

Þý Mécanismes d acclimatation aux espèces réactives de Symbiodiniaceae de coraux scléactiniaires

Auteur : Micha, Maud

Promoteur(s) : Plumier, Jean-Christophe; Roberty, Stéphane

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie

Année académique : 2018-2019

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/7356>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Mécanismes d'acclimatation aux espèces réactives de l'oxygène chez les Symbiodiniaceae de coraux scléractiniaires



Maud MICHA

**Mémoire réalisé dans le cadre de l'obtention du diplôme de master en
Biologie des Organismes et Ecologie, à finalité approfondie**

Août 2019

Promoteur: Pr. Jean-Christophe Plumier
Co-promoteur: Dr. Stéphane Roberty
Laboratoire de physiologie animale
Unité de recherche InBioS

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	5
1.1 LA SYMBIOSE CORALLIENNE	5
1.2 LA PHOTOSYNTHESE.....	8
<i>Phase claire et phase sombre de la photosynthèse</i>	8
<i>Mécanismes alternatifs lors de la phase claire</i>	9
<i>Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors de la phase claire et dommages</i>	11
1.3 LE BLANCHISSEMENT CORALLIEN, ET LE STRESS OXYDANT QUI EN SERAIT A LA BASE	13
1.4 ROLE DU PRECONDITIONNEMENT DANS LES MECANISMES DE TOLERANCE AU STRESS.....	15
1.5 OBJECTIFS	17
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	18
2.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE : SOUCHE ET CONDITIONS DE CULTURE	18
2.2 DOSAGE DE LA BIOMASSE	19
<i>Comptage cellulaire</i>	19
<i>Dosage des chlorophylles</i>	19
2.3 MÉTHODES	19
<i>Capacité photosynthétique : Fluorescence des chlorophylles</i>	19
<i>Production de ROS</i>	21
<i>Contenu pigmentaire et lipidique</i>	23
2.4 TRAITEMENTS EXPÉRIMENTAUX	25
<i>Molécules chimiques utilisées</i>	25
<i>Tests de préconditionnement à la MSB et au DCMU</i>	27
<i>Analyse du contenu pigmentaire et lipidique après traitement pro-oxydant in vivo ou in vitro</i>	29
2.5 STATISTIQUES	30
CHAPITRE 3 : RESULTATS	31
3.1 CARACTERISATION DE LA SOUCHE SSB01 DE <i>B. MINUTUM</i>	31
3.2 EFFETS DE LA MSB SUR LA PRODUCTION DE ROS ET LA CAPACITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE	33
<i>Courbes dose-réponse</i>	33
<i>Préconditionnements à la MSB</i>	35
3.3 EFFETS DU DCMU SUR LA CAPACITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE ET LA PRODUCTION DE ROS	38
<i>Courbes dose-réponse</i>	38
<i>Préconditionnements au DCMU, et à une intensité lumineuse élevée</i>	39
3.4 EFFETS DE DIFFÉRENTS TRAITEMENTS PRO-OXYDANTS SUR LA COMPOSITION PIGMENTAIRE ET LIPIDIQUE	41
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	49
CHAPITRE 5 : CONCLUSION	54
ANNEXES	55
BIBLIOGRAPHIE	58
RESUME	67

Remerciements

Je remercie énormément mon promoteur, Jean-Christophe Plumier, et mon co-promoteur, Stéphane Roberty, pour avoir suivi l'évolution de mon mémoire chaque semaine, et même presque chaque jour ! Pour m'avoir encouragée quand les résultats n'étaient pas aussi extraordinaires que je l'attendais, et pour avoir eu toutes ces idées qui ont permis à mon mémoire de produire beaucoup de résultats. Merci aussi à vous pour avoir eu des idées brillantes là où mon cerveau s'arrêtait juste en mode « error, pourquoi ça ne fonctionne pas ! ». Et merci à vous pour votre gentillesse, et pour cet environnement si agréable au sein du labo !

Je remercie également le professeur G. Eppe pour sa collaboration concernant la GC-MS, ainsi qu'Amélie pour ses explications concernant l'HPLC.

Je vous remercie, mes chères amies, Blandine Keymolen, France Gaspard, Julie Linden et Marie Michielin, pour avoir suivi l'évolution de mon mémoire, pour avoir eu parfois des idées qui allaient m'aider à résoudre certains problèmes, et pour toutes les fois où nous nous sommes remontés le moral mutuellement!

Et enfin, je remercie mes parents pour m'avoir permis de faire ces magnifiques 5 années d'études. Elles n'ont pas été faciles, mais elles ont été riches, remplies de belles rencontres, et elles m'ont permis d'aboutir à ce mémoire qui me permettra, normalement (on ne sait jamais...) de devenir diplômée universitaire, ce dont je serai très fière !

Liste des abréviations les plus utilisées

ROS : espèces réactives de l'oxygène

MSB : menadione sodium bisulfite

DCMU : 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée

Φ PSII : rendement photochimique effectif

F_v/F_m : rendement photochimique maximum

NPQ : « Non Photochemical Quenching », rendement d'extinction non photochimique

SOD : superoxide dismutase

APX : ascorbate peroxidase

GPX : glutathione peroxidase

CAT : catalases

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La symbiose corallienne

Les récifs coralliens constituent des écosystèmes complexes, et particulièrement riches en biodiversité (entre 600 000 et 9 millions d'espèces) (Knowlton, 2001) malgré qu'ils ne représentent que 0,09% de la surface totale des océans (Green, Ravilious, & Spalding, 2001). C'est un des écosystèmes marins les plus productifs, ce qui le rend intéressant pour la pêche, la découverte de nouvelles molécules (utiles en pharmacologie par exemple), et le tourisme (Moberg & Folke, 1999). De plus, les récifs assurent une protection des côtes en absorbant une partie de l'énergie des vagues et des courants marins.

Les récifs existent majoritairement grâce à la symbiose entre des coraux scléactiniaires (Cnidaires) et des dinoflagellés photosynthétiques de la famille des Symbiodiniaceae, et plus précisément des genres *Symbiodinium*, *Breviolum*, *Cladocopium*, et *Durusdinium* (LaJeunesse et al., 2018). Les microalgues sont maintenues au sein de phagosomes transformés (symbiosomes) dans les cellules du gastroderme du cnidaire (Wakefield & Kempf, 2001) (Fig. 1). Elles lui transmettent jusqu'à 95% des molécules qu'elles synthétisent (sucres, lipides, acides aminés) par l'action d'« host release factors » produits par l'animal, ce qui contribue grandement à la respiration, la croissance, la survie et la reproduction de celui-ci. En retour, la symbiose apporte aux microalgues une protection face aux brouteurs de plancton, une source de nutriments (carbone, azote et phosphore inorganiques) (Yellowlees, Rees, & Leggat, 2008), et une position stable dans la colonne d'eau favorisant l'accès à la lumière incidente (Sheppard, Davy, & Pilling, 2009).

Il est aussi important de savoir que les coraux ont également besoin d'une alimentation hétérotrophe car plusieurs composés essentiels (azote et phosphore principalement) ne sont pas fournis par les algues. Les coraux prélèvent ainsi de la matière organique dissoute (sucres, acides aminés libres et urée), des exudats microbiens, de la matière organique détritique, mais aussi des bactéries, des protozoaires, ainsi que du phytoplancton et du zooplancton (Houlbrèque & Ferrier-Pagès, 2009).

La symbiose s'établit à la suite d'une série d'événements.

D'abord, les deux partenaires doivent se reconnaître, que ce soit lors d'une transmission horizontale (Symbiodiniaceae « environnementales » acquises par la larve planula) ou verticale (Symbiodiniaceae transmises par la colonie mère dans l'œuf ou la larve planula) (Marlow & Martindale, 2007). On pensait jusqu'à il y a peu que l'animal utilisait des lectines (protéines qui se lient à des sucres) SLL-2 et des millectines (Kvennefors et al., 2008) pour reconnaître les souches d'algues capables de vivre en symbiose, et que, après reconnaissance dans la cavité digestive du polype, l'interaction lectine-sucres induisait une perte des flagelles des algues suivie de leur incorporation à l'animal. Cependant, une étude récente a montré que, même si les polysaccharides et les glycoprotéines des algues étaient masqués par des lectines, celles-ci pouvaient tout de même être intégrées aux cellules animales, ce qui impliquerait que les algues ne soient pas nécessairement incorporées grâce à leur composition en sucres membranaires (Parkinson et al., 2018). De plus, cette même étude a montré qu'il existait peu de différence de composition en sucres membranaires entre une

espèce capable d'entrer en symbiose (*Breviolum minutum*) et une espèce qui n'en est pas capable (*Symbiodinium pilosum*) : il y a 7% de galactosyl (α -1,3) galactose en plus chez *B. minutum*, et 14% de mannoside N-glycans à N-Acetylglucosamine en plus chez *S. pilosum*. Une même espèce de scléactiniaire peut héberger différentes souches d'algues également selon les conditions environnementales (lumière et température, liées à la latitude ou la profondeur) à cause des différences de sensibilité à la lumière et à la température de ces souche (Coffroth & Santos, 2005; Lajeunesse & Trench, 2000; Lajeunesse et al., 2004; Rowan et al., 1997; Stat, Carter, & Hoegh-Guldberg, 2006).

Les Symbiodiniaceae, une fois phagocytées, sont maintenues dans ces phagosomes grâce à l'action d'une protéine : ApRab5 (Barbieri et al. 1994). Cette protéine empêcherait deux autres protéines, ApRab7 et ApRab11, de se fixer sur le phagosome et de conduire celui-ci à fusionner avec les lysosomes (Chen et al., 2003; Chen et al., 2005; Zerial & McBride, 2001). Par ailleurs, ces deux protéines ont été observées dans les phagosomes contenant des algues abîmées ou mortes.

Par la suite, les phagosomes sont transformés en symbiosomes par la mise en place dans la membrane de protéines similaires aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), sans doute impliquées dans des réponses cellulaires et dans la modification de l'expression génique de l'hôte, et de transporteurs permettant les échanges de nutriments inorganiques et de photosynthétats entre les deux partenaires. Par ailleurs, des protéines de stress et des protéines chaperones sont produites pour protéger l'hôte des dommages causés par un stress oxydant dû à la photosynthèse de leurs symbiontes (Peng et al., 2010).

Les coraux maintiennent une densité optimale de symbiontes en limitant leur mitose (limitation des apports en nutriments ou production de facteurs inhibiteurs de croissance) (Falkowski, Dubinsky, Muscatine, & McCloskey, 1993; G. J. Smith & Muscatine, 1999) ou en éliminant l'excès d'algues par digestion ou par expulsion des cellules en division (Jones & Yellowlees, 1997). Celles-ci réapprovisionnent le pool de Symbiodiniaceae libres dans l'environnement (Adams, Cumbo, & Takabayashi, 2009; Carlos, Baillie, Kawachi, & Maruyama, 1999; Coffroth et al., 2006; Gou et al., 2003; Hirose et al., 2008; Littman, van Oppen, & Willis, 2008; Manning & Gates, 2008; Pochon et al., 2010; Porto et al., 2008).

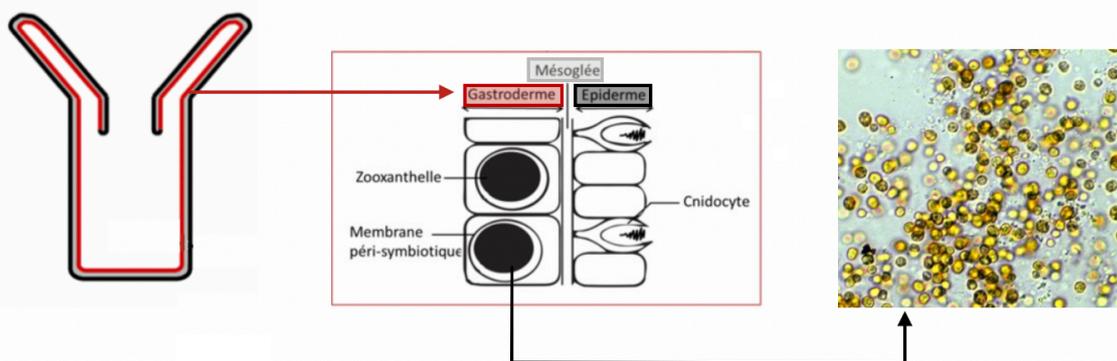


Figure 1: Structure d'un polype. Les Symbiodiniaceae sont incorporées dans les cellules du gastroderme, le tissu interne du cnidaire, séparé de l'épiderme par une matrice extracellulaire, la mésogée. Schéma modifié à partir de (Gambini, C. La morphogenèse gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012) (Furla, Allemand, & Courtial, 2018) et (Santos, 2009)

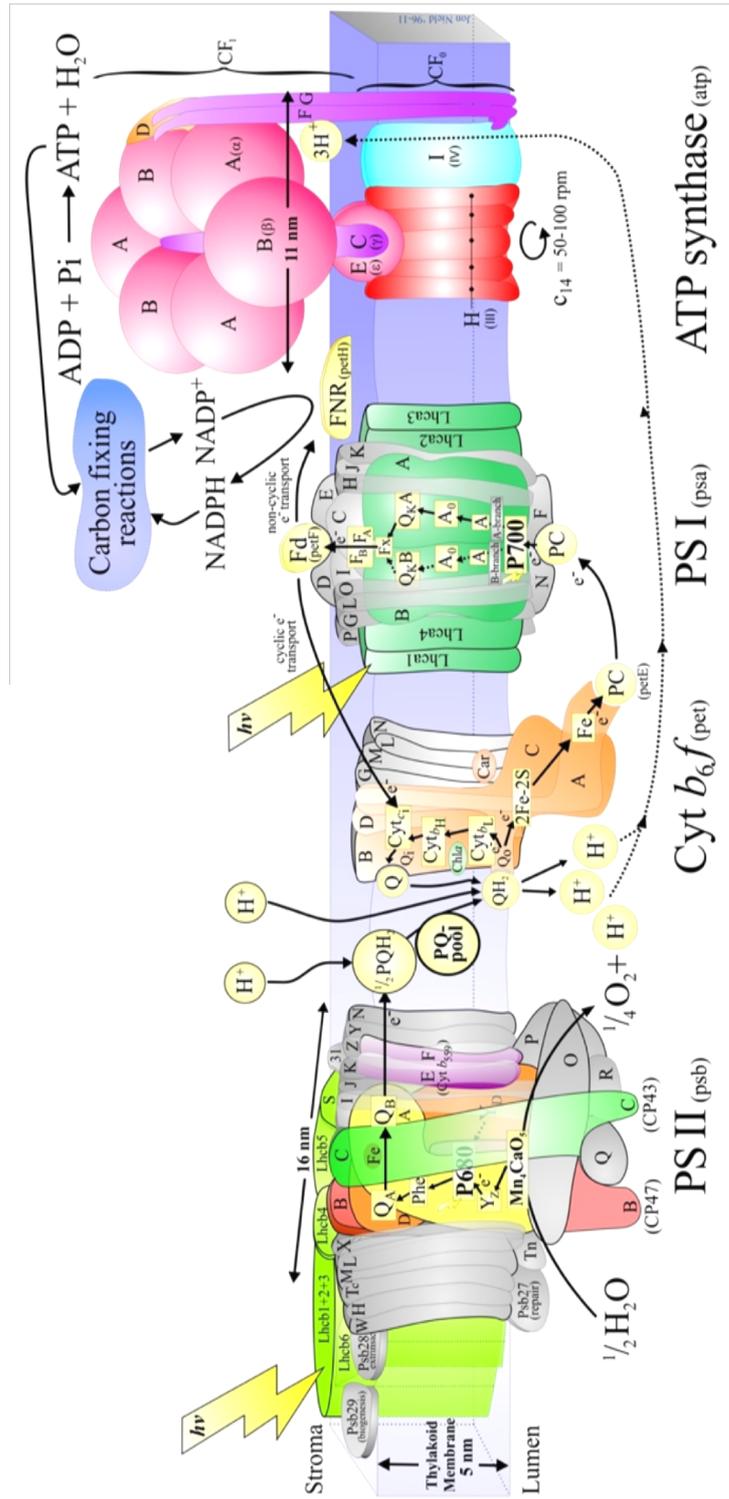


Figure 2: Complexes de la phase claire de la photosynthèse et succession des composés réduits par le transfert linéaire des électrons (Six, n.d.)

1.2 La photosynthèse

La symbiose corallienne est fondée sur la photosynthèse des Symbiodiniaceae. C'est cette photosynthèse qui a permis à l'écosystème corallien de prospérer dans les eaux oligotrophes tropicales car la lumière est la principale source d'énergie, et aussi parce que la symbiose permet le recyclage des nutriments entre les deux partenaires.

Phase claire et phase sombre de la photosynthèse

La photosynthèse a lieu dans les chloroplastes, au niveau des thylakoïdes (membranes internes s'organisant en vésicules) et du stroma (volume aqueux remplissant l'organelle) (Fig. 3).

La phase claire de la photosynthèse a pour but, à partir de la lumière, de produire l'énergie et le pouvoir réducteur nécessaire à la transformation du CO₂ en molécules organiques, et est réalisée dans les thylakoïdes. Elle utilise un transport d'électrons entre des complexes protéiques au sein de la membrane : le photosystème II, le complexe des cytochromes *b₆/f*, puis le photosystème I (Fig. 2). Les photons sont absorbés au niveau des systèmes antennaires des photosystèmes grâce à trois pigments chez les dinoflagellés : la chlorophylle *a*, la chlorophylle *c₂* et la péridinine. Ces pigments, en nombreux exemplaires, se transmettent l'énergie des photons par résonance, jusqu'aux centres réactionnels des photosystèmes, où elle peut être utilisée pour enlever un électron à la chlorophylle des centres réactionnels, ou être retransmise aux antennes pour être perdue sous forme de fluorescence ou de chaleur. L'oxydation des centres réactionnels permet d'initier le transport des électrons jusqu'au NAD(P)⁺. Les charges positives laissées par les oxydations des centres réactionnels sont neutralisées par oxydation d'autres donneurs d'électrons. Ainsi, les électrons passent, par oxydations successives, d'une molécule à l'autre pour finir par former du NAD(P)H.

Le centre réactionnel du photosystème II (P680) est réduit par une tyrosine (Y_Z), elle-même réduite par le cluster-Mn du complexe OEC (oxygen evolving complex). Lorsque ce cluster a perdu 4 électrons, une molécule d'eau est oxydée en oxygène et 4 protons (accumulés à l'intérieur du thylakoïde, dans le lumen), et réduit le cluster-Mn.

Les électrons émis par le centre réactionnel du photosystème II sont transmis à la phéophytine, qui par la suite réduit la plastoquinone Q_A, elle-même réduisant la plastoquinone Q_B. Quand Q_B est réduite 2 fois, elle se lie à 2 protons du stroma et forme le plastoquinol (PQH₂), qui diffuse à travers la membrane du thylakoïde pour aller réduire la protéine de Rieske du cytochrome *b₆/f*, en larguant les deux protons dans le lumen. Cette protéine réduit le cytochrome *f*, qui lui-même réduit la plastocyanine ou le cytochrome C₅₅₃. Ces molécules diffusent également dans la membrane, et atteignent le photosystème I, où elles réduisent le centre réactionnel. Les électrons émis par celui-ci sont transférés successivement sur les phylloquinones (A₀ à A₁), le cluster fer-soufre F_X, les protéines à Fer F_B/F_A, et puis la ferrédoxine (Fd). Celle-ci réduit majoritairement le NAD(P)⁺ (Chitnis, 2001; Nelson & Yocum, 2006), mais également la thioredoxine (qui active plusieurs enzymes de la phase sombre) (Buchanan & Balmer, 2005), et le NO₂⁻ en NH₄⁺ via l'action de la nitrite reductase.

Les protons transférés dans le lumen sont transportés dans le stroma par l'action des ATP synthétases, qui utilisent l'énergie du gradient électrochimique des H⁺ pour produire des molécules d'ATP (Fig. 2).

La phase sombre de la photosynthèse ne requiert pas directement de lumière, et a lieu dans le stroma, principalement au niveau des pyrénoides. Elle utilise l'ATP et le NAD(P)H produits par la phase claire pour lier des molécules de CO₂, et les transformer en glucose par plusieurs enzymes dont la Rubisco (ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase), fortement concentrée dans les pyrénoides. Les réactions successives forment le cycle de Calvin-Benson. Le CO₂ utilisé ne provient pas simplement d'une diffusion passive depuis le milieu. Il vient également de la transformation du HCO₃⁻ par les anhydrases carboniques (Leggat, Badger, & Yellowlees, 1999).

Par ailleurs, le transport linéaire des électrons tel qu'expliqué ci-dessus génère un ratio ATP/NADPH d'environ 1,29 (Turina, Samoray, & Gräber, 2003), ce qui indique qu'il doit exister des mécanismes producteurs d'ATP supplémentaires pour obtenir le ratio de 1,5 nécessaire au cycle de Calvin.

Mécanismes alternatifs lors de la phase claire

Les électrons peuvent subir un transport alternatif pour réguler leur flux et la production d'ATP et/ou NAD(P)H. Le flux cyclique d'électrons autour du photosystème I (Fig. 2) réduit la plastoquinone Q_B à partir de la ferrédoxine ou du NAD(P)H pour transférer des protons du stroma vers le lumen et donc produire plus d'ATP (Alric, 2010; Cardol, Forti, & Finazzi, 2011; Eberhard, Finazzi, & Wollman, 2008).

