

Parcours Interdisciplinaire en Biologie Licence 3 – 2017/2018

Stage du 11 Juin 2018 au 3 Août 2018

*La crise de biocalcification du passage Crétacé-Paléogène
(« Back to the Futur »)*

*Effectué au Centre de recherche sur la paléobiodiversité et les paléoenvironnements (CR2P), UMR 7207
Bâtiment 46/56, 5^e étage,
Université Pierre et Marie Curie, Paris V^e*



Responsable : Silvia GARDIN

Co-Encadrante : Diana RUIZ PINO (Laboratoire LOCEAN, Sorbonne Université)

Remerciements

Ce stage a été réalisé sous la direction de Silvia GARDIN, avec l'aide précieuse de Diana RUIZ PINO, que je remercie pour ses conseils et sa supervision. Je tiens également à remercier Berengère BROCHE pour les explications sur sa thèse et sa méthode ainsi que Hengyi BAI pour sa collaboration et le partage des données chimiques en lien avec les expériences. Enfin, ce stage a été grandement facilité par Dominique GOMMERY pour l'accès matinal au laboratoire et Frank SENEGAS, pour le soutien technique lors de l'utilisation du MEB.

Table des matières

I.	Introduction	1
II.	Matériel & Méthodes	4
2.1.	Matériel	4
2.1.1.	Culture des échantillons étudiés	4
2.1.2.	Microscope Electronique à Balayage pour la prise de vue.....	5
2.2.	Méthodes	5
2.2.1.	Répétabilité des mesures	5
2.2.2.	Stabilité des moyennes d'un échantillon en fonction des spécimens échantillonnés	6
2.2.3.	Répliquabilité en conditions différentes.....	6
III.	Résultats	8
3.1.	Variations des paramètres morphologiques observés et calculés en fonction du rapport [Mg]/[Ca] et de [SO ₄].....	8
3.1.1.	Paramètres morphologiques mesurés	8
3.1.2.	Paramètres morphologiques calculés	9
3.2.	Corrélations et couplages entre les paramètres morphologiques.....	11
3.3.	Corrélations avec les paramètres calculés à partir de l'eau de culture : taux de calcification, taux de croissance, pH et salinité	13
IV.	Discussion	14
4.1.	Une meilleure calcification et croissance au Crétacé ?.....	14
4.2.	Le Soufre, toxique pour <i>E. hux</i> ?.....	15
4.3.	Rôle du rapport [Mg]/[Ca] et de [Ca]	16
4.4.	Interpolation à partir des sédiments.....	16
V.	Conclusions et Perspectives	18
	Bibliographie	20

Liste des abréviations

EMA : Eau de Mer Artificielle

SFH : Sulfate Facilitation Hypothesis

MEB : Microscope Electronique à Balayage

Crise K/T : Crise du Crétacé/Tertiaire ou Crétacé/Paléogène (≈-66 Millions d'années)

[SO4] (mM) Mg Ca (mM)	5	17	28.8	90	120
Actuel : [Mg] = 54.2 [Ca] = 10.5	S5	S	A		
Crétacé 1 (K1) : [Mg] = 25 [Ca] = 25	K1S5	K1	MC1	K1S90	
Crétacé 3 (K3) : [Mg] = 10.5 [Ca] = 10.5	K3S5	K3	MC3	K3S90	K3S120

Tableau récapitulatif des conditions expérimentales, avec les abréviations correspondantes.

Pour les deux duplicatas, on utilisera **NOM_D1** et **NOM_D2**

Abréviations utilisées pour les mesures des Coccolithes et schémas récapitulatifs :

CAA : Central Area Area $CAA = CAL \times CAW$

CAL : Central Area Length

CAR : Central Area Roundness $CAR = \frac{CAW}{CAL} \times 100$

CAW : Central Area Width

DA : Distal shield Area $DA = DL \times DW$

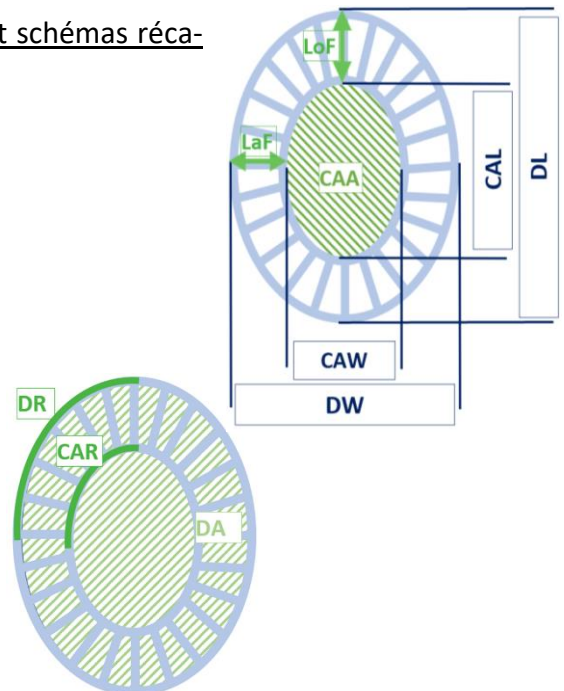
DL : Distal shield Length

DR : Distal shield Roundness

DW : Distal shield Width

LaF : Largeur de Frange $\frac{DW - CAW}{2}$

LoF : Longueur de Frange $\frac{DL - CAL}{2}$



Abréviations pour les paramètres non-morphologiques :

μ : Taux de croissance

pH : potentiel Hydrogène

Activités de recherche du laboratoire d'accueil

Le **CR2P (Centre de Recherche sur la Paléobiodiversité et les Paléoenvironnements)** est un laboratoire sous trois tutelles : le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Sorbonne Université et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Il comporte 5 laboratoires différents et est formé de 3 équipes :

- L'équipe « **HDV** » (**Histoire du vivant**), qui s'intéresse à l'origine et l'histoire des Vertébrés, ainsi qu'à la diversification taxonomique des Métazoaires, notamment grâce au développement de nouvelles méthodes de datation.
- L'équipe « **2F** » (**Formes et Fonctions**), qui étudie la locomotion, la perception de l'environnement et l'appropriation du milieu terrestre ou aquatique par les vertébrés.
- L'équipe « **PACE** » (**Paléoécosystèmes : Analyse, Compréhension, Evolution**), sous la responsabilité de Silvia GARDIN, qui encadre ce stage. C'est donc le travail de cette équipe qui va être développé ici.

L'équipe **PACE** s'intéresse aux interactions entre biosphère et environnements, aussi bien par la rétroaction des organismes sur leur environnement que leur adaptation à ceux-ci, notamment en cas de crise majeure comme celle du Crétacé-Paléogène (crise K-Pg). En effet, comprendre **comment la biosphère a contribué et réagi aux changements environnementaux passés**, lointains ou récents, permet de mieux appréhender les questions autour du changement climatique actuel. Pour répondre à cette problématique, l'équipe s'articule autour de 3 projets :

- **EPICE** : Ecosystèmes et Paléoclimats, interactions et couplages, qui étudie les couplages entre l'évolution de la vie et du climat, à différentes échelles spatiales et temporelles, les variations haute fréquence étant une partie importante du projet. Ce projet se déploie surtout autour des environnements continentaux.
- **BIOCRI** : Signature Biotique des intervalles critiques. Ce projet s'intéresse aux intervalles passés qui ont été marqués par une forte variation de la biodiversité (extinction, radiation évolutive), en essayant de comprendre les conditions environnementales et les stratégies adaptatives face à celles-ci, ainsi que l'initiation et la fin de ces phases.
- **PALEX** : Paléobiodiversité, aspects exceptionnels et cryptiques, qui cherche des hotspots de paléobiodiversité et de conservation, à l'échelle régionale ou locale dans le but de comprendre les conditions de mise en place de ces hotspots et de mieux estimer les diversités fossiles ignorées, comme le paléoparasitisme ou les organismes précambriens.

I. Introduction

Depuis sa découverte, la **crise Crétacé/Paléogène** (crise K/T, ≈-66 Millions d'années) fascine par son ampleur et ses impacts considérables sur la biodiversité : il s'agit de la dernière crise d'extinction biologique majeure du Phanérozoïque, qui a vu notamment l'extinction des Dinosaures, laissant la place à l'essor des Mammifères. Elle est aussi caractérisée par une crise de biocalcification sans précédent des protistes dans les océans, dont **les coccolithophoridés calcifiants** : alors qu'ils étaient tellement abondants qu'ils avaient donné son nom au Crétacé, par l'abondance de craie (*creta* en latin) produite, cette crise marque une **diminution drastique de leur abondance et richesse spécifique dans les enregistrements sédimentaires, couplée à une diminution de leur taille** (GARTNER 1996).

Les causes de cette crise sont encore débattues. Elle est contemporaine de la chute d'un astéroïde sur une plateforme carbonatée au Yucatan, composée de gypse et donc riche en sulfates (HILDEBRAND, et al. 1991), mais aussi d'une éruption sans équivalent au cours des 200 derniers millions d'années : les trapps du Deccan, qui rejettent en moins de 500 000 ans pas moins de 2 millions de km³ de lave (COURTILLOT 1990), accompagnée de rejets phénoménaux de gaz, notamment de soufre sous forme de SO₂.

