

Culture of *Gephyrocapsa huxleyi* and characterization of calcification by flow cytometry

Jordan BOURRIQUET¹, Marie RENAUDIE¹, Pierre ALBRAND¹, Guillaume COGNE¹ and Pascale GILLON¹

1 : GEPEA – UMR CNRS 6144, Nantes Université, Nantes, France

Abstract

Coccolithophores are photosynthetic unicellular marine algae capable of producing an extracellular shell composed of calcium carbonate (CaCO₃) scales called coccoliths. Photosynthesis and calcification are closely linked intracellular mechanisms and it has been proposed to use them for the development of bioconversion processes and long-term storage of CO₂ in mineral form. *Gephyrocapsa huxleyi* (formerly named *Emiliana huxleyi*) is the model species of coccolithophores and the most studied. Few studies have focused on validating the methodology for monitoring these cultures. The objective of this preliminary work was to implement a culture of *G. huxleyi* in an artificial medium (ESAW) from a strain cultivated in natural seawater and to set up a method for monitoring cells and free coccoliths by flow cytometry. The results show that the artificial culture medium allows better growth of *G. huxleyi* than the natural medium, after an adaptation phase, provided that the transfer between these two environments is as progressive as possible. Flow cytometry makes it possible to count cells but must be complemented by other methods for quantitative or comparative studies. Finally, calcein seems to be an interesting marker for counting free coccoliths simultaneously with cell counting by flow cytometry.

Culture de *Gephyrocapsa huxleyi* et caractérisation de la calcification par cytométrie en flux

Jordan BOURRIQUET¹, Marie RENAUDIE¹, Pierre ALBRAND¹, Guillaume COGNE¹ and Pascale GILLON¹

1 : GEPEA – UMR CNRS 6144, Nantes Université, Nantes, France

Résumé

Les coccolithophores sont des algues marines unicellulaires capables de produire une coque extracellulaire composée d'écailles en carbonate de calcium (CaCO₃) nommées coccolithes. La photosynthèse et la calcification sont des mécanismes intracellulaires étroitement liés et il a été proposé de les utiliser pour le développement de procédés de bioconversion et de stockage à long terme du CO₂ sous forme minérale. *Gephyrocapsa huxleyi* (anciennement nommée *Emiliania huxleyi*) est l'espèce modèle de coccolithophores et la plus étudiée. Peu d'études ont porté sur la validation de la méthodologie de suivi de ces cultures. L'objectif de ce travail préliminaire a été de mettre en œuvre une culture de *G. huxleyi* en milieu artificiel (ESAW) à partir d'une souche cultivée en eau de mer naturelle et de mettre en place une méthode de suivi des cellules et des coccolithes libres par cytométrie en flux. Les résultats montrent que le milieu de culture artificiel permet une meilleure croissance de *G. huxleyi* que le milieu naturel, après une phase d'adaptation, à condition que le transfert entre ces deux milieux soit le plus progressif possible. La cytométrie en flux permet de dénombrer les cellules mais doit être complétée par d'autres méthodes pour des études quantitatives ou comparatives. Enfin, la calcéine semble être un marqueur intéressant pour le comptage des coccolithes libres simultanément au dénombrement des cellules.

Introduction

Les coccolithophores sont des algues unicellulaires capables de produire une coque extracellulaire, la coccosphère, composée d'écailles majoritairement constituées de carbonate de calcium (CaCO_3) nommées coccolithes (Billard, C. et Inouye, I. 2004). Plus de 200 espèces sont présentes dans tous les océans et sont régulièrement responsables de bloom, un phénomène soudain de prolifération visible à l'œil nu (Young, J.R. *et al.* 2003 ; Winter, A. 1994 ; Brown, C.W. et Yoder, J.A. 1994). Ces microalgues marines sont des producteurs primaires importants et jouent un rôle majeur dans le cycle du carbone via leurs processus de photosynthèse et de calcification, leur permettant de stocker le CO_2 sous forme organique et inorganique (Monteiro, F.M. *et al.* 2016).

Chez les coccolithophores, la calcification pourrait jouer un rôle de protection de l'intégrité cellulaire, contre les prédateurs et permettrait aux cellules de se déplacer dans la colonne d'eau par sédimentation ou flottaison (Young, J.R. 1994 ; Paasche, E. 2001 ; Monteiro, F.M. *et al.* 2016). Ce mécanisme est étroitement lié à la photosynthèse. Selon leur orientation, les coccolithes, dans et autour de la cellule diffusent ou concentrent la lumière, ou encore dissipent l'énergie lumineuse en cas de forte irradiation (Paasche, E. 2001 ; Monteiro, F.M. *et al.* 2016). Chez *Gephyrocapsa huxleyi*, la calcification se fait à partir des bicarbonates (HCO_3^-) présents dans l'eau (Raven, J. 1997 ; Moheimani, N.R. *et al.* 2012) tandis que la photosynthèse utilise directement le CO_2 . Ainsi, en présence de fortes concentrations en carbone inorganique dissous (CID), la photosynthèse et la calcification ont lieu en parallèle (Bach, L.T. *et al.* 2013). La photosynthèse fournit alors l'énergie et les polysaccharides nécessaires à la formation de coccolithes tandis que la calcification génère un gradient de protons permettant aux CID de se retrouver sous forme CO_2 et de compenser la basification induite par la photosynthèse (Moheimani, N.R. *et al.* 2012). Lors de faibles concentrations en CID, il est suggéré que la calcification s'arrête, permettant une remobilisation des bicarbonates pour la photosynthèse (Bach, L.T. *et al.* 2013).