La réaction de Mehler réduit le dioxygène à partir de la ferrédoxine ou d'un cluster fer-soufre du photosystème I, ce qui induit la formation d'ATP mais pas de NAD(P)H (Asada, 1999; Asada, Allen, Foyer, & Matthijs, 2000; Ort & Baker, 2002). Ce procédé produit des ions superoxydes, qui sont transformés en H₂O₂ par la superoxyde dismutase (SOD). L'H₂O₂ est ensuite réduit en eau grâce à l'ascorbate peroxidase (APX) (Fig. 4).

La photorespiration permet de maintenir le cycle de Calvin fonctionnel lorsqu'il y a trop d'oxygène et pas assez de CO₂ grâce à de nombreuses réactions dans le chloroplaste et les peroxysomes, étant donné que la Rubisco peut fixer l'oxygène autant que le dioxyde de carbone sur le ribulose-1,5-diphosphate (Eberhard et al., 2008; Wingler et al., 2000).

Par ailleurs, le NADPH généré par le flux linéaire d'électrons peut être transporté jusqu'à la mitochondrie et utilisé pour la production d'ATP afin d'atteindre le ratio ATP/NADPH de 1,5 lorsque l'énergie lumineuse génère une production élevée de pouvoir réducteur (Cardol et al., 2011; Eberhard et al., 2008; Noctor et al., 2004).

La photosynthèse doit s'adapter aux nutriments et à la lumière disponibles afin de ne pas produire plus de glucose que nécessaire et afin de gérer l'excès d'énergie lumineuse pour qu'il ne cause pas de dommages. Les cellules végétales y parviennent grâce aux flux alternatifs d'électrons, mais aussi grâce au « Non Photochemical Quenching » (NPQ) (Müller, Li, & Niyogi, 2001), à savoir les réactions rédox des xanthophylles (la diadinoxanthine et sa forme dé-époxydée, la diatoxanthine) (Brown et al., 1999; Warner & Berry-Lowe, 2006), la déconnection temporaire des antennes collectrices aux centres réactionnels (Wollman, 2001), et la photoinhibition, causée par des photosystèmes II rendus inutilisables par des dégâts ou des changements de conformation. De plus, les mécanismes de réparation des dommages causés par la lumière sur la protéine D1, une protéine du centre réactionnel du photosystème II, peuvent être inhibés également (Murata et al., 2007; Nishiyama et al., 2001). Ces trois NPQ

sont notés qE, qT, et qI respectivement, et ont pour but de diminuer le flux linéaire d'électrons.

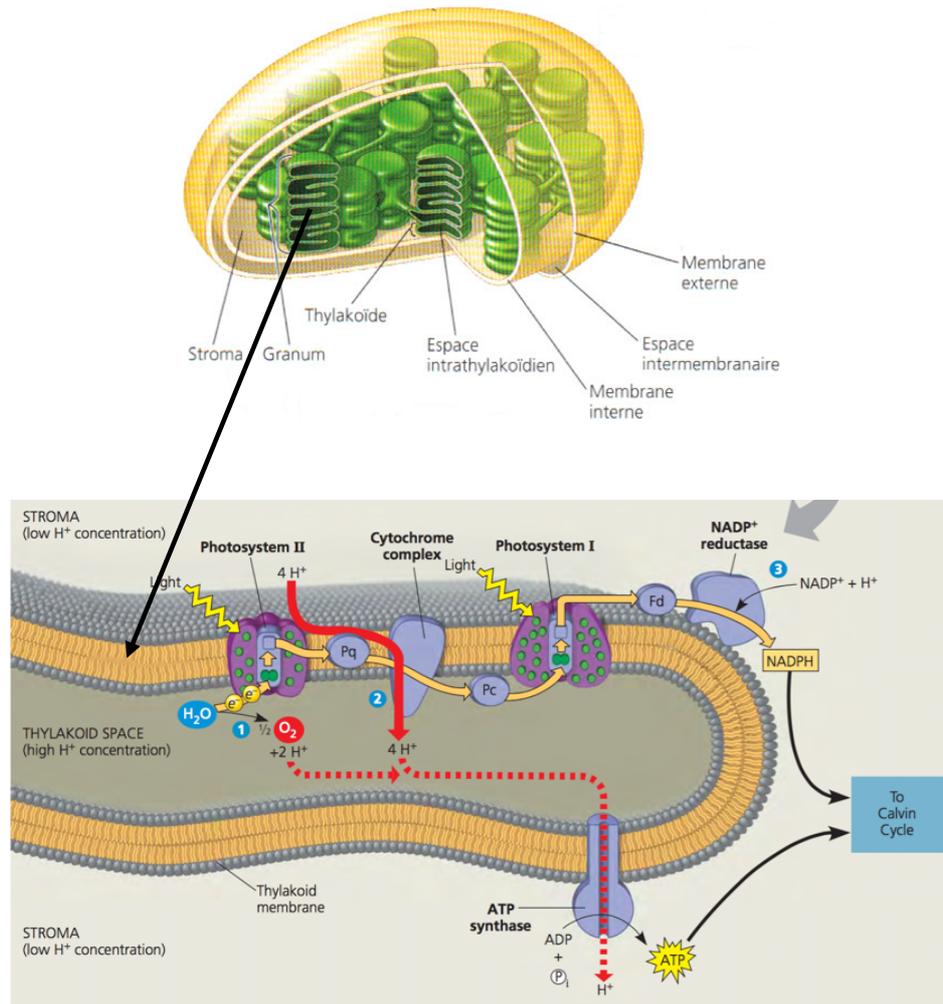
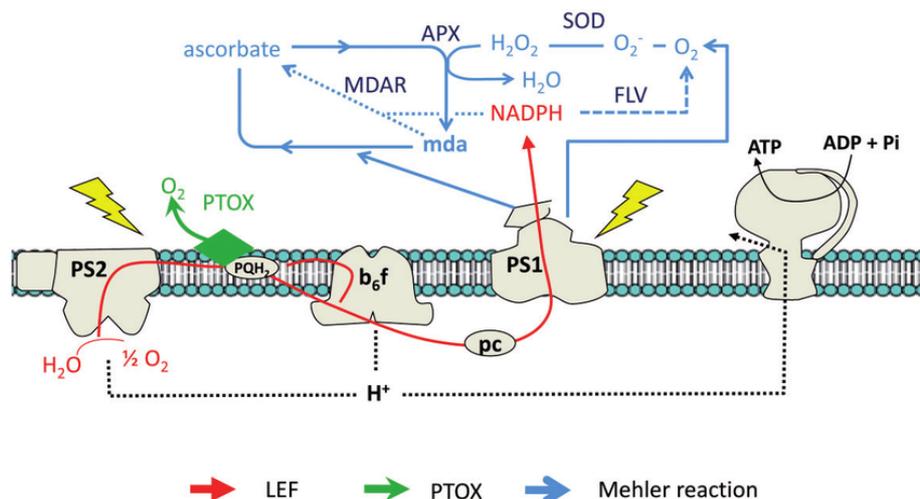


Figure 3: Structure d'un chloroplaste (image supérieure) et de ses thylakoïdes et transferts des protons entre le stroma et le lumen (image inférieure), modifié à partir de (Reece et al., 2012)



→ LEF → PTOX → Mehler reaction

Figure 4: Réaction de Mehler. LEF : flux linéaire d'électron ; SOD : superoxide dismutase ; APX : ascorbate peroxidase ; mda : monodehydroascorbate (Curien et al., 2016). La plastid terminal oxidase (PTOX) est aussi reprise sur ce schéma, mais n'intervient pas dans la réaction de Mehler.

Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors de la phase claire et dommages

Cependant, l'oxygène, produit par la photosynthèse et provenant du milieu, accepte facilement de l'énergie ou des électrons, ce qui forme des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Fig. 5 et 6). De l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est continuellement produit au niveau du photosystème II par un transfert d'énergie de la chlorophylle excitée (Krieger-Liszky, 2005; Triantaphylidès & Havaux, 2009). Si le dioxyde de carbone est limité, la réaction de Mehler forme des ions superoxydes, rapidement transformés en H_2O_2 par la SOD (Asada et al., 2000). Le peroxyde d'hydrogène peut ensuite être transformé en eau par l'APX (Asada et al., 2000), mais, s'il y a des métaux de transition, il peut aussi être réduit en radical hydroxyle, la ROS la plus réactive (Apel & Hirt, 2004) par la réaction de Fenton. De plus, lorsque la photorespiration a lieu, du glycolate est transporté vers les peroxysomes et son oxydation génère aussi du H_2O_2 (Del Río, Sandalio, Corpas, Palma, & Barroso, 2006). Ces réactions ont lieu lors de la phase claire de la photosynthèse. La nuit, c'est plutôt la respiration mitochondriale qui génère des ions superoxydes aux complexes I et III (Møller, 2001).

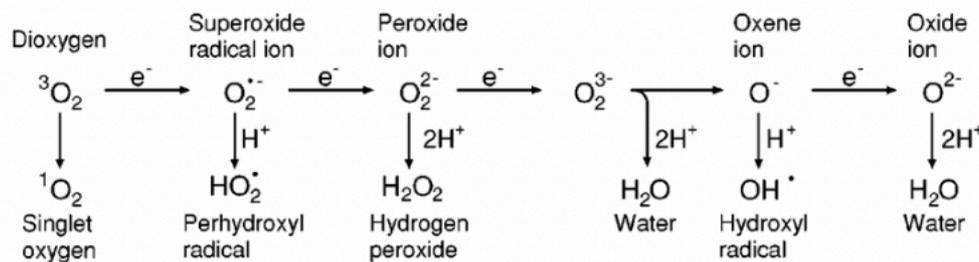


Figure 5: Réactions de production des différentes ROS (Rodriguez & Redman, 2005)

L'oxygène singulet cause des dommages au niveau des pigments, et principalement au niveau du β -carotène, situé exclusivement dans les centres réactionnels des photosystèmes. Chaque double liaison du β -carotène peut être oxydée par $^1\text{O}_2$ et former des apocaroténoïdes, sous forme d'aldéhydes et des cétones. Mais la réaction avec $^1\text{O}_2$ forme aussi des époxydes et des endoperoxydes. La plupart des produits d'oxydation des caroténoïdes par les ROS sont des espèces réactives électrophiles, attirées par les atomes nucléophiles tels que le soufre et l'azote (Havaux, 2014).

L'ion superoxyde est modérément réactif, et cause principalement des dommages aux protéines. Il peut à la fois oxyder les protéines (comme des déshydrogénases) ou les réduire (comme par exemple le cytochrome C).

Le peroxyde d'hydrogène est également modérément réactif, mais il est plus stable et il peut migrer dans la cellule. Cette ROS oxyde principalement les protéines, surtout au niveau des cystéines et des méthionines.

Les radicaux hydroxyles sont solubles dans l'eau, très mobiles et très réactifs. Ils s'attaquent à toutes les biomolécules présentes dans les quelques nanomètres de leur lieu de production. Ils peuvent par exemple réagir avec les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés et initier la peroxydation des lipides en enlevant un hydrogène d'un acide gras. Cet acide gras radical réagit rapidement avec de l'oxygène pour former un peroxy radical, qui enlève un hydrogène sur un autre acide gras, propageant ainsi la peroxydation. Seul l'ajout de composés

hydrogénés, telle que la vitamine E, peut stopper cette chaîne de peroxydation (Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014)

Les cellules végétales ont élaboré plusieurs stratégies de défense contre le stress oxydant. D'abord enzymatiques avec la SOD, les catalases (CATs) qui transforment H_2O_2 directement en H_2O et O_2 dans les peroxysomes (Halliwell, 2015), l'APX des chloroplastes qui permet de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau grâce à l'oxydation de l'ascorbate (Asada, 1999), et la glutathione peroxidase (GPX) qui utilise le glutathion comme réducteur pour la réduction de H_2O_2 dans le cytosol (Apel & Hirt, 2004).

Les autres défenses sont non-enzymatiques et reprennent l'acide ascorbique et le glutathion, qui peuvent réduire directement les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles et le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène singulet ; les tocophérols liposolubles, réducteurs de l'oxygène singulet et principaux inhibiteurs de la peroxydation des lipides ; et les caroténoïdes agissant dans le cycle des xanthophylles (Halliwell, 2015; Triantaphylidès & Havaux, 2009). Certains caroténoïdes modifiés sont spécifiques de la ROS qui a été générée (par exemple, les endoperoxydes des caroténoïdes sont spécifiquement générés en présence d'oxygène singulet) (Havaux, 2014).

Lorsque la quantité de ROS produites dépasse les capacités défensives, les cellules synthétisent habituellement plus d'antioxydants et de protéines de défense (contre le choc thermique par exemple) lorsque le stress oxydatif est modéré. Par contre, un stress plus sévère peut conduire à des dommages cellulaires. L'ADN, principalement chloroplastique et mitochondrial, peut être oxydé par les radicaux hydroxyles au niveau des sucres ou des bases azotées, ce qui implique des délétions ou des mutations, souvent sur un seul brin (Imlay, 2003; Møller, Jensen, & Hansson, 2007). Les protéines peuvent aussi être altérées et perdre leur fonction suite à leur oxydation. C'est particulièrement problématique pour celles qui sont impliquées dans des processus métaboliques essentiels, telles que la Rubisco, D1,... (Møller & Kristensen, 2004). La peroxydation des acides gras polyinsaturés est un autre dommage causé principalement par l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles. Les produits de dégradation semblent être spécifiques à la ROS générée (Farmer & Mueller, 2013). Enfin, le métabolisme des ions peut être altéré par désactivation de gènes de transporteurs ou des transporteurs eux-mêmes, ou bien en conséquence d'une modification du gradient électrochimique générée par un dommage cellulaire. Par exemple, une augmentation du calcium intracellulaire peut endommager l'ADN en activant des endonucléases, abîmer les membranes en activant la phospholipase A2, et trouser la membrane interne des mitochondries, libérant ainsi des initiateurs d'apoptose (Orrenius, Gogvadze, & Zhivotovsky, 2007; Orrenius, Zhivotovsky, & Nicotera, 2003; Salido, 2007).

Les ROS induisent aussi des modifications de l'expression génétique nucléaire. Elles agissent donc comme molécules signal, mais on ne sait pas encore comment. Elles oxydent peut-être des facteurs de transcription, des composants de voies de signalisation, ou bien activent des cascades de signalisation menant à l'expression génique (Apel & Hirt, 2004).

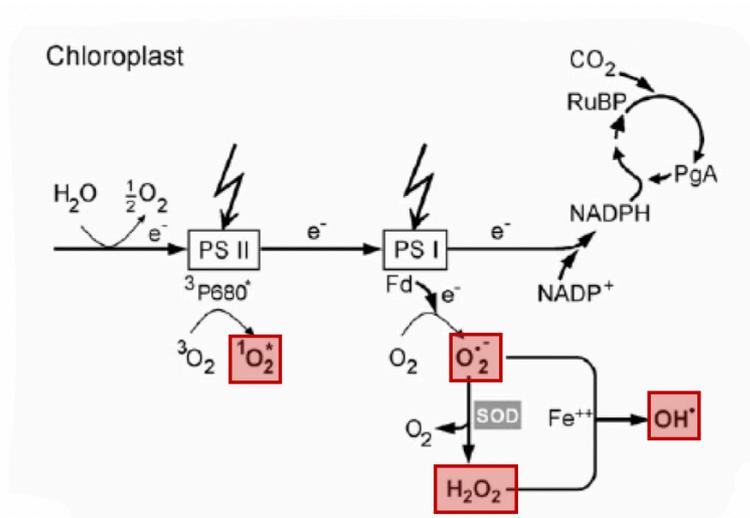


Figure 6: Sites des production des ROS lors de la phase claire de la photosynthèse, modifié à partir de (Laloi, Przybyla, & Apel, 2006)

1.3 Le blanchissement corallien, et le stress oxydant qui en serait à la base

On parle de blanchissement corallien lorsque la symbiose entre les Symbiodiniaceae et leur hôte est rompue, soit par la perte des algues, soit par la perte de leurs pigments. Ce phénomène a lieu lors d'un stress sévère (changement de salinité, pollution, irradiation lumineuse importante, hausse ou baisse importante de la température) (Goreau 1964; Fabricius 2005; Banaszak and Trench 1995; Iglesias-Prieto et al. 1992; Steen and Muscatine 1987), et induit la perte de coloration du corail, ce qui rend son endosquelette calcaire visible, d'où le nom de « blanchissement » (Fig. 7).

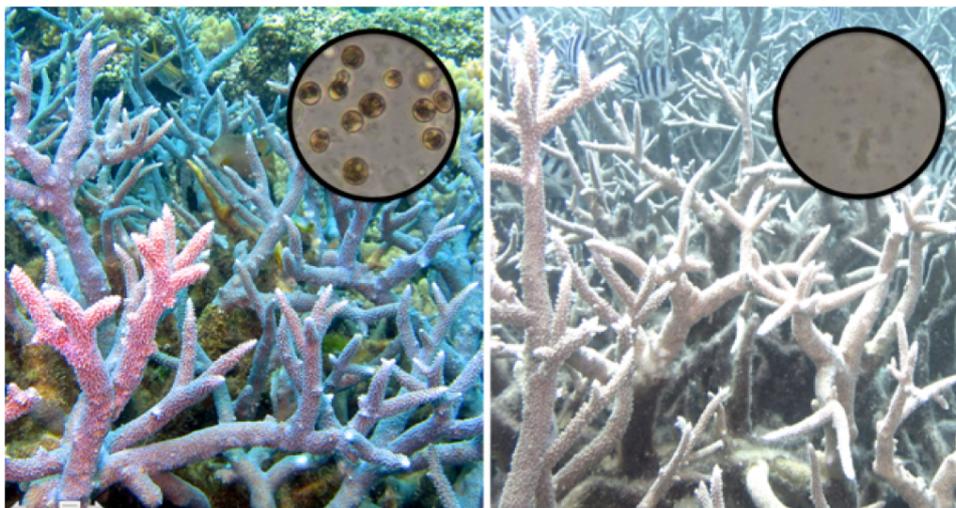


Figure 7: Blanchissement corallien : perte des Symbiodiniaceae (Mondialisation, 2018)

Le blanchissement est corrélé avec un dysfonctionnement de la photosynthèse des Symbiodiniaceae, principalement dans le cas d'une hausse des températures. En effet, une température élevée inhibe l'activité de la Rubisco (Jones et al., 1998; Leggat, Whitney, & Yellowlees, 2004), ce qui diminue l'absorption des électrons par le $NAD(P)^+$, et induit donc des

dommages au niveau du photosystème II et particulièrement de la protéine D1 (Hill, Larkum, Frankart, Kühl, & Ralph, 2004; D. J. Smith, Suggett, & Baker, 2005; Warner, Fitt, & Schmidt, 1999). De plus, une température élevée en plus d'une forte lumière impacte la structure de la membrane des thylakoïdes, ce qui empêche le flux linéaire correct des électrons (Tchernov et al., 2004). Par ailleurs, il semblerait qu'une température légèrement élevée inhibe les systèmes de réparation du photosystème II (Murata et al., 2007; Takahashi & Murata, 2008; Takahashi et al., 2004; Takahashi, Whitney, & Badger, 2009).

Ces événements impliquent un excès d'énergie non-canalitée, qui finit par produire de l'oxygène singulet (Apel & Hirt, 2004) et des ions superoxydes (Jones et al., 1998; Suggett et al., 2008; Tchernov et al., 2004), transformés en peroxyde d'hydrogène, et en radicaux hydroxyles en cas de présence de métaux de transition (Asada, 1999; Lesser, 2006; Niyogi, 1999). Les défenses anti-oxydantes sont dépassées en cas de production trop élevée de ROS, comme après 2h d'exposition à 33°C (Roberty et al., 2015). L'oxygène singulet, s'il n'est pas maîtrisé par des caroténoïdes ou du tocophérol, peut abîmer le photosystème II et détruire les pigments (Krieger-Liszkay, 2005). Les radicaux hydroxyles causent des dommages au niveau des membranes, des protéines et de l'ADN. De plus, l'H₂O₂ peut diffuser et atteindre la cellule animale (Downs et al., 2002; Flores-Ramírez & Liñán-Cabello, 2007; Suggett et al., 2008; Tchernov et al., 2004). Certains chercheurs pensent que les ions superoxydes générés par les mitochondries et l'H₂O₂ de l'hôte et des symbiotes activent le facteur de transcription NF-κB, lui-même activant l'expression de gènes pro-apoptotiques ou du gène de la nitric oxide synthase (Perez & Weis, 2006; Weis, 2008). Cette enzyme produit du NO, qui, si elle se combine aux ions superoxydes, peut former le peroxyde nitrite, molécule très réactive qui endommage la membrane mitochondriale et laisse s'échapper des molécules pro-apoptotiques. D'autres chercheurs suggèrent que les ROS et les espèces réactives de l'azote (RNS) modifient la calmoduline, et induisent ainsi la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (Desalvo et al., 2008). Ce calcium initierait, entre autres, la mort cellulaire.

Finalement, les cellules animales meurent par apoptose ou par nécrose si le stress est plus violent, ou bien les Symbiodiniaceae sont digérées, exocytées, ou empaquetées dans une petite portion de la cellule animale pour être expulsées ; on a également remarqué que les cellules animales du gastroderme pouvaient se détacher entièrement (Dunn, Schnitzler, & Weis, 2007; Gates, Baghdasarian, & Muscatine, 1992; Lesser, 2004; Weis, 2008).