Si l'impact du CO₂ sur le climat et sur les coccolithophoridés a été largement étudié (BACH, et al. 2012 *cum biblio*), celui du soufre reste encore largement inconnu. Pourtant, la **quantité non négligeable de soufre rejetée durant l'événement** (de 0.11 à 0.95 Gt/an, pour un total de 1700Gt sur la durée de l'événement (CHENET, et al. 2009), une quantité astronomique quand on la compare aux 0.3 Gt de l'atmosphère actuelle), mais aussi d'autres métaux lourds, a pu avoir des impacts majeurs sur la vie, soit via l'acidification des océans, soit via une interférence directe avec le métabolisme ou la **biocalcification des coccolithophoridés**, d'autant plus qu'il a été montré que ceux-ci sont très sensibles aux variations des paramètres chimiques de l'eau de mer (salinité (BOLLMANN, et al. 2009), pH (BACH, et al. 2012), rapport [Mg]/[Ca] (STANLEY, et al. 2005), ...). Par ailleurs, ce problème est aussi actuel : les rejets de soufre anthropiques depuis la révolution industrielle sont inquiétants (115.507 Mt de SO₂ au niveau mondial en 2005 (SMITH, et al. 2011)) et leurs conséquences pourraient approcher celles du volcanisme du Deccan et de la météorite du Yucatan. **Il est donc essentiel de comprendre le passé pour en saisir les mécanismes et les paramètres impliqués, afin de remettre en perspective les questions actuelles, à l'heure de l'anthropocène et de la 6^e extinction de masse.**

Si l'effet du soufre sur les coccolithophoridés a été jusqu'à présent peu ou pas étudié dans la littérature scientifique, une **thèse pionnière, soutenue par Bérengère BROCHE** en 2018 (BROCHE 2018) a permis une première approche de ce problème, via la croissance en Eau de Mer Artificielle (EMA), du coccolithophoridé *Emiliana huxleyi* (*E. hux*) à **des concentrations de SO₄ allant de l'actuelle (28.8mM) à 180 mM (expérience EMA-COCCO-1)**. Cette thèse a montré que si *E. hux* est très résiliente, voire favorisée, par une augmentation de soufre (sous la forme de SO₄) par rapport à la concentration actuelle (x2 à x3), elle subit au-delà d'un seuil de 120mM une **diminution drastique de la biomasse carbonatée ainsi qu'un ralentissement, voir une inhibition de la biocalcification**. Une telle concentration pourrait être atteinte localement par des apports brusques (volcanisme massif, impact de météoritique) et/ou de faible répartition spatiale (pollution locale).

Cette étude s'inscrit dans la continuité de cette thèse grâce à l'analyse de 13 échantillons de colonies d'*E. hux* ayant été cultivés dans les mêmes conditions expérimentales que EMA-COCCO-1, dans des milieux à [SO₄] variable, dans le but de simuler indirectement les effets possibles d'un dégazage de soufre tel que celui des trapps du Deccan il y a environ 66 millions d'années, avec un rapport [Mg]/[Ca] et une concentration de Ca reproduisant les conditions actuelles (**Act, avec [Mg]=54.2mM et [Ca]=10.5mM**), ou celles supposées du Crétacé selon deux hypothèses : **K1** (STANLEY & HARDIE, 1998) **avec [Ca]=25mM et [Mg]/[Ca]=1** et **K3 avec [Ca]=10.5 mM et [Mg]/[Ca]=1** (rapport de 1 comme K1 mais avec la concentration en Ca de l'Act, pour distinguer l'effet du rapport [Mg]/[Ca] et de [Ca] ; BROCHE 2018). En effet, il a été montré que le rapport [Mg]/[Ca] et la concentration absolue en Calcium ont un impact majeur sur la biocalcification des organismes (STANLEY, et al. 2005). Selon les conditions, est favorisée soit la production de low-Mg Calcite (avec moins de 4% de Mg), soit celle de high-Mg Calcite (plus de 4% de soufre), soit celle d'Aragonite. Le Phanérozoïque a ainsi vu se succéder 3 mers dites « à Aragonite », entrecoupées de 2 mers « à Calcite ». Les conditions de [Mg] et de [Ca] sont donc essentielles à l'étude de l'impact du soufre rejeté par le volcanisme du Deccan.

Cette étude sur les **variations morphologiques des coccolithophoridés lors d'une reproduction en laboratoire des possibles effets du dégazage en soufre de la crise K/T** est couplée à une **étude chimique** de nombreux paramètres des eaux de culture (PIC, POC, pH, Salinité, taux de calcification, ...), avant l'introduction d'*E. hux* dans le milieu et après la fin de leur phase de croissance, menée par Hengyi BAI dans le cadre d'un stage de Master 2 encadré par D. RUIZ (LOCEAN). Du fait de la complémentarité de deux approches, certains de ses résultats seront utilisés ici, et l'expérience

EMA-COCCO-2, supervisée de concert par Silvia Gardin et Diana RUIZ PINO, les regroupe. Les questions étudiées ci-après sont donc les suivantes :

- **Existe-t-il un changement de morphologie des coccosphères et coccolithes selon les conditions de $[SO_4]$, mais aussi de $[Mg]$ et $[Ca]$?**
- **Si oui, quels sont les paramètres qui varient et leurs relations varient-elles également ?**
- **Peut-on associer ces éventuels changements à des variations du milieu de culture détectables chimiquement ?**

II. Matériel & Méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Culture des échantillons étudiés

Les coccolithophoridés étudiés, de l'espèce *Emiliana huxleyi* (*E. hux*), ont été cultivés dans de l'**eau de mer artificielle (EMA)**, fabriquée selon le protocole détaillé dans le Chapitre 1 de la thèse de Bérengère BROCHE, *L'impact du Soufre sur le biocalcifiant Emiliana huxleyi (Prymnesiophyceae)*, 2018. Les différentes EMA représentent pour les concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} les conditions actuelles (Act) ou deux conditions supposées du Crétacé (K1 et K3), avec des concentrations **en SO_4 croissantes (de 5 à 120 mM)**. Le détail des échantillons avec les noms correspondants est fourni dans la liste des abréviations. Les autres paramètres chimiques (tels que pH, salinité, DIC, PIC, POC, etc.) sont mesurés tout au long de l'expérience, pour s'assurer de leur constance, et étudier leur co-variabilité avec les paramètres morphologiques. En particulier, le pH et la salinité sont connus pour avoir une forte influence sur la morphologie des coccolithes et le pouvoir de calcification des coccolithophoridés (BACH, et al. 2012). Il est donc important de s'assurer de leur faible variation au cours et entre les expériences, de façon à mettre en évidence la seule action du SO_4 .

Les clones d'*E. hux* employés sont issus de la souche RCC 963 d'*E. hux*, âgée de 15 ans et isolée à partir d'une cellule ayant vécu dans la gyre anticyclonique et oligotrophique de l'océan Pacifique Sud Estsouche. Les expériences ont été réalisées précédemment (BROCHE 2018) et les coc-

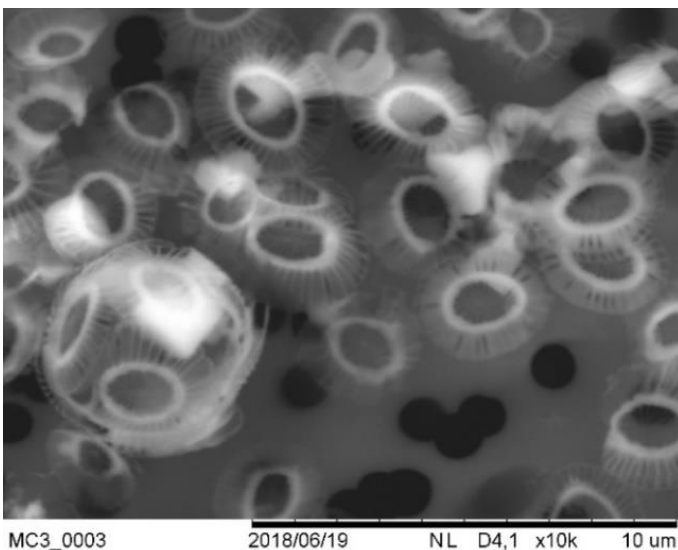


FIGURE N°1 : Exemple de cliché de l'échantillon MC3_D2, pris à l'aide du MEB du CR2P à un grossissement x10 000

cosphères et coccolithes en résultant ont été conservés sur les filtres à $1\mu\text{m}$ qui ont servi à leur extraction du milieu de culture. Ce qui nous intéresse ici n'est pas la réaction à une augmentation ou diminution progressive de $[\text{SO}_4]$ mais bien la **réponse morphologique d'*E. hux* à une condition donnée de $[\text{Ca}]$, $[\text{Mg}]$, $[\text{Mg}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{SO}_4]$** , c'est pourquoi les expériences à proprement parler ont été précédées d'une **période d'acclimatation** aux conditions de laboratoires et aux conditions

de [SO₄]. On choisit *E. hux* car sa culture en laboratoire est aisée et c'est le coccolithophoridé actuellement le plus abondant sur Terre, il représente donc plutôt bien l'impact de ce genre sur l'écosystème en général. Par ailleurs, il est le plus étudié en laboratoire, c'est donc un point de départ cohérent pour cette étude.

2.1.2. Microscope Electronique à Balayage pour la prise de vue

Pour étudier la morphologie d'*E. hux*, les échantillons sont pris en photographie **au Microscope Electronique à Balayage (MEB)** du CR2P, avec un grossissement variant de x6000 à x12000 (majoritairement x10000). Une tentative sera effectuée avec le MEB de l'Institut des Sciences de la Terre de Paris (ISTeP), plus performant, mais ces clichés ne seront pas exploités dans cette étude (voir partie Méthode). Les mesures sont ensuite faites à l'aide du logiciel ImageJ, grâce à l'échelle enregistrée par le MEB avec l'image lors de la prise de vue.