Il a été proposé d'utiliser les coccolithophores pour la capture et le stockage à long terme de CO_2 issu de fumées industrielles (Moheimani, N.R. *et al.* 2012). En outre, les coccolithes sont potentiellement valorisables dans le secteur des nanotechnologies (Skeffington, A.W et Scheffel, A. 2018). La biomasse organique constitue une potentielle source de lipides à haute-valeur ajoutée utilisable dans l'alimentation, la cosmétique ou la pharmaceutique (Aveiro, S.S. *et al.* 2020). Toutefois, leur culture reste un défi : seul une trentaine d'espèces a été cultivée en laboratoire avec succès et sont disponibles dans les collections de culture (Probert, I. et Houdan, A. 2004). *G. huxleyi* est l'espèce modèle de coccolithophores. Elle est la plus étudiée, décrite dans de nombreuses revues (Paasche, E. 2001 ; Raven, J. 1997 ; Eikrem, W. *et al.* 2017) et réputée s'adapter à une large variété de conditions et de milieux de cultures (Paasche, E. 2001 ; Probert, I. et Houdan, A. 2004 ; Berges, J.A. *et al.* 2001).

Cependant, il n'existe pas de protocole standard pour suivre les cultures de *G. huxleyi* en laboratoire. La croissance est généralement suivie par comptage au microscope (Takano, H. *et al.* 1994 ; Moheimani, N.R. et Borowitzka, M.A. 2006), mesure de la masse sèche (Takano, H. *et al.* 1995) ou par cytométrie (Jakob, I. *et al.* 2018 ; Rubner, T. *et al.* 2015). La production de coccolithes peut-être suivie par comptage au microscope (Paasche, E. 1998 ; Jakob, I. *et al.* 2018), gravimétrie (Moheimani, N.R. 2005) ou par dosage du calcium après dissolution (Takano, H. *et al.* 1994). Aucune étude n'a été faite à notre connaissance quant à la complémentarité et la redondance de ces méthodes.

Cette étude s'inscrit dans un travail visant à maîtriser le couplage des mécanismes de photosynthèse-calcification lors de la culture de *G. huxleyi*, afin de maximiser la production de coccolithes, puis de caractériser les matières organiques et minérales valorisables. L'objectif spécifique de cette étude préliminaire était de mettre en œuvre une culture de *G. huxleyi* en milieu artificiel défini et d'initier le développement d'une méthode de suivi de la culture.

Matériel et méthodes

Souche et milieux de cultures

Pour cette étude, nous avons utilisé la souche de *G. huxleyi* RCC1216 provenant de la collection de culture de Roscoff (RCC) (Figure 1). Il s'agit de la forme calcifiante (forme C, morphotype R) de cette espèce prélevée au large de la Nouvelle-Zélande par I. Probert et son équipe en septembre 1998. Cette souche est tempérée et croît sans difficulté aux températures ambiantes ($\approx 19^\circ\text{C}$).

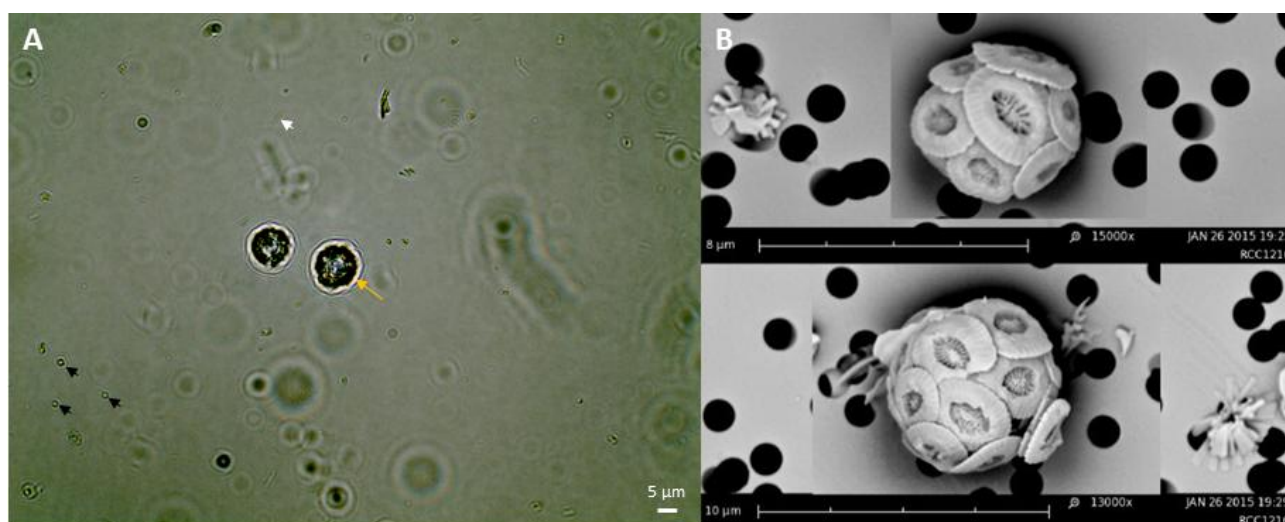


Figure 1 : *Gephyrocapsa huxleyi* RCC1216 utilisée dans cette étude. (A) Suspension de cellules en K2I après réception de Roscoff observée au microscope optique (Zeiss AxioStar, grossissement X1000). Des cellules avec leur coccosphère formant un halo sont visibles au centre (flèche jaune). Des bactéries coques en chaînettes (flèche blanche) ainsi que des coccolithes libres (flèche noire) sont également visibles. (B) Observation au microscope électronique à balayage (MEB) d'une cellule avec sa coccosphère (Roscoff Culture Collection).

Les cellules ont été cultivées dans un volume de 100 mL en fioles d'Erlenmeyer de 250 mL. Les cultures ont été maintenues sous agitation (agitateur rotatif, 150 rpm) à 20°C en lumière continue avec une irradiance de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Elles ont été repiquées à 10% v/v toutes les une à deux semaines. Les cultures ont été effectuées en duplicats.