Le blanchissement prive le cnidaire de sa principale source d'énergie, ce qui diminue sa croissance, sa reproduction, et augmente sa sensibilité aux stress et aux maladies. Il s'ensuit alors une mortalité importante si le facteur de stress à l'origine du phénomène ne s'arrête pas rapidement (McClanahan et al., 2009). Cependant, quelques espèces de scléactiniaires peuvent survivre, et réacquies un nombre suffisant de Symbiodiniaceae mieux adaptées aux nouvelles conditions, qu'elles viennent du milieu ou qu'elles aient été déjà présentes en petite quantité dans les tissus de l'animal lorsque le stress est apparu. Par ailleurs, des modifications physiologiques de l'hôte et/ou du symbiote peuvent permettre aux coraux de mieux survivre à certains stress.

1.4 Rôle du préconditionnement dans les mécanismes de tolérance au stress

Plusieurs expériences ont montré que, chez certains organismes, il est possible d'améliorer la résistance face à un stress lié à la production de ROS en exposant l'organisme à une de ces ROS afin de le preconditionner. Un tel traitement peut, par exemple, initier la production des molécules antioxydantes afin qu'elles soient présentes en plus grand nombre lorsque survient un stress plus important.

Plusieurs chercheurs ont déjà montré que certains coraux ou que certaines Symbiodiniaceae pouvaient être acclimatés, voire s'adapter, à une augmentation de température. Par exemple, une exposition de 8 jours à une température inférieure de 3°C à celle induisant le blanchissement modifie l'expression de plusieurs gènes chez *Acropora millepora* (Bellantuono, Granados-Cifuentes, Miller, Hoegh-Guldberg, & Rodriguez-Lanetty, 2012). Le corail exprime en quantité plus importante des gènes contre le stress oxydant, comme un homologue de transporteur d'électrons (*electron transferring alpha polypeptide*) et une enzyme à activité antioxydante (*oxidase peroxidase*). De plus, une voie de signalisation de l'apoptose est inhibée. Une autre étude a montré que les Symbiodiniaceae pouvaient réparer leurs photosystèmes plus rapidement, et synthétisaient plus de xanthophylles lorsque les *Acropora aspera* dans lesquelles elles se trouvaient étaient soumises à 31°C pendant 48h, une ou deux semaine(s) avant d'être exposés à 34°C, une température connue pour induire le blanchissement (Middlebrook, Hoegh-Guldberg, & Leggat, 2008). Une expérience d'évolution assistée a permis, sur 2,5 ans, de sélectionner des génotypes de Symbiodiniaceae capables de mieux tolérer une température de 31°C (Chakravarti, Beltran, & van Oppen, 2017). Ces cellules présentaient une meilleure performance photophysiological ainsi qu'un meilleur taux de croissance. Les chercheurs ont augmenté très lentement la température d'incubation à partir de 27°C, et ont sélectionné les populations qui présentaient le meilleur taux de croissance à chaque changement de température.

Hawkins et Warner (Hawkins & Warner, 2017) ont montré qu'une acclimatation thermique d'*Exaiptasia pallida* à 30°C pendant 7 semaines permettait d'amoindrir la diminution du rapport photosynthèse/respiration algale et de la densité de symbiontes lorsque les anémones étaient soumises à un choc thermique de 33°C. Le preconditionnement a également permis de retarder de 3-4 jours, mais pas d'empêcher, les dommages engendrés par le choc thermique au niveau de l'appareil photosynthétique.

Chez les plantes (Hossain et al., 2015), un pré-traitement des graines de concombres (*Cucumis sativus*) et de tomates (*Solanum lycopersicum*) induit une augmentation de l'activité de l'APX. Les herbacées *Lolium perenne* et *Festuca arundinacea* augmentent l'activité de leurs APX, GPX, CATs, ainsi que la quantité d'acide ascorbique et de glutathion (principalement sous la forme GSSG avec un pont disulfure) lorsqu'elles sont preconditionnées au peroxyde d'hydrogène.

Par ailleurs, un preconditionnement thermique du maïs induit un pic d' H_2O_2 dans les graines, ainsi qu'une meilleure survie (diminution de la perte d'électrolytes par les racines et maintien de la vitalité des coléoptiles) face à un stress salin, thermique, ou lié à une sécheresse. De plus, un pré-traitement à l' H_2O_2 de souches de riz sensibles au sel augmente leur résistance face à un stress thermique. Il semblerait que tous ces stress soient liés à la production de ROS, et

qu'un préconditionnement à une température élevée ou à l'eau oxygénée puisse améliorer la résistance face à l'un de ces stress.

Les mécanismes ne sont pas encore établis avec certitude, mais les chercheurs pensent que l' H_2O_2 pourrait agir sur des voies de signalisation en oxydant des protéines, y compris le glutathion, au niveau des résidus cystéines et/ou oxyder des facteurs de transcription de protéines de stress thermique et/ou induire l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, et l'activation d'enzyme Ca^{2+} -dépendantes, telle que la catalase CAT3 (Hossain et al., 2015). En outre, certains facteurs de transcription en doigts de Zinc sont up-régulés chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à une exposition au H_2O_2 .

Ledford et ses collègues (Ledford, Chin, & Niyogi, 2007) ont montré que la chlorophycee *Chlamydomonas reinhardtii* pouvait être préconditionnée avec de l'oxygène singulet. En effet, en ajoutant entre 0,25 et 2 μ molaires de rose bengal, un colorant xanthénique produisant de l'oxygène singulet lorsqu'il est exposé à la lumière, les microalgues pouvaient croître par la suite sur un milieu avec entre 6 et 12 μ molaires de colorant, alors que les algues non-préconditionnées n'en étaient pas capables. Le préconditionnement ne fonctionnait pas si les algues n'avaient pas été exposées à la lumière, ce qui prouvait que ce n'était pas le rose bengal qui permettait l'acclimatation mais bien l'oxygène singulet produit par le rose bengal suite à son activation par la lumière. Cependant, l'acclimatation était à court terme étant donné qu'elle n'agissait plus 24h après que les algues aient été préconditionnées, soumises à la dose challenge, puis rincées. Ce préconditionnement permettait aux algues de mieux résister au stress causé par l'ajout de rouge neutre étant donné que cet autre colorant produit aussi de l'oxygène singulet. Par contre, il ne permettait pas d'augmenter la résistance vis-à-vis d'autres espèces réactives de l'oxygène, telles que le peroxyde d'hydrogène ou l'ion superoxyde (généralisé par un traitement au métronidazole par exemple). Ainsi, les gènes de la GPX et d'une thiorédoxine cytosolique étaient up-régulés, mais pas les gènes codant pour la SOD.

1.5 Objectifs

Le réchauffement climatique menace actuellement les récifs coralliens. Cependant, plusieurs études ont déjà montré qu'un préconditionnement thermique peut améliorer la survie des coraux et de leurs algues symbiotiques (Bellantuono et al., 2012; Middlebrook et al., 2008). De plus, on sait que l'augmentation de la température est liée à une production accrue de ROS au sein des Symbiodiniaceae. Il serait donc intéressant d'essayer de préconditionner ces algues à l'aide de produits chimiques induisant la formation directe de ROS au sein des cellules, et d'observer les effets des différentes ROS. Ainsi, de la Menadione Sodium Bisulfite (MSB) et du 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée (DCMU) peuvent être utilisés pour produire respectivement de l' $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/\bullet OH$ et du 1O_2 (voir partie « Traitements expérimentaux » du Matériel et Méthodes). L'espèce de Symbiodiniaceae utilisée sera la *Breviolum minutum* étant donné que c'est un organisme souvent étudié dans le cadre des expériences sur les algues symbiotiques des cnidaires.

Objectif 1 : déterminer si les *Breviolum minutum* sont capables d'être préconditionnées par la production directe de ROS grâce à l'ajout de produits chimiques prooxydants. Si c'est possible, tenter d'identifier les mécanismes antioxydants utilisés.

Par ailleurs, les ROS réagissent avec les biomolécules, dont les lipides membranaires et les pigments (Ayala et al., 2014; Havaux, 2014). Il serait intéressant de déterminer quels produits de dégradation des pigments et des acides gras sont obtenus chez les *B. minutum* suite à la production de ROS, produits qui pourraient éventuellement être utilisés comme molécules signal.

Objectif 2 : déterminer, au moins en partie, quelles dégradations lipidiques et/ou pigmentaires les ROS engendrent chez les *B. minutum*.

Actuellement, on pense que plusieurs processus sont associés avec la production de ROS, tels que l'augmentation de la température, la défense contre des agents pathogènes (Apel & Hirt, 2004)... Cependant, on ne sait souvent pas laquelle (lesquelles) de ces ROS est (sont) produite(s). L'identification de produits de dégradation lipidiques et/ou pigmentaires spécifiques d'une ROS pourrait donc être utile dans l'avenir afin d'associer un processus à la production d'une ROS en particulier chez *B. minutum*.

Objectif 3 : Identifier les produits de dégradation lipidiques et/ou pigmentaires spécifiques d'une ROS afin de pouvoir utiliser ces biomarqueurs lors de futures expériences.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1 Matériel biologique : souche et conditions de culture

L'espèce de Symbiodiniaceae étudiée est *Breviolum minutum* (souche SSB01), qui a été isolée initialement à partir d'anémones d'*Exaiptasia pallida* (clône H2), une espèce d'anémone de mer tropicale. Les microalgues ont été cultivées dans du F/2, un milieu liquide à base d'eau de mer artificielle autoclavée à laquelle ont été ajoutés

- NaNO_3 ($8,82 \times 10^{-4}$ M),
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($3,62 \times 10^{-5}$ M),
- des métaux traces :

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5}$ M
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5}$ M
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$3,93 \times 10^{-8}$ M
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,60 \times 10^{-8}$ M
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$7,65 \times 10^{-8}$ M
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4,20 \times 10^{-8}$ M
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$9,10 \times 10^{-7}$ M

- des vitamines :

Thiamine HCl (vit. B ₁)	$2,96 \times 10^{-7}$ M
Biotine (vit. H)	$2,05 \times 10^{-9}$ M
Cyanocobalamine (vit. B ₁₂)	$3,69 \times 10^{-10}$ M

L'eau de mer artificielle était faite à base d'eau désionisée et de sels pour aquarium avec 420 ppm de Calcium et 1370 ppm de Magnésium (Colombo, Pays-Bas), ajoutés de manière à atteindre une salinité d'environ 34g kg^{-1} .

Les microalgues étaient maintenues en milieu stérile dans des erlenmeyers autoclavés à bouchons filtrant favorisant les échanges gazeux, et tout prélèvement avait lieu sous une hotte à flux laminaire, à l'aide de pipettes sérologiques stériles.

Les cultures de *B. minutum* étaient placées dans une chambre de croissance I-36LLX (Percival, USA), dans des conditions permettant une croissance optimale :

- $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$,
- alternance lumière-obscurité de 12h-12h,
- intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$,
- tubes fluorescents bleus Lumivie SM-T8, 25 000 °K (Aquavie, France),
- tubes fluorescents blancs Grolux T8, 18W (Sylvania, Allemagne)

Lors de toutes les expériences, les cellules ont été prélevées dans des cultures de concentration cellulaire comprise entre 200 000 et 600 000 cellules mL^{-1} , correspondant à la phase exponentielle de croissance, comme illustré sur la Figure 21 des Résultats. Le début de la phase exponentielle a été défini comme étant la période pendant laquelle le logarithme en base 10 augmentait de façon linéaire.

Le taux de croissance a été calculé comme suit : $(\log_{10}(\text{jour 11}) - \log_{10}(\text{jour 0}))/11$.
Le temps de doublement de la biomasse équivaut à $\log_{10}(2)/\text{taux de croissance}$.

2.2 Dosage de la biomasse

La quantité cellulaire dans les cultures était évaluée soit par comptage cellulaire, soit par dosage des chlorophylles.

Comptage cellulaire

Un volume déterminé de culture était prélevé et mélangé à 10 mL d'isoton (solution filtrée d'eau déminéralisée avec 9 g L^{-1} NaCl et 0,5% v/v de formaldéhyde), et le nombre de cellules d'une taille comprise entre $4,8 \mu\text{m}$ et $15 \mu\text{m}$ était compté par un Z2 Coulter Counter (Beckman Coulter).

Dosage des chlorophylles

Un volume déterminé de culture était centrifugé dans une centrifugeuse MicroStar 17 (VWR, Belgique) à $17\,000 \times g$, et le surnageant était enlevé. Le culot contenant les cellules était resuspendu dans 1,5 mL de méthanol 100%, et combiné avec 250 μL billes de verre de 1 mm de diamètre (Sigma-Aldrich, USA). Ces solutions étaient ensuite placées dans un Tissue Lyser II (Qiagen, Allemagne) et vortexées à 30 Hz afin d'extraire les pigments dans le méthanol. Elles étaient ensuite centrifugées à $17\,000 \times g$ avec la centrifugeuse MicroStar 17 afin de culoter les débris cellulaires, et ne laisser que les pigments dans le surnageant. Ce dernier était placé dans un spectromètre, et les absorbances à 632 nm et 665 nm étaient mesurées.

La concentration en chlorophylles (en $\mu\text{g mL}^{-1}$) était calculée grâce aux équations définies pour les dinophytes:

$$[\text{Chl-}a] = 13,6849 \times A_{665} - 3,4551 \times A_{632}$$

$$[\text{Chl-}c_2] = 32,9371 \times A_{632} - 7,014 \times A_{665}$$

2.3 Méthodes

L'effet des différents traitements a été évalué à plusieurs niveaux : la capacité photosynthétique des organismes, leur production de ROS, ainsi que leur contenu pigmentaire et lipidique.

Capacité photosynthétique : Fluorescence des chlorophylles

La capacité photosynthétique peut être approximée par la fluorescence émise par les molécules de chlorophylle. En effet, lorsque les chlorophylles reçoivent de la lumière, elles la convertissent en photochimie (transfert d'électrons), mais aussi en émission de chaleur et de lumière (fluorescence).

Une caméra Speedzen JBeamBio a été utilisée pour mesurer la fluorescence émise par les chlorophylles contenues dans les échantillons et indirectement l'activité photosynthétique (Fig. 8) (Johnson et al., 2009). D'abord, une lumière non-actinique était projetée sur les microalgues. Elle était assez faible pour induire une légère fluorescence des chlorophylles, mais pas assez forte pour engendrer une séparation de charge au niveau des centres réactionnels ; ainsi, tous les centres réactionnels étaient ouverts (réduits). La fluorescence mesurée est minimale, et appelée « F_0 ».

Ensuite, un pulse saturant de $3200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($3200 \mu\text{E}$) était appliqué sur les échantillons, assez fort pour fermer (oxyder) tous les centres réactionnels, mais trop court pour initier le transport d'électrons le long de la membrane thylakoïdienne. La fluorescence alors émise, appelée « F_M », était maximale, et l'on pouvait ainsi évaluer le rendement photochimique maximum, soit la capacité photosynthétique maximale.

Par la suite, trois autres pulses saturants de $20 \mu\text{s}$ étaient appliqués sur les échantillons à 1 minute d'intervalle chacun. Entre chaque pulse, une lumière rouge de $230 \mu\text{E}$ était appliquée aux algues. La fluorescence était mesurée avant et pendant chaque pulse saturant. La lumière rouge permettait qu'une certaine proportion de centres réactionnels soient, en moyenne, fermés. La fluorescence mesurée entre les 3 derniers pulses saturants était appelée « F », et celle émise lors de l'exposition au dernier pulse était appelée $F_{m'}$.

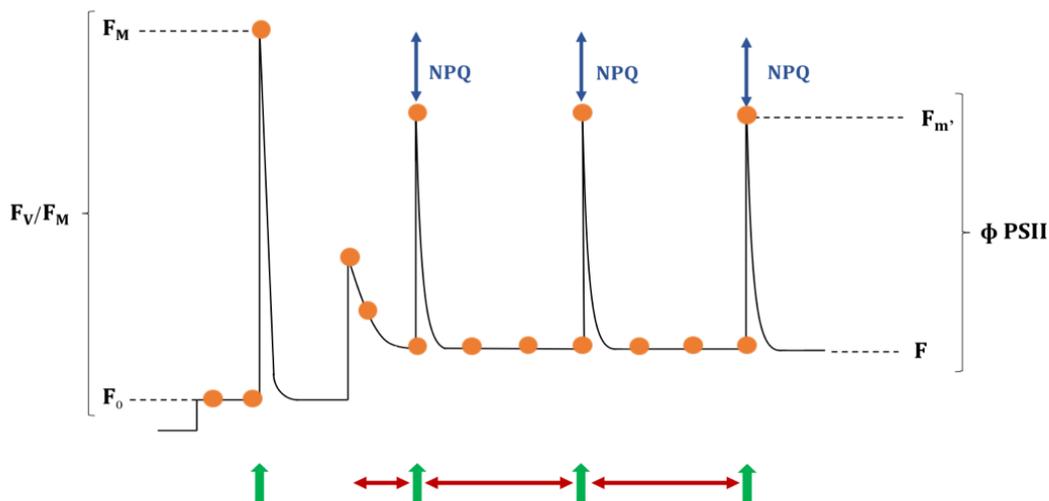


Figure 8: Schéma illustrant l'émission de fluorescence des microalgues telle qu'elle pourrait être mesurée par un PAM classique (Fluorimètre fonctionnant avec une lumière analytique modulée, capable de mesurer la fluorescence de la chlorophylle d'un échantillon) dans les mêmes conditions d'illumination que dans la caméra Speedzen :

↑ : pulse saturant

↔ : lumière actinique

NPQ : « Non Photochemical Quenching », rendement d'extinction non photochimique

$$F_V/F_M = \frac{F_M - F_0}{F_M}$$

$$\phi \text{ PSII} = \frac{F_{m'} - F}{F_{m'}}$$

Deux valeurs sont communément utilisées pour quantifier l'activité photosynthétique : il s'agit du rendement photochimique maximum (F_V/F_M), et du rendement photochimique effectif (Φ_{PSII}).

F_V/F_M	=	$(F_M - F_0)/F_M$
Φ_{PSII}	=	$(F_{m'} - F)/F_{m'}$

Le F_V/F_M donne une idée de la capacité photosynthétique maximale, alors que le Φ_{PSII} approxime la capacité photosynthétique effective, résultant des effets du NPQ.

Le programme de la caméra Speedzen permet de visualiser F_V/F_M et Φ_{PSII} sur des images en fausses couleurs (Fig. 9).

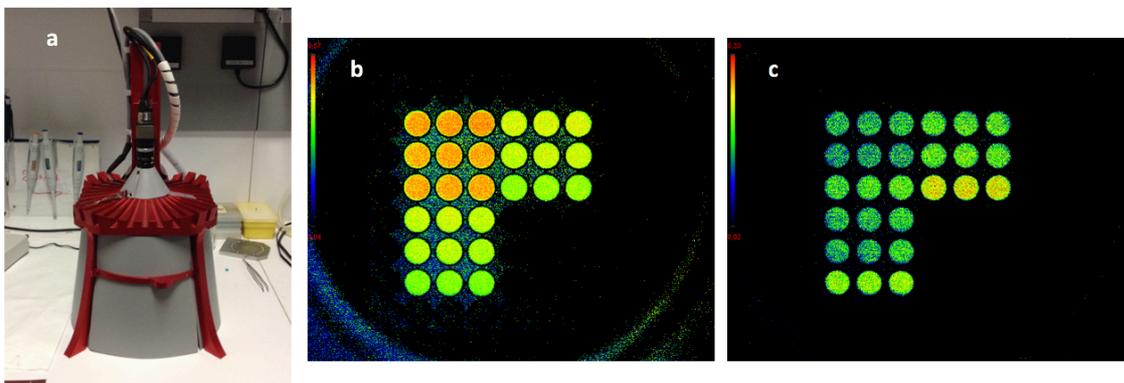


Figure 9: Mesure des capacités photosynthétiques : a. caméra Speedzen ; b. image en fausses couleurs du F_V/F_M ; c. image en fausses couleurs du Φ_{PSII}

Production de ROS

La production de ROS a été mesurée grâce à deux méthodes.

- La première a consisté à incuber les cellules avec du 5-(6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy- H_2DCFDA , Molecular Probes, Invitrogen), une molécule qui, modifiée par les estérases cellulaires et oxydée (notamment par les ROS), émet de la fluorescence dans des longueurs d'onde comprises entre 517 et 527 nm lorsqu'elle est excitée à 485 nm (Figure 10). Cette sonde est située principalement dans le cytosol. Elle réagit rapidement avec $\bullet OH$, et plus lentement H_2O_2 et $O_2^{\bullet -}$.

Afin de charger la sonde, les cellules étaient centrifugées pour ensuite être resuspendues dans un tampon de charge F/2 + acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) + carboxy- H_2DCFDA (en solution dans de l'éthanol 100%) de telle sorte que les concentrations finales en DTPA et carboxy- H_2DCFDA soient de 150 μM et 25 μM respectivement. Le DTPA, un agent chélatant, était utilisé pour éviter la formation de radical hydroxyle extracellulaire, en inhibant la réaction entre le fer et le peroxyde d'hydrogène. Les cellules étaient incubées 30 minutes à l'obscurité, puis recentrifugées pour remplacer le tampon de charge par du F/2 + DTPA afin d'éviter

que du carboxy-H₂DCFDA extracellulaire ne réagisse avec le H₂O₂ émis par les algues avant d'avoir soumis les cellules à un traitement pro-oxydant. Les cellules étaient ensuite mélangées soit avec une molécule pro-oxydante, soit avec du F/2. La fluorescence émise par la sonde était ensuite mesurée par un spectrofluorimètre Synergy Mx (Biotek, USA).