2.2. Méthodes

Pour chaque échantillon, **on mesure 200 coccosphères (à raison de 3 diamètres mesurés par coccosphère pour obtenir le diamètre moyen) et 80 coccolithes (à raison de 4 mesures par coccolithes, voir Figure n°2 (BOLLMANN, et al. 2009).**

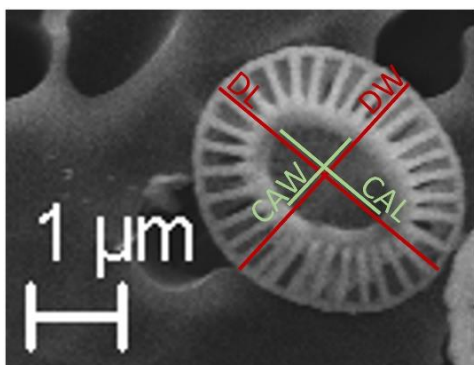


FIGURE N°2 : Photographie d'un coccolithe de l'échantillon K1S90_D1, prise avec le MEB de l'ISTeP, indiquant les mesures prises sur un coccolithe

Plusieurs expériences ont été entreprises pour vérifier la fiabilité de ces mesures. En effet, les photographies peuvent s'avérer floues et les mesures sont faites sur un logiciel, mais c'est une personne qui décide de la longueur à mesurer, il y a donc toujours une certaine incertitude due à l'erreur humaine

2.2.1. Répétabilité des mesures

Tout d'abord fut testée **la répétabilité** des mesures (reproduction exacte, avec même matériel et même expérimentateur), sur un échantillon (K1S90_D1) avec le même set de photographies :

elles ont été mesurées trois fois. Les résultats sont visibles sur la figure n°3 (points J_J_1, J_J_2 et J_J_3, en bleu), où l'on présente les mesures pour le diamètre des coccosphères. Les résultats pour les autres éléments mesurés (CAW, CAL, DW et DL), sont disponibles en Annexe (page n°1). Pour les tests statistiques suivants, on a tout d'abord vérifié la distribution normale des échantillons (test de Shapiro-Wilk, avec correction de Bonferroni pour l'écueil du test multiple) : on remarque que l'échantillon H_J_2 ne suit pas une loi normale, probablement dû à un problème lors de la prise de mesure, on l'exclut donc de l'étude suivante. Un test d'ANOVA, en supposant l'homoscédasticité, permet de conclure à **l'absence de différence significative entre ces réplicats de mesures.**

2.2.2. Stabilité des moyennes d'un échantillon en fonction des spécimens échantillonnés

Ensuite fut testée **la stabilité des résultats à travers plusieurs sets de photographies issus du même échantillon.** Comme on peut le voir sur le graphique, les 2 réplicas de mesures effectués sur ces photographies différentes (J_H_1 et J_H_2, en cyan) sont très proches des résultats sur les premières photographies : les barres d'erreur se chevauchent largement. Un ANOVA avec ces 5 jeux de mesures conclut à l'absence de différence significative. Le 2^e set de photographies ayant été réalisé par un autre expérimentateur, on en déduit **que le choix de l'expérimentateur pour les prises de vues n'influence pas le résultat,** et que le **nombre de mesures est suffisant pour être représentatif de l'échantillon** (les spécimens étant pris en photographie par chacun des expérimentateurs n'étant pas identiques)

2.2.3. Réplicabilité en conditions différentes

Pour tester la **réplicabilité** des mesures, on les reproduit avec dans un premier temps un matériel différent et dans un second temps un expérimentateur différent.

a. Modification du matériel

Le MEB du CR2P ayant été dysfonctionnel une semaine, l'utilisation d'un **autre MEB, celui de l'ISTeP,** d'une qualité nettement supérieure, a été testée (point ISTeP, en brun). J'ai réalisé moi-même les photographies et les mesures, le seul changement et donc celui du microscope, mais dès que ce jeu de mesures est ajouté aux 5 autres, le test d'ANOVA conclut à une différence significative. Ces photographies ne seront donc pas exploitées dans la partie Résultats, et aucun autre échantillon ne sera pris en photographie avec ce MEB. On en déduit que **les mesures faites ne donnent pas des**

valeurs absolues et réelles de la moyenne, mais elles permettent de comparer des échantillons entre eux, étant donné la faible variabilité intra-échantillon.

b. Modification de l'expérimentateur

Dans le but de réaliser plus rapidement l'ensemble des mesures, et de pouvoir faire les duplicatas de chaque échantillon, on teste s'il existe un fort biais dû à l'expérimentateur lors de la prise de mesure. Comme on peut le voir sur le graphique, les points de l'autre expérimentateur (H_J_1, H_J_2, H_H_1, H_H_2, H_H_3, en vert) (Hengyi Bai), sont éloignés des mesures prises premièrement, que ce soit pour l'un ou l'autre des sets de photographies (2 premiers points sur mes photographies, 3 suivants sur les siennes). Par ailleurs, un test ANOVA sur ses 4 jeux de mesures (H_J_2 exclut) révèle **des différences significatives** entre ces mesures, sans même prendre en compte les différences avec les points J. **J'ai donc réalisé seule l'ensemble des mesures utilisées pour l'exploitation, dans le but de minimiser les biais.**

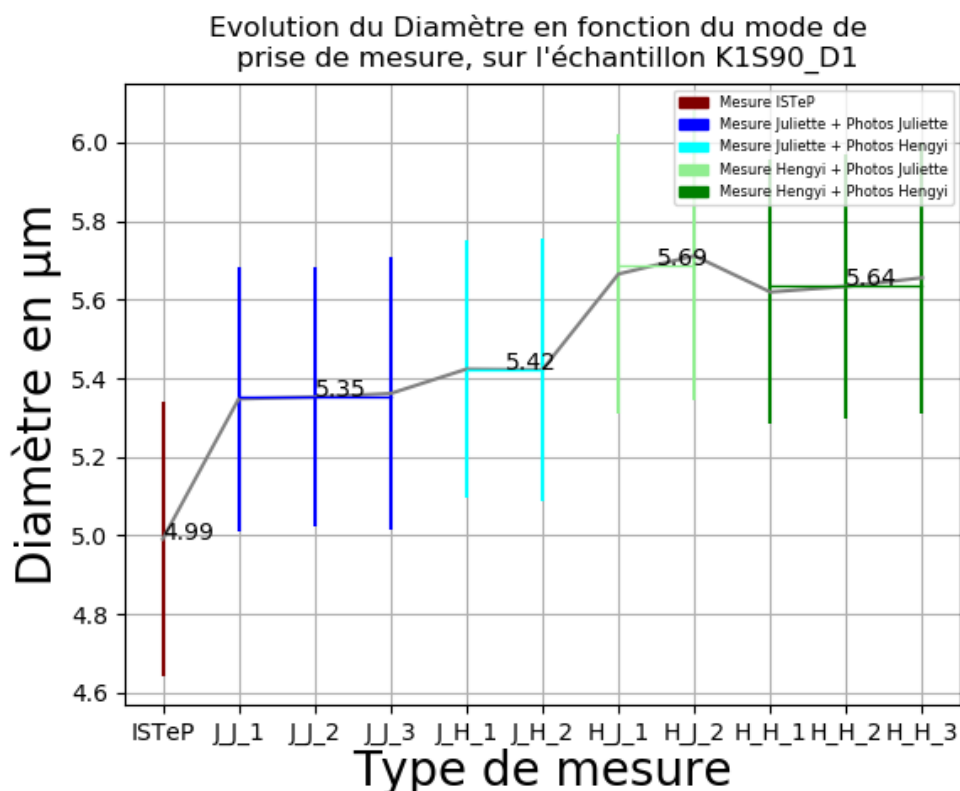


FIGURE N°3 : Variation de la valeur moyenne du diamètre des coccosphères (en µm) pour l'échantillon K1S90_D2, en fonction du type de mesure effectué

III. Résultats

Les résultats ci-dessous regroupent les mesures d'EMA-COCCO-2 (découpées en 3 catégories : Act, K1 et K3), ainsi que les mesures d'EMA-COCCO-1 (en violet), issues de la thèse de Bérengère BROCHE (2018). L'expérimentateur étant différent, la comparaison des mesures n'est pas évidente, mais on supposera ici que la tendance de la courbe EMA-COCCO-1 (et non ses valeurs) peut être exploitée.