Deux milieux ont été utilisés. Le milieu K2I (Keller, M.D. *et al.* 1987) modifié par I. Probert est à base d'eau de mer naturelle filtrée à 25 μm et autoclavée (prélèvement au Croisic, France, salinité 32 g/L). Cette eau est supplémentée en NaNO_3 (288 μM), NH_4Cl (5 μM), KH_2PO_4 (18 μM), Fe (5,85 μM), métaux trace et vitamines (thiamine, biotine et cyanocobalamine (vitamine B12)). Ce milieu est utilisé en routine par la RCC pour le maintien de cette souche. Le milieu ESAW (Berges, J.A. *et al.* 2001) est un milieu artificiel conçu à partir d'eau ultra-pure. Il a récemment été modifié par Jakob *et al.* (Jakob, I. *et al.* 2018). Les quantités de CaCl_2 , NaNO_3 , NaH_2PO_4 , SrCl_2 et NaHCO_3 ont été modifiées (12,1 mM, 549 μM , 25,8 μM , 138 μM et 2,07 mM respectivement).

Dénombrements cellulaires

Les cellules ont été dénombrées sur cellule de Malassez tous les deux à trois jours. Pour cela les Erlenmeyers ont été agités par des mouvements en huit puis 1 mL de culture a été prélevé stérilement dans un tube de 2 mL puis homogénéisé au moyen d'un agitateur à vortex.

Sur ces mêmes échantillons, des comptages par cytométrie ont également été effectués à l'aide d'un cytomètre trieur (CytotflexSRT BG13068, Beckman Coulter) piloté à l'aide du logiciel CytExpertSRT. La diffusion frontale de la lumière (FSC, forward scatter), la diffusion latérale de la lumière (SSC, side scatter) et la fluorescence latérale de la chlorophylle (laser 488, filtre 690/50) ont été mesurées. Le débit d'acquisition a été fixé à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ et le temps d'acquisition à 2 minutes. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Floreada.

Les concentrations cellulaires et les courbes de croissances obtenues par ces deux méthodes ont été comparées pour des mêmes échantillons.

Dénombrement des coccolithes libres

Les coccolithes ont été marqués par de la calcéine (C0875, Sigma-Aldrich) selon un protocole inspiré de Wang *et al.* (Wang, X. *et al.* 2023). La calcéine a été préparée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) anhydre à 1 g/L

puis conservé à l'obscurité et à -20°C . 10 μL de cette solution a été ajouté à 1 mL de culture, ce qui donne une concentration finale de 10 mg/L de calcéine. Le mélange a été incubé 2 h à l'obscurité.

L'observation a été effectuée par cytométrie. Les paramètres FSC, fluorescence de la chlorophylle (laser 488 nm, filtre 690/50) et fluorescence de la calcéine (laser 488, filtre 525/40) ont été utilisés. Le débit d'acquisition a été fixé à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ et le temps d'acquisition à 2 minutes. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Floreada.

Résultats et discussion

Courbes de croissance dans les différents milieux

Influence du milieu

Les deux répliquats ont évolué de façon similaire pour les deux milieux.

Dans le milieu K2I, les concentrations initiales étaient de $4,6 \cdot 10^5$ et $5,31 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} . Il y a une croissance sans phase de latence jusqu'au 5^{ème} jour où les concentrations sont maximales et atteignent $3,73 \cdot 10^6$ et $4,5 \cdot 10^6$ cellules. mL^{-1} respectivement. Au-delà, les concentrations diminuent lentement pour atteindre $2,54 \cdot 10^6$ et $3,23 \cdot 10^6$ cellules. mL^{-1} au 10^{ème} jour de culture (Figure 2A).

Dans le milieu ESAW, il y a une longue phase pendant laquelle presque aucune croissance n'est observée (Figure 2B). Les concentrations augmentent de $2,64 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} au 2^{ème} jour à $3,31 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} au 7^{ème} jour et de $2,88 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} au 2^{ème} jour à $5,31 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} au 7^{ème} jour respectivement. On observe ensuite une importante phase de croissance jusqu'au 14^{ème} jour où les concentrations cellulaires atteignent $9,5 \cdot 10^6$ et $1,05 \cdot 10^7$ cellules. mL^{-1} respectivement. Il semble y avoir une légère diminution ou stagnation de la concentration cellulaire au-delà avec $8,44 \cdot 10^6$ et $8,84 \cdot 10^6$ cellules. mL^{-1} au 18^{ème} jour.

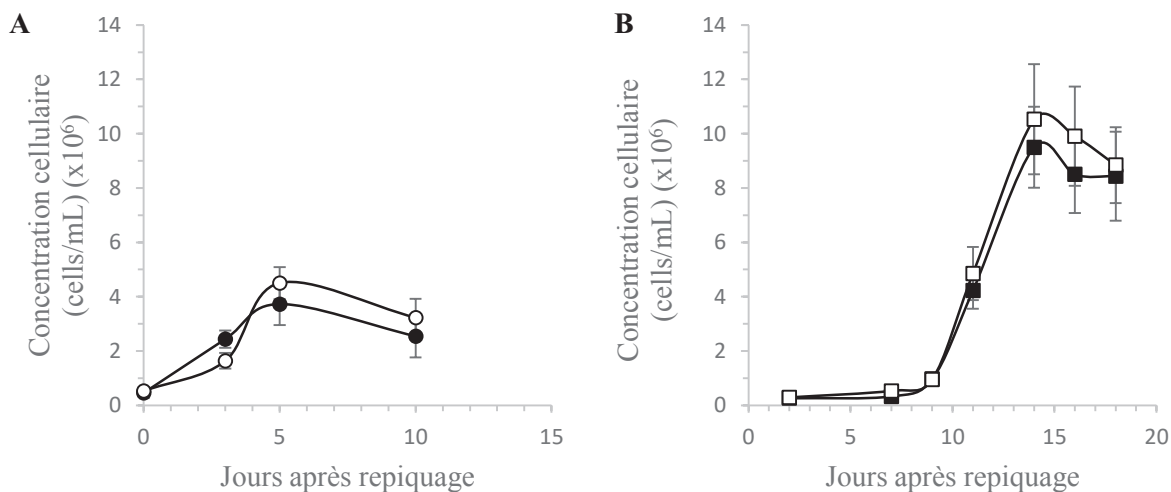


Figure 2. Courbes de croissance de *G. huxleyi* après repiquage en K2I (—○—) et après repiquage en ESAW (—□—). Deux cultures ont été effectuées et sont représentées par une couleur différente.

