanced growth in aquatic plants: Myth or Reality. *Bioscience* 49, 29-37.

Bi, R., Arndt, C., Sommer, U., 2012. Stoichiometric responses of phytoplankton species to the interactive effect of nutrient supply ratio and growth rates. *Journal of phycology* 48, 539-549.

Billen, G., Garnier, J., 2007. River basin nutrient delivery to the coastal sea: assessing its potential to sustain new production of non siliceous algae. *Marine Chemistry* 106, 12.

Bissinger, J.E., Montagnes, D.J.S., Sharples, J., Atkinson, D., 2008. Predicting marine phytoplankton maximum growth rates from temperature: Improving on the Eppley curve using quantile regression. *Limnology and Oceanography* 53, 487-493.

Blache, U., Jakob, T., Su, W., Wilhelm, C., 2011. The impact of cell specific absorption properties on the correlation of electron transport rates measured by chlorophyll fluorescence and photosynthetic oxygen production in planktonic algae. *Plant physiology and Biochemistry* 49, 801-808.

Borchard, C., Engel, A., 2012. Organic matter exudation by *Emilinia huxleyi* under simulated future ocean conditions. *Biogeosciences* 9, 3405-3423.

Box, G.E.P., Cox, D.R., 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society* 26, 211-252.

Breteler, W.C.M.K., Schogt, N., Baas, M., Schouten, S., Kraay, G.W., 1999. Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. *Marine Biology* 135, 191-198.

Breton, E., Brunet, C., Sautour, B., Brylinski, J.M., 2000. Annual variation of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *Journal of Plankton Research* 22, 1423-1440.

Breton, E., Rousseau, V., Parent, J.-Y., 2006. Hydroclimatic modulation of diatom/Phaeocystis blooms in nutrient-enriched Belgian coastal waters (North Sea). *Limnology and Oceanography* 51, 1401-1409.

Bricaud, A., Babin, M., Morel, A., Claustre, H., 1995. Variability in the chlorophyll-specific absorption coefficients of natural phytoplankton: Analysis and parameterization. *Journal of Geophysical Research* 100, 13,321-13,332.

Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, P.A., Savage, V.M., West, G.B., 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85, 1771-1789.

Bruno, J.F., Boyer, K.E., Duffy, E., Lee, S.C., Kertesz, J.S., 2005. Effects of macroalgal species identity and richness on primary production in benthic marine communities. *Ecology letters* 8, 1165-1174.

Brzezinski, M.A., 1985. The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *Journal of Phycology* 21, 347-357.

Byrnes, J.E.K., Gamfeldt, L., Isbell, F., Lefcheck, J.S., Griffin, J.N., Hector, A., Cardinale, B.J., Hooper, D.U., Dee, L.E., Duffy, J.E., 2014. Investigating the relationship between biodiversity and ecosystem multifunctionality: Challenges and solutions. *Methods in Ecology and Evolution* 5, 111-124.

Cardinale, B.J., Gross, K., Fritschie, K., Flombaum, P., Fox, J., Rixen, C., van Ruijven, J., Reich, P.B., Scherer-Lorenzen, M., Wilsey, B.J., 2013. Biodiversity simultaneously enhances the production and stability of community biomass, but the effects are independent. *Ecology* 94, 1697-1707.

Cardinale, B.J., Hillebrand, H., Harpole, W.S., Gross, K., Ptacnik, R., 2009. Separating the influence of resource relationships. *Ecology Letters* 12, 475-487.

Cardinale, B.J., Ives, A.R., Inchausti, P., 2004. Effects of species diversity on the primary productivity of ecosystems: extending our spatial and temporal scales of inference. *Oikos* 104, 437-450.

Cardinale, B.J., Matulich, K.L., Hooper, D.U., Byrnes, J.E., Duffy, E., Gamfeldt, L., Balvanera, P., O'Connor, M.I., Gonzalez, A., 2011. The functional role of producer diversity in ecosystems. *American Journal of Botany* 98, 572-592.

Cardinale, B.J., Srivastava, D.S., Duffy, J.E., Wright, J.P., Downing, A.L., Sankaran, M., Jouseau, C., 2006. Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature* 443, 989-992.

Cardinale, B.J., Wright, J.P., Cadotte, M.W., Carroll, I.T., Hector, A., Srivastava, D.S., Loreau, M., Weis, J.J., 2007. Impacts of plant diversity on biomass production increase through time because of species complementarity. *Proceedings of the national academy of sciences* 104, 18123-18128.

Chin, W.C., Orellana, M.V., Quesada, I., Verdugo, P., 2004. Secretion in unicellular marine phytoplankton: Demonstration of regulated exocytosis in *Phaeocystis globosa*. 2004 45, 535-542.

Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S., Veron, B., 2008. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology* 51, 1-11.

Cloern, J.E., 1978. Empirical model of *Skeletonema costatum* photosynthetic rate, with applications in the San Francisco Bay estuary. *Advances in water resources* 1, 267-274.

Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210, 223-253.

Cloern, J.E., Grenz, C., Vildergar-Lucas, L., 1995. An empirical model of the phytoplankton Chlorophyll: Carbon ratio---the conversion factor between productivity and growth rate. *Limnology and Oceanography* 40, 1313-1321.

Collos, Y., Berges, J.A., 2004. Nitrogen metabolism in phytoplankton, in: Duarte, C.M., Lot, A. (Eds.), *Encyclopedia of Life Support Systems*. Eolss, Oxford, UK.

Connell, J.H., 1979. Tropical rain forests and coral reefs as open non-equilibrium systems, in: Anderson, R.M., Turner, B.D., Taylor, L.R. (Eds.), *Population Dynamics*. Blackwell Scientific, Oxford, UK.

Consalvey, M.C., Paterson, D.M., Underwood, G.J.C., 2004. The ups and downs in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. *Diatom research* 19, 181-202.

Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Diaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., Ter Steege, H., Morgan, H.D., Van der Heijden, M.D.A., Pausas, J.G., Porter, H., 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51, 335-380.

Da Silva, A.F., Lourenço, S.O., Chaloub, R.M., 2009. Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a marine tropical microalga *Rhodomonas sp.* *Aquatic Botany* 91, 291-297.

Davison, I.R., 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of phycology* 27, 2-8.

Decho, A.W., 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography Marine Biology Annual Review* 28, 73-153.

Diaz, S., Cabido, M., 2001. Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 646-655.

Doblin, M.A., Petrou, K.L., Shelly, K., Westwood, K., Enden, R., Wright, S., Griffiths, B., Ralph, P.J., 2011. Diel variation of chlorophyll-a fluorescence, phytoplankton pigments and productivity in the Sub-antarctic and Polar Front zones south of Tasmania, Australia. *Deep sea research* 58, 2189-2199.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.

Duffy, J.E., 2002. Biodiversity and ecosystem function: The consumer connection *Oikos* 99, 201-219.

Duffy, J.E., 2009. Why biodiversity is important to the functioning of real-world ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7, 437-444.

Duffy, J.E., Stachowicz, J.J., 2006. Why biodiversity is important to oceanography: potential roles of genetic, species, and trophic diversity in pelagic ecosystem processes. *Marine Ecology Progress Series* 311, 179-189.