3.1. Variations des paramètres morphologiques observés et calculés en fonction du rapport [Mg]/[Ca] et de [SO₄]

3.1.1. Paramètres morphologiques mesurés

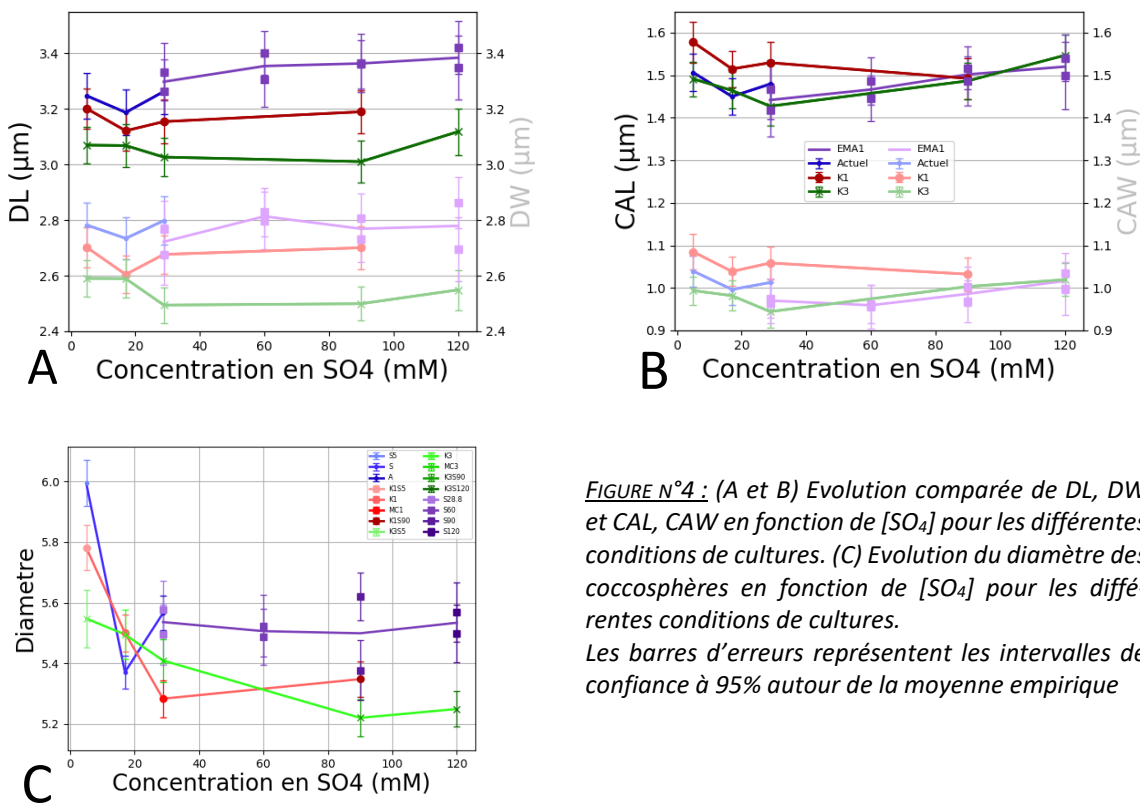


FIGURE N°4 : (A et B) Evolution comparée de DL, DW et CAL, CAW en fonction de [SO₄] pour les différentes conditions de cultures. (C) Evolution du diamètre des coccosphères en fonction de [SO₄] pour les différentes conditions de cultures.

Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95% autour de la moyenne empirique

On observe une **évolution parallèle** des conditions Act, K1 et K3, en particulier pour les mesures faites sur les coccolithes (CAL, CAW, DL et DW), avec pour chaque paramètre une baisse suivie d'une augmentation de la taille. Le minimum de la courbe est atteint pour [SO₄]=17mM pour Act et K1, tandis qu'il est atteint à une concentration plus importante de SO₄ pour K3. Par ailleurs, pour la grande majorité des conditions de soufre et des paramètres, les **valeurs mesurées sur K3 sont les plus basses**.

Compte tenu des conditions différentes d'observation pour EMA-COCCO-1, il est difficile de tirer des conclusions de ces résultats, mais on remarque que **la mesure EMA-COCCO-2 effectuée dans les conditions de salinité et [SO₄] actuelles (28.8mM, Act) est toujours plus proche des mesures correspondantes d'EMA-COCCO-1 (S28.8) que des mesures de K1 et K3 à la même valeur de [SO₄],** une certaine cohérence entre les 2 expériences se dégage donc.

L'évolution des diamètres de coccosphère semble moins définie, mais la tendance générale est à **une baisse suivie d'une réaugmentation avec l'augmentation de [SO₄], les valeurs maximales initiales n'étant pour chaque condition jamais réatteintes par la suite.**

Ces paramètres directement mesurés n'étant pas nécessairement les plus parlants, on calcule à partir de ceux-ci un certain nombre de paramètres morphologiques.

3.1.2. Paramètres morphologiques calculés

Pour mieux appréhender la morphologie des coccolithes mesurés, on utilise différents indices, déjà proposés par des travaux antérieurs : **CAR, DR, LaF, LoF, CAA et DA** (BROCHE 2018). Par ailleurs, on s'intéresse ici également à la **surface calcifiée** (définie comme DA-CAA), qui permet d'appréhender la quantité de calcite composant chaque coccolithe (bien que la densité ne soit pas ici prise en compte faute d'appareil adéquat et de temps pour la mesurer), et on définit un **indice de malformation** pour chaque échantillon :

$$Malf = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{DA}{CAA} - m_{\frac{DA}{CAA}} \right)^2 \left(\frac{DR}{CAR} - m_{\frac{DR}{CAR}} \right)^2}{n}$$

avec m la moyenne empirique de l'échantillon pour lequel on calcule l'indice.

Cet indice permet de refléter plusieurs choses : un coccolithe ayant une grande DA pour faible CAA, ou l'inverse, présente une morphologie anormale, de même qu'un coccolithe présentant un *distal shield* presque rond, alors que la *central area* ne l'est pas. À chaque fois, on s'intéresse à l'écart à la moyenne de l'échantillon pour observer une forte **dispersion** (les anomalies étant le plus souvent ponctuelles), et pour éviter des biais car la valeur exacte de ces rapports pour un coccolithe « parfait » est inconnue, et parce que davantage de mesures sont disponibles pour K3 que pour K1 ou Act : la moyenne serait donc tirée par les valeurs de K3, ce qui diminuerait sa Malformation tout en augmentant celle de K1 et Act. Ces résultats sont présentés à la figure n°5.

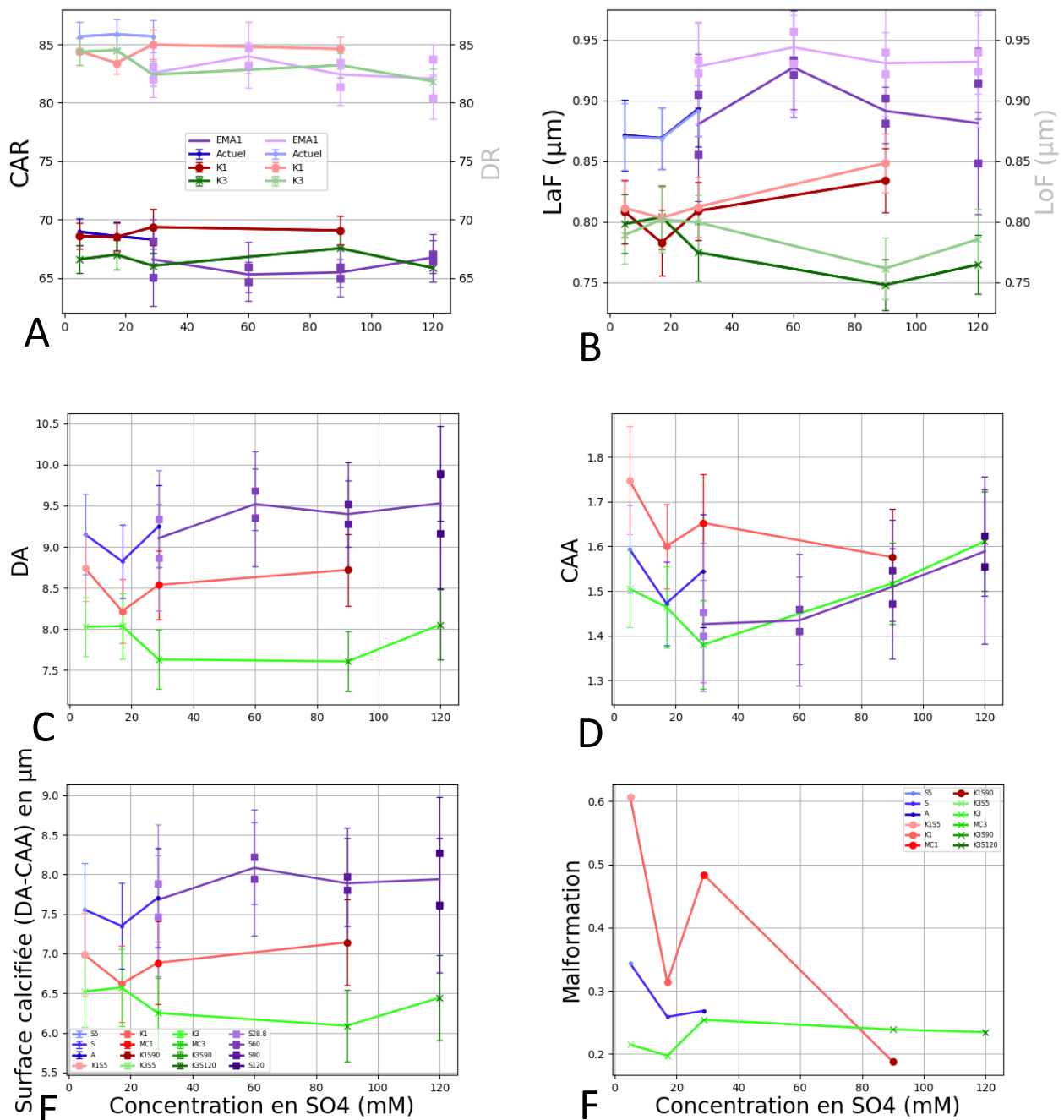


FIGURE N°5 : (A et B) Evolution comparée de CAR, DR et LaF, LoF en fonction de $[SO_4]$ pour les différentes conditions de cultures. (C et D) Evolution de DA et CAA en fonction de $[SO_4]$ pour les différentes conditions de cultures. (E et F) Evolution de la surface calcifiée (DA-CAA) et de l'indice de malformation en fonction de $[SO_4]$ pour les différentes conditions de cultures.

Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95% autour de la moyenne empirique

De même que pour les paramètres mesurés directement sur l'échantillon, la **courbe de malformation de K3 se trouve systématiquement en-dessous des autres**, alors qu'on aurait pu s'attendre à ce que la petite taille des coccolithes soit associée à une certaine malformation. La faible taille n'est donc pas forcément associée à morphologie aberrante. La malformation n'est pas montrée pour EMA-COCCO-1 car, probablement dû à des méthodes de mesures différentes, les résultats

sont très éloignés de ce que l'on trouve pour Act, K1 et K3, ce qui rend impossible toute comparaison.

La Figure 5-B montre que **LaF et LoF sont très proches**, et mêmes confondus dans le cas Act. La tendance générale est, comme dans la partie précédente, une **baisse suivie d'une augmentation**. Cependant, cette augmentation peut permettre d'atteindre des valeurs plus hautes que le maximum initial (pour $[SO_4] = 5\text{mM}$), comme par exemple pour la surface calcifiée (5-E), un indicateur *a priori* plus précis que les paramètres observés directement. Le graphe de la surface calcifiée est néanmoins très proche de celui de DA, et l'influence de CAA, beaucoup plus faible que DA, est difficile à observer. Pour la suite, on suppose donc que DA est un bon indicateur de la surface calcifiée, car ne pas utiliser cet indice permet de limiter les calculs sur les données et donc la propagation d'incertitudes.

3.2. Corrélations et couplages entre les paramètres morphologiques

Parallèlement à l'évolution en fonction du soufre dans les différentes conditions de [Mg] et [Ca], il est intéressant d'observer de plus près les corrélations entre certains paramètres, pour en déduire des dépendances entre les paramètres morphologiques, qui ne sont pas toujours intuitives.

Pour cela, on effectue 2 tests de corrélations, le **test de Pearson et le test de Spearman**, pour toutes les variables indépendantes, afin de faire ressortir des corrélations ou absences de corrélations. En effet, si **CAW, CAL, DL et DW sont indépendants**, il est évident que CAA est indépendant de DL et DW mais pas de CAW et CAL. Ces indépendances sont résumées dans le Tableau n°1 de l'Annexe. Pour chacune des méthodes, on réalise 34 tests, soit un total de 68 tests. La p-value est donc corrigée en conséquence selon la méthode de Bonferroni et le seuil de significativité est défini à $\alpha = \frac{0,05}{68} = 0,00073$. Les Tableaux n°1 et 2 donnent respectivement les **coefficients de corrélation de Pearson et les p-value associées**, pour les variables indépendantes considérées. Les mêmes résultats pour le coefficient de corrélation de Spearman sont disponibles en Annexe : les couples de variables significativement corrélés pour Spearman sont exactement les mêmes que pour Pearson.

On peut observer sur la figure n°6 les graphes des corrélations (*on sélectionne les figures montrant des corrélations uniques : Diam étant corrélé à DL et DW, il est évidemment aussi corrélé à DA*), avec droites de régression linéaires par échantillon et pour l'ensemble des mesures. Cela permet de montrer que les 2 variables ne sont pas seulement corrélées entre elles, mais aussi aux conditions du milieu ([Ca], $[Mg]/[Ca]$ et $[SO_4]$).

	CAW	DL	DW	Diam	CAA	CAR	DA	DR	LaF	LoF
CAL	0.8808	0.3244	0.1758	0.2180			0.2287	-0.0990	-0.1610	
CAW		0.5920	0.5096	0.3268			0.5377	0.2837		0.1552
DL			0.9613	0.5325	0.5187	0.6855			0.8571	
DW				0.5532	0.3978	0.7491				0.9070
Diam					0.2903	0.2897	0.5483	0.4636	0.4989	0.4395
CAA							0.4412	0.1261		
CAR							0.7237	0.7230		
LaF										0.9746

TABLEAU N°1 :
Coefficient de corrélation de Pearson pour les variables indépendantes

TABLEAU N°2 :
p-value des tests de corrélation de Pearson

	CAW	DL	DW	Diam	CAA	CAR	DA	DR	LaF	LoF
CAL	1.54E-04	3.04E-01	5.85E-01	4.96E-01			4.75E-01	7.59E-01	6.17E-01	
CAW		4.26E-02	9.05E-02	3.00E-01			7.14E-02	3.72E-01		6.30E-01
DL			6.38E-07	7.47E-02	8.40E-02	1.39E-02			3.67E-04	
DW				6.21E-02	2.00E-01	5.04E-03				4.68E-05
Diam					3.60E-01	3.61E-01	6.49E-02	1.29E-01	9.87E-02	1.53E-01
CAA							1.51E-01	6.96E-01		
CAR							7.80E-03	7.88E-03		
LaF										8.03E-08

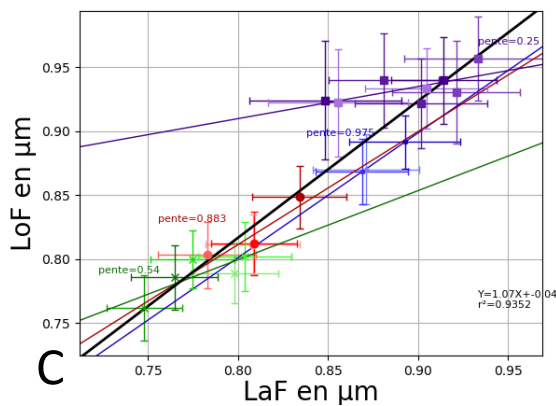
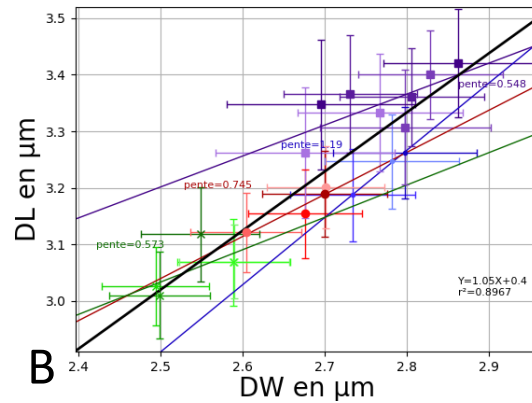
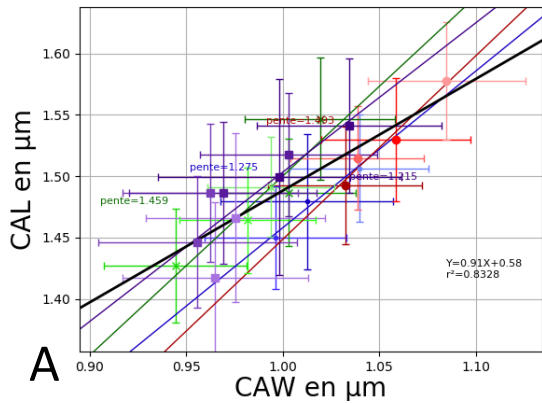


FIGURE N°6 : (A, B, C) Evolution de CAL (resp. DL, LoF), en fonction de CAW (resp. DW, LaF) pour les différentes conditions de cultures.

Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95% autour de la moyenne empirique

Les droites sont des droites de régression linéaire et *r* est le coefficient de corrélation de Pearson

On remarque que **CAR** et **DR** ne sont significativement corrélés à aucune autre variable, ce qui va à l'encontre des observations de précédents articles (BACH, et al. 2012).

LaF est également corrélé à DL et LoF à DW, ce qui est logique car LaF dépend de DW, qui est corrélé à DL. De même pour LoF.

Dans tous les graphiques de la figure n°6, on observe aussi **un regroupement des points par couleur, c'est-à-dire par type de condition [Ca] et [Mg]**.

3.3. Corrélations avec les paramètres calculés à partir de l'eau de culture : taux de calcification, taux de croissance, pH et salinité

On cherche à déterminer si les **variations morphologiques observées peuvent être causée par des variations des paramètres chimiques connus pour avoir une forte influence sur ceux-ci, tels que le pH et la salinité, et si elles sont corrélées à des variables biologiques mesurables comme le taux de calcification ou de croissance.** Ces données proviennent de communication personnelle de Hengyi BAI, dans le cadre d'un stage de Master 2 et sont disponibles en annexe.

Des tests de corrélation entre ces 4 paramètres mesurés à partir de l'eau de culture et les 5 paramètres morphologiques mesurés directement (CAL, CAW, DL, DW et Diamètre) révèlent une **absence totale de corrélation linéaire ou monotone entre ces types de paramètres** (voir Tableau des valeurs en annexe, on a comme limite de significativité $\alpha = \frac{0,05}{40} = 0,00125$ et toutes les *p-values* sont supérieures au double de cela). Par ailleurs, il est difficile de déterminer un possible autre type de relation à partir des graphes (voir en annexe).

On conclut donc à l'absence d'influence du pH ou de la salinité sur les variations morphologiques observées et à l'absence de corrélation avec le taux de calcification ou de croissance : le dynamisme biologique des populations n'est pas relié à leur morphologie. Le pH et la salinité ont été contrôlés tout au long de l'expérience justement pour que les éventuels résultats ne soient imputables que aux variations de la teneur en SO_4 et non aux variations de ces paramètres.