L'absence de phase de latence en milieu K2I était attendue puisqu'il s'agit d'un milieu proche du milieu naturel de *G. huxleyi* et que c'est dans celui-ci que notre souche est conservée à la RCC.

La croissance de *G. huxleyi* dans le milieu ESAW a été déterminée lors du premier repiquage à 10% (v/v) dans celui-ci. Les cellules ont dû s'adapter à la nouvelle composition, salinité et force ionique du milieu, ce qui constitue un stress et peut expliquer la phase de latence observée. Après cette adaptation, *G. huxleyi* semble mieux croître en ESAW qu'en K2I, ce qui est en accord avec d'autres études (Berges, J.A. *et al.* 2001 ; Probert, I. et Houdan, A. 2004). Il est à noter qu'après ce premier repiquage, la composition du milieu ESAW n'est pas exacte : les cellules n'ayant pas été lavées, du milieu K2I a été introduit (10%) dans celui-ci. Un repiquage avec lavage a été testé mais n'a pas permis d'obtenir une croissance. Il a donc été décidé de continuer l'ensemble des repiquages sans lavage.

La quantité de K2I introduite dans ESAW diminue au fil des repiquages, tandis que *G. huxleyi* devrait s'adapter à la composition de ce dernier. A terme, la croissance de *G. huxleyi* dans ce milieu devrait devenir optimale et la quantité de K2I indétectable. ESAW étant un milieu artificiel de composition parfaitement connue, il est possible de contrôler la nature et la quantité des nutriments disponibles et de suivre leur consommation au cours de la culture par chromatographie ionique.

Influence du lavage

A la suite du repiquage avec lavage, aucune croissance n'a été observée pour les deux cultures (Figure 3). Celles-ci ont rapidement décliné : de $1,38 \cdot 10^5$ cellules.mL⁻¹ au jour 0 à $6,25 \cdot 10^3$ cellules.mL⁻¹ au 5^{ème} jour et de $6,88 \cdot 10^4$ cellules.mL⁻¹ au jour 0 à $2,50 \cdot 10^4$ cellules.mL⁻¹ au 5^{ème} jour respectivement. Lors de l'observation au microscope, les cellules étaient petites et ne présentaient pas le halo normalement visible sur des cultures en bonne santé. Pour confirmer le déclin des cultures, celles-ci ont été analysées par cytométrie : très peu de cellules fluorescentes ont été observées au 5^{ème} jour avec beaucoup de débris. Un deuxième contrôle a été effectué au 7^{ème} jour et plus aucune cellule ne pouvait être comptée (résultats non montrés).

Après un repiquage sans lavage, on observe une phase de latence apparente jusqu'au 9^{ème} jour pour les deux cultures, aucun déclin cellulaire n'a été observé. Les concentrations cellulaires initiales étaient de $2,64 \cdot 10^5$ et $2,88 \cdot 10^5$ cellules.mL⁻¹ pour les deux cultures. Au 9^{ème} jour, elles ont atteint respectivement $9,69 \cdot 10^5$ et $9,56 \cdot 10^5$ cellules.mL⁻¹.

Il semble que le lavage entre deux repiquages soit défavorable aux cellules. Lors du passage du milieu K2I vers ESAW des deux cultures, il avait été décidé de laver les cellules afin de ne pas modifier la composition du milieu ESAW (connue) par l'incorporation de milieu à base d'eau de mer (de composition inconnue). Cette expérience montre que le lavage des cellules avec la méthode choisie (centrifugation et rinçage avec le nouveau milieu) n'est pas adapté pour *G. huxleyi*.

Le changement de milieu sans lavage ne semble pas avoir d'effet négatif sur la culture. Pour cette espèce, il semble préférable d'effectuer le changement de milieu progressivement. Il est suggéré que *G. huxleyi* serait sensible au stress mécanique de cisaillement (Moheimani, N.R *et al.* 2011) inévitable lors des lavages (re-suspension du culot cellulaire par aspiration-refoulement et/ou vortex). Une autre hypothèse serait un choc osmotique lié au changement trop brutal de milieu.

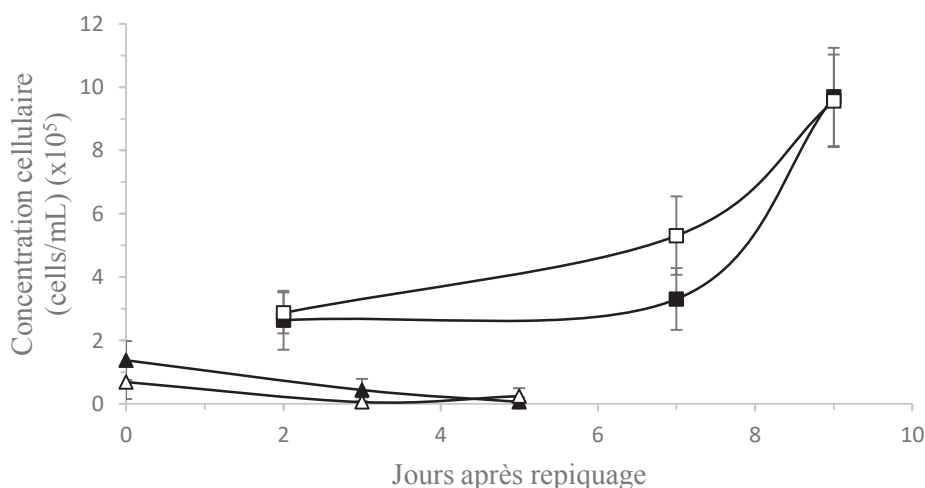


Figure 3. Courbes de croissance de *G. huxleyi* après repiquage avec lavage (–△–) et sans lavage (–□–). Deux cultures ont été effectuées et sont représentées par une couleur différente.