Duffy, J.E., Stachowicz, J.J., 2006. Why biodiversity is important to oceanography: potential roles of genetic, species, and trophic diversity in pelagic ecosystem processes. *Marine Ecology Progress Series* 311, 179-189.

Dyrhman, S.T., Palenik, B., 2003. Characterization of ectoenzyme activity and phosphate-regulated proteins in the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Journal of Plankton Research* 25, 1215-1225.

Edwards, K.F., Litchman, E., C.A., K., 2013. Functional traits explain phytoplankton community structure and seasonal dynamics in a marine ecosystem. *Ecology Letters* 16, 56-63.

Edwards, M., Richardson, A.J., 2004. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. *Nature* 430, 881-884.

Engel, A., Händel, N., Wohlers, J., Lunau, M., Grossart, H.P., Sommer, U., Riebesell, U., 2011. Effects of sea surface warming on the production and composition of dissolved organic matter during phytoplankton blooms: results from a mesocosm study. *Journal of Plankton Research* 33, 357-372.

Eppley, R.W., 1972. Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fishery Bulletin* 70, 1063-1085.

Fajon, C., Cauwet, G., Lebaron, P., Terzic, S., Ahel, M., Malej, A., Mozetic, P., Turk, V., 1999. The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment. *FEMS microbiology ecology* 29, 351-363.

Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200-206.

Falkowski, P.G., Kiefer, D.A., 1985. Chlorophyll *a* fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass *Journal of Plankton Research* 7, 715-731.

Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press.

Fernandez-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., Labarta, U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83, 17-37.

Ferrario-Méry, S., Thibaud, M.-C., Betsche, T., Valadier, M.-H., Foyer, C.H., 1997. Modulation of carbon and nitrogen metabolism, and of nitrate reductase, in untransformed and transformed *Nicotiana glauca* during CO₂ enrichment of plants grown in pots and in hydroponic culture. *Planta* 202, 510-521.

Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281, 237-240.

Finkel, Z., Beardall, J., Flynn, K.J., Qiuigg, A., Rees, A.P., Raven, J.A., 2010a. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research* 32, 119-137.

Finkel, Z.V., 2001. Light absorption and size scaling of light-limited metabolism in marine diatoms. *Limnology and Oceanography* 46, 86-94.

Finkel, Z.V., Beardall, J., Flynn, K.J., Quigg, A., Alwyn, T., Rees, V., Raven, J.A., 2010b. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of plankton research* 32, 119-137.

Finkel, Z.V., Irwin, A.J., Schofield, O., 2004. Resource limitation alters the 3/4 size scaling of metabolic rates in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 273, 269-279.

Fiori, E., Pistocchi, R., 2014. *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae) sensitivity to herbicides and effects of temperature increase on cellular responses to terbutylazine exposure. *Aquatic Toxicology* 147, 112-120.

Follows, M.J., Dutkiewicz, S., Grant, S., Chrisholm, S.W., 2007. Emergent Biogeography of Microbial Communities in a Model Ocean. *Science* 315, 1843-1846.

Foyer, C.H., Noctor, G., Lelandais, M., Lescure, J.C., Valadier, M.H., Boutin, J.P., Horton, P., 1994. Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosynthesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. *Planta* 192, 211-220.

Fry, E.L., Power, S.A., Manning, P., 2014. Trait-based classification and manipulation of plant functional groups for biodiversity–ecosystem function experiments. *Journal of Vegetation Science* 25, 248-261.

- Fu, F.
algal blooms in the ocean. *Marine Ecology Progress Series* 470, 207-233.
- Fujiki, T., Taguchi, S., 2002. Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance. *Journal of Plankton Research* 24, 859-874.
- Fukao, T., Kimoto, K., Kotani, Y., 2010. Production of transparent exopolymeric particles by four diatom species. *Fisheries science* 76, 755-760.
- Gamfeldt, L., Hillebrand, H., Jonsson, P.R., 2005. Species richness changes across two trophic levels simultaneously affect prey and consumer biomass. *Ecology Letters* 8, 696-703.
- Gao, Y., Smith, J.G., Alberte, R.S., 2000. Temperature dependence of nitrate reductase activity in marine phytoplankton: biochemical, analysis and ecological implications. *Journal of phycology* 36, 304-313.
- Gauthier, D., Turpin, D.H., 1997. Interactions between inorganic phosphate (Pi) assimilation, photosynthesis and respiration in the Pi-limited green alga *Selenestrum minutum*. *Plant, Cell & Environment* 20, 12-24.
- Geider, R.J., Delucia, E.H., Falkowski, P.G., Finzi, A.C., Grime, J.P., Grace, J., Kana, T.M., La Roche, J., Long, S.P., Osborne, B.A., Platt, T., Prentice, I.C., Raven, J.A., Schlesinger, W.H., Smetacek, V., Stuart, V., Satyendranath, S., Thomas, R.B., Vogelmann, T.C., Williams, P., Woodward, F.I., 2001. Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global Change Biology* 7, 849-882.
- Geider, R.J., Macintyre, H.L., Graziano, L.M., McKay, R.M.I., 1998a. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *European journal of phycology* 33, 315-332.
- Geider, R.J., MacIntyre, H.L., Kana, T.M., 1998b. A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnology and Oceanography* 43, 679-694.
- Geider, R.J., Roche, J.L., Greene, R.M., Olaizola, M., 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *Journal of phycology* 29, 755-766.
- Gentilhomme, V., Lizon, F., 1998. Seasonal cycle of nitrogen and phytoplankton biomass in a well-mixed coastal system (Easter English Channel). *Hydrobiologia* 361, 191-199.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., 2001. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science* 293, 2248-2251.
- Granum, E., Kirkvold, S., Mykkestad, S.M., 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatoms *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series* 242, 83-94.

Grizzetti, B., Bouraoui, F., Aloe, A., 2012. Changes of nitrogen and phosphorus loads to European seas. *Global Change Biology* 18, 769-782.

Guerrini, F., Cangini, M., Boni, L., Trost, P., Pistocchi, R., 2000. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. *Journal of phycology* 36, 882-890.

Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Denotula confervacea* Cleve. *Canadian journal of microbiology* 8, 229-239.

Gypens, N., Lacroix, G., Lancelot, C., 2007. Causes of variability in diatom and Phaeocystis blooms in Belgian coastal waters between 1989 and 2003: A model study. *Journal of sea research* 57, 19-35.

Hallegraeff, G.M., 2010. Ocean Climate Change, Phytoplankton Community Responses, and Harmful algal blooms: A Formidable Predictive Challenge. *Journal of Phycology* 46, 220-235.

Harrison, P.J., Thompson, P.A., Calderwood, G.S., 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* 2, 45-56.

Hecky, R.E., Kilham, P., 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography* 33, 796-822.

Hector, A., Bazeley-White, E., Loreau, M., Otway, S., Schmid, B., 2002. Overyielding in grassland communities: Testing the sampling effect hypothesis with replicated biodiversity experiments. *Ecology Letters* 5, 502-511.