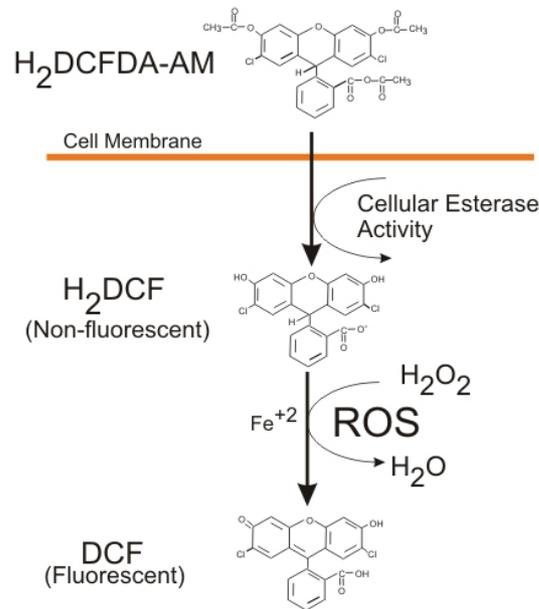


Figure 10: Mécanisme de détection des ROS par la sonde H₂DCFDA. Schéma tiré du site de la marque Biotek (USA) (*An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells*, 2014)

- La deuxième méthode a consisté à utiliser de la L-histidine, acide aminé capable de réagir avec l'oxygène singulet (Fig. 11). La différence entre la production d'oxygène moléculaire sans ajout d'histidine et avec ajout d'histidine permet donc d'évaluer la quantité d'oxygène singulet produit. Une certaine quantité de L-histidine était dissoute dans du F/2 afin que la concentration après ajout dans la solution cellulaire soit de 6 mM. Deux sondes à oxygène optiques OXROB3 (Pyroscience, Allemagne), reliées à un boîtier Firesting O₂ 4 channels (Pyroscience, Allemagne), étaient ensuite utilisées pour mesurer la différence de production d'oxygène moléculaire entre une solution sans histidine et une solution avec histidine.

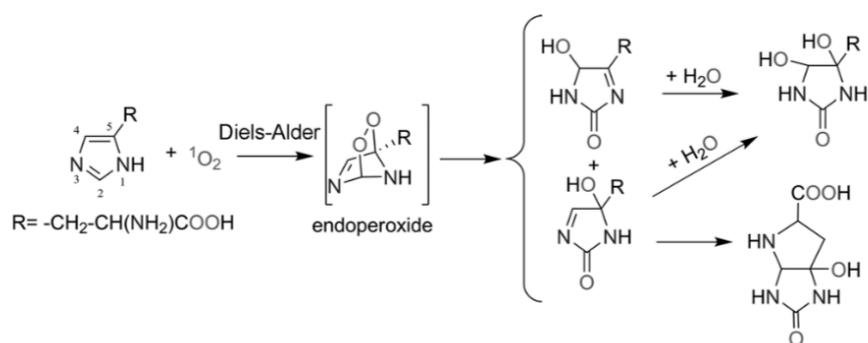


Figure 11: Réaction entre l'oxygène singulet et l'histidine. Schéma tiré de (Méndez-Hurtado et al., 2012) . La réaction entre l'histidine et l'oxygène singulet permet de calculer la quantité d' 1O_2 produite par un traitement (par exemple l'ajout de DCMU) en mesurant l'oxygène à l'aide d'une sonde, et en comparant cette mesure à ce qui est mesuré dans une solution de cellules contrôles.

Contenu pigmentaire et lipidique

L'analyse du contenu pigmentaire et lipidique avec ou sans traitement par une molécule pro-oxydante a été réalisée par HPLC et GC-MS.

Le contenu pigmentaire des B. minutum a été analysé par HPLC.

Les pigments ont été extraits dans du méthanol 100%, avant d'être analysés par HPLC en phase reverse, utilisant le système Shimadzu Prominence HPLC et comprenant une unité de dégazage DGU-20A5R, un chromatographe en phase liquide LC-20AT, un échantillonneur automatique SIL-20AC, un four à colonne CTO-10ASVP et un détecteur à barrettes de diode SPD-M20A (Shimadzu, Japon). La colonne utilisée est la Nova Pak C18, 60A, avec une longueur de 150 mm et un diamètre de pore de 4 μ m.

Pour chaque échantillon, la colonne a été éluée avec la phase mobile suivante (1mL min⁻¹) :

Tableau 1: Description de l'éluion du système HPLC Shimadzu Prominence

Durée d'éluion (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Solvant C (%)
0 -> 0,5	100 -> 0	0 -> 100	0
0,5 -> 1,1	0	100 -> 90	0 -> 10
1,1 -> 6,1	0	90 -> 65	10 -> 35
6,1 -> 11,5	0	65 -> 40	35 -> 60
11,5 -> 15	0	40 -> 0	60 -> 100
15 -> 17	0 -> 100	0	100 -> 0
17 -> 23	100	0	0

Solvant A: 80% (v/v) méthanol et 20% acétate d'ammonium 100 mM

Solvant B : 90% (v/v) acétonitrile dans l'eau

Solvant C : 100% (v/v) éthylacétate

Le chromatogramme d'absorbance a été détecté à 430 nm, et quantifié après passage de standards de pigments de chlorophylle-*a*, chlorophylle-*c*₂, péridinine, diadinoxanthine, diatoxanthine, β -carotène provenant de chez DHI (Horstholm, Danemark).

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Labsolutions (Shimadzu).

Les temps de rétention des différents pigments ainsi que leur(s) maximum d'absorption sont repris dans de Tableau 2.

Tableau 2: Temps de rétention dans l'HPLC et maximum d'absorbance des différents pigments de *B. minutum*

Pigment	Temps de rétention (min)	Maximum d'absorbance (nm)
Chlorophylle-c₂	3.68 ± 0.01	445, 630
Péridinine	4.12 ± 0.00	472
Cis-péridinine	5.23 ± 0.01	330, 467
Diadinoxanthine	6.13 ± 0.01	427, 447, 476
Diatoxanthine	7.20 ± 0.01	427, 452, 480
Chlorophylle-a	10.74 ± 0.01	430, 662
β-carotène	14.10 ± 0.01	454, 480

Le contenu en acides gras des B. minutum a été déterminé par GC-MS (collaboration avec le professeur G. Eppe)

L'équivalent de 20 millions de cellules de *B. minutum* a été prélevé. Le culot contenant les cellules a été combiné avec 250 µL de billes de verre de 1 mm de diamètre (Sigma-Aldrich, USA) et un volume déterminé de solvant d'extraction (CHCl₃/Méthanol ; 2 :1). Les échantillons ont ensuite été placés dans un Tissue Lyser II (Qiagen, Allemagne) et vortexés à 30 Hz pendant 10 min afin d'extraire les lipides dans le solvant. Ils ont ensuite été centrifugés à 16 000 x g dans la MicroStar 17 pendant 5 min. La phase chloroforme a ensuite été récupérée et laissée évaporer pendant la nuit. Ensuite, les acides gras extraits ont été méthyl estérifiés en présence d'un réactif composé à 33% d'HCl méthanolique 3N, 67% méthanol et une concentration finale de 10 µg mL⁻¹ d'hydroxytoluène butylé (BHT), et incubés pendant 1h à 70°C. 1 mL d'hexane a été ajouté aux échantillons, avant d'être vortexé 2 x 5 min à 25Hz.

La suite des manipulations a été réalisée en étroite collaboration avec le professeur Gauthier Eppe. La phase hexane contenant les méthyl esters d'acide gras a été analysée par GC/MS en utilisant système Interscience Trace GC combiné à un spectromètre de masse Polaris Q de type « ion trap ». La colonne utilisée était une SP-2331 (30m x 0.25 mm x 0.2 µm). Pour chaque échantillon, le gaz vecteur était de l'Hélium (1 mL min⁻¹) et le programme de température était le suivant : 2 min à 60°C ; 8 min à 170°C et 1 min à 250°C (taux d'accroissement de la température de 10°C min⁻¹). La température d'injection des échantillons était de 250°C, et l'injection était réalisée en mode « splitless/liquide ». En ce qui concerne l'analyse des masses, l'énergie d'ionisation a été fixée à 70 eV, la température de la source d'ions à 200°C, et les masses scannées étaient comprises entre 45 et 650 m/z. Enfin, les différents acides gras ont été identifiés grâce à la comparaison de leur temps de rétention et de leur masse à mélange de standards FAME C8-C24 (Sigma-Adrich).

2.4 Traitements expérimentaux

Molécules chimiques utilisées

Tous les produits utilisés sont de marque Sigma-Aldrich (USA)

MSB : 2-Méthyl-1,4-naphthoquinone sodium bisulfite (Fig. 12)

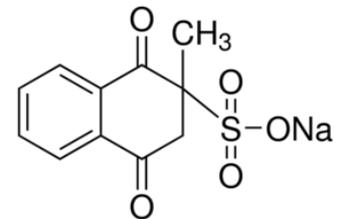


Figure 12: Molécule de MSB

La ménadione est une forme synthétique de la vitamine liposoluble K, intervenant dans des modifications post-traductionnelles. En y ajoutant le bisulfite de sodium, elle devient hydrosoluble, et est donc incorporée principalement dans le cytosol lorsqu'elle est mise en contact avec les cellules. Là, elle se fait réduire par des enzymes réducteurs, en forme de radicaux semiquinones instables (Roberty, Furla, & Plumier, 2016). Afin d'être retransformée en quinone, elle nécessite la présence d'oxygène moléculaire ; et la réaction engendre la production d'ion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Fig.13).

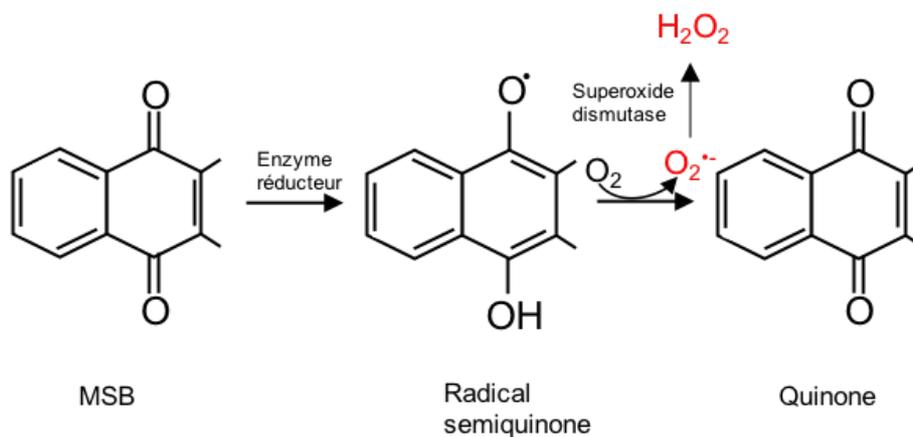


Figure 13: Production de ROS par la MSB

DCMU : 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea (Fig. 14)

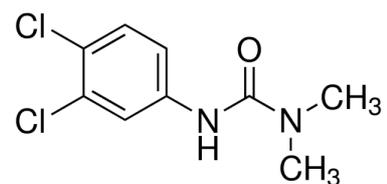


Figure 14: Molécule de DCMU

Le DCMU est un inhibiteur de la photosynthèse utilisé comme herbicide. Il se fixe au site de liaison de la plastoquinone Q_B , ce qui bloque le flux d'électrons le long de la chaîne photosynthétique, entre le photosystème II et le pool de plastoquinones (Haynes et al., 2000), et induit la formation d'oxygène singulet au niveau du PSII par excès d'énergie (Fig. 15)

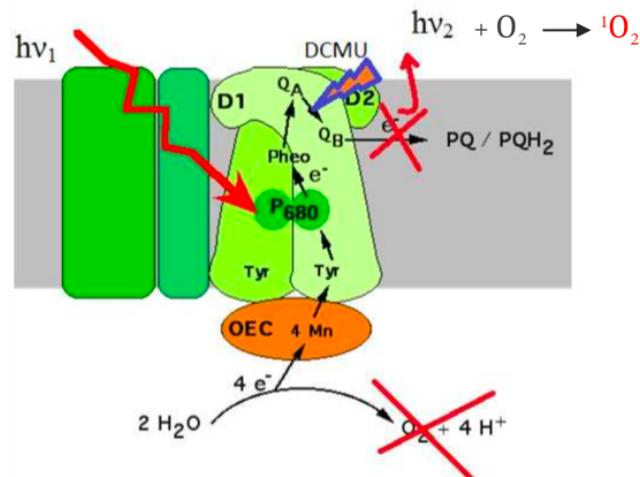


Figure 15: Action du DCMU sur l'appareil photosynthétique. Schéma modifié à partir de (Ferro & Durrieu, 2014)

Rose bengal : 4,5,6,7-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein disodium salt (Fig. 16)

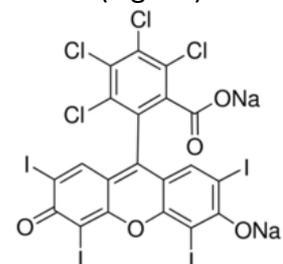


Figure 16: Molécule de rose bengal

Le rose bengal (RB) est un pigment qui absorbe la lumière à environ 550 nm. Il passe ainsi d'un état de singulet (RB^{2-}) à un état de triplet (${}^3RB^{2-}$) (Ludvíková et al., 2016). Cet excès d'énergie peut être absorbé par l'oxygène moléculaire, ce qui produit de l'oxygène singulet (Figure 17). Le RB a déjà été utilisé pour analyser l'effet de l'oxygène singulet lors d'expériences *in vitro* ou *in vivo* (Fischer, Krieger-Liszkay, & Eggen, 2004).

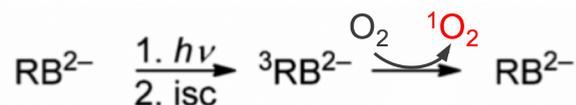


Figure 17: Production d'oxygène singulet après excitation à 550 nm du rose bengal, en présence d'oxygène. Schéma modifié à partir (Ludvíková et al., 2016)

Peroxyde d'hydrogène: H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène est lui-même un agent oxydant, mais peut aussi réagir avec du fer afin de produire des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (Triantaphylidès et al., 2008) (Figure 18)

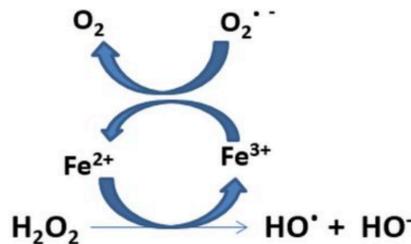


Figure 18: Réaction de Fenton par laquelle du H₂O₂ est réduit en [•]OH par des métaux de transition. Schéma tiré de (Latunde-Dada, 2017)

Tableau 3: Tableau récapitulatif des produits chimiques utilisés et de leurs effets

Molécule pro-oxydante	ROS produite(s)	Zone de production des ROS
MSB	O ₂ ^{•-} ; H ₂ O ₂	Cytosol
DCMU	¹ O ₂	Chloroplaste
RB	¹ O ₂	Cytosol
H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ ; [•] OH (en présence de Fe)	Toute la cellule

Détermination des concentrations expérimentales des molécules pro-oxydantes

L'effet sur la capacité photosynthétique effective des *B. minutum* des concentrations de MSB comprises entre 0,125 et 10 mM ainsi que des concentrations en diuron (DCMU) comprises entre 0,005 et 40 µM a été testé. Chaque mesure de fluorescence a été réalisée sur un puit d'une microplaque 96 puits, contenant une solution d'environ 3,5 x 10⁶ cellules mL⁻¹.

Les puits étaient remplis comme suit : 50% (v/v) solution algale à 7 millions cellules mL⁻¹ avec 50% (v/v) solution de MSB + F/2 pour la MSB, et 99 % (v/v) solution algale à 3,5 millions de cellules mL⁻¹ avec 1 % (v/v) de DCMU dissout dans l'éthanol afin de limiter l'effet de l'éthanol sur les cellules.

Afin de déterminer si des ROS étaient bien produites suite à l'ajout de molécules pro-oxydante, la fluorescence du carboxy-H₂DCFDA a été mesurée après ajout de 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 30 ; 60 ; 100 ; 250 ; 500 ; 1000 et 2000 µM de MSB, et la production d'oxygène singulet par ajout de 40 µM DCMU a été mesurée en utilisant la méthode employant de la L-histidine.

Tests de préconditionnement à la MSB et au DCMU

MSB

Les cellules de *B. minutum* ont été exposées à une première dose de MSB afin d'essayer de les préconditionner, c'est-à-dire d'augmenter leur résistance face à une deuxième dose de MSB (dose test). Les algues n'ont pas été rincées avant l'ajout de la dose test. Ces cellules « préconditionnées » ont été comparées à des algues provenant de la même culture et ayant

été soumises à la dose test sans dose de préconditionnement au préalable (algues « MSB 0 »), ainsi qu'à des algues auxquelles aucune MSB n'a été ajoutée, mais ayant subi tous les autres traitements tels que la centrifugation ou le mélange avant la mesure à la caméra Speedzen (algues « contrôles »). Des mesures de fluorescence de la chlorophylle ont été réalisées à différents moments du préconditionnement et du test (Figure 19) afin d'évaluer la capacité photosynthétique des trois traitements.

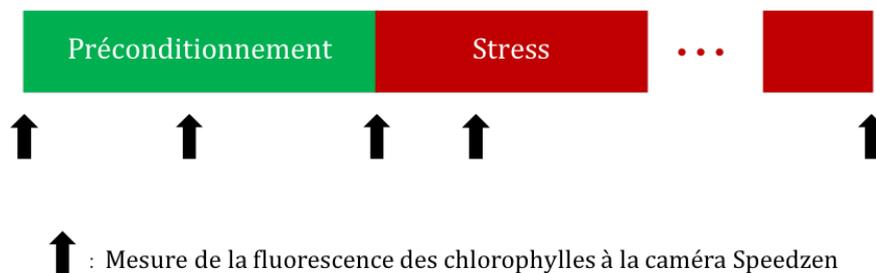


Figure 19: Représentation schématique d'un préconditionnement à la MSB

- Le préconditionnement a d'abord été testé directement dans des microplaques 96 puits contenant 50% (v/v) culture à environ $6,5 \times 10^6$ cellules mL^{-1} et 50% (v/v) milieu de culture MSB + F/2 (15, 30 ou 60 μM). 20 μL d'une solution de MSB 8 mM étaient ensuite ajoutés pour tester les cellules avec 500 μM (« Stress » de la Fig. 19). Chaque traitement était réalisé en triplicat.
- Il a ensuite été testé dans des berlins de 25 mL, contenant 4 mL de culture à environ $3,3 \times 10^6$ cellules mL^{-1} , avec 90% (v/v) algues et 10% (v/v) de MSB+F/2 82,5 μM . Après 2h, 40 μL de 55,5 mM MSB étaient ajoutés aux cellules préconditionnées et à des cellules n'ayant pas encore reçu de MSB (« MSB 0 »). Pour chaque mesure, 3 x 300 microlitres de chaque solution étaient disposés sur une microplaque 96 puits, puis remis dans les berlins après la mesure.
- Il a finalement été testé dans des erlenmeyers de 500 mL contenant environ 50 mL de culture non concentrée par centrifugation. Un volume équivalent à 1/10 du volume dans l'erlenmeyer d'une solution F/2 + MSB 82,5 μM était ajouté aux cellules à préconditionner. Pour chaque mesure, un volume de culture était prélevé et centrifugé afin d'obtenir au moins 1,2 mL d'une concentration cellulaire d'environ $1,7 \times 10^6$ cellules mL^{-1} , nécessaire pour produire une fluorescence suffisante que pour être supérieure au bruit. Les algues utilisées pour la mesure n'étaient pas remises dans les erlenmeyers. Après 3h de préconditionnement, 10% (v/v) d'une solution concentrée en MSB était ajoutés aux volumes restants dans les erlenmeyers des cellules préconditionnées et des MSB 0 afin d'ajouter 500 μM .

La production de ROS après préconditionnement à la MSB a également été mesurée grâce à la méthode utilisant le carboxy- H_2DCFDA .

DCMU

Un préconditionnement au DCMU a également été testé en soumettant les algues + DCMU à une lumière d'intensité optimale pour la croissance, ou à une lumière beaucoup plus intense,

à deux reprises : une fois pour préconditionner, et une deuxième fois pour tester le préconditionnement (traitement noté « Pré DCMU »). Ces algues ont été comparées à d'autres algues + DCMU n'ayant été soumises qu'au 2^e éclaircissement à forte lumière (Traitement noté « DCMU non pré »). L'effet du DCMU seul a été analysé en soumettant des algues au DCMU mais pas à une lumière d'intensité supérieure à celle de l'incubateur (Traitement noté « Contrôle DCMU »).

D'autres algues ont été soumises aux deux périodes de forte lumière, ou seulement à la 2^e, sans ajout de DCMU afin d'analyser l'effet de la lumière seule. Ces traitements sont notés « Contrôle pulse » et « Contrôle stress » respectivement.

Une solution d'algues était maintenue dans l'incubateur, sans ajout de DCMU ni exposition à la forte lumière, et servaient de contrôle (notées « Contrôle »). Les 6 traitements sont repris à la Figure 20.

6 solutions d'environ $3,3 \times 10^6$ algues mL^{-1} de 4 mL étaient disposées dans 6 récipients en verre de 7 mL, et 40 μL DCMU dissout dans de l'éthanol 100% étaient ajoutés à « Contrôle DCMU », « DCMU non pré » et « Pré DCMU », alors que 40 μL F/2 étaient ajoutés aux autres traitements.

Les cultures traitées, lorsqu'elles étaient soumises à forte lumière, étaient modérément agitées à l'aide d'un agitateur magnétique.