Comparaison des comptages par cytométrie et Malassez

Les mêmes échantillons issus des comptages en milieu ESAW sur cellule de Malassez ont été analysés par cytométrie en flux (Figure 4A). Pour chaque échantillon, un rapport compris entre 1,5 et 2 est observé entre les deux méthodes quelle que soit la concentration (facteur de 1,72, R²=0,96 sur l'ensemble) (Figure 4B).

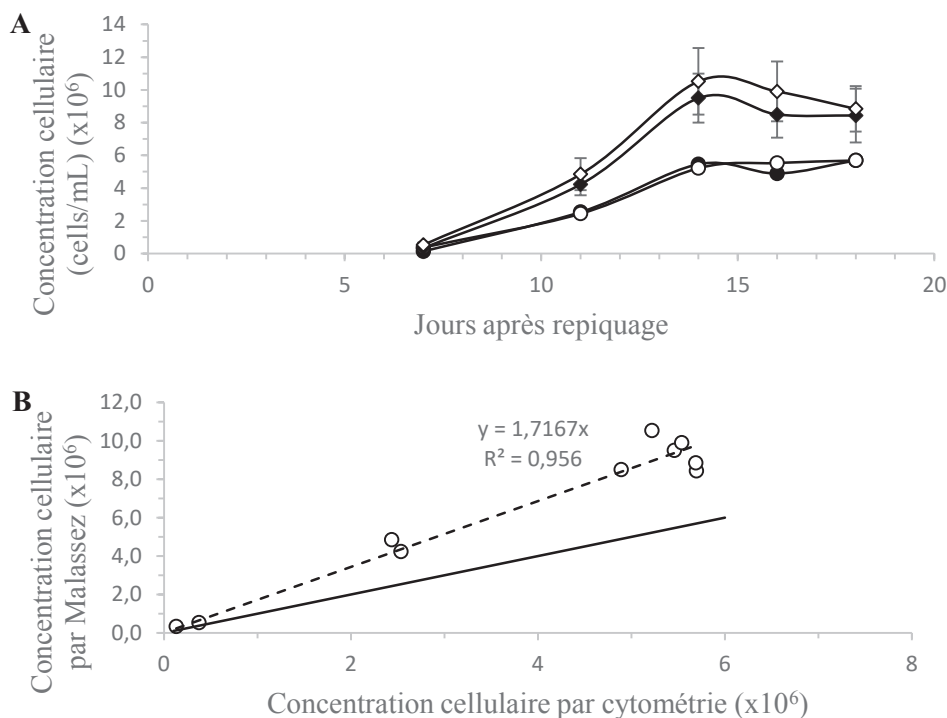


Figure 4. A: courbes de croissance de *G. huxleyi* en ESAW obtenues par comptages sur cellule de Malassez (—◇—) et par cytométrie en flux (—○—). Deux cultures ont été effectuées et sont représentées par une couleur différente. B: correspondance entre les concentrations cellulaires obtenues par comptage sur Malassez et par cytométrie sur les mêmes échantillons (○), droite de corrélation sur ces échantillons (droite pointillée), droite de corrélation théorique (droite continue).

Le dénombrement par cytométrie en flux montre une bonne corrélation qualitative avec le comptage sur cellules de Malassez. Les courbes de croissance obtenues ont la même allure. Il est ainsi possible de suivre rapidement et facilement les cultures avec cette méthode. En revanche, il y a une faible corrélation quantitative entre les deux méthodes. L'analyse par cytométrie en flux semble sous-estimer la concentration cellulaire par rapport au comptage sur cellule de Malassez. Le facteur existant entre les deux méthodes n'est pas constant en fonction de la concentration ou de l'échantillon, il n'est donc pas possible de faire correspondre les valeurs des concentrations obtenues pour chaque échantillon.

Lorsque les concentrations cellulaires sont élevées et plus encore en fin de phase exponentielle, il a été constaté la présence d'agrégats cellulaires sur cellule de Malassez (Figure 5). Il est possible que ces agrégats ne soient pas comptés lors de l'analyse par cytométrie en flux (considérés comme des doublets de particules) ou compté comme une seule cellule, alors que ceux-ci peuvent être comptés sur cellules de Malassez. En effet, lorsque les agrégats sont suffisamment petits, il est possible de compter les cellules les constituant. De plus, il n'est pas exclu que des cellules mortes soient comptées sur cellule de Malassez, étant donné qu'il est impossible de vérifier leur viabilité par fluorescence de la chlorophylle sur ce dispositif. Ces cellules mortes ne sont pas comptées en cytométrie en flux. Ces deux analyses donnent donc accès à des informations complémentaires : cellules en suspension et fluorescentes, dans le cas de l'analyse par cytométrie en flux, et nombre total de cellules dans le cas du dénombrement sur cellules de Malassez.