HELCOM, 1988. Guidelines concerning phytoplankton species composition, abundance and biomass.

Hernández-Fariñas, T., Soudant, D., Barillé, L., Belin, C., Lefebvre, A., Bacher, C., 2013. Temporal changes in the phytoplankton community along the French coast of the eastern English Channel and the southern Bight of the North sea. *ICES Journal of marine science*.

Hessen, D.O., Anderson, T.R., 2008. Excess carbon in aquatic organisms and ecosystems: Physiological, ecological, and evolutionary implications. *Limnology and Oceanography* 53, 1685-1696.

Hillebrand, H., Cowles, J.M., Lewandowska, A., Van de Waal, D.B., Plum, C., 2014. Think ratio! A stoichiometric view on biodiversity-ecosystem function in research. *Basic and Applied Ecology*, *in press*.

Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35, 403-424.

Hillebrand, H., Gruner, D.S., Borer, E.T., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Elser, J.J., Harpole, W.S., Ngai, J.T., Seabloom, E.W., Shurin, J.B., Smith, J.E., 2007. Consumer versus resource control of producer diversity depends on ecosystem type and producer community structure. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America* 104, 10904-10909.

Hillebrand, H., Lehmpful, V., 2011. resource stoichiometry and consumers control the biodiversity-productivity relationship in pelagic metacommunities. *The American Naturalist* 178, 171-181.

Hillebrand, H., Matthiessen, B., 2009. Biodiversity in a complex world: consolidation and progress in functional biodiversity research. *Ecology Letters* 12, 1-15.

Hillebrand, H., Steinert, G., Boersma, M., Malzhan, A., Meunier, C.L., Plum, C., Ptacnik, R., 2013. Goldman revisited: Faster-growing phytoplankton has lower N:P and lower stoichiometric flexibility. *Limnology and Oceanography* 58, 2076

Hitchcock, G.L., 1980. Diel variation in Chlorophyll *a*, carbohydrate and protein content of the marine diatom *Skeletonema costatum* *Marine Ecology Progress Series Marine Biology*.

Hitchcock, G.L., 1982. A comparative study of the size-dependent organic composition of marine diatoms and dinoflagellates. *Journal of Plankton Research* 4, 363-377.

Hooper, D.U., Chapin, F.S.I., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, a.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75, 3-35.

Hooper, D.U., Vitousek, P.M., 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* 277, 1302-1305.

Houliet, E., Lizon, F., Artigas, F.L., Lefebvre, S., Schmitt, F.G., 2013. spatio-temporal variability of phytoplankton photosynthetic activity in a macrotidal ecosystem (The Strait of Dover, eastern English Channel). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 129, 37-48.

Hulot, F.D., Lacroix, G., Loreau, M., 2014. Differential responses of size-based functional groups to bottom – up and top – down perturbations in pelagic food webs: a meta-analysis. *Oikos* 123, 1291-1300.

Huot, Y., Babin, M., 2010. Overview of fluorescence protocols: Theory, Basic concepts, and Practice, in: Sugget, D.J., Prasil, O., Borowitzka, M.A. (Eds.), *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and Applications*. Springer Science & Business Media.

Huppert, A., Blasius, B., Olinky, R., Stone, L., 2005. A model for seasonal phytoplankton blooms. *Journal of Theoretical Biology* 236, 276-290.

Hutchinson, G.E., 1961. The paradox of the plankton. *American Naturalist* 95, 137-145.

Ietswaart, T., Schneider, P., Prins, R., 1994. Utilization of Organic Nitrogen Sources by Two Phytoplankton Species and a Bacterial Isolate in Pure and Mixed Culture. *Applied Environmental Microbiology* 60, 1554-1560.

Iglesias-Rodríguez, M.D., Brown, C.W., Doney, S.C., Kleypas, J., Kolber, D., Kolber, Z., Hayes, P.K., Falkowski, P.G., 2002. Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: Coccolithophorids. *Global biochemical cycles* 16, 1-20.

Interlandi, S.J., Kilham, S., 2001. Limiting resources and the regulation of diversity in phytoplankton communities. *Ecology* 82, 1270-1282.

IPCC, 2007. *Climate Change 2007: The Physical Sciences Basis: Working Group I Contribution to the Fourth Assessment Report of the IPCC*, in: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tygnor, m., Miller, H.L. (Eds.). Intergovernmental Panel on Climate Change.

Irigoien, Campbell, R., Shreeve, R., Ward, P., Smith, A.N., Dam, H.G., Peterson, W., Tirelli, V., Koski, M., Smith, T., Harbour, D., Davidson, R., 2002. Copepod hatching success in marine ecosystems with high diatom concentrations. *Nature* 419, 387-389.

Jahnke, J., Rick, H.-J., Aletsee, L., 1986. On the light and temperature dependence of the minimum and maximum phosphorus contents in cells of the marine plankton diatom *Thalassiosira rotula* Meunier. *Journal of plankton research* 3, 549-555.

Jouenne, F., Lefebvre, S., Véron, B., Lagadeuc, Y., 2007. Phytoplankton community structure and primary production in small intertidal estuarine-bay ecosystem (eastern English Channel, France). *Marine Biology* 151, 805-825.

Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S., 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of Algae for biofuels production: a review. *Energies* 6, 4608-4638.

Kahru, M., Brotas, V., Manzano-Sarabia, M., Mitchell, B.G., 2011. Are phytoplankton blooms occurring earlier in the Arctic? *Global Change Biology* 17, 1733-1739.

Kjørboe, T., 1993. Turbulence, Phytoplankton Cell Size, and the Structure of Pelagic Food Webs, in: Blaxter, J.H.S. (Ed.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press.

Kirtman, B., Power, S.B., Adedoyin, J.A., Boer, G.J., Bojariu, R., Camilloni, I., Doblaser-Reyes, F.J., Fiore, A.M., Kimoto, M., Meehl, G.A., Prather, M., Sarr, A., Schär, C., Sutton, R., van Oldenborgh, G.J., Vecchi, G., Wang, H.J., 2013. Near-term Climate Change: Projections and Predictability, in: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

Klaveness, D., 1989. Biology and ecology of the Cryptophyceae: status and challenges. *Biological Oceanography* 6, 257-270.

Kolber, Z.S., Prasil, O., Falkowski, P.G., 1998. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1367, 88-106.

Koroleff, F., 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *ICES CM* 9, 4.

Krawiec, R.W., 1982. Autecology and Clonal Variability of the Marine Centric Diatom *Thalassiosira rotula* (Bacillariophyceae) in Response to Light, Temperature and Salinity. *Marine Biology* 69, 79-89.

Kriest, I., Oschlies, A., 2007. Modelling the effect of cell-size-dependent nutrient uptake and exudation on phytoplankton size spectra. *Deep Sea research Part I* 54, 1593-1618.

Kruk, C., Huszar, C.V.L.M., Peeters, E.T.H.M., Bonilla, S., Costa, L., Lüring, M., Reynold, C.S., Scheffer, M., 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology* 55, 614-627.

Kruk, C., Segura, A.M., 2012. The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia* 698, 191-202.