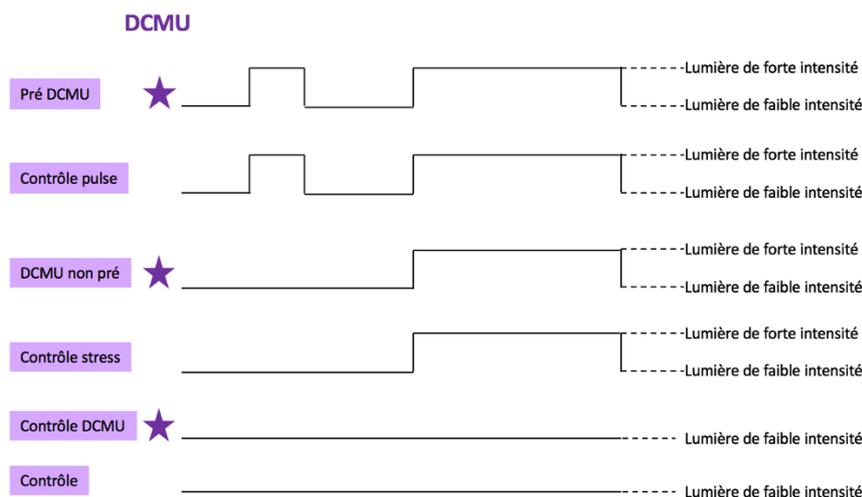


Figure 20: Représentation schématique des 6 traitements testés lors d'un préconditionnement au DCMU

Analyse du contenu pigmentaire et lipidique après traitement pro-oxydant *in vivo* ou *in vitro*

Analyse pigmentaire par HPLC

Traitements *in vivo*

Pour chaque analyse, les pigments de *B. minutum* ont été extraits sur des culots (éventuellement congelés au préalable) dans du méthanol 100% de la même façon que pour l'extraction des chlorophylles, excepté qu'ici, une 2^e centrifugation sur le surnageant était réalisée afin de s'assurer qu'aucun débris cellulaire ne serait injecté dans l'HPLC.

Premièrement, des cellules non traitées ont été analysées afin d'identifier les pigments principaux de cette espèce.

Ensuite, les algues ont été traitées à la MSB, à forte lumière, ou au DCMU à forte lumière.

Le contenu pigmentaire des cellules après préconditionnement au MSB a également été analysé.

Traitements in vitro

Les extraits pigmentaires de 2 cultures ont été rassemblés et séparés en 6 traitements : 200 μL ont été gardés comme contrôle ; 1800 μL ont été mélangés à 200 μL de rose bengal dissout dans du méthanol afin d'obtenir une concentration de 0,1 mM dans les 2 mL ; 1800 μL ont été mélangés à 100 μL de méthanol et 100 μL d' H_2O_2 afin d'obtenir une concentration de 50 mM dans les 2 mL ; 100 μL de la même solution d' H_2O_2 et 100 μL de FeCl_2 10 mM ont été ajoutés à 1800 μL d'extrait ; et 8 mL d'extrait ont été séparés en 2 pour y ajouter soit 440 μL de méthanol soit 440 μL de rose bengal 1 mM afin d'être soumis à 500 μE pendant une heure, sous bullage d'air et sous parafilm pour diminuer l'évaporation du méthanol.

Analyse lipidique par GC-MS

Le contenu lipidique des *B. minutum* a d'abord été déterminé en extrayant les lipides de cellules n'ayant subi aucun traitement.

Ensuite, les effets sur les lipides de plusieurs traitements ont été analysés:

- MSB ;
- MSB + Fe ;
- Exposition à une forte lumière ;
- DCMU + exposition à une forte lumière

2.5 Statistiques

Lorsque les hypothèses de normalité et d'égalité des variances étaient vérifiées, une ANOVA à deux facteurs sur des mesures répétées était réalisée sur les mesures de ΦPSII pour comparer les traitements entre eux, et au cours du temps. Si l'une des deux hypothèses n'était pas respectée, la même ANOVA était réalisée sur les valeurs $\arcsin(\text{racine_carrée}(\Phi\text{PSII}))$ étant donné que cette fonction augmente la probabilité que les hypothèses soient vérifiées. Si ce n'était toujours pas le cas, une ANOVA à un facteur était réalisée sur les valeurs de ΦPSII au cours du temps par traitement pour suivre l'évolution de chaque traitement séparément, et une ANOVA à un facteur était réalisée sur le ϕPSII à chaque temps de mesure pour comparer les traitements entre eux. Un test post hoc Student-Newman-Keuls (SNK) était réalisé pour les ANOVA 1 qui vérifiaient les hypothèses de normalité et d'égalité des variances. Par contre, un test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test post hoc de Tukey était réalisé si au moins une de ces deux hypothèses n'était pas vérifiée.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Caractérisation de la souche SSB01 de *B. minutum*

L'évolution des concentrations cellulaires au sein de trois cultures de *B. minutum* SSB01 a été suivie pendant 60 jours (Fig. 21). Au début de la croissance, les trois cultures étaient proches de 30 000 cellules mL⁻¹. Les cellules ont montré une croissance exponentielle pendant les 11 premiers jours puis se sont multipliées plus lentement jusqu'à atteindre une concentration d'environ 600 000 cellules mL⁻¹ après environ 30 jours de culture. Par la suite, la croissance était plus lente pour les cultures 2 et 3. C'est pourquoi nous avons essayé de travailler avec une concentration maximale de 600 000 cellules mL⁻¹.

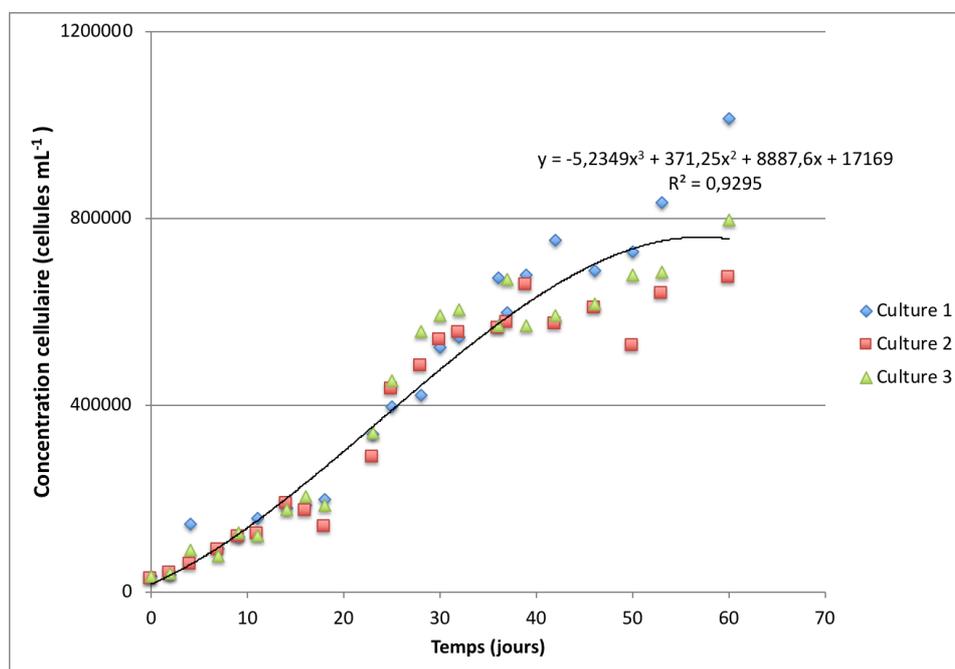


Figure 21: Courbe de croissance de *B. minutum*

Le tableau ci-dessous (Tableau 4) reprend plusieurs caractéristiques des cellules de *B. minutum*. Lors de la phase de croissance exponentielle, la concentration cellulaire est multipliée par $0,056 \pm 0,006$ chaque jour, ce qui implique qu'il faut entre 5 et 6 jours pour que le nombre de microalgues double. Les *B. minutum* ont une capacité photosynthétique maximale comprise entre 0,48 et 0,58, et le rendement d'extinction photochimique effectif mesuré après 3 minutes d'exposition à 230 μE était compris entre 0,2 et 0,4.

Tableau 4: Caractéristiques de croissance et photophysologie de *B. minutum* SSB01. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

TAUX DE CROISSANCE	$0,056 \pm 0,006 \text{ jours}^{-1}$
TEMPS DE DOUBLEMENT DE LA BIOMASSE	$5,42 \pm 0,66 \text{ jours}$
TAILLE	9,1 – 10,5 μm
F_v/F_M	0,48 - 0,58
ϕPSII^*	0,2 - 0,4
NPQ*	0,08 – 0,38

* valeurs mesurées après 3 min d'exposition à 230 micromoles photons m⁻² s⁻¹

Les pigments principaux des *B. minutum* ont été déterminés par HPLC (voir partie « Contenu pigmentaire et lipidique » des Méthodes) et sont repris à la Fig. 22. Ils ont été identifiés par leurs spectres d'absorption dans le visible (Annexe 1) et leur temps de rétention, établis grâce au passage de standards.

Les chlorophylles sont plus abondantes que les caroténoïdes, et il y a, en moyenne, 5 fois plus de chlorophylle *a* que de chlorophylle *c*₂. Le caroténoïde le plus abondant est la périidine, qui est 3,6 fois plus abondante que le 2^e caroténoïde le plus représenté, à savoir la diadinoxanthine. Par ailleurs, il y a très peu de β -carotène.

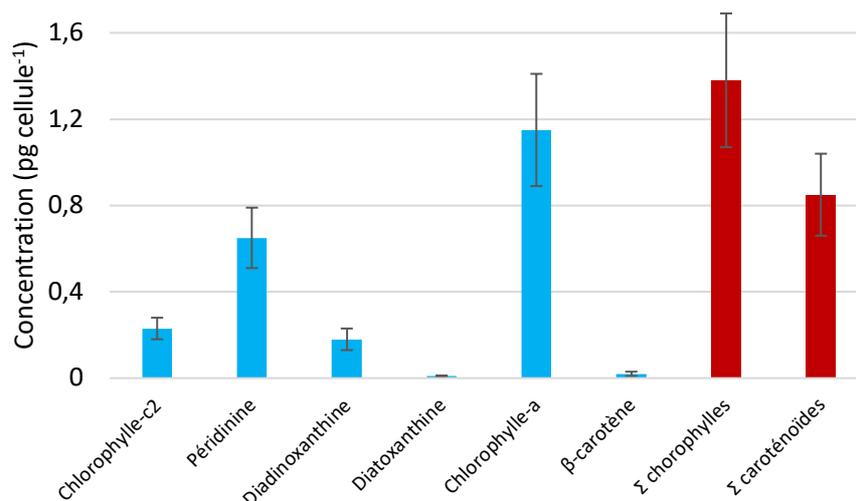


Figure 22: Concentrations cellulaires des différents pigments de *B. minutum*. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

Le composition en acides gras des *B. minutum* a été déterminée par GC-MS (voir partie « Contenu pigmentaire et lipidique » des Méthodes), et est reprise dans le Tableau 5. Le C22:6 est l'acide gras le plus abondant. Il est suivi par le C16 et le C18 respectivement. Viennent ensuite, dans l'ordre, C14, C18:3 γ , C16:1, C18:1, C12, C18:3, C18:2 et C22. Il est intéressant de remarquer que plusieurs acides gras ne sont pas présents dans cette souche : C8, C10, C20, C20:3, C20:4, C22:1, C20:5 et C24.

Tableau 5: Concentrations cellulaires des acides gras présents chez *B. minutum*. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type.

Acide gras	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3 γ	C18:3	C22	C22:6
Concentration (pg cellule⁻¹)	0,32	0,98	3,88	0,64	1,46	0,59	0,21	0,78	0,28	0,02	8,01
	\pm	\pm	\pm	\pm							
	0,15	0,17	0,30	0,12	0,15	0,09	0,03	0,09	0,03	0	0,81

3.2 Effets de la MSB sur la production de ROS et la capacité photosynthétique

Courbes dose-réponse

L'effet de différentes concentrations de MSB sur la capacité photosynthétique de *B. minutum* a été testé afin de déterminer si une augmentation de la concentration s'accompagnait d'une diminution accrue de la photosynthèse, et d'identifier les concentrations optimales à appliquer lors des expériences de préconditionnement. En premier lieu, les suspensions cellulaires ont été exposées à des concentrations comprises entre 2 et 10 mM. Il en ressort que les concentrations supérieures ou égales à 6 mM inhibent totalement la photosynthèse dès 2h d'exposition (Fig. 23 A). Dès lors, l'impact sur la photosynthèse a été suivi sur 6h d'exposition. Tous les traitements impactent de façon significative les algues après 2h (Fig. 23 B), sauf les concentrations comprises entre 2 mM et 4mM. Après 4h, seules les concentrations 3 et 4 mM diffèrent significativement des contrôles, ainsi que 4 mM comparé à 125 μ M (Fig. 23 C). Après 6h, seule la différence entre les contrôles et les traitements à 3 et 4 mM reste significative (Fig. 23 D). 125 μ M et 250 μ M diminuent respectivement de 28% et de 36% le Φ PSII après 2h d'exposition, mais l'impact est assez stable dans le temps (p-valeur > 0,05 avec Kruskal-Wallis pour 125 μ M, et p-valeurs > 0,05 entre 2h et 4h ainsi qu'entre 4h et 6h avec le test SNK pour 250 μ M). 500 μ M diminue de 48% la photosynthèse après 2h, et continue d'impacter négativement les algues au cours du temps (p-valeurs <0,05 entre 2h et 4h ainsi qu'entre 4h et 6h pour le test SNK). Les concentrations comprises entre 1 mM et 3 mM impactent également de façon continue les algues, sauf que, contrairement aux 500 μ M, le Φ PSII est totalement inhibé après 6h d'exposition. Plus précisément, 1 mM et 2 mM impactent de façon continue la photosynthèse (p-valeurs <0,05 avec SNK), tandis qu'il n'y a plus de différence entre 4h et 6h pour 3 mM (p-valeur >0,05 avec SNK). Un test Kruskal-Wallis suivi d'un post hoc de Tukey semble indiquer qu'il n'y a pas de différence significative de la capacité photosynthétique des cellules exposées à 4 mM au cours du temps.

Des concentrations inférieures à 125 μ M ont été choisies pour préconditionner les cellules afin d'induire une diminution du Φ PSII inférieure à 20%. Et une concentration de 500 μ M a été choisie comme dose test car elle impactait assez fortement les cellules sans toutefois inhiber totalement la photosynthèse.

La production de ROS en fonction de la concentration de MSB a également été suivie au cours du temps sur 3 cultures de *B. minutum* (Fig. 24) afin de vérifier que l'ajout de MSB impliquait une plus grande production de ROS par rapport aux contrôles, et afin de déterminer si différentes concentrations de MSB impliquaient la production de différentes quantités de ROS. L'ajout de MSB semble induire une production supplémentaire de ROS par rapport aux contrôles, mais les tests de Kruskal-Wallis ne concluent pas à une différence significative (p-valeur > 0,05). Il n'y a pas non plus de différence significative entre les différentes concentrations de MSB (Kruskal-Wallis).

Par ailleurs, les tests Kruskal-Wallis et de Tukey (sauf pour 60 μ M où les données ont permis d'utiliser une anova 1 suivie d'un SNK) sur l'évolution temporelle de chaque traitement indiquent qu'il n'y a de différence significative qu'entre 3 minutes et 245 minutes, à part pour les concentrations 7,5 μ M et 250 μ M. L'effet de la MSB à 250 μ M n'évolue pas au cours du

temps (Kruskal-Wallis, p-valeur >0,05). Il semble que l'effet de 7,5 μM soit comparable pendant les 90 premières minutes, et différent par la suite (ANOVA 1, SNK).

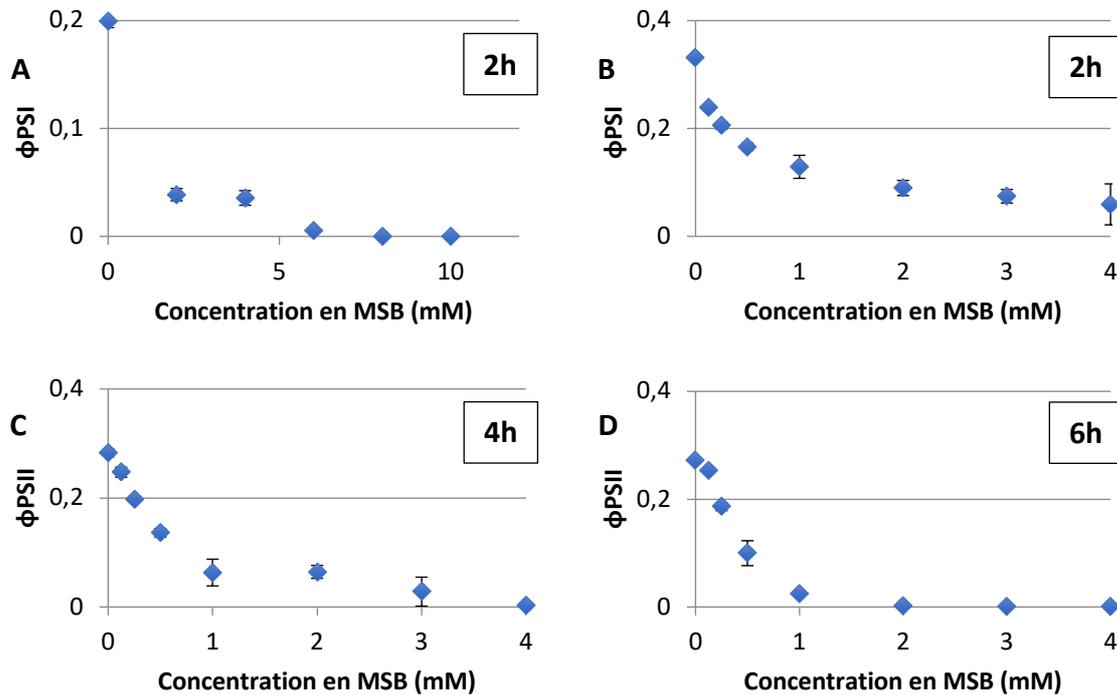


Figure 23: Effet de plusieurs concentrations en MSB comprises entre 2 et 10 mM sur le ΦPSII des cellules après 2h d'exposition (A), et effet de plusieurs concentrations en MSB comprises entre 125 μM et 4 mM sur le ΦPSII des cellules après 2h (B), 4h (C), 6h (D) d'exposition. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

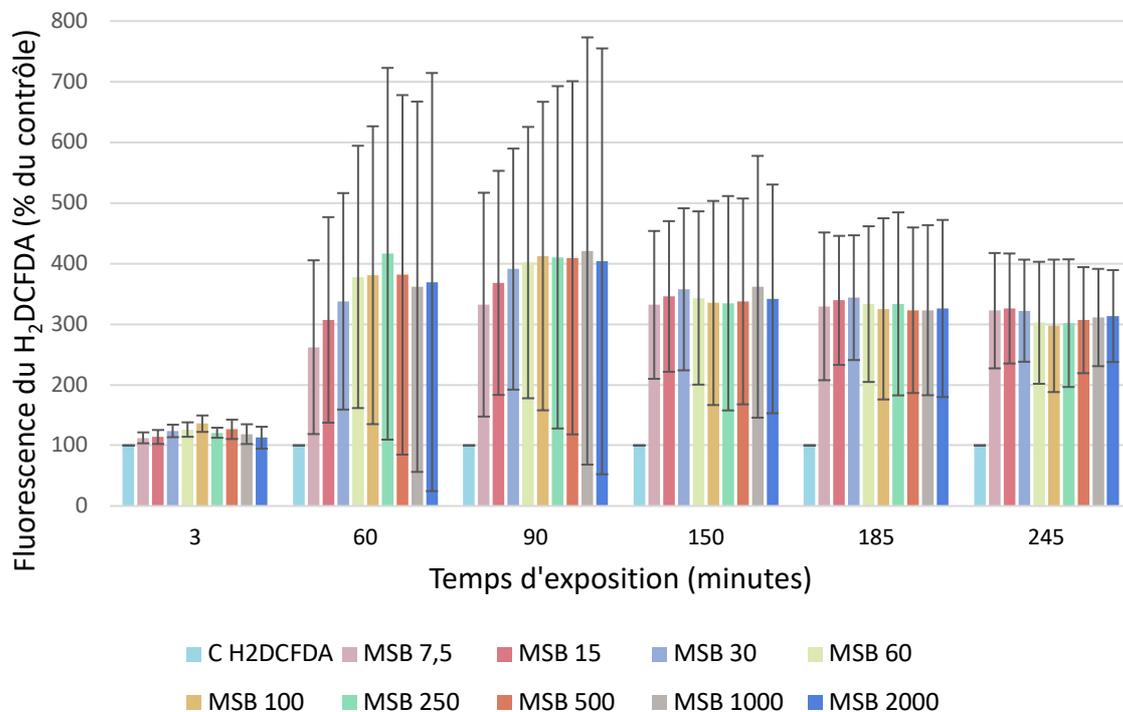


Figure 24: Evaluation de la production de ROS au cours du temps après ajout de différentes concentrations en MSB (en μM) par mesure de la fluorescence du H_2DCFDA . Les concentrations sont notées à côté des « MSB » dans la légende, et C H_2DCFDA correspond aux cellules incubées avec la sonde mais non soumises à la MSB. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

Préconditionnements à la MSB

Les cellules ont été preconditionnées à la MSB dans le but de savoir si la MSB et les ROS qu'elle engendre ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et $\bullet OH$) étaient capables d'initier des mécanismes capables de protéger la cellule lors d'une seconde vague de production de ROS.