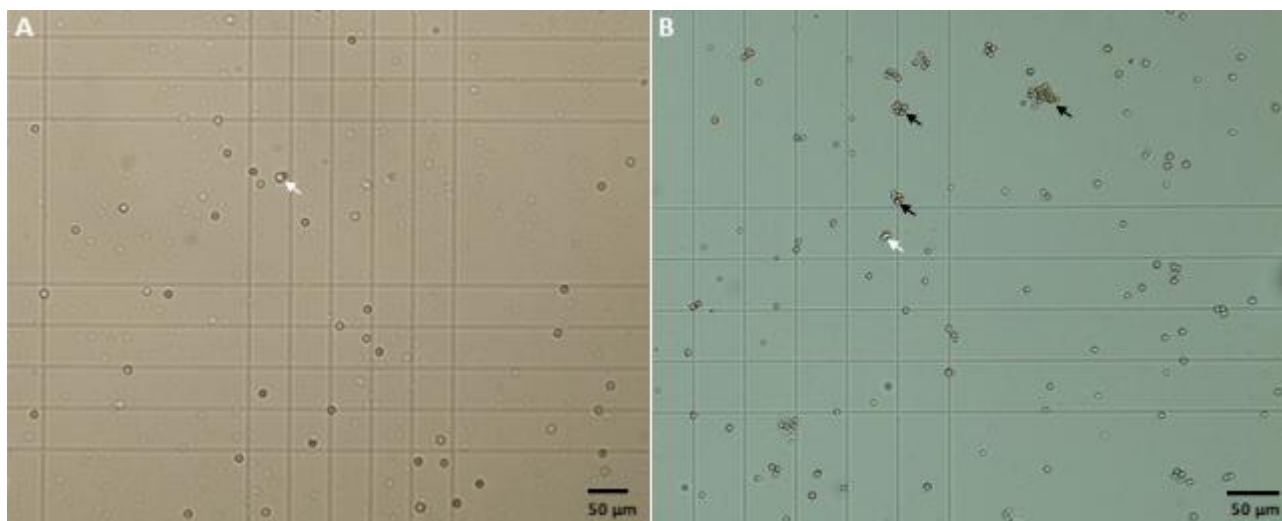


Figure 5. *G. huxleyi* vue en microscopie optique (Zeiss AxioStar, grossissement X100) sur cellule de Malassez pour comptage en début (A) et en fin (B) de phase exponentielle. Des débris ou cellules endommagées sont visibles sur les deux images (flèches blanches). Des agrégats de différentes tailles peuvent être observés en fin de phase exponentielle (flèches noires).

Notons que d'autres méthodes peuvent être utilisées pour suivre la croissance et permettraient d'obtenir une redondance sur cette donnée. La mesure de la matière sèche par gravimétrie permet de connaître la biomasse totale dans les cultures. Combinée à une mesure des cendres (après calcination de la matière sèche à 550°C et gravimétrie), celle-ci permet de déduire la quantité de matière organique et inorganique (coccolithes) constituant cette biomasse. Il est également possible de suivre la croissance et l'état physiologique des cellules en mesurant l'oxygène produit lors de la photosynthèse (Cogne, G. *et al.* 2005 ; Cogne, G. *et al.* 2001).

Dénombrement des coccolithes par marquage à la calcéine

Lorsque les cultures fraîches sont analysées par cytométrie en flux (Figure 6A), on distingue deux populations de particules. Une population de débris non fluorescents pour la chlorophylle (de 0 à 10^3 unités d'absorbances (UA)) et avec une taille très variable (FSC entre $5 \cdot 10^3$ et $4 \cdot 10^6$ UA) et une population de cellules viables fluorescentes pour la chlorophylle (de 10^5 à 10^6 UA) et de taille plutôt homogène (FSC entre 10^5 et 10^6 UA). Le marquage à la calcéine ne provoque pas de changement de ces paramètres (Figure 6C). Les débris ainsi que les cellules possèdent une fluorescence basale pour la calcéine lorsque les cultures sont non marquées (de 0 à $3 \cdot 10^3$ et de $7 \cdot 10^3$ à 10^5 UA respectivement) (Figure 6B). Le marquage à la calcéine provoque un important décalage des débris, d'environ deux décades de fluorescence, ainsi qu'un étalement du signal des cellules (de 10^3 à 10^6 UA) (Figure 6D).

Ce qui est nommé « débris » ici est en réalité une population plus complexe. Celle-ci contient des bactéries (la souche utilisée n'étant pas axénique), des débris cellulaires, des coccolithes libres et des coccosphères vides (de taille équivalente aux cellules). En absence de marquage, il n'est pas possible de les distinguer ; seules les cellules viables peuvent être distinguées par la fluorescence de leur chlorophylle.

La calcéine est une molécule très affine pour le calcium. En absence de calcium, elle n'est presque pas fluorescente alors qu'elle l'est fortement lorsqu'elle chélate ou est fixée sur du calcium. Cette propriété a été précédemment utilisée pour marquer des organominéraux de carbonates de calcium (Wang, X. *et al.* 2023) et les coccolithes de *G. huxleyi* (Fox, E. *et al.* 2018).

L'important décalage de la population de « débris » dans la fluorescence de la calcéine après marquage suggère que celle-ci est principalement constituée de coccolithes libres et que la calcéine s'y est fixée. Notons toutefois que le décalage n'est probablement pas suffisant pour dénombrer l'ensemble des coccolithes marqués. L'application d'une matrice de compensation sur un échantillon similaire a été rapportée pour augmenter ce décalage (Fox, E. *et al.* 2018). Le léger étalement du signal de la population cellulaire vers la droite suggère différents niveaux de calcification. L'étalement vers la gauche est possiblement dû aux coccosphères vides marquées (de taille comparables aux cellules).