Lai, J., Yu, Z., Song, biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 405, 6-17.

Lancelot, C., Spitz, Y., Gypens, N., Ruddick, K., Becquevort, S., Rousseau, V., Lacroix, G., Billen, G., 2005. Modelling diatom and Phaeocystis blooms and nutrient cycles in the Southern Bight of the North sea: the MIRO model. *Marine Ecology Progress Series* 289, 63-78.

Lavorel, S., Garnier, E., 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* 16, 545-556.

Lefebvre, A., Guiselin, N., Barbet, F., Artigas, F.L., 2011. Long-term hydrological and phytoplankton monitoring (1992–2007) of three potentially eutrophic systems in the eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. *ICES Journal of marine science* 68, 2029-2043.

Lewandowska, A., Hillebrand, H., Lengfellner, K., Sommer, U., 2014. Temperature effects on phytoplankton diversity - the zooplankton link. *Journal of sea research* 85, 359-364.

Lippemeier, S., Hintze, R., Vanselow, K.H., Hartig, P., colijn, F., 2001. In line recording of PAM fluorescence of phytoplankton cultures as a new tool for studying effects of fluctuating nutrient supply on photosynthesis. *European journal of phycology* 36, 89-100.

Litchlé, C., 1979. Effects of nitrogen deficiency and light of high intensity on *Cryptomonas rufescens* (Cryptophyceae). *Protoplasma* 101, 283-299.

Litchman, E., Edwards, K.F., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., 2012. Phytoplankton niches, traits and eco-evolutionary responses to global environmental change. *Marine Ecology Progress Series* 470, 234-248.

Litchman, E., Klausmeier, C.A., 2008. Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 39, 615-639.

Litchman, E., Klausmeier, C.A., Miller, J.R., Schofield, O.M., Falkowski, P.G., 2006. Multi-nutrient, multi-group model of present and future oceanic phytoplankton communities. *Biogeosciences* 3, 585-606.

Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M., Falkowski, P., 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: Scaling from cellular to ecosystem level. *Ecology Letters* 10, 1170-1181.

Litchman, E., Pinto, P.d.T., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., Yoshiyama, K., 2010. Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* 653, 15-28.

Liu, Y., Song, *Skeletonema costatum* to different nutrient conditions. *Journal of Plankton Research* 35, 165-176.

Loebl, M., Colijn, F., Beusekom, J.E.E.v., Baretta-Bekker, J.G., Lancelot, C., Philippart, C.J.M., Rousseau, V., Wiltshire, K.H., 2009. Recent patterns in potential phytoplankton limitation along the Northwest European continental coast. *Journal of sea research* 61, 34-43.

Lopez-Sandoval, D.C., Rodriguez-Ramos, T., Cermeño, P., Maraño, E., 2013. Exudation of organic carbon by marine phytoplankton: dependence on taxon and cell size. *Marine Ecology Progress Series* 477, 53-60.

Lopez-Sandoval, D.C., Rodriguez-Ramos, T., Cermeño, P., Sobrino, C., Maraño, E., 2014. Photosynthesis and respiration in marine phytoplankton: relationship with cell size, taxonomic affiliation, and growth phase. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 457, 151-159.

Loreau, M., Hector, A., 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412, 72-76.

Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D.A., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294, 804-808.

Lynn, S.G., Kilham, S.S., Kreeger, S.S., Interlandi, S.J., 2000. Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus*. *Journal of Phycology* 36.

MacIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T., Geider, R.J., 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of phycology* 38, 17-38.

Magaletti, E., Urbani, R., Sist, P., Ferrari, C.R., Cicero, A.M., 2004. Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N- and P-limitation. *European Journal of Phycology* 39, 133-142.

Malinsky-Ruhansky, N.Z., Legrand, C., 1996. Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. *Marine Ecology Progress Series* 132, 249-255.

Mantoura, R.F.C., Martin, J.-M., Wollast, R., 1991. Ocean margin processes in global change. Wiley Interscience, New-York.

Marañon, E., Cermeño, P., Huete-Ortega, M., Lopez-Sandoval, D., Mouriño-Carballido, B., Rodriguez-Ramos, T., 2014. Resource Supply Overrides Temperature as a Controlling Factor of Marine Phytoplankton Growth. *Plos One*.

Marañon, E., Cermeño, P., Lopez-Sandoval, D., Rodriguez-Ramos, T., Sobrino, C., Huete-Ortega, M., Blanco, J.M., Roriguez, J., 2013. Unimodal size scaling of phytoplankton growth and the size dependence of nutrient uptake and use. *Ecology Letters* 16, 371-379.

Margalef, R., 1978. Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* 1, 493-509.

Mari, transparent exopolymeric particles (TEP) production by *Phaeocystis globosa* under N- or P-limitation: A controlling factor of the retention/export balance. *Harmful algae* 4, 895-914.

Marinov, I., Doney, S.C., Lima, I.D., 2010. Response of ocean phytoplankton community structure to climate change over the 21st century: partitioning the effects of nutrients, temperature and light. *Biogeosciences* 7, 3941-3959.

Mc Gill, B.J., Enquist, B.J., Weiher, E., Westoby, M., 2006. Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 178-185.

McQuatters-Gollop, A., Raitsos, D.E., Edwards, M., Pradhan, Y., Mee, L.D., Lavender, S.J., Attrill, M.J., 2007. A long-term chlorophyll data set reveals regime shift in North Sea phytoplankton biomass unconnected to nutrient trends. *Limnology and Oceanography* 52, 635-648.

Menden-Deuer, S., Lessard, E.J., Satterberg, J., 2001. Effect of preservation on dinoflagellate and diatom cell volume and consequences for carbon biomass predictions. *Marine Ecology Progress Series* 222, 41-50.

Meunier, A., 1913. *Microplankton de la mer flamande. Les diatomacées*. Hayez, imprimeur de l'académie royale de Belgique.

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis*, in: Press, I. (Ed.), Washington, DC.

Mitchell, B.G., Kahru, M., Wieland, J., Stramska, M., 2003. Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples, in: J.L. Mueller, G.S.F., C.R. McClain (Ed.), *NASA Technical Memorandum 2003-211621. Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation*, pp. 39-64.

Moal, J., Martin-Jezequel, V., Harris, R.P., Samain, J.-F., Poulet, S.A., 1987. Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. *Oceanologica Acta* 10, 339-345.

Montford, K., 1969. Measuring dissolved oxygen as an indicator of primary productivity. *Chesapeake Science* 10, 327-330.

Moore, K.J., Doney, S.C., Kleypas, J.A., Glover, D.M., Fung, I.Y., 2002. An intermediate complexity marine ecosystem model for the global domain. *Deep Sea research II* 49, 403-462.