Les tests de preconditionnement ont consisté à soumettre les *B. minutum* à une concentration en MSB inférieure à celle choisie pour tester l'éventuelle résistance acquise grâce à la première dose. Grâce aux résultats de la courbe dose-réponse sur la capacité photosynthétique, 500 μM ont été choisis comme dose test.

Plusieurs tests de preconditionnement ont été réalisés avec différentes conditions afin de déterminer celles qui permettaient d'induire la meilleure résistance : 3h ou 5h de preconditionnement ; 7,5 , 15 ou 30 μM comme dose de preconditionnement ; 30, 60, 100, 250 ou 500 μM comme dose test ; rinçage 1h ou 2h après ajout de la dose test ou bien absence de rinçage. Le rinçage consistait à remplacer 150 μL du puit d'une microplaque 96 puits par du F/2 afin d'essayer d'enlever la MSB du milieu extracellulaire et d'arrêter, ou au moins de limiter, la production de ROS. Il a été considéré que le preconditionnement fonctionnait lorsque l'on obtenait $\Phi PSII$ (preconditionné) > $\Phi PSII$ (MSB 0) après l'ajout de la dose test. Peu de preconditionnements de 5h ont fonctionné. Les preconditionnements de 3h ont donné les meilleurs résultats, et sont repris dans le Tableau 6. De plus, un preconditionnement était plus souvent observé avec les traitements sans rinçage.

Après avoir trouvé des conditions pouvant induire un preconditionnement en microplaque, ces conditions ont été testées sur des solutions de *B. minutum* en berlins (n= 3 cultures) afin de savoir si le preconditionnement pouvait être réalisé dans des conditions plus proches des conditions de culture, et donc éventuellement à plus grande échelle. Après 3h de test, les cellules preconditionnées ont une capacité photosynthétique égale à celle des contrôles alors que les MSB 0 sont légèrement plus affectées (Annexe 2). Une ANOVA univariée suivie d'un test post hoc Student-Newman-Keuls sur les $\Phi PSII$ conclut à une différence significative entre les cellules preconditionnées et les MSB 0 après 3h de test (p-valeur = 0,007).

Enfin, le preconditionnement a été testé sur 5 cultures non concentrées, dans les erlenmeyers de 500 mL (Fig. 25). Le $\Phi PSII$ des cellules preconditionnées était supérieur à celui des cellules MSB 0 après 1h de test. Une ANOVA univariée, suivie d'un SNK, utilisée sur les valeurs transformées de $\Phi PSII$ à 1h de test permet de conclure qu'il existe une différence significative entre les cellules preconditionnées et les cellules MSB 0 après 1h de test (p-valeur = 0,051). Il est donc possible de preconditionner les cellules avec une faible dose de MSB.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des préconditionnements ayant fonctionné après 1h, 21h ou 45h de test lors de 3 expériences indépendantes. La première colonne résume le traitement : le premier nombre correspond à la concentration (μM) utilisée pour un préconditionnement de 3h, la deuxième partie permet de savoir si les cellules ont été rincées 1h ou 2h après ajout de la dose test ou bien si elles n'ont pas été rincées (SR), et le troisième nombre correspond à la dose test (μM) ajoutée après les 3h de préconditionnement. Une cellule vert clair signifie que le préconditionnement a fonctionné, c'est-à-dire que le ΦPSII des préconditionnées est supérieur à celui des non-préconditionnées après ajout de la dose test. Une cellule vert foncée signifie que le préconditionnement a fonctionné lors de deux expériences indépendantes.

		Triplet indépendant		
		Temps après ajout de la dose test		
		1h	21h	45h
1h				
7,5/R1h/30				
7,5/R1h/60				
7,5/R1h/100				
7,5/R1h/250		■		
7,5/R1h/500		■	■	■
15/R1h/30				
15/R1h/60				■
15/R1h/100		■	■	
15/R1h/250		■	■	
15R1h/500		■		
30/R1h/30				
30/R1h/60				
30/R1h/100		■		
30/R1h/250		■		
30/R1h/500		■	■	■
2h				
7,5/R2h/30				
7,5/R2h/60				
7,5/R2h/100				
7,5R2h/250		■	■	
7,5/R2h/500			■	■
15/R2h/30				
15/R2h/60				
15/R2h/100				
15/R2h/250		■		
15/R2h/500				
30/R2h/30				
30/R2h/60				
30/R2h/100				
30/R2h/250		■		
30/R2h/500		■		■
SR				
7,5/SR/30				■
7,5/SR/60		■	■	
7,5/SR/100		■		
7,5/SR/250		■		■
7,5/SR/500		■	■	■
15/SR/30				
15/SR/60				
15/SR/100		■		
15/SR/250		■	■	
15/SR/500		■	■	■
30/SR/30				
30/SR/60				
30/SR/100				
30/SR/250		■		
30/SR/500		■		■

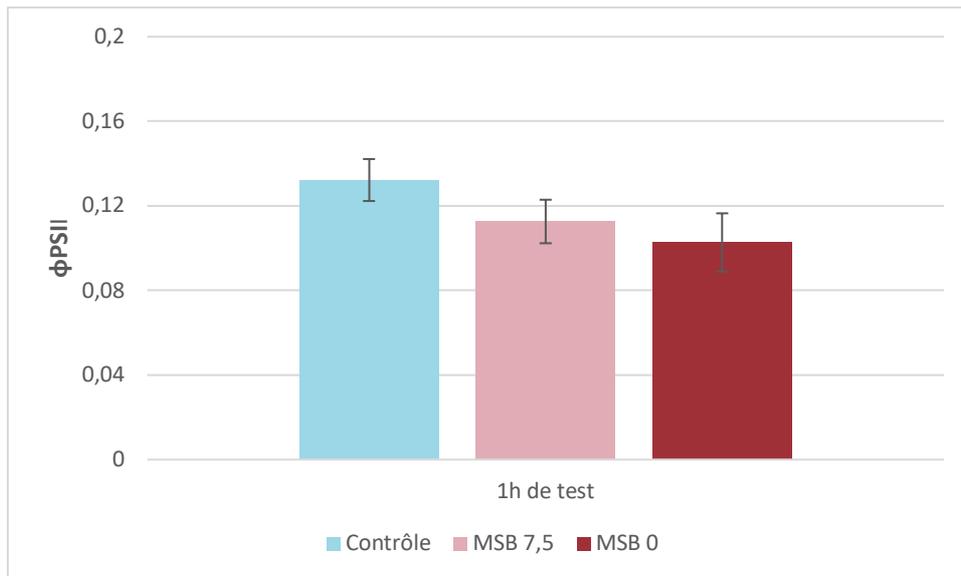


Figure 25: Synthèse des valeurs de Φ_{PSII} obtenues après 1h de test à 500 μM MSB de deux cultures de *B. minutum*, après un préconditionnement de 3h à 7,5 μM . Les « Contrôles » correspondent aux cellules non traitées, et les « MSB 0 » aux cellules testées à 500 μM mais non préconditionnées. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

La production de ROS des cellules préconditionnées par la MSB et des cellules MSB 0 après ajout de 500 μM MSB a été suivie grâce à la fluorescence de la sonde H_2DCFDA (Fig. 26). Suite à l'ajout des 500 μM , on observe une augmentation massive de la fluorescence et donc des ROS produites. Les différences sont trop faibles pour qu'il y ait une différence statistique entre les cellules préconditionnées et les MSB 0 (tests de Tukey sur des ANOVA univariées aux différents moments du test).

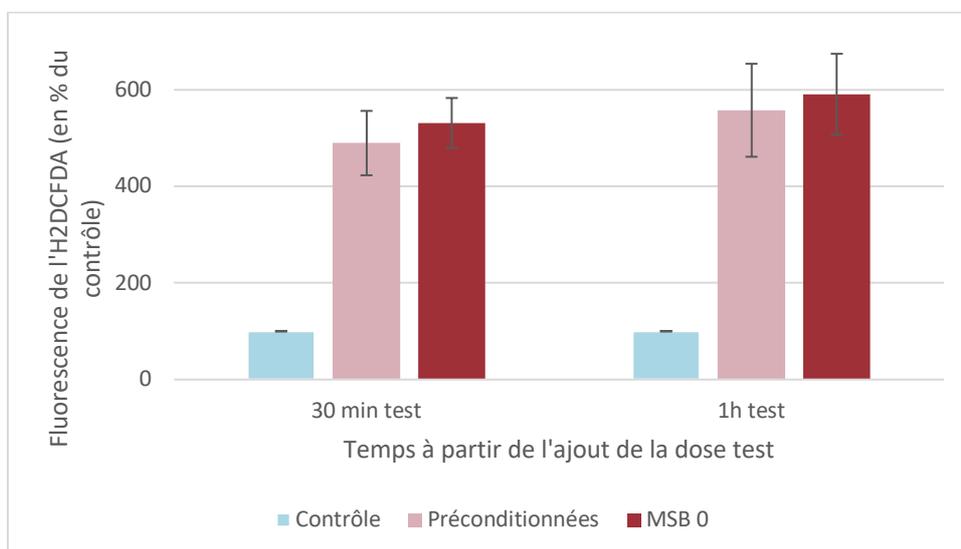


Figure 26: Comparaison de la production de ROS entre des cellules préconditionnées à 7,5 μM MSB et des MSB 0, exprimées en pourcentage des contrôles (cellules non traitées à la MSB). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type des données obtenues sur 3 réplicats biologiques

3.3 Effets du DCMU sur la capacité photosynthétique et la production de ROS

Courbes dose-réponse

L'effet de différentes concentrations de DCMU (0,005 - 40 μM) sur le ΦPSII des *B. minutum* a été déterminé par imagerie de la fluorescence (caméra Speedzen). Après minimum 30 minutes d'exposition au DCMU et à l'obscurité, le ΦPSII était mesuré. Une inhibition de 50% après ajout de 0,3125 μM a déjà été observée (Fig. A), c'est pourquoi d'autres concentrations plus faibles ont été testées (Fig. B). Cependant, un test Kruskal-wallis suivi d'un test de Tukey estiment qu'il n'y a de différence significative qu'entre les cellules contrôles et les cellules exposées à 20 et à 40 μM . Concernant le test avec les concentrations plus faibles, les concentrations comprises entre 0,005 et 0,039 μM sont comparables d'un point de vue statistique (Kruskal-Wallis suivi de Tukey). 0,039 μM inhibent environ 10% de la photosynthèse alors que 0,078 μM et 0,156 μM inhibent respectivement 20% et 40% en moyenne.

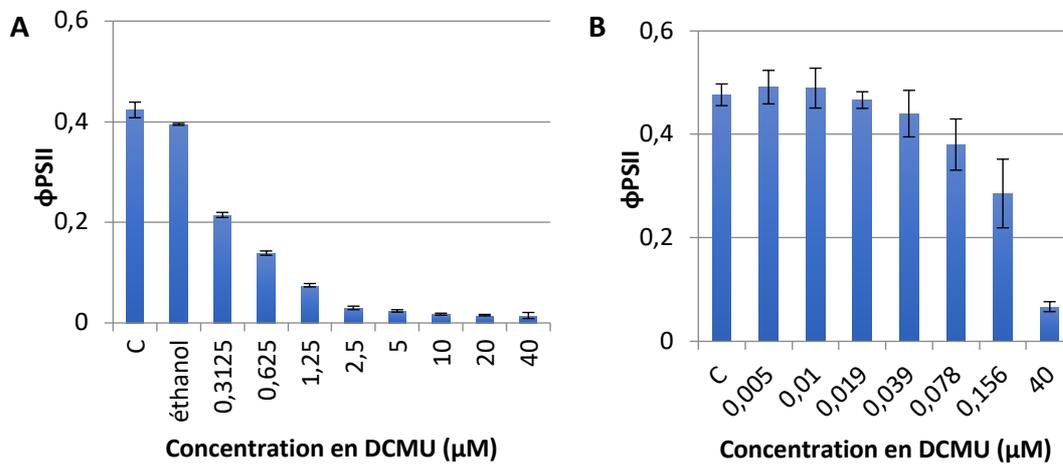


Figure 27: Effet sur la capacité photosynthétique de minimum 30 min d'exposition à différentes concentrations en DCMU (triplicats). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

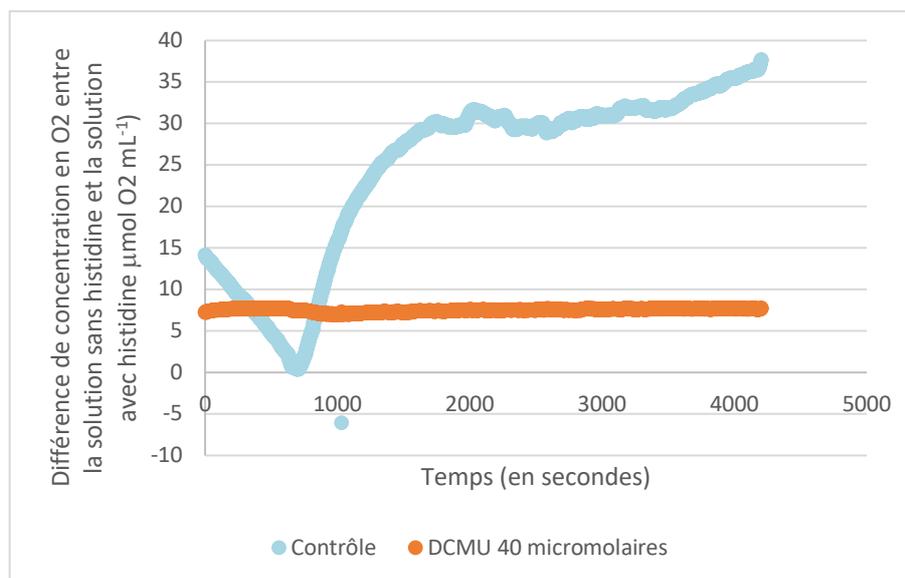


Figure 28: Comparaison de la production d'oxygène singulet à 3000 μE entre les cellules contrôles (non-traitées) et les cellules exposées à 40 μM DCMU

L'utilisation de la L-histidine pour évaluer la quantité d' $^1\text{O}_2$ montre d'une part que les cellules non traitées au DCMU produisent de l'oxygène singulet de façon naturelle, et d'autre part que l'exposition à 3000 μE suite à l'ajout de 40 μM DCMU induit une production tellement importante d' $^1\text{O}_2$ que pratiquement tout l'oxygène est sous forme d' $^1\text{O}_2$.

Préconditionnements au DCMU, et à une intensité lumineuse élevée

Les traitements appliqués étaient ceux définis sur la Fig. 20. Un volume déterminé d'une solution stock de DCMU a été ajouté aux « contrôle DCMU », « préconditionnement DCMU », « DCMU non-préconditionné » afin d'obtenir une concentration finale de 0,078 μM . Les cellules des conditions « préconditionnement au DCMU » et « contrôle pulse » ont été soumises à 230 μE pendant 30 minutes, puis placés à l'incubateur pendant 1h. Ensuite, ces deux traitements ainsi que le « DCMU non-préconditionné » et le « contrôle stress » ont été placés à 230 μE pendant une heure. L'expérience a été réalisée sur 2 cultures séparément. Bien que les préconditionnées au DCMU présentent un ΦPSII légèrement supérieur à celui des cellules testées sans préconditionnement (pré DCMU vs DCMU non pré ; Fig. 29), la différence à 30 minutes de test correspond à une p-valeur de 0,07 (ANOVA univariée et test post hoc Student-Newman-Keuls), et la différence n'est pas significative après 1h de test (analyse Kruskal-Wallis, et post hoc Tukey) (Annexe 4).

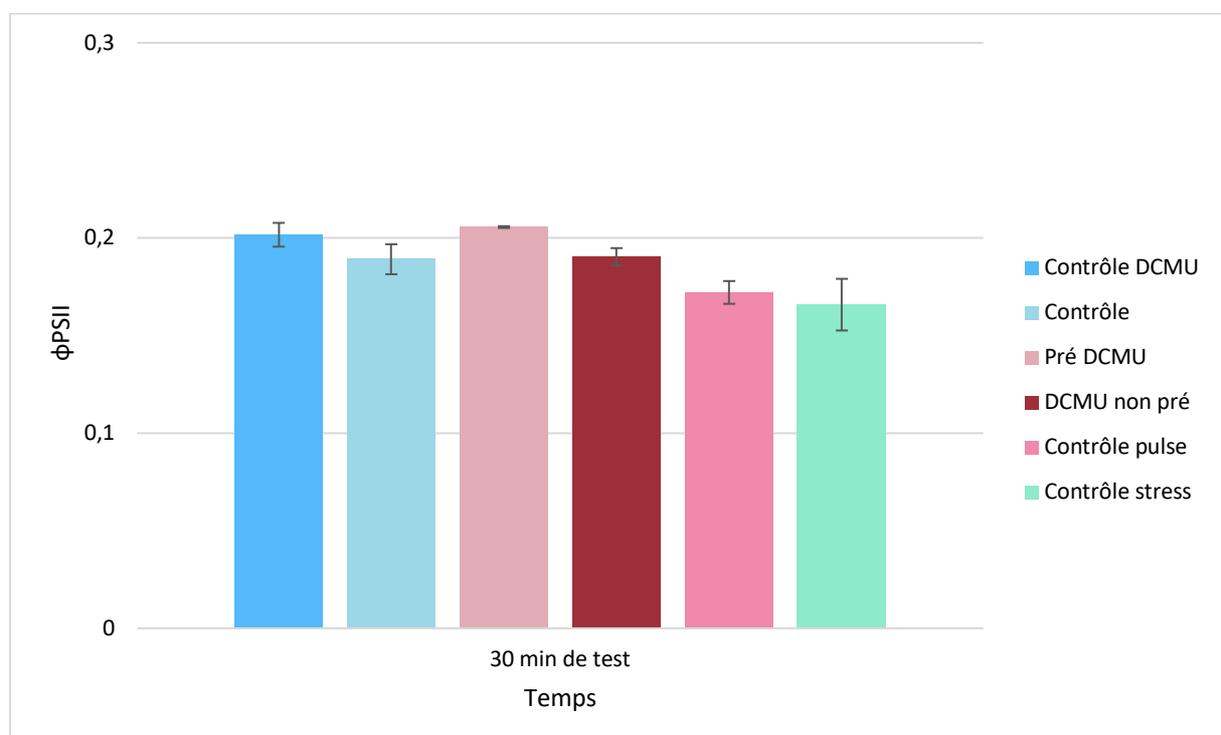


Figure 29: Effet sur le ΦPSII d'une culture de *B. minutum* de 30 minutes d'exposition à 230 μE , après un préconditionnement de 30 minutes à 230 μE avec 0,078 μM DCMU. Les traitements sont ceux définis à la Fig. 20 du Matériel et Méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

Par la suite, un préconditionnement à 1200 μE a été testé dans des boîtes de cultures afin de savoir si, d'une part, le préconditionnement pouvait s'opérer à plus forte lumière, et d'autre part pour savoir si la diminution du ΦPSII des contrôles était liée à l'agitation magnétique. L'expérience a eu lieu dans un incubateur maintenu à 26°C sans agitation. 3 cultures ont été utilisées. Un volume déterminé de DCMU a été ajouté aux trois traitements avec DCMU (Figure xx) afin d'atteindre une concentration finale de 0,078 μM . Les cellules ont été placées à 100 μE et 26°C pendant une heure avant le début du préconditionnement. La condition « préconditionnement DCMU » et le « contrôle pulse » ont été placés à 1200 μE pendant 10 minutes, et ensuite replacés avec les autres traitements à 100 μE pendant 1h. Enfin, les cultures des conditions « préconditionnement DCMU », « DCMU non-préconditionné », « contrôle pulse » et « contrôle stress » ont été soumises à la forte lumière pendant 1h. Ici, les cellules traitées au DCMU et exposées à forte lumière ont été très impactées, et le préconditionnement n'a pas fonctionné après 1h de test (Fig. 30). Par contre, les cellules exposées pendant 10 minutes à forte lumière présentent un meilleur ΦPSII pendant le test que celles exposées pour la première fois à 1200 μE . Cependant, les valeurs ne sont pas significativement différentes selon une analyse Kruskal-Wallis suivie d'un test post hoc de Tukey.