Ces résultats préliminaires suggèrent que la calcéine peut être utilisée pour marquer les coccolithes de notre souche dans nos conditions de culture et déterminer le niveau de calcification des cellules. Toutefois la méthode doit être encore affinée pour permettre un dénombrement des coccolithes libres.

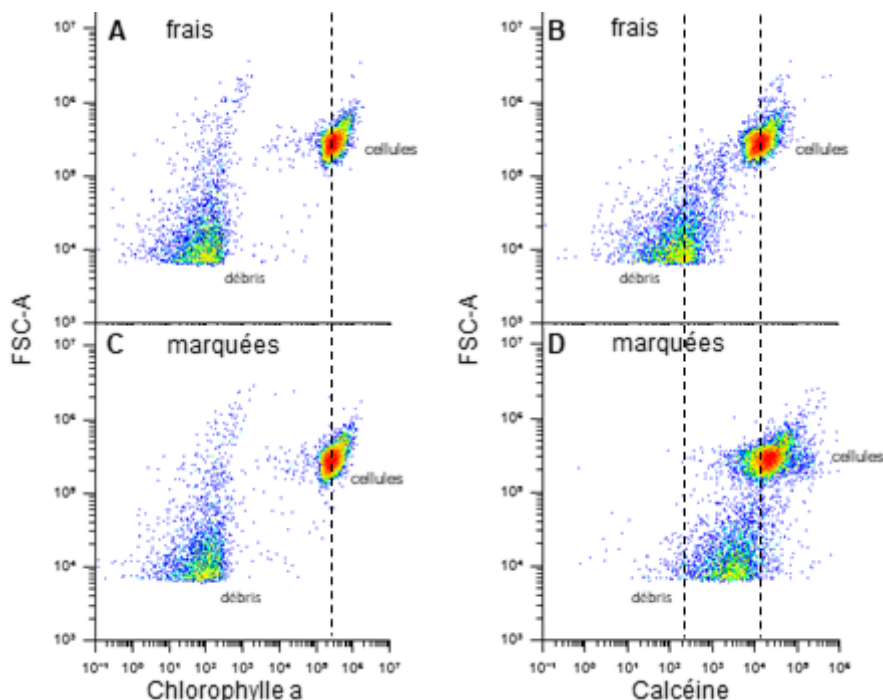


Figure 6. Cytométrie de cultures de *G. huxleyi* marquées à la calcéine à une concentration plus élevée (10^{-2} g/L) sans lavage. Représentation en nuage de densité chlorophylle vs FSC-A (A,C) et calcéine vs FSC-A (B,D) de cellules non marquées (A,B) ou marquées (C,D).

Conclusion

La croissance de *G. huxleyi* est plus importante dans le milieu artificiel testé que dans le milieu utilisant une eau de mer naturelle. Le milieu artificiel permet la mise en place d'un suivi quantitatif de la consommation des nutriments. Toutefois, la transition entre milieu naturel et artificiel peut poser des difficultés et doit s'effectuer progressivement. Il apparaît nécessaire d'effectuer plusieurs repiquages en milieu artificiel afin que la culture puisse s'y adapter. La cytométrie en flux constitue un outil rapide et puissant pour le suivi des cultures et leur viabilité. Cependant, la comparaison avec les données obtenues sur cellule de Malassez révèle qu'elle doit être complétée par d'autres méthodes pour obtenir des informations quantitatives comparables en ce qui concerne la croissance cellulaire. Pour compléter la caractérisation de la biomasse produite, les premiers résultats de marquage des coccolithes par la calcéine semblent prometteurs. En effet, après ajustement des paramètres de l'analyse, il serait ainsi possible de connaître la quantité de coccolithes produits durant la culture et le niveau de calcification des cellules.

Références bibliographiques

- Aveiro, Susana S., Tânia Melo, Ana Figueiredo, Pedro Domingues, Hugo Pereira, Inês B. Maia, Joana Silva, M. Rosário Domingues, Cláudia Nunes, et Ana S. P. Moreira. 2020. « The Polar Lipidome of Cultured *Emiliana Huxleyi*: A Source of Bioactive Lipids with Relevance for Biotechnological Applications ». *Biomolecules* 10 (10): 1434. <https://doi.org/10.3390/biom10101434>.
- Bach, Lennart T., Luke C. M. Mackinder, Kai G. Schulz, Glen Wheeler, Declan C. Schroeder, Colin Brownlee, et Ulf Riebesell. 2013. « Dissecting the Impact of CO₂ and pH on the Mechanisms of Photosynthesis and Calcification in the Coccolithophore *Emiliana Huxleyi* ». *New Phytologist* 199 (1): 121-34. <https://doi.org/10.1111/nph.12225>.
- Berges, John A., Daniel J. Franklin, et Paul J. Harrison. 2001. « Evolution of an Artificial Seawater Medium: Improvements in Enriched Seawater, Artificial Water Over the Last Two Decades ». *Journal of Phycology* 37 (6): 1138-45. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01052.x>.