- Moran,
Southern Ocean phytoplankton and bacterioplankton production to short-term experimental warming. *Limnology and Oceanography* 51, 1791-1800.
- Morel, A., Bricaud, A., 1981. Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep Sea research* 28, 1375-1393.
- Morel, F.M.M., 1987. Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton. *Journal of phycology* 23, 137-150.
- Morgan, K.C., Kallf, J., 1979. Effect of light and temperature interactions on growth of *Cryptomonas erosa* *Journal of Phycology* 15, 127-134.
- Morris, I., Glover, H., Yentsch, C., 1974. Products of phototsynthesis by marine phytoplankton: The effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis. *Marine Biology* 27, 1-9.
- Mullin, M.M., Sloan, P.R., Eppley, R.W., 1966. Relationship between carbon content cell volume and area in ppytoplankton. *Limnology and Oceanography* 11, 307-311.
- Myklestad, S.M., 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparisons of nine different species in culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 15, 261-274.
- Myklestad, S.M., 1977. Production of carbohydrates by the marine diatoms.II. Influence of the N:P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* and *Skletonema costatum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 29, 161-179.
- Myklestad, S.M., 2000. Dissolved organic Carbon from phytoplankton, in: Wangersky, P.J. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg.
- Myklestad, S.M., Skanoy, E., Hestmann, S., 1997. A sensitive and rapid method for analysis of dissolved mono- and polysaccharides in seawater. *Marine Chemistry* 56, 279-286.
- Naeem, S., 1998. Species Redundancy and Ecosystem Reliability. *Conservation Biology* 12, 39-45.
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Riou, P., Claquin, P., 2014. Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the English Channel. *Marine Ecology Progress Series* 505, 49-64.
- Napoléon, C., Raimbault, V., Claquin, P., 2013. Influence of nutrient stress on the relationships between PAM measurements and Carbon Incorporation in four phytoplankton species. *Plos One* 8.
- Norberg, J., 2000. Resource-niche complementarity and autotrophic compensation determines ecosystem-level responses to increased cladoceran species richness. *Oecologia* 122, 264-272.

Obernosterer, I., Herndl, G.J., 1995. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence of the inorganic N:P ratio. *Marine Ecology Progress Series* 116, 247-257.

Olli, K., Ptacnik, R., Andersen, T., Trikk, O., Klais, R., Lehtinen, S., Tamminen, T., 2014. Against the tide: Recent diversity increase enhances resource use in a coastal ecosystem. *Limnology and Oceanography* 59, 267-274.

Oviatt, C., Doering, B., Reed, L., Cole, J., Frithsen, J., 1995. An ecosystem level experiment on nutrient limitation in temperate coastal marine environments. *Marine Ecology Progress Series* 116, 171-179.

Palmer, M.A., Liermann, C.A.R., Nilsson, C., Flörke, M., Alcamo, J., Lake, S., Bond, N., 2008. Climate change and the world's river basins: anticipating management option. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6.

Palmer, M.A., Van Dijken, G.L., Mitchell, B.G., Seegers, B.J., Lowry, K.E., Mills, M.M., Arrigo, K.R., 2013. Light and nutrient control of photosynthesis in natural phytoplankton populations from the Chukchi and Beaufort seas, Arctic Ocean. *Limnology and Oceanography* 58, 2185-2205.

Panagiotopoulos, C., Sempéré, R., 2005. Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnology and Oceanography: Methods* 3, 419-454.

Parke, M., Green, J.C., Manton, I., 1971. Observations on the fine structure of zooids of the genus *Phaeocystis* (Haptophyceae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 927-941.

Parker, M.S., Armbrust, V., 2005. Synergistic effects of light, temperature, and nitrogen source on transcription of genes for carbon and nitrogen metabolism in the centric diatom *thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae). *Journal of phycology* 41, 1142-1153.

Parson, P.R., Maita, Y., Lalli, M.C., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford.

Parsons, T.R., Takahashi, M., Hargrave, B., 1984. Biological oceanographic processes, in: Pergamon International Library of Science, T., Engin (Ed.). Pergamon, Oxford, p. 330.

Paytan, A., McLaughlin, K., 2007. The oceanic phosphorus cycle. *chemical reviews* 107, 563-576.

Peperzak, L., 2002. The wax and wayne of *Phaeocystis globosa* bloom. *Chapter 10. Phaeocystis globosa: ecological data and bloom phenomena*.

Peperzak, L., Colijn, F., Gieskes, W.W.C., Peeters, J.C.H., 1998. Development of the diatom-*Phaeocystis* spring bloom in the Dutch coastal zone of the North Sea: the silicon depletion versus the daily irradiance threshold hypothesis. *J. Plankton Res.* 20, 517-537.

Peperzak, L., Colijn, F., Vrieling, E.G., Gieskes, W.W.C., Peeters, J.C.H., 2000. Observations of flagellates in colonies of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): a hypothesis for their position in the life cycle. *Journal of Plankton Research* 22, 2181-2203.

Peperzak, L., Gäbler-Schwarz, S., 2012. Current knowledge of the life cycles of *Phaeocystis globosa* and *Phaeocystis antarctica*. *Journal of Phycology* 48, 514-517.

Peperzak, L., Gäbler-Schwarz, S., 2012. Current knowledge of the life cycles of *Phaeocystis globosa* and *Phaeocystis antarctica* (Prymnesiophyceae). *Journal of phycology* 48, 514-517.

Petchey, O.L., Gaston, K.J., 2006. Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology Letters* 9, 741-758.

Peter, H.K., Sommer, U., 2013. Phytoplankton cell size reduction in response to warming mediated by nutrient limitation. *Plos One* 8.

Petrou, K., Kranz, S.A., Doblin, M.A., Ralph, P.J., 2012. Photophysiological responses of *fragilariopsis cylindrus* (bacillariophyceae) to nitrogen depletion at two temperatures. *Journal of Phycology* 2012, 127-136.

Ploug, H., Stolte, W., Epping, E.H.G., Jorgensen, B.B., 1999. Diffusive boundary layers, photosynthesis, and respiration of the colony-forming plankton algae, *Phaeocystis sp.* *Limnology and Oceanography* 44, 1949-1958.

Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25, 943-948.

Power, L.D., Cardinale, B.J., 2009. Species richness enhances both algal biomass and rates of oxygen production in aquatic microcosms. *Oikos* 118, 1703-1711.

Ptacnik, R., Moorthi, S.D., Hillebrand, H., 2010. Hutchinson reversed, or why there need to be so many species, in: Woodward, G. (Ed.), *Advances in ecological research - Integrative ecology: from molecules to ecosystems*. Academic Press, Burlington.

Ptacnik, R., Solimini, A.G., Andersen, T., Tamminen, T., Brettum, P., Lepistö, L., Willen, E., Rekolainen, S., 2008. Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton community. *Proceedings of the national academy of sciences* 105, 5134-5138.

Quiel, K., Becker, A., Kirchesch, V., Schöl, A., Fisher, H., 2011. Influence of global change on phytoplankton and nutrient cycling in Elbe river. *Regional Environmental Change* 11, 405-421.

Raffaelli, D., Emmerson, M., Solanb, M., Biles, C., Paterson, D., 2003. Biodiversity and ecosystem processes in shallow coastal waters: an experimental approach. *Journal of sea research* 49, 133-141.

Raven, J.A., 1997. The vacuole: a cost-benefit analysis, in: Leigh, R.A., Sanders, D. (Eds.), *The plant vacuole. Advances in botanical research incorporating advances in plant pathology*. Academic Press, San Diego.