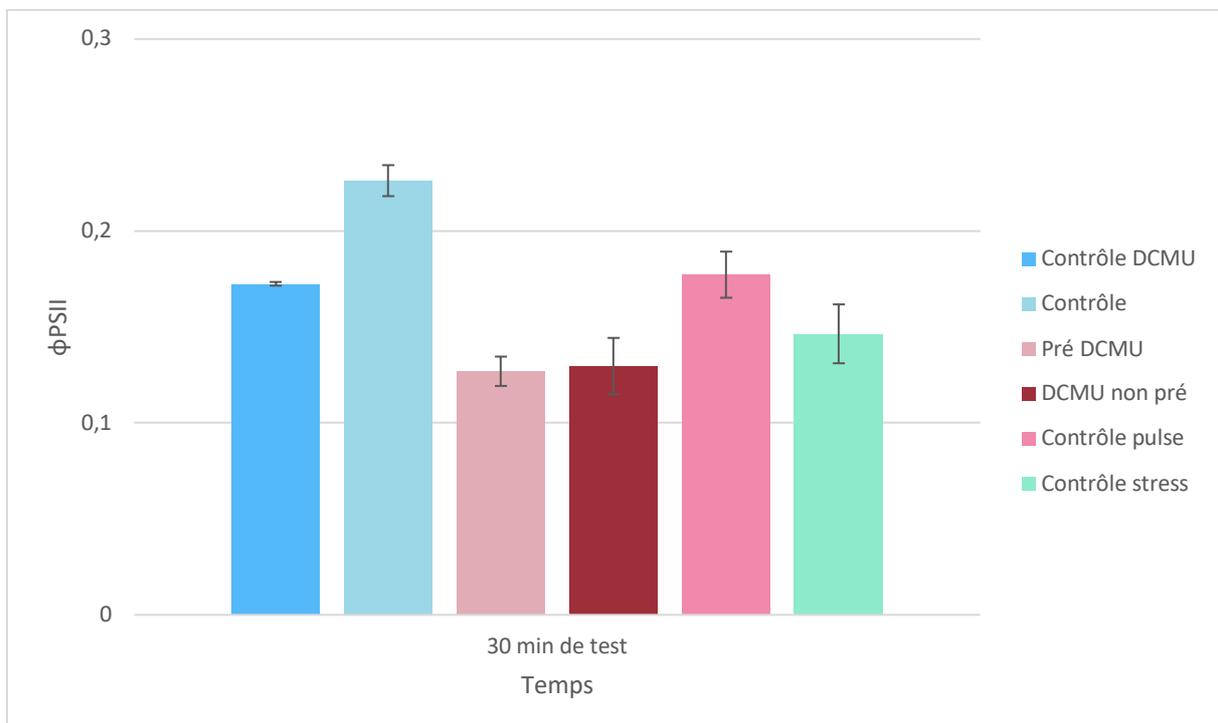
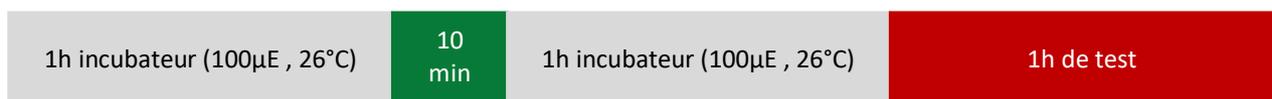


Figure 30: Effet sur le ΦPSII d'une culture de *B. minutum* de 30 minutes d'exposition à 1200 μE après avoir été exposée à cette même intensité lumineuse pendant 10 minutes 1h auparavant. Les différents traitements correspondent à ceux expliqués à la Figure 20 du Matériel et Méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

Bien que les résultats ne soient pas significatifs d'un point de vue statistique, l'exposition à 230 μE pendant 30 minutes après ajout de 0,078 μM DCMU, et l'exposition à 1200 μE pendant 10 minutes ont tendance à induire des mécanismes de préconditionnement chez les *B. minutum*.

3.4 Effets de différents traitements pro-oxydants sur la composition pigmentaire et lipidique

Les différents traitements pro-oxydants ont été choisis, entre autres, pour produire différentes ROS et ainsi éventuellement distinguer des effets spécifiques.

En premier lieu, une oxydation *in vitro* des pigments a été réalisée, c'est-à-dire que des conditions pro-oxydantes ont été appliquées sur les extraits pigmentaires et non sur les cellules entières. Après avoir été extraits, les pigments ont été mélangés à du rose bengal, du peroxyde d'hydrogène, ou du peroxyde d'hydrogène en présence de fer, puis analysés par HPLC, comme expliqué dans la partie « Analyse pigmentaire par HPLC » du Matériel et Méthodes. Tous les traitements impliquent une diminution globale du contenu en pigments (Fig. 31).

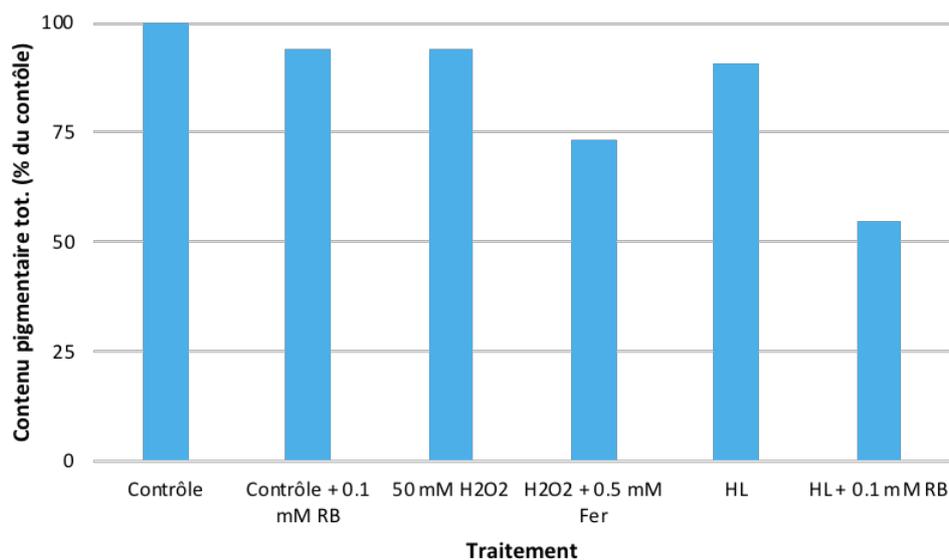


Figure 31: Impacts des différents traitements expérimentaux (RB, RB exposé 30 min à 2000 μE , exposition à 2000 μE sans ajout de composé chimique, H₂O₂ 50 mM avec et sans Fe 0,5 mM) sur le contenu pigmentaire total. Les données illustrées correspondent à l'aire totale des pics intégrés sur le chromatogramme de chaque traitement et sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle

Dans tous les traitements, la chlorophylle-*a* diminue, mais la diminution est plus importante chez les cellules exposées à 500 μE , de même que la chlorophylle-*a* dégradée augmente 4 fois plus lorsque les cellules sont soumises à 500 μE .

Le contenu en chlorophylle-*c*₂ diminue également sauf dans les cellules exposées à une forte lumière sans RB, où le pigment augmente. Cependant, cette augmentation ne correspond pas à une synthèse, mais à une concentration des pigments étant donné que le méthanol s'évapore, surtout avec le bullage. Une des isoformes de la périidine (pic 8) augmente lors des traitements plus impactants (H₂O₂ + Fe, forte lumière avec et sans RB) alors que l'autre isoforme (pic 7) a tendance à diminuer avec presque tous les traitements. La dinoxanthine, la

diadinoxanthine et la diatoxanthine diminuent dans tous les traitements, et plus particulièrement lorsqu'elles sont exposées à 500 μ E (Fig. 32 et Tableau 7).

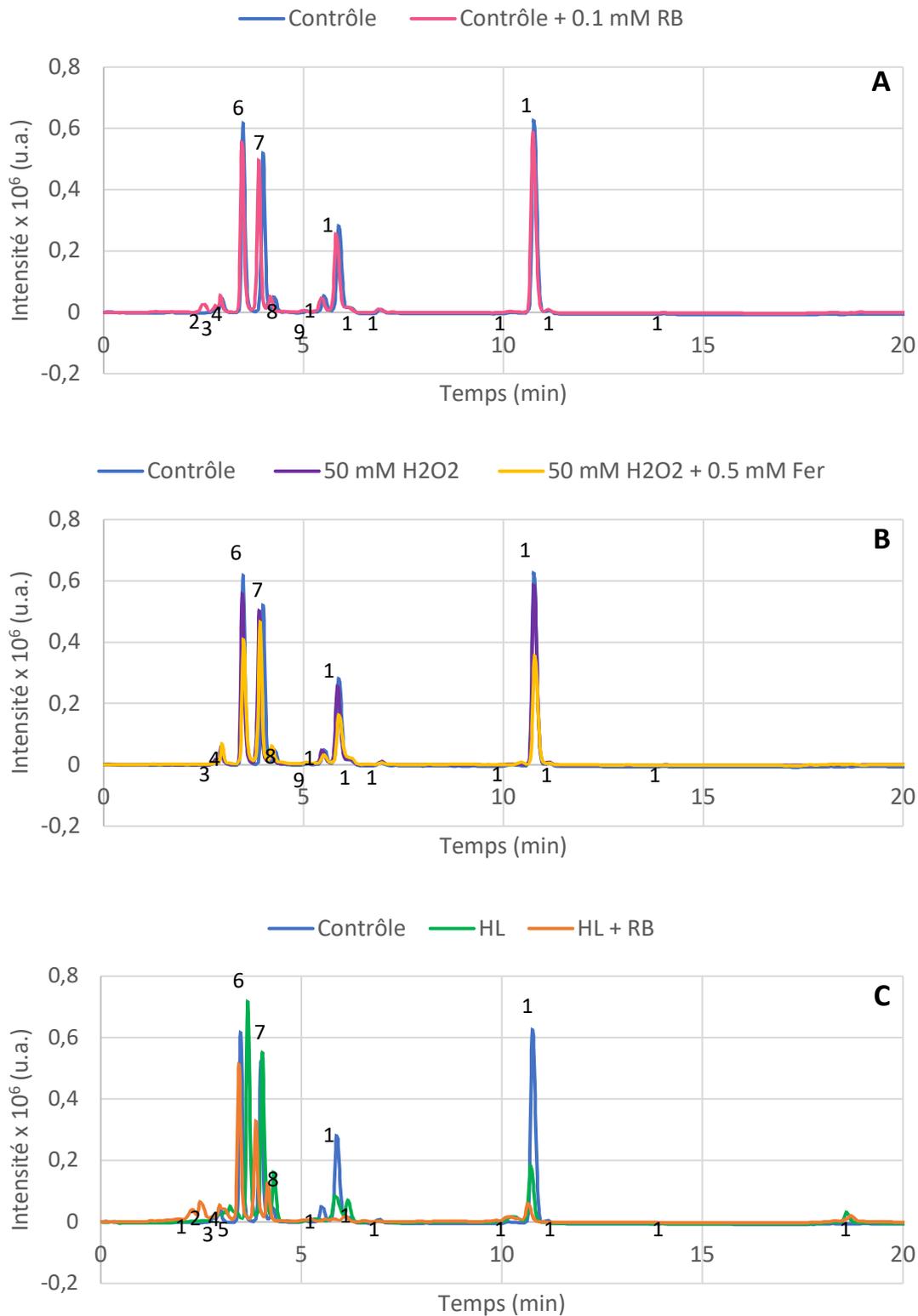


Figure 32 : Chromatogrammes des extraits pigmentaires soumis à différentes conditions pro-oxydantes. L'évolution des différents pics par rapport au contrôle est reprise dans le tableau ci-dessous

Tableau 7: Impacts de différentes conditions pro-oxydante sur la composition d'extraits pigmentaires provenant de *B. minutum* SSB01. Les données présentées sont rapportées aux valeurs contrôle.

Pigment	?	Rose Bengal	?	Péridinine-like	Chl-C ₂ -like	Chl-C ₂	Péridinine	Péridinine	Chl deg.	Dinoxanthine	Diadinoxanthine	Car. ND	Diatoxanthine	Chl- α deg	Chl- α	Chl- α	β -Carotène	?
N° Pic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Temps Ret. (min)	2.3	2.5	2.8	3.0	3.1	3.4	3.9	4.2	5.1	5.5	5.9	6.2	6.9	10.2	10.7	11.1	14.0	18.6
Contrôle			1.00	1.00		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Contrôle + 0.1 mM RB		pres	0.97	1.09		0.93	0.94	1.03	1.11	0.90	0.93	1.05	0.93	0.91	0.93	1.04	0.87	
50 mM H ₂ O ₂			1.02	1.09		0.92	0.97	1.02	1.16	0.91	0.93	1.06	0.90	0.74	0.93	0.90	0.88	
H ₂ O ₂ + 0.5 mM Fer			0.63	1.30	pres	0.74	0.89	1.19	1.52	0.77	0.66	1.27	0.52	0.90	0.57	0.48	0.00	
HL	pres		2.82	1.16	pres	1.25	1.11	3.20	0.00	0.40	0.46	3.81	0.68	4.00	0.31	0.29	0.00	pres
HL + 0.1 mM RB	pres	pres	1.13	1.45	pres	0.86	0.67	2.28	1.35	0.05	0.05	1.11	0.22	4.27	0.11	0.18	0.00	pres

Augmentation

Diminution

> 60%	60 - 30%	< 30%		< 30%	60 - 30%	> 60%
-------	----------	-------	--	-------	----------	-------

L'effet sur la composition pigmentaire d'une exposition de 5h à 500 μ M a également été analysé (Fig. 33 et 34). Tous les pigments se retrouvent en moins grande quantité chez les cellules traitées à la MSB par rapport au contrôles alors que des composés, correspondant sans doute aux chlorophylles dégradées (pics 3 et 12), augmentent. Des tests de Student permettent de conclure que la quantité totale de chlorophylle ainsi que la quantité totale de caroténoïdes diffèrent entre les deux traitements. De plus, chaque pigment est présent en quantité significativement différente (p-valeurs inférieures ou égales à 0,03) entre les cellules traitées à la MSB et les cellules contrôles selon des tests de Student, excepté la diadinoxanthine (test Mann Whitney sur les rangs), le caroténoïde non-identifié (pic 9) et la diatoxanthine (tests de Student).

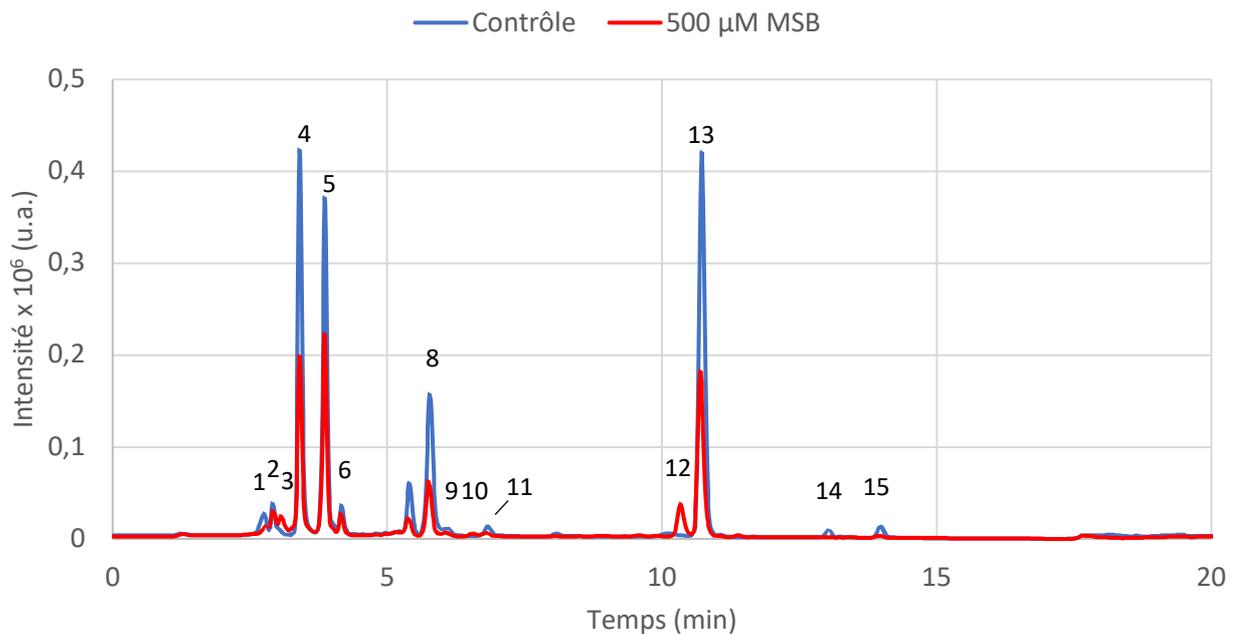


Figure 33 : Exemples de chromatogrammes obtenus à 430 nm, montrant l'impact sur le profil pigmentaire d'un traitement des cellules de *B. minutum* SSB01 avec 500 μ M de MSB pendant 5h. L'évolution des différents pics par rapport aux échantillons contrôles est reprise dans le tableau ci-dessous.

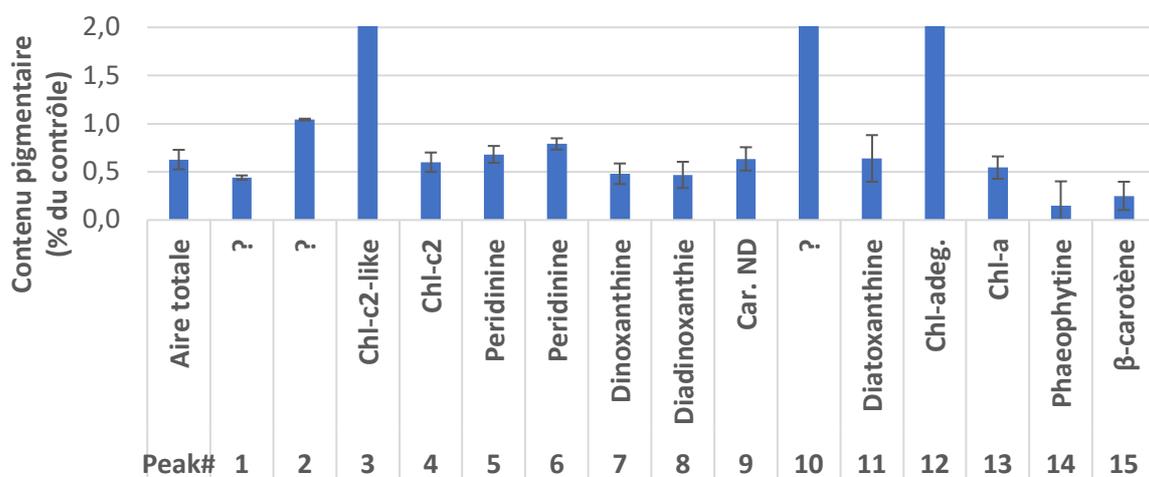
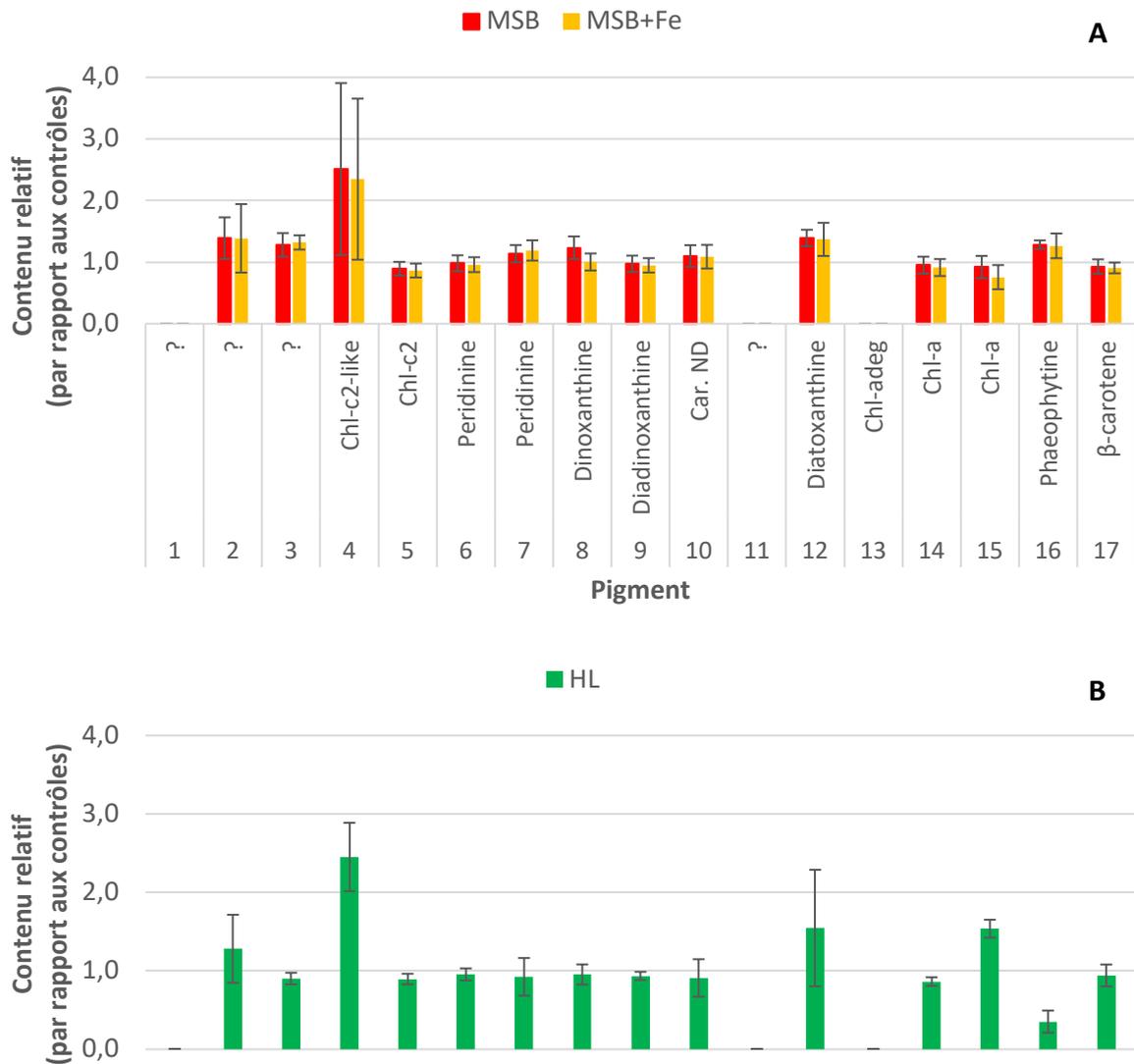


Figure 34 : Impacts d'une exposition de 5 h en présence de MSB 500 μ M sur le contenu le contenu pigmentaire des cellules de *B. minutum*. Les données illustrées (moyennes \pm écart-types ; $n = 3$) correspondent aux aires des pics intégrés sur les chromatogrammes (à 430 nm) et sont exprimées par rapport aux valeurs des contrôles. Si > 1 -> augmentation du contenu ;

si < 1 -> diminution du contenu suite à l'ajout de MSB. Les pigments correspondant aux pics 10 et 12 sont uniquement présents dans les échantillons traités avec la MSB. Le pic n°3 a une valeur réelle de 4.77 ± 1.66 .