- Billard, Chantal, et Isao Inouye. 2004. « What Is New in Coccolithophore Biology? » In *Coccolithophores*, édité par Hans R. Thierstein et Jeremy R. Young, 1-29. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4_1.
- Brown, Christopher W., et James A. Yoder. 1994. « Coccolithophorid Blooms in the Global Ocean ». *Journal of Geophysical Research: Oceans* 99 (C4): 7467-82. <https://doi.org/10.1029/93JC02156>.
- Cogne, G., Ch. Lasseur, J.-F. Cornet, C.-G. Dussap, et J.-B. Gros. 2001. « Growth Monitoring of a Photosynthetic Micro-Organism (*Spirulina Platensis*) by Pressure Measurement ». *Biotechnology Letters* 23 (16): 1309-14. <https://doi.org/10.1023/A:1010521406607>.
- Cogne, Guillaume, Jean-François Cornet, et Jean-Bernard Gros. 2005. « Design, Operation, and Modeling of a Membrane Photobioreactor to Study the Growth of the Cyanobacterium *Arthrospira Platensis* in Space Conditions ». *Biotechnology Progress* 21 (3): 741-50. <https://doi.org/10.1021/bp0495926>.
- Eikrem, Wenche, Linda Medlin, Jorijntje Henderiks, Sebastian Rokitta, Björn Rost, Ian Probert, Jahn Thronsdén, et Bente Edvardsen. 2017. « Haptophyta ». In *Handbook of the Protists: Second Edition*, 893-953. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_38.
- Fox, Emily, Erin Meyer, Natalie Panasiak, et Alison R. Taylor. 2018. « Calcein Staining as a Tool to Investigate Coccolithophore Calcification ». *Frontiers in Marine Science* 5 (septembre):326. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00326>.
- Jakob, I., F. Weggenmann, et C. Posten. 2018. « Cultivation of *Emiliana Huxleyi* for Coccolith Production ». *Algal Research* 31 (avril):47-59. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.013>.
- Keller, Maureen D., Rhonda C. Selvin, Wolfgang Claus, et Robert R. L. Guillard. 1987. « Media for the Culture of Oceanic Ultraphytoplankton_{1,2} ». *Journal of Phycology* 23 (4): 633-38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04217.x>.
- Moheimani, Navid R., Andreas Isdepsky, Jan Lisec, Eric Raes, et Michael A. Borowitzka. 2011. « Coccolithophorid Algae Culture in Closed Photobioreactors ». *Biotechnology and Bioengineering* 108 (9): 2078-87. <https://doi.org/10.1002/bit.23161>.
- Moheimani, Navid Reza. 2005. « THE CULTURE OF COCCOLITHOPHORID ALGAE FOR CARBON DIOXIDE BIOREMEDIATION ». Murdoch University.
- Moheimani, Navid Reza, et Michael A. Borowitzka. 2006. « The Long-Term Culture of the Coccolithophore *Pleurochrysis Carterae* (Haptophyta) in Outdoor Raceway Ponds ». *Journal of Applied Phycology* 18 (6): 703-12. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9075-1>.
- Moheimani, N.R., J.P. Webb, et M.A. Borowitzka. 2012. « Bioremediation and Other Potential Applications of Coccolithophorid Algae: A Review ». *Algal Research* 1 (2): 120-33. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.06.002>.
- Monteiro, Fanny M., Lennart T. Bach, Colin Brownlee, Paul Bown, Rosalind E. M. Rickaby, Alex J. Poulton, Toby Tyrrell, et al. 2016. « Why Marine Phytoplankton Calcify ». *Science Advances* 2 (7): e1501822. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501822>.
- Paasche, E. 1998. « Roles of Nitrogen and Phosphorus in Coccolith Formation in *Emiliana Huxleyi* (Prymnesiophyceae) ». *European Journal of Phycology* 33 (1): 33-42. <https://doi.org/10.1080/09670269810001736513>.
- . 2001. « A Review of the Coccolithophorid *Emiliana Huxleyi* (Prymnesiophyceae), with Particular Reference to Growth, Coccolith Formation, and Calcification-Photosynthesis Interactions ». *Phycologia* 40 (6): 503-29. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-6-503.1>.
- Probert, Ian, et Aude Houdan. 2004. « The Laboratory Culture of Coccolithophores ». In *Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact*, édité par Hans R. Thierstein et Jeremy R. Young, 217-49. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4_9.
- Raven, John. 1997. « Putting the C in Phycology ». *European Journal of Phycology* 32 (4): 319-33. <https://doi.org/10.1080/09670269710001737259>.
- Skeffington, Alastair W, et André Scheffel. 2018. « Exploiting Algal Mineralization for Nanotechnology: Bringing Coccoliths to the Fore ». *Current Opinion in Biotechnology* 49 (février):57-63. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.013>.
- Takano, H., R. Takei, E. Manabe, J. G. Burgess, M. Hirano, et T. Matsunaga. 1995. « Increased Coccolith Production by *Emiliana Huxleyi* Cultures Enriched with Dissolved Inorganic Carbon ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 43 (3): 460-65. <https://doi.org/10.1007/BF00218449>.
- Takano, Hiroyuki, Jaekuk Jeon, J. Grant Burgess, Eichi Manabe, Yoshito Izumi, Megumi Okazaki, et Tadashi Matsunaga. 1994. « Continuous Production of Extracellular Ultrafine Calcite Particles by the Marine Coccolithophorid Alga *Pleurochrysis Carterae* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 40 (6): 946-50. <https://doi.org/10.1007/BF00174004>.

- Tobias Rubner, Ioanna Hariskos. 2015. « Investigation of Cell Growth and Chlorophyll a Content of the Coccolithophorid Alga *Emiliana Huxleyi* by Using Simple Bench-Top Flow Cytometry ». *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 05 (06). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000234>.
- Wang, Xiao, Xiangxin Kong, Qian Liu, Kun Li, Zaixing Jiang, Hengjun Gai, et Meng Xiao. 2023. « Effect of Clay Minerals on Carbonate Precipitation Induced by *Cyanobacterium Synechococcus* sp. » *Microbiology Spectrum* 11 (3): e00363-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00363-23>.
- Winter A. 1994. « Biogeography of living coccolithophores in ocean waters ». *Coccolithophores*, 161-77.
- Young, J. R. 1994. « Function of coccoliths ». *Coccolithophores*, 63-82.
- Young, Jeremy R, Markus Geisen, Lluisa Cros, Annelies Kleijne, Claudia Sprengel, et Ian Probert. 2003. « A GUIDE TO EXTANT COCCOLITHOPHORE TAXONOMY ». *Journal of Nannoplankton Research* Special Issue 1.