Raven, J.A., 1998. The twelfth Transley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional Ecology* 12, 503-513.

- Raven, J.A., Geider, R.J., 1988. Temperature and algal growth. *New Phytologist* 110, 441-461.
- Raven, J.A., Waite, A.M., 2004. The evolution of silification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape. *New Phytologist* 162, 45-61.
- Raybaud, V., Beaugrand, G., Goberville, E., Delebecq, G., Destombe, C., Valero, M., Davoult, D., Morin, P., Gevaert, F., 2013. Decline in Kelp in West Europe and Climate. *Plos One*.
- Razzoulzadegan, F., Laval-Peuto, M., Sheldon, R.W., 1988. Partitioning of the food ration of marine ciliates between pico-and nanoplankton. *Hydrobiologia* 159, 75-88.
- Reay, D.S., Priddle, J., Nedwell, D.B., Whitehouse, M.J., Ellis-Evans, J.C., Deubert, C., Connelly, D.P., 2001. Regulation by low temperature of phytoplankton growth and nutrient uptake in the Southern Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 219, 51-64.
- Record, N.R., Pershing, A.J., Maps3, F., 2013. The paradox of the “paradox of the plankton”. *ICES Journal of marine science*.
- Rees, A.P., Owens, N.J.P., Heath, M.R., Plummer, D.H., Bellerby, R.S., 1995. Seasonal nitrogen assimilation and carbon fixation in a fjordic sea loch. *Journal of plankton research* 17, 1307-1324.
- Regaudie-de-Gioux, A., Duarte, C.M., 2012. Temperature dependence of planktonic metabolism in the ocean. *Global Biochemical Cycles* 26, 1-10.
- Renaud, S.M., Thinh, L.-V., Lambridinis, G., Parry, D.L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195-214.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Cruik, C., Naselli-Flores, L., Melo, S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24, 417-428.
- Rhee, G.Y., Gotham, I.J., 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interaction of temperature with nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* 26, 635-648.
- Richardson, A.J., Schoeman, D.S., 2004. Climate impact on plankton ecosystems in the northeast atlantic. *Science* 305, 1609-1611.
- Riegman, R., Van Boekel, W., 1996. The ecophysiology of *Phaeocystis globosa*: a review. *Journal of sea research* 35, 235-242.
- Roleda, M.Y., Slocombe, S.P., Leakey, R.J.G., Day, J.G., Bell, E.M., Stanley, M.S., 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology* 129, 439-449.

Rombouts, I., Beaugrand, G., Dauvin, J.-C., 2012. Potential changes in benthic macrofaunal distributions from the English Channel simulated under climate change scenarios. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 99, 153-161.

Rooney-Varga, J.N., Giewat, M.W., Savin, M.W., Sood, S., LeGresley, M., Martin, J.L., 2005. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*.

Rousseau, V., Lantoine, F., Rodriguez, F., LeGall, F., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Lancelot, C., 2013. Characterization of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae), the blooming species in the Southern North Sea. *Journal of sea research* 76, 105-113.

Rousseau, V., Leynaert, A., Daoud, N., Lancelot, C., 2002. Diatom succession, silification and silicic acid availability in Belgian coastal waters (Southern North Sea). *Marine Ecology Progress Series* 236, 61-73.

Rousseau, V., Mathot, S., Lancelot, C., 1990. Calculating carbon biomass of *Phaeocystis* sp. from microscopic observations. *Marine Biology* 107, 305-314.

Rychter, A.M., Rao, I.M., 2005. Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism. *Handbook of photosynthesis* 2, 123-148.

Sala, E., Knowlton, N., 2006. Global Marine Biodiversity Trends. *Annual Review of Environment and Resources* 31, 93-122.

Salisbury, E.J., 1931. Annual meeting, January 1931. *Journal of Ecology* 19, 221-226.

Santore, U.J., 1982. The ultrastructure of *Hemiselmis brunnescens* and *Hemiselmis virescens* with additional observations on *Hemiselmis rufescens* and comments on the Hemiselmidaceae as a natural group of the Cryptophyceae. *British Phycological Journal* 17, 81-99.

Sar, E.A., Sunesen, I., Lavigne, A.S., Lofeudo, S., 2011. *Thalassiosira rotula*, a heterotypic synonym of *Thalassiosira gravida*: morphological evidence. *Diatom research* 16, 109-119.

Sayegh, F.A.Q., Montagnes, D.J.S., 2011. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource technology* 102, 3007-3013.

Schapira, m., Vincent, D., Gentilhomme, V., Seuront, I., 2008. Temporal patterns of phytoplankton assemblages, size spectra and diversity during the wane of a *Phaeocystis globosa* spring bloom in hydrologically contrasted coastal waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88, 649-662.

Schlapfer, F., Schmid, B., Seidl, I., 1999. Expert estimates about effects of biodiversity on ecosystem processes and services. *Oikos* 84, 346-352.

Schmidtke, A., Gaedke, U., Weithoff, G., 2010. A mechanistic basis for underyielding in phytoplankton communities. *Ecology* 91, 212-221.

Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J.B., Rousseau, V., Lancelot, C., 2005. Phaeocystis blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: A review. *Journal of Sea Research* 53, 43-66.

Schreiber, U., Bilger, W., Schliwa, U., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis research* 10, 51-62.

Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27, 379-423.

Shatwell, T., Köhler, J., Nicklisch, A., 2013. Temperature and photoperiod interactions with silicon-limited growth and competition of two diatoms. *Journal of Plankton Research* 35, 957-971.

Slomp, C.P., Cappellen, P.V., 2007. The global marine phosphorus cycle: sensitivity to oceanic circulation. *Biogeosciences* 4, 155-171.

Smayda, T.J., 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography* 42, 1137-1153.

Smith, A., Morris, I., 1980. Pathways of carbon assimilation in phytoplankton from the Antarctic Ocean. *Limnology and Oceanography* 25, 865-872.

Sommer, U., 1983. Nutrient competition between phytoplankton species in multispecies chemostat experiments. *Archiv für Hydrobiologie* 96, 399-416.

Sorokin, C., Krauss, R.W., 1962. Effects of temperature & illuminance on *Chorella* growth uncoupled from cell division. *Plant Physiology* 37, 37-42.

Spijkerman, E., 2010. High photosynthesis rates under a colimitation for inorganic phosphorus and carbon dioxide. *Journal of phycology* 46, 658-664.

Staats, N., Stal, L.J., Mur, L.R., 2000. Exopolysaccharide production by the epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient condition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249, 13-27.

Stachowicz, J.J., Bruno, J.F., Duffy, J.E., 2007. Understanding the effects of marine biodiversity on communities and ecosystems. *Annual review of ecology and systematics* 38, 739-766.

Stachowicz, J.J., Fried, H., Osman, R.W., Whitlatch, R.B., 2002. Biodiversity, invasion resistance, and marine ecosystem function: Reconciling pattern and process. *Ecology* 83, 2575-2590.