Si ces variables ne sont pas corrélées linéairement ou de manière monotone aux paramètres morphologiques, on note néanmoins qu'ils **varient en fonction de $[Mg]/[Ca]$, $[Ca]$ et $[SO_4]$, comme on peut le voir à la figure n°7, avec un comportement semblable du taux de calcification et de croissance pour K1, alors qu'ils sont en opposition pour Act et K3.**

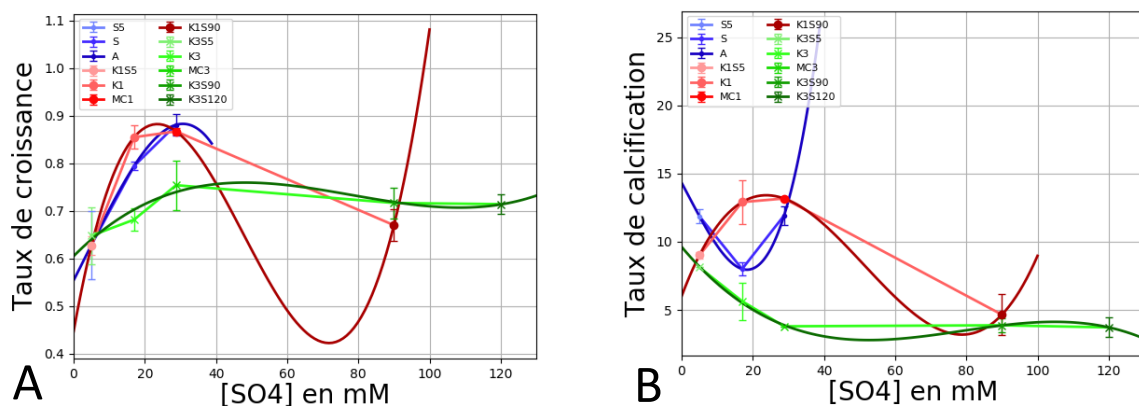


FIGURE N°7: (A, B) Evolution du taux de croissance (resp. taux de calcification), en fonction de $[SO_4]$ et des conditions de $[Mg]$ et $[Ca]$

Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95% autour de la moyenne empirique

Les droites correspondent aux régressions polynomiales de degré 3 (les résultats pour un degré plus élevé sont similaires)

IV. Discussion

4.1. Une meilleure calcification et croissance au Crétacé ?

Il a été montré dans une expérience précédente (STANLEY, et al. 2005) que 3 espèces de coccolithophoridés présentent **une croissance plus rapide dans l'eau de mer type Crétacé**, on s'attendait donc à **un taux de croissance plus élevé et à une meilleure calcification pour les conditions K1 et K3 par rapport à l'Actuel**. Or, si les taux de croissance pour K1 et Act sont quasiment similaires pour $[SO_4]$ allant de 5 à 28.8mM, on note que K3 reste, quoiqu'il arrive, largement en-dessous des résultats attendus. Les conditions du Crétacé ne sont donc pas aussi favorables que prévues pour *E. hux*, ce qui peut s'expliquer de différentes manières.

Tout d'abord, on ne connaît pas les concentrations de soufre tout au long du Crétacé, mais on sait que les concentrations en SO_4 au Crétacé supérieur étaient bien inférieures aux concentrations actuelles (ALGEO, et al. 2015). Les expériences précédentes ayant été menées avec le taux de soufre actuel, les résultats ne sont pas nécessairement extrapolables à tout le spectre possible de $[SO_4]$. Ensuite, *E. hux* n'est pas un coccolithophoridé ordinaire, mais une espèce très récente (apparue il y a 268 000 ans), la plus abondante aujourd'hui et capable de blooms phénoménaux. **Cette espèce est donc bien adaptée au chimisme de l'eau de mer actuelle**, et on ne peut pas savoir si elle réagit dans l'eau du Crétacé de la même façon que ses ancêtres. En effet, **si le chimisme actuel limite la croissance de nombreuses espèces, qui ne répondent pas à une fertilisation par le Fer ou les Nitrates, *E. hux* y répond parfaitement** (STANLEY, et al. 2005), le chimisme de l'eau n'est donc limitant ni pour sa calcification ni pour sa croissance.

En ce qui concerne la morphologie, on s'attendrait à observer de plus gros coccolithes et coccosphères dans les conditions Crétacé (car on observe dans les sédiments des fossiles plus gros à cette époque, ainsi qu'une réduction drastique de la taille après la limite K/T (GARTNER 1996)), ce qui ne se vérifie pas : DA est supérieur dans les conditions Act que K1 et K3, et le diamètre des coccosphères également, sauf pour $[SO_4] = 17mM$, où les résultats sont proches les uns des autres. Une explication possible est encore une fois la non-représentativité d'*E. hux* vis-à-vis de ses ancêtres.

Néanmoins, une approche plus exacte est difficile car ***E. hux* est le coccolithophoridé qui se cultive le plus facilement en laboratoire**, ces expériences ne sont donc pas forcément réalisables sur d'autres espèces. De plus, **toutes les espèces vivant au Crétacé sont aujourd'hui éteintes**, il n'est pas garanti qu'essayer avec d'autres espèces actuelles soit plus représentatif du comportement des coccolithophoridés du Crétacé.

4.2. Le Soufre, toxique pour *E. hux* ?

On sait que le soufre est **un inhibiteur de la calcite en conditions abiotiques** (BOTS, et al. 2011), on s'attend donc à ce que la **calcification soit plus difficile pour des $[SO_4]$ élevées pour *E. hux*, ce qui pourrait se traduire physiologiquement (taux de croissance) ou morphologiquement (taille des coccosphères et des coccolithes). Or, pour le taux de croissance on observe d'abord une augmentation puis une baisse (en fonction de $[SO_4]$), et pour la plupart des paramètres morphologiques on observe une baisse puis une augmentation. Cela laisserait par ailleurs supposer que croissance et morphologie sont liés : **la croissance ralentit lorsqu'on forme des structures plus grosses**, mais les tests statistiques effectués révèlent une absence de corrélation significative.**

On peut supposer que, **contrairement à la précipitation abiotique de $CaCO_3$, la précipitation biotique implique une réaction de l'organisme à son environnement**. Ainsi, le soufre se révèle tout d'abord toxique pour la croissance des structures morphologiques (ce qui pourrait induire une multiplication plus rapide, en réponse à un stress). Cependant, au-delà d'un certain seuil (dont la valeur varierait en fonction d'autres paramètres chimiques car celui-ci semble atteint pour une $[SO_4]$ plus élevée pour K3 que pour K1 et Act), des **mécanismes de défense** semblent être mis en place par *E. hux*, permettant de rétablir, même à forte concentration de SO_4 , des structures morphologiques plus grandes. $[SO_4]$ agit aussi tout d'abord comme fertilisant, provoquant un taux de croissance en augmentation au moins jusqu'aux conditions Act, ce qui s'accorde avec la **théorie SFH (Sulfate Facilitation Hypothesis)**, qui postule que **l'émergence évolutive de la lignée rouge du phytoplancton (à laquelle appartient *E. hux*), aurait été favorisée par l'augmentation de $[SO_4]$** . Ainsi, les membres de cette lignée seraient favorisés pour $[SO_4]$ variant de 10 à 30mM (RATTI, KNOLL et GIORDANO 2011). De plus, Bérengère BROCHE (2018) montre dans sa thèse une forte résilience vis-à-vis de l'augmentation en soufre jusqu'à 90mM et en effet, les baisses de croissance observées au-delà de 28.8mM semblent minimales, voire non-significatives.

Le milieu est donc d'une grande importance, et il est essentiel de connaître davantage le système de l'eau de mer si l'on veut reproduire la crise K/T et l'influence des dégagements sulfureux (par les trapps du Deccan et par le choc de l'astéroïde sur une plateforme carbonatée riche en sulfates au Yucatan) sur les organismes. En effet, si par exemple le rapport $[Mg]/[Ca]$ est relativement bien connu depuis longtemps (STANLEY & HARDIE, 1998), bien que toujours débattues (1.5 au lieu de 1 proposé récemment (COGGON, et al. 2010)), la plupart des concentrations exactes sont largement inconnues, et nos connaissances sur ce sujet complexe ne progressent que lentement. En attendant,

des expériences plus exhaustives (avec un spectre plus large de $[Mg]/[Ca]$ et $[Ca]$) seraient nécessaires pour établir, voire quantifier, la relation entre ce seuil hypothétique de $[SO_4]$ et l'environnement chimique.

4.3. Rôle du rapport $[Mg]/[Ca]$ et de $[Ca]$

On remarque que **pour une même $[SO_4]$, les coccolithes et coccosphères sont plus petits dans les conditions K3 que dans les conditions K1**. Cela peut traduire plusieurs choses.

Tout d'abord, il est évident que le rapport $[Mg]/[Ca]$ n'explique pas à lui seul la qualité du milieu pour le développement d'*E. hux*. En effet, K1 et K3 diffèrent uniquement par les concentrations absolues en Mg et Ca, tous les autres paramètres étant égaux. Il ressort donc que **dans les conditions K3, il y aurait un manque de Mg et/ou de Ca, qui inhiberait la croissance d'*E. hux***. Ce point est problématique, car les valeurs absolues de concentrations en ions dans les eaux du passé sont le plus souvent inconnues, au contraire des rapports entre ces éléments qui sont relativement bien déterminés (STANLEY & HARDIE, 1998). Pour améliorer notre connaissance du passé, il serait donc nécessaire de reconstituer de manière plus exhaustive la teneur de l'eau de mer.