Staeher, P.A., Henriksen, P., Markager, S., 2002. Photoacclimation of four marine phytoplankton species to irradiance and nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series* 238, 47-59.

Staeher, P.A., Sand-Jensen, K., 2006. Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural communities. *Freshwater Biology* 51, 249-262.

Steemann Nielsen, E., 1952. The use of radio-active carbon for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil / Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 18, 117-140.

Stockenreiter, M., Haupt, F., Graber, A.-K., Seppälä, J., Spilling, K., Tamminen, T., Stibor, H., 2013. Functional group richness: implications of biodiversity for light use and lipid yield in microalgae. *Journal of phycology* 49, 838-847.

Suzumura, M., 2005. Phospholipids in marine environments: a review. *Talanta* 66, 422-434.

Tadonlélé, R.D., 2010. Evidence of warming effects on phytoplankton productivity rates and their dependence on eutrophic status. *Limnology and Oceanography* 55, 973-982.

Talmy, D., Blackford, J., Hardman-Mountford, N.J., Polimene, L., Follows, M.J., Geider, R.J., 2014. Flexible C : N ratio enhances metabolism of large phytoplankton when resource supply is intermittent. *Biogeosciences* 11, 4881-4895.

Tassan, S., Ferrari, G.M., 1998. Measurement of light absorption by aquatic particles retained on filters: determination of the optical pathlength amplification by the 'transmittance-reflectance' method. *Journal of plankton research* 20, 1699-1709.

Terseleer, L.N., 2014. Bottom-up and Top-down Controls of Diatoms in the Belgian Coastal Zone (Southern North Sea): Combining Plankton Functional Type Modelling and Trait-based Approaches. *Université Libre de Bruxelles, Bruxelles*, p. 197.

Tilman, D., 2001. Functional Diversity, in: Tilman, D. (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, St. Paul.

Tilman, D., Kilham, S.S., Kilham, P., 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annual review of ecology and systematics* 13, 349-372.

Toseland, A., Daines, S.J., Clark, J.R., Kirkham, A., Strauss, J., Uhlig, C., Lenton, T.M., Valentin, K., Pearson, G.A., Moulton, V., Mock, T., 2013. The impact of temperature on marine phytoplankton resource allocation and metabolism. *Nature Climate Change*.

Touchette, B.W., Burkholder, J.M., 2000. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 250, 133-167.

Turpin, D.H., 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology* 27, 14-20.

Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A., 2004. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition and pathway of production. *Journal of phycology* 40, 293-304.

Urbani, R., Magaletti, E., Sist, P., Cicero, A.M., 2005. Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: effect of P-depletion and growth status. *Science of the Total Environment* 353, 300-306.

Utermöhl, H.v., 1931. Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons. Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie 5, 567-595.

Van Boekel, W., Veldhuis, M.J.W., 1990. Regulation of alkaline phosphatase synthesis in *Phaeocystis* sp. Marine Ecology Progress Series 61, 281-289.

Van mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Pedler, B.E., Dyhrman, S.T., Karl, D.M., Koblizek, M., Lomas, M.W., Mincer, T.J., Moore, L.R., Moutin, T., Rappé, S.M., Webb, E.A., 2009. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. Nature Letters 458, 69-72.

Van Rijssel, M., Hamm, C., Gieskes, W., 1997. *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) colonies: hollow structures built with small amounts of polysaccharides. European Journal of Phycology 32, 185-192.

Vaulot, D., Courties, C., Partensky, F., 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. Cytometry 10, 629-635.

Veldhuis, M., Admiraal, W., 1987. Influence of phosphate depletion on the growth and colony formation of *Phaeocystis pouchetii*. Marine Biology 95, 47-54.

Veldhuis, M.J.W., Colijn, F., Admiraal, W., 1991. Phosphate Utilization in *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae). P.S.Z.N. I: Marine Ecology 12, 53-62.

Verdy, A., Follows, M., Flierl, G., 2009. Optimal phytoplankton cell size in an allometric model. Marine Ecology Progress Series 379, 1-12.

Verity, P.G., 1981. Effects of temperature, irradiance, and daylength on the marine diatom *Leptocylindrus danicus* Cleve. II. Excretion. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 55, 159-169.

Verity, P.G., Smayda, T.J., Sakshaug, E., 1991. Photosynthesis, excretion, and growth rates of *Phaeocystis* colonies and solitary cells. Polar research 10, 117-112.

Verity, P.G., Smetacek, V., 1996. Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems. Marine Ecology Progress Series 130, 277-293.

Vidyarathna, N.K., Granéli, E., 2013. Physiological responses of *Ostreopsis ovata* to changes in N and P availability and temperature increase. Harmful algae 22, 54-63.

Violle, C., Navas, M.L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! Oikos 116, 882-892.

Vitousek, P.M., Howarth, R.W., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? Biogeochemistry 13, 87-115.

Von Scheibner, M., Dörge, P., Biermann, A., Sommer, U., Hoppe, H.-G., Jürgens, K., 2014. Impact of warming on phyto-bacterioplankton coupling and bacterial community composition in experimental mesocosms. Environmental Microbiology 16, 718-733.

Vuorio, K., Lagus, A., Lehtimäki, J.M., Suomela, J., Helminen, H., 2005. Phytoplankton community responses to nutrient and iron enrichment under different nitrogen to phosphorus ratios in the northern Baltic sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 322, 39-52.

Wang, C., Kong, H., He, S., Zheng, growth rate and cell carbohydrate content of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* 22, 105-107.

Wang, Z., Liang, Y., Kang, W., 2011. Utilization of dissolved organic phosphorus by different groups of phytoplankton taxa. *Harmful algae* 12, 113-118.

Ward, B.A., Dutkiewicz, S., Follows, M.J., 2014. Modelling spatial and temporal patterns in size-structured marine plankton communities: top-down and bottom-up controls. *Journal of Plankton Research* 36, 31-47.

Webb, W.L., Herzig, R., Falkowski, P.G., D.H. Turpin, 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia* 17, 281-291.

Welschmeyer, N.A., 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments. *Limnology and Oceanography* 39, 1985-1992.

Westoby, M., Wright, I.J., 2006. Land-plant ecology on the basis of functional traits. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 261-268.

Wilson, J.B., 2011. The twelve theories of co-existence in plant communities: the doubtful, the important and the unexplored. *Journal of vegetation Science* 22, 184-195.

Wohlers, J., Engel, A., Zöllner, E., Breithaupt, P., Jürgens, K., Hoppe, H.G., Sommer, U., Riebesell, U., 2009. Changes in biogenic carbon flow in response to sea surface warming. *Proceedings of the national academy of sciences* 106, 7067-7072.

Worm, B., Barbier, E.B., Beaumont, N., Duffy, J.E., Folke, C., Halpern, B.S., Jackson, J.B., Lotze, H.K., Micheli, F., Palumbi, S.R., Sala, E., Selkoe, K.A., Stachowicz, J.J., Watson, R., 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314, 787-790.

Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A., Grossman, A.R., 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 117, 129-139.

Young, E.B., Beardall, J., 2003. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of phycology* 39, 897-905.