De plus, à l'état actuel, il nous est ici **impossible de déterminer si le manque vient de Ca ou de Mg**, et changer l'un ou l'autre de ces paramètres indépendamment de l'autre changerait leur rapport, or nous savons déjà que ce rapport est déterminant pour la facilitation de la précipitation de la calcite. Distinguer l'importance de l'un et de l'autre semble donc hasardeux, et c'est l'influence couplée des 2 concentrations qu'il faut étudier plus avant.

Enfin, il est important de noter qu'une plus **petite taille n'est pas nécessairement le signe d'un manque**, mais peut aussi être l'effet d'un taux de reproduction important et avec un cycle de « maturité » plus rapide des coccolithophoridés. Néanmoins, le taux de croissance est plus faible dans les conditions K3 que K1 et Act, au moins pour les 3 premiers points, la petite taille semble donc ici bien liée à un manque et non à une surabondance. Une piste de recherche spécifiquement focalisée sur la rôle du rapport Mg/Ca et la taille de l'organisme pourrait se dégager.

4.4. Interpolation à partir des sédiments

Il n'est pas facile de faire une estimation de la bonne santé et du niveau de stress subit par *E. hux* uniquement à partir de sa morphologie, et on peut supposer que cela s'applique également aux autres espèces de coccolithophoridés. En effet, on interprète souvent la plus petite taille des coccosphères et coccolithes des sédiments juste après la limite K/T comme un signe

d'environnement difficile pour eux et de conditions défavorables, pourtant on n'observe **pas ici de corrélation entre la taille des organismes et le taux de croissance de la population ou le taux de calcification**. Au-delà d'une croissance rapide de la population, avec une arrivée à maturité précoce des individus (ce qui est tout de même un signe de déséquilibre), la petite taille n'est pas nécessairement liée à un stress sur la croissance et le développement de la population, mais peut être simplement une stratégie adaptative au chimisme de l'eau de mer.

Par ailleurs, on remarque **que l'environnement chimique donnant l'indice de malformation le plus bas, quelque que soit $[SO_4]$, est K3**. Néanmoins, c'est aussi dans les conditions K3 qu'on retrouve le plus faible taux de calcification et de croissance : **une mauvaise ou faible calcification et croissance n'induisent donc pas de malformations particulières** ce qui implique que la malformation n'est pas non plus un indice facile à interpréter pour déduire des sédiments si les coccolithophoridés se sont développés dans des conditions néfastes ou non pour leur développement. On peut avancer ici que dans les conditions K3 la calcification est si difficile qu'elle ne permet pas de former de calcite anarchique, alors que la calcification est moins contrainte dans les conditions K1, ce qui permet des développements plus anarchiques (les plus fortes concentrations en $[Ca]$ et $[Mg]$ favorisent la précipitation, même abiotique).

V. Conclusions et Perspectives

Globalement, il ressort de cette étude que, comme supposé, **la concentration en sulfates a un impact sur la morphologie des coccolithes étudiés**. En effet, il semble que, selon sa concentration, SO_4 puisse inhiber la calcification biotique. **Les sulfates auraient donc pu jouer un rôle lors de la crise K/T**, mais on ne peut en être sûr avec cette étude, car *E. hux* ne se comporte pas nécessairement comme les autres espèces de coccolithophoridés, passées ou actuelles. Ces résultats sont donc difficiles à extrapoler sur la crise K/T, d'autant plus que le chimisme exact de l'eau de mer de cette époque est inconnu. **Pour conclure quant à l'impact des rejets considérables de soufre des éruptions du Deccan et libérés lors de l'impact d'un astéroïde sur une plateforme carbonatée au Yucatan**, il serait donc intéressant de réaliser le même genre d'expérience sur d'autres espèces de coccolithophoridés. Parmi ces espèces, *Coccolithus pelagicus* présente des caractéristiques de taille, structure et calcification différentes d'*E. hux*. L'intérêt de cette espèce réside aussi dans son origine : apparue juste après la crise K/T (environ -64 millions d'années), elle est l'espèce la plus proche de la crise K/T. Par ailleurs, une étude du métabolisme du soufre chez les membres du nanoplancton en général, et *E. hux* en particulier, pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de $[\text{SO}_4]$ et son importance dans la crise K/T. Il ne faut pas oublier que les rejets de soufre s'accompagnent d'une acidification, qui n'est pas étudiée ici afin de dégager l'effet propre au soufre, **après cette étude sur l'impact isolé du soufre, il serait donc intéressant d'étudier son effet combiné avec d'autres paramètres**, afin de déterminer si les effets s'additionnent, s'annulent ou se décuplent.

Pour répondre aux questions posées en introduction, cette étude montre aussi que **non seulement $[\text{SO}_4]$ mais aussi le rapport $[\text{Mg}]/[\text{Ca}]$, $[\text{Ca}]$ et $[\text{Mg}]$ ont un impact majeur sur la morphologie des coccolithes et coccosphères d'*E. hux***, même si celui-ci est difficile à préciser. Ces paramètres morphologiques varient plus que les paramètres physiologiques comme le taux de croissance ou le taux de calcification, et les facteurs ayant le plus d'influence semblent être $[\text{Mg}]$ et $[\text{Ca}]$, car les variations entre K1, K3 et Act sont le plus souvent plus fortes que celles observées pour une même condition avec différents $[\text{SO}_4]$. L'interdépendance entre les paramètres morphologiques ne semble pas varier car les relations observées entre ceux-ci sont linéaires et valables pour les 3 conditions. **Enfin, ces variations morphologiques ne sont pas couplées à d'autres variations indésirables du milieu (comme le pH ou la salinité), on en déduit donc que les effets observés sont imputables aux variations de $[\text{SO}_4]$, $[\text{Ca}]$ et $[\text{Mg}]$.**

De plus, nos connaissances de la chimie de l'eau de mer du Crétacé doivent s'approfondir pour définir au mieux les conditions d'expériences à venir avec *E. hux* et d'autres organismes du nanoplancton calcifiant, car les connaissances actuelles ne permettent pas de faire d'expériences avec des conditions plus précises pour la période Crétacé.

Bibliographie

- Algeo, T. J., G. M. Luo, H. Y. Song, T. W. Lyons, und D. E. Canfield. „Reconstruction of secular variation in seawater sulfate concentrations.“ *Biogeosciences*, 2015: 2131-2151.
- Bach, L. T., C. Bauke, K. J. S. Meier, U. Riebesell, und K. G. Schulz. „Influence of changing carbonate chemistry on morphology and weight of coccoliths formed by *Emiliana huxleyi*.“ *Biogeosciences*, Nr. 9 (2012): 3449-3463.
- Bollmann, J., J. O. Herrle, M. Y. Cortés, und S. R. Fielding. „The effect of sea water salinity on the morphology of *Emiliana huxleyi* in plankton and sediment samples.“ *Earth and Planetary Science Letters*, Nr. 284 (2009): 320-328.
- Bots, P., L. G. Benning, R. E. M. Rickaby, und S. Shaw. „The role of SO₄ in the switch from calcite to aragonite seas.“ *Geology*, Nr. 39 (2011): 331-334.
- Broche, B. *L'impact du Soufre sur le biocalcifiant *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae)*. Sorbonne Paris Université: Centre de recherche sur la paléodiversité et les paléoenvironnements, 2018.
- Chenet, A-L., et al. „Determination of rapid Deccan eruptions across the Cretaceous-Tertiary boundary using paleomagnetic secular variation: 2. Constraints from analysis of eight new sections and synthesis for a 3500-m-thick composite section.“ *Journal of Geophysical Research* 114 (2009): B06103.
- Coggon, R. M., D. A. H. Teagle, C. E. Smith-Duque, J. C. Alt, und M. J. Cooper. „Reconstructing Past Seawater Mg/Ca and Sr/Ca from Mid-Ocean Ridge Flank Calcium Carbonate Veins.“ *Science*, 2010: 1114-1117.
- Courtillot, V. „Deccan volcanism at the Cretaceous-Tertiary boundary: past climatic crises as a key to the future?“ *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, Nr. 189 (1990): 291-299.
- Gartner, S. „Calcareous nannofossils at the Cretaceous-Tertiary boundary.“ *Cretaceous-Tertiary mass extinctions : biotic and environmental changes*, 1996: 27-47.
- Hildebrand, A. R., et al. „Chicxulub Crater: A possible Cretaceous/Tertiary boundary impact crater on the Yucatán Peninsula, Mexico.“ *Geology*, 1991: 867-871.
- Ratti, S., A. H. Knoll, und M. Giordano. „Did sulfate availability facilitate the evolutionary expansion of chlorophylla+cphytoplankton in the oceans?“ *Geobiology*, 2011: 301-312.
- Smith, S. J., J. van Aardenne, Z. Klimont, R. J. Andres, A. Volke, und S. Delgado Arias. „Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850–2005.“ *Atmospheric Chemistry and Physics*, Nr. 11 (2011): 1101-1116.
- Stanley, S. M., J. B. Ries, und L. A. Hardie. „Seawater chemistry, coccolithophore population growth, and the origin of Cretaceous chalk.“ *Geology* 33, Nr. 7 (2005): 593-596.
- Stanley, S. M., und L. A. Hardie. „Secular oscillations in the carbonate mineralogy of reef-building and sediment-producing organisms driven by tectonically forced shifts in seawater chemistry.“ *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, Nr. 144 (1998): 3-19.

Annexe

Les photographies ainsi que les mesures faites sur celles-ci sont disponibles à cette adresse : <https://cloud.biologie.ens.fr/index.php/s/PSdgaExAAotLIEf>

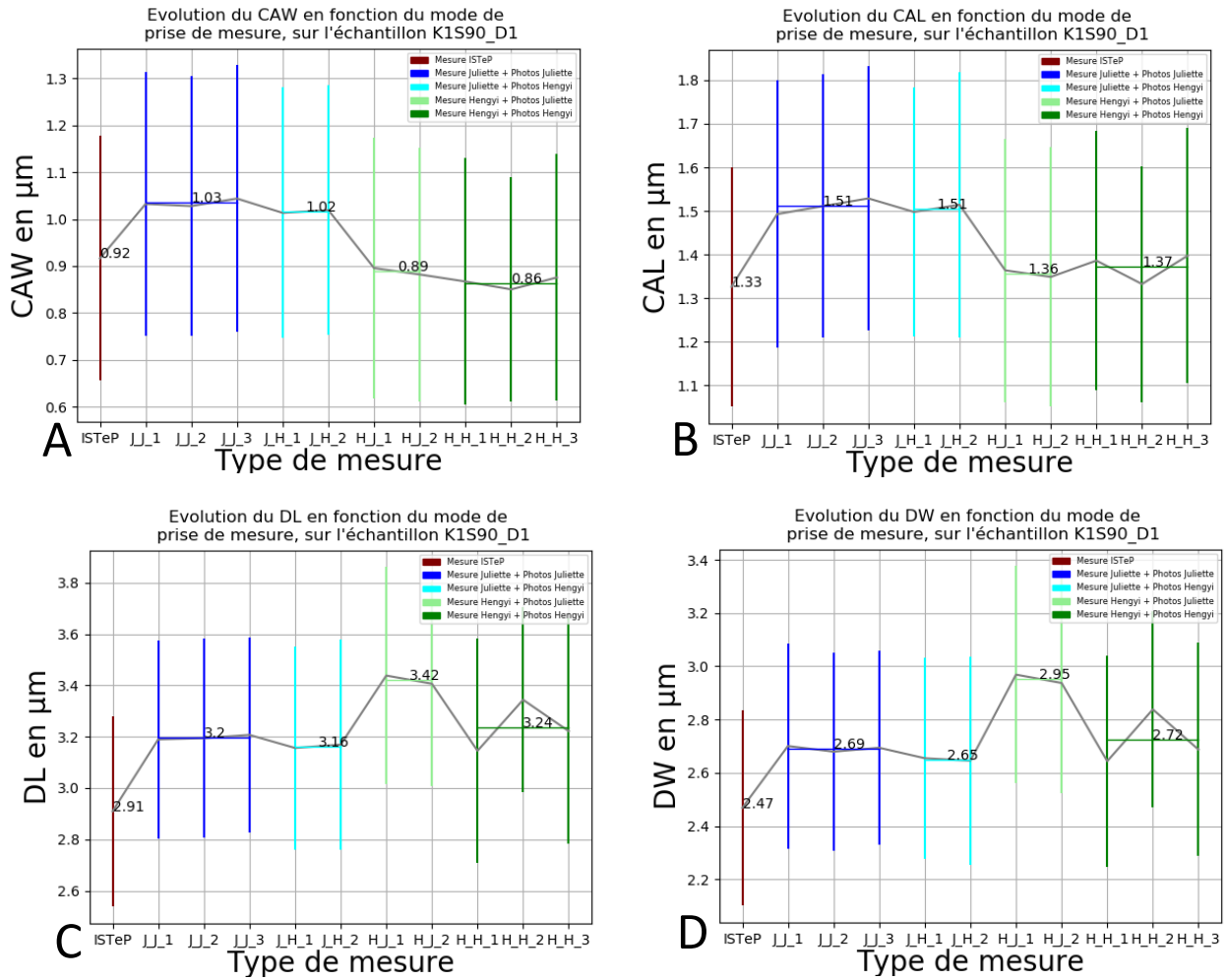


FIGURE N°1 : (A, B, C, D) Variation de la valeur moyenne de CAW (resp. CAL, DL, DW) (en µm) pour l'échantillon K1S90_D2, en fonction du type de mesure effectué

	CAL	CAW	DL	DW	Diam	CAA	CAR	DA	DR	LaF	LoF
CAL	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON
CAW		NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	OUI	NON	OUI
DL			NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	NON
DW				NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	OUI
Diam					NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
CAA						NON	NON	OUI	OUI	NON	NON
CAR							NON	OUI	OUI	NON	NON
DA								NON	NON	NON	NON
DR									NON	NON	NON
LaF										NON	OUI
LoF											NON

Tableau n°1 : Indépendances des variables à l'étude

	CAW	DL	DW	Diam	CAA	CAR	DA	DR	LaF	LoF
CAL	0.6992	-0.2340	-0.1745	0.0203			-0.2759	0.1691	-0.3625	
CAW		0.0013	0.1325	0.2182			-0.0169	0.3597		-0.1623
DL			0.8818	0.4883	0.1117	-0.3195			0.9052	
DW				0.5234	0.1779	-0.1091				0.8390
Diam					0.2078	-0.0286	0.4909	0.0727	0.4545	0.3961
CAA							0.0688	0.2182		
CAR							-0.3052	0.6390		
LaF										0.9325

Tableau n°2 : coefficient de corrélation de Spearman pour les variables indépendantes

	CAW	DL	DW	Diam	CAA	CAR	DA	DR	LaF	LoF
CAL	4.20E-04	3.07E-01	4.49E-01	9.30E-01			2.26E-01	4.64E-01	1.06E-01	
CAW		9.96E-01	5.67E-01	3.42E-01			9.42E-01	1.09E-01		4.82E-01
DL			1.27E-07	2.47E-02	6.30E-01	1.58E-01			1.72E-08	
DW				1.49E-02	4.40E-01	6.38E-01				2.01E-06
Diam					3.66E-01	9.02E-01	2.38E-02	7.54E-01	3.84E-02	7.55E-02
CAA							7.67E-01	3.42E-01		
CAR							1.79E-01	1.82E-03		
LaF										7.63E-10

Tableau n°3 : *p-value* du test de corrélation de Spearman

A	pH	Salinité	Croissance	Calcification
CAL	0.3181	-0.0590	-0.0583	0.2606
CAW	0.5844	-0.0644	0.0776	0.5647
DL	0.5865	-0.0106	0.2426	0.6442
DW	0.6489	-0.0262	0.2577	0.7259
Diamètre	0.6320	-0.3342	-0.2457	0.5380

B	pH	Salinité	Croissance	Calcification
CAL	0.3846	-0.0909	-0.0769	0.3077
CAW	0.6364	-0.0769	0.0140	0.6084
DL	0.6434	-0.0140	0.0350	0.6224
DW	0.6853	-0.0140	0.1259	0.7063
Diamètre	0.7133	-0.4965	-0.1958	0.5315

Tableau n°4 : Coefficients de corrélation pour les paramètres chimiques mesurés (A : Pearson, B : Spearman)

A	pH	Salinité	Croissance	Calcification
CAL	3.14E-01	8.56E-01	8.57E-01	4.13E-01
CAW	4.60E-02	8.42E-01	8.10E-01	5.57E-02
DL	4.50E-02	9.74E-01	4.47E-01	2.38E-02
DW	2.24E-02	9.36E-01	4.19E-01	7.53E-03
Diamètre	2.75E-02	2.88E-01	4.42E-01	7.12E-02

B	pH	Salinité	Croissance	Calcification
CAL	2.17E-01	7.79E-01	8.12E-01	3.31E-01
CAW	2.61E-02	8.12E-01	9.66E-01	3.58E-02
DL	2.40E-02	9.66E-01	9.14E-01	3.07E-02
DW	1.39E-02	9.66E-01	6.97E-01	1.02E-02
Diamètre	9.20E-03	1.01E-01	5.42E-01	7.54E-02

Tableau n°5 : *p-value* des tests pour ces paramètres chimiques (A : Pearson, B : Spearman)

A	CAL	CAW	DL	DW	Diamètre
pH	<p>Evolution de pH en fonction de CAL</p>	<p>Evolution de pH en fonction de CAW</p>	<p>Evolution de pH en fonction de DL</p>	<p>Evolution de pH en fonction de DW</p>	<p>Evolution de pH en fonction de Diametre</p>
Salinité	<p>Evolution de Salinité en fonction de CAL</p>	<p>Evolution de Salinité en fonction de CAW</p>	<p>Evolution de Salinité en fonction de DL</p>	<p>Evolution de Salinité en fonction de DW</p>	<p>Evolution de Salinité en fonction de Diametre</p>
Croissance	<p>Evolution de Croissance en fonction de CAL</p>	<p>Evolution de Croissance en fonction de CAW</p>	<p>Evolution de Croissance en fonction de DL</p>	<p>Evolution de Croissance en fonction de DW</p>	<p>Evolution de Croissance en fonction de Diametre</p>
Calcification	<p>Evolution de Calcification en fonction de CAL</p>	<p>Evolution de Calcification en fonction de CAW</p>	<p>Evolution de Calcification en fonction de DL</p>	<p>Evolution de Calcification en fonction de DW</p>	<p>Evolution de Calcification en fonction de Diametre</p>