Effects of nutrient limitation, temperature or their interaction on several response traits of five phytoplankton species: a multifactorial experimental approach

Marine microalgae are essential primary producers involved in several fundamental ecosystem processes. These organisms are highly dependent on environmental conditions such as, but not limited to, nutrient concentration or temperature. Some modifications of these environmental conditions, through global change, are going to influence the ecology of phytoplankton.

The influence of nitrogen or phosphorus limitations at two temperatures on functional response traits related to photosynthesis, carbohydrate content and exudation, stoichiometry and biomass formation of five phytoplankton species were investigated through laboratory experiments. The small sized species *Phaeocystis globosa* (Pg), *Hemiselmis rufescens* (Hr), *Skeletonema sp* (Ske), the mid-sized *Thalassiosira rotula* (Tr) and the larger species *Ditylum brightwellii* (Db) were chosen belonging to 3 phyla and showing a size range from 40 to 60000 μm^3 .

Photosynthesis was strongly negatively affected by the interactive effects of nutrient and temperature, especially in small sized species. Moreover these species showed stronger responses than mid-sized or larger cells to the different treatments. Regarding carbohydrate production, an increase in carbohydrate per cell resulting from nutrient limitation, temperature effect or their interactions was overall observed. Nevertheless, contrary to photosynthetic activity, these responses depended on species rather than size. Taken together these results highlighted that a same limitation will lead to different response depending on trait. Moreover, two species from same functional groups could show different responses depending on specific physiological characteristics or cell size. Cell size therefore appears as a master trait which should be considered for the formation of functional groups. We also showed that diatoms were more affected by phosphorus limitation while *Phaeocystis globosa* was strongly dependent on nitrogen concentration. Finally, the different response traits were overall more sensitive to nutrient limitation compared to temperature.

Three communities, with three, four and five species, were done in nitrogen or phosphorus limitation in order to describe the relationship between diversity and productivity, and the dependence of this relationship to nutrient limitation. The three communities were mainly composed, at the end of the experiments, by *Skeletonema sp.* and, to a lesser extent, by *Ditylum brightwellii* and *Phaeocystis globosa*. The latter was strongly negatively affected by nitrogen limitation. Our results showed that communities were more efficient for resource use (nitrogen, phosphorus and light) due to a complementarity effect between species. However, an overall underyielding was observed concerning carbohydrate and biomass formation. Furthermore, no clear link between productivity and diversity was observed in our studies.

All these results taken together, i.e. specific responses to nutrient limitation and temperature, the size dependence of responses to environmental gradient, the presence of interactive effects, and the role of diversity for resource absorption are of importance regarding the effects of global change in natural environments which will disturb the phytoplankton ecology at cellular and community levels, and through bottom-up effects, will influence marine ecosystem functioning.

Keywords: *phytoplankton, nutrient limitation, temperature, functional response traits, diversity/productivity relationship, photosynthesis, carbohydrates*

Effets de la limitation en sels nutritifs, de la température et de leurs interactions sur la réponse de cinq espèces phytoplanctoniques : Approche multifactorielle expérimentale en monoculture et en communauté

Les organismes phytoplanctoniques sont, depuis des années, largement étudiés du fait de leur rôle essentiel dans les processus écosystémiques marins. La physiologie du phytoplancton est fortement tributaire des conditions environnementales. Ainsi, la température et la concentration en sels nutritifs sont des paramètres clés qui vont influencer la physiologie de ces organismes à plusieurs niveaux mais également la structure des communautés phytoplanctoniques.

Les objectifs de cette thèse sont d'étudier, par des expérimentations en laboratoire, l'effet de la température, de la concentration en sels nutritifs ou de leurs interactions sur divers traits de réponse d'espèces phytoplanctoniques pélagiques. Les principaux traits sélectionnés sont, la capacité photosynthétique, la production d'hydrates de carbone particuliers et d'exsudats, la stoechiométrie et la formation de biomasse. Cette étude est menée sur trois diatomées (*Ditylum brightwellii*, *Thalassiosira rotula* et *Skeletonema sp.*), une prymnesiophycée (*Phaeocystis globosa*) et une cryptophycée (*Hemiselmis rufescens*). En plus d'appartenir à 3 phylums différents, ces espèces montrent une gamme de taille allant de 3 à 200 μm . Après avoir étudié ces espèces en monoculture, des communautés expérimentales de diversité croissante ont été établies afin d'étudier les réponses de ces communautés aux mêmes stress environnementaux.

La limitation en sels nutritifs, l'effet de la température ou leurs interactions aboutissaient globalement à une diminution de l'activité photosynthétique. Les cellules de petites tailles montraient un effet résultant de l'interaction entre sels nutritifs et température. La diminution de l'activité photosynthétique observée pour ces espèces était supérieure à celle mesurée pour les espèces plus grandes. La taille des cellules se révèle donc être une propriété fondamentale qui définit les réponses de la capacité photosynthétique aux différentes conditions environnementales. L'effet de la limitation en sels nutritifs, de la température ou de leurs interactions sur les hydrates de carbone particuliers aboutissaient de façon spécifique à une augmentation de la quantité d'hydrates de carbone par cellule. Par ailleurs l'évolution de la quantité d'hydrates de carbone particuliers et dissous, en réponse aux mêmes stress environnementaux, ne semble pas dépendre de la taille mais dépend davantage du taxon considéré.

Nos résultats montrent qu'il existe des effets de la limitation en azote et en phosphore, de la température et des interactions sels nutritifs-température sur tous les traits étudiés. Toutefois, ces effets diffèrent en fonction des traits et des espèces, et mettent en exergue la présence de réponses fonctionnelles différentes. La taille des cellules se révèle être un trait essentiel qui pourrait être utile pour définir les groupes fonctionnels.

Enfin concernant les communautés, les résultats obtenus sont très contrastés selon les communautés qui montrent de fortes variations de leur patron de réponse à la limitation en sels nutritifs. Les différentes communautés étaient en fin d'expérimentation principalement composées de *Phaeocystis globosa*, *Skeletonema sp.* et *Ditylum brightwellii*. *Phaeocystis globosa* était plus affectée par la limitation en azote qu'en phosphore, et ce, aussi bien en communauté qu'en monoculture. Nos communautés présentaient une meilleure utilisation des ressources, à savoir les sels nutritifs et la lumière, résultant d'un phénomène de complémentarité entre espèces. Ce résultat est dû à la présence d'espèce ayant des caractéristiques fonctionnelles et des sensibilités différentes aux mêmes limitations. Cependant, malgré une meilleure absorption des ressources, les communautés étaient moins productives que les monocultures, notamment en termes d'hydrates de carbone et de biomasse. Aucune relation claire entre la productivité et la diversité n'a été mise en évidence.

Ces travaux sont d'importance compte tenu des effets du changement global observés et à venir en milieu marin qui vont influencer le phytoplancton à l'échelle cellulaire et des communautés et, par conséquent, le fonctionnement des écosystèmes.

Mots clés : *phytoplancton, approche multifactorielle, limitation en sels nutritifs, température, traits fonctionnels, photosynthèse, hydrates de carbone*