L'exposition à 500 μM MSB pendant 5h semble donc affecter principalement les chlorophylles.

Finalement, l'impact sur la dégradation des pigments et des acides gras d'une exposition d'une heure à 500 μM MSB avec ou sans Fe (II) 200 μM ou d'une exposition de 30 minutes à 2000 μE avec ou sans DCMU (40 μM ou 0,078 μM) a été analysé (Fig. 35 et 36).



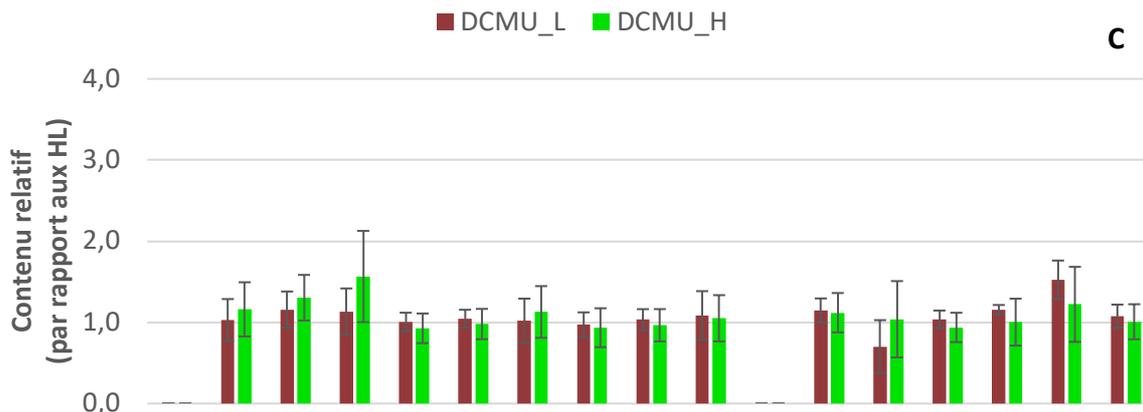
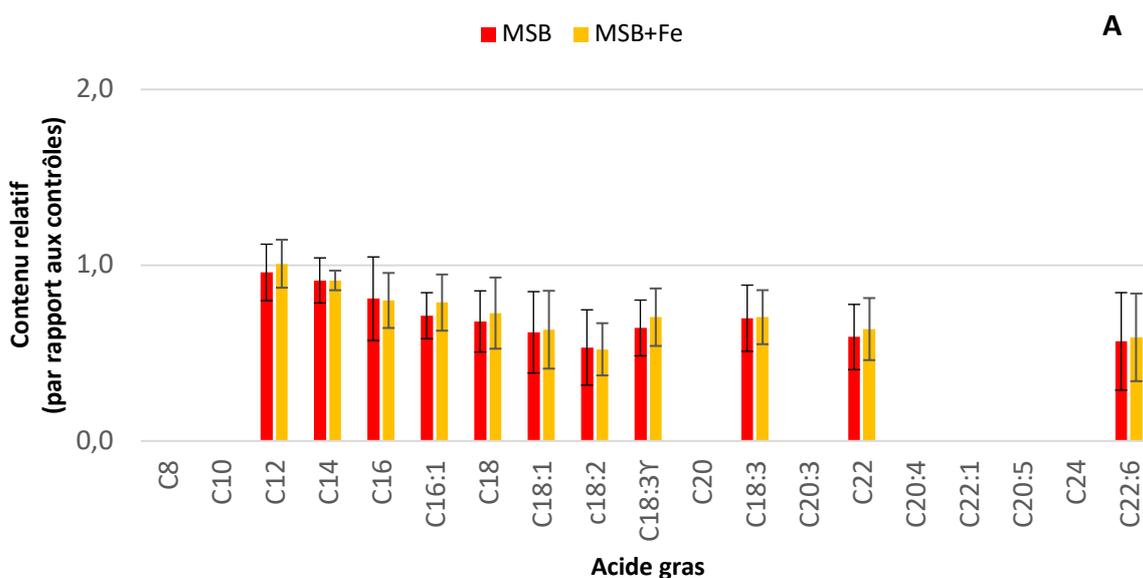


Figure 35 : Impact sur le contenu pigmentaire des *B. minutum* d'une exposition d'une heure à 500 μM de MSB avec ou sans ajout de 200 μM de Fer (II) (A), et d'une exposition de 30 minutes à 2000 μE sur des cellules non traitées (B) ou subséquemment à un ajout de 0,078 ou 40 μM de DCMU, « DCMU L » et « DCMU H » respectivement (C). Le contenu pigmentaire est exprimé comme un rapport aux cellules contrôles (A et B) ou aux cellules exposées à forte lumière sans ajout de DCMU (C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type.

D'un point de vue statistique, l'ajout de MSB avec ou sans FeCl_2 semble augmenter la quantité de péridinine par rapport aux cellules contrôles, alors que la quantité de dinoxanthine n'augmente qu'avec la MSB seule. De plus, une exposition à 2000 μE après ajout de 40 μM DCMU favorise une augmentation de la chlorophylle- c_2 . Enfin, un ajout de MSB ou de DCMU favorise une augmentation de la phaeophytine alors qu'une exposition à 2000 μE sans DCMU semble diminuer la quantité de ce produit de dégradation de la chlorophylle.

L'exposition à la MSB est donc liée à une augmentation de certains caroténoïdes des produits de dégradation de la chlorophylle (phaeophytine), alors que le DCMU est uniquement lié à une augmentation de la phaeophytine.



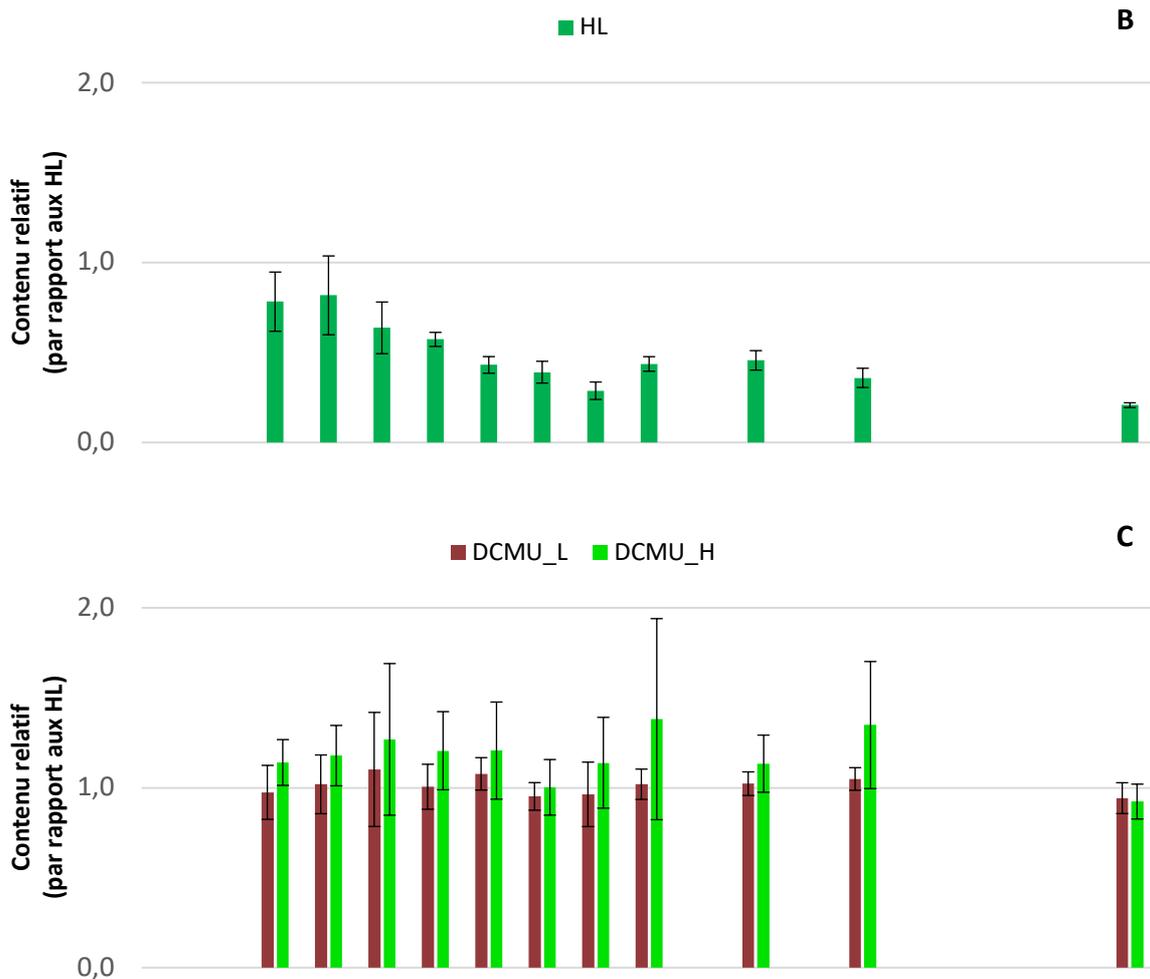


Figure 36 : Impact sur le contenu en acides gras des *B. minutum* d'une exposition d'une heure à 500 μM de MSB avec ou sans ajout de 200 μM de Fer (II) (A), et d'une exposition de 30 minutes à 2000 μE sur des cellules non traitées (B) ou subséquemment à un ajout de 0,078 ou 40 μM de DCMU, « DCMU L » et « DCMU H » respectivement (C). Le contenu pigmentaire est exprimé comme un rapport aux cellules contrôles (A et B) ou aux cellules exposées à forte lumière sans ajout de DCMU (C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

Bien que plusieurs acides gras semblent être présents en moindre quantité dans les cellules traitées à la MSB avec ou sans Fer, seuls C18 et C18:3 sont présents en quantité significativement inférieure d'un point de vue statistique (p -valeurs $<0,05$ avec les deux ANOVA 1 suivies de SNK).

Par contre, tous les acides gras contenant 16 carbones ou plus sont présents en quantité significativement plus faible lorsque les cellules ont été soumises à 2000 μE pendant 30 minutes.

Tous les acides gras de 16 carbones ou plus (excepté C16) sont significativement présents en quantité différente par rapport aux contrôles lorsque les cellules ont été soumises à 0,078 μM DCMU et forte lumière. C18, C18:3 γ , C18:3 et C22 semblent être présents en plus grande quantité alors que C18:1, C18:2 et C22:6 semblent être moins abondants.

Par contre, moins d'acides gras sont significativement affectés lors de l'ajout de 40 μM de DCMU : C18 et C18:3 semblent être plus présents, alors que C22:6 semble être moins abondant.

Des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests de Tukey ont été réalisés pour C16, C18:1, C18:2, C18:3 γ , C22, C22:6 alors que des ANOVA 1 suivie de SNK ont été utilisées pour les autres acides gras.

Il semble que ce soit une exposition de 30 minutes à 2000 μ E qui affecte le plus les acides gras parmi tous les traitements testés.

Chapitre 4 : discussion

Le réchauffement climatique engendre, entre autres, un stress thermique chez les organismes marins. On pense que l'augmentation de la température impacte les organismes par l'intermédiaire d'une production de ROS (Lesser, 2006). L'impact sur les coraux est particulièrement problématique car ces cnidaires ont formé des récifs abritant des écosystèmes complexes et regroupant une biodiversité importante (Knowlton, 2001). Cependant, il est possible d'acclimater (Takahashi, Yoshioka-Nishimura, Nanba, & Badger, 2013), voire d'adapter (Chakravarti et al., 2017) les algues symbiotiques des coraux à une augmentation de température. Nous voulions donc déterminer si les algues symbiotiques de la famille des Symbiodiniaceae pouvaient être préconditionnées à l'aide de molécules génératrices de ROS.

Nous avons réussi à trouver des conditions permettant de préconditionner les cellules de *B. minutum*, algues symbiotiques d'*Exaiptasia pallida*, à un stress oxydant. De plus, nous avons identifié les pigments et les acides gras sur lesquels les ROS avaient un impact, ce qui a permis d'établir des hypothèses sur certains mécanismes antioxydants induits par les *B. minutum*, ainsi que sur d'éventuelles molécules signal utilisées par ces algues. En plus, nous avons pu établir une différence significative entre l'impact de 1O_2 et celui de $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/^{\bullet}OH$ sur les pigments.

Génération du stress oxydant

Nous avons ajouté des concentrations croissantes de MSB ou de DCMU aux cellules afin de déterminer l'impact sur la capacité photosynthétique effective de l' $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/^{\bullet}OH$ et de l' 1O_2 respectivement.

L'ajout de molécules chimiques génératrices de ROS induisait une diminution de la capacité photosynthétique effective des *B. minutum*. Cette diminution était plus importante en fonction de la concentration, probablement car plus de dommages étaient générés au niveau des photosystèmes et de la membrane thylakoïde (Fig. 23 et 27). En effet, toutes les ROS sont capables d'oxyder les protéines et les lipides.

Par ailleurs, ce n'est qu'à partir de 500 μM MSB que la capacité photosynthétique continue à diminuer au cours du temps, ce qui veut dire que les ROS ont initié des réactions en chaîne (telle que la peroxydation lipidique causée par $^{\bullet}OH$) ou ont causé des dégâts irréparables conduisant finalement à la mort cellulaire.

Contrairement à la MSB, des concentrations de l'ordre de 0,01 μM de DCMU sont suffisantes pour induire une diminution de la photosynthèse comprise entre 20 et 40% lorsque les *B. minutum* sont soumises à 230 μE (Fig. 27). Cette sensibilité au DCMU peut s'expliquer par le fait que le DCMU génère des ROS uniquement dans le chloroplaste alors que la MSB génère des ROS principalement dans le cytoplasme, qui réagissent donc avec tous les compartiments cellulaires.

La production de ROS par la MSB et le DCMU ont été confirmées par l'utilisation d' H_2DCFDA (Fig. 24) et de L-histidine (Fig. 28).

Préconditionnement

Nous avons ensuite appliqué aux cellules des concentrations en MSB et en DCMU qui induisaient une perte de capacité photosynthétique de maximum 20% afin d'induire des

mécanismes de préconditionnement à un stress oxydant subsequent. Une exposition de 10 minutes à 1200 μE , de 30 minutes à 230 μE après ajout de 0,078 μM DCMU, ou de 3h à 7,5 μM MSB, permettait d'amoinrir la perte de capacité photosynthétique effective liée à l'exposition à un stress subséquent.

L'exposition à 7,5 μM MSB pendant 3h des *B. minutum* a permis de les préconditionner pour l'ajout de 500 μM MSB qui a suivi. Nos analyses HPLC ont montré que l'exposition à la MSB induisait l'augmentation de la dinoxanthine, sans diminution significative de la diadinoxanthine. Or, la dinoxanthine est produite par oxydation de la diadinoxanthine. Il se pourrait donc que les cellules aient synthétisé plus de diadinoxanthine pour améliorer le cycle des xanthophylles.

Si la MSB agit comme chez *A. thaliana*, le préconditionnement est lié aussi à l'augmentation de la production de glutathione-S-transferase (GST) et de cytochrome P450 (Borges et al., 2014), des enzymes permettant la détoxification de la cellule. Cependant, la quantité de ROS produite après ajout des 500 μM est la même dans les cellules préconditionnées à 7,5 μM MSB que dans les cellules MSB 0 (Fig. 26). Soit le moment choisi pour la mesure ne permet pas de voir une réduction de la production des ROS dans les cellules préconditionnées, soit le préconditionnement est lié à autre chose qu'une diminution de la production de ROS (comme une amélioration des mécanismes de protection ou de réparation par exemple).

Les cellules ayant été soumises à 0,078 μM DCMU et exposées 30 minutes à 230 μE ont également eu tendance à montrer une légère résistance de leur appareil photosynthétique face à une 2^e exposition à cette intensité lumineuse. L'analyse en GC-MS a montré que le DCMU avait tendance à augmenter la quantité des acides gras suivants : que C18, C18:3 γ , C18:3 et C22. Il se pourrait donc que la 1^{ère} exposition à 230 μE en présence de DCMU induise une réparation des membranes lors du préconditionnement. De plus, si le préconditionnement s'effectue de la même façon que chez *C. reinhardtii*, l' $^1\text{O}_2$ induit l'augmentation de la transcription des GPX et des GST (Ledford et al., 2007).

Nous avons essayé de préconditionner les cellules à 1200 μE pendant 10 minutes en présence de 0,078 μM DCMU, mais ce stress était trop important pour induire un préconditionnement. Par contre, les traitements « Contrôle pulse » et « Contrôle stress » (Fig. 30) ont permis d'observer qu'une exposition à 1200 μE sans DCMU avait tendance à amoindrir la perte de capacité photosynthétique effective des cellules lors d'une 2^{ème} exposition, d'une heure cette fois, à la même intensité lumineuse. Ce préconditionnement correspond peut-être à une production accrue de caroténoïdes dans le but d'augmenter le cycle des xanthophylles, comme chez la Chlamydomonadale *Dunaliella bardawil* (Salguero et al., 2003).

La tentative infructueuse de préconditionnement à 1200 μE avec ajout de DCMU suggère que la quantité de ROS produite détermine si la cellule survivra en améliorant ses défenses antioxydantes, ou bien mourra.

Afin de déterminer quels mécanismes antioxydants sont améliorés par le préconditionnement, qu'il s'agisse de MSB, de DCMU ou de lumière à forte intensité, il faudrait réaliser des analyses transcriptomiques ciblant les défenses enzymatiques (voir introduction) et des analyses des défenses non-enzymatiques (voir introduction) des cellules préconditionnées. Il serait utile de faire de telles analyses au cours du préconditionnement pour voir un éventuel changement de stratégie antioxydante.

Par ailleurs, le fait que le préconditionnement ait fonctionné dans des berlins et des erlenmeyers de 500 mL indique qu'un préconditionnement à grande échelle est possible, ce qui serait utile pour générer du matériel en suffisance pour des analyses biochimiques.

Modification des pigments et des acides gras par les ROS

Nos autres objectifs étaient d'identifier quels pigments et quels acides gras étaient impactés par de grandes quantités de ROS chez cette souche d'algue afin d'éventuellement distinguer un pattern spécifique à un stress oxydant ou à des molécules en particulier, et/ou de possibles molécules utilisées comme signal cellulaire.

Les traitements induisent plusieurs dommages au niveau pigmentaire et lipidique. La MSB affecte plus les acides gras (en particulier C18 et C18:3) que les caroténoïdes (Fig. 35 et 36), mais une exposition prolongée augmente la quantité de chlorophylle-*a* dégradée et d'une molécule proche de la chlorophylle-*c*₂ (Fig. 35). Après 5h d'exposition, un pigment dont l'identification reste à effectuer était également plus abondante (Fig. 35). Il s'agit peut-être d'un produit de dégradation, mais il se pourrait qu'il ait été produit en réponse au stress pour contrebalancer les effets de la MSB. Il semble logique que la MSB affecte plus les acides gras étant donné qu'elle produit des ROS dans le cytosol, et que donc toutes les membranes intracellulaires sont susceptibles d'être endommagées. Toutefois, l'augmentation de la chlorophylle-*a* dégradée ainsi que de la molécule proche de la chlorophylle-*c*₂ prouve que les ROS produites par la MSB atteignent aussi les photosystèmes.

L'ajout de 0,078 μM DCMU augmente la quantité de phaeophytine (un produit de dégradation de la chlorophylle), et diminue celle des acides gras insaturés C18:1, C18:2 et C22:6 lorsque les *B. minutum* sont soumises à 2000 μE. Il semble que l'¹O₂ produit par les photosystèmes II endommage les photosystèmes eux-mêmes, mais aussi les acides gras insaturés des membranes thylakoïdiennes, avant d'éventuellement propager les dommages oxydants aux autres membranes.

Une exposition à 2000 μE, contrairement au DCMU, diminue la quantité de phaeophytine, et diminue la quantité de presque tous les acides gras de 16 carbones ou plus. Cette lumière semble moins affecter les photosystèmes que les acides gras des membranes.

Le seul pattern d'oxydation qui pourrait être spécifique au vu de nos expériences est la production de dinoxanthine, une xanthophylle provenant de l'oxydation de la diadinoxanthine des antennes collectrices, lorsqu'on ajoute de la MSB. Une production plus élevée de cette xanthophylle pourrait donc être le signe que les ROS O₂[•]/ H₂O₂ sont produites.

Il se pourrait que la phaeophytine (Fig. 35), la chlorophylle-*a* dégradée et/ou la molécule proche de la chlorophylle-*c*₂ (Fig. 34 et 35), si celle-ci correspond bien à un produit de dégradation de la chlorophylle-*c*₂, servent de molécules signal étant donné que leur quantité augmente lorsque des ROS sont produites.

On sait déjà que les caroténoïdes oxydés peuvent servir de signal (Havaux, 2014). Les caroténoïdes, et principalement le β-carotène peuvent être oxydés, et clivés, au niveau de chaque double liaison C-C, ce qui produit des aldéhydes, des cétones, des époxydes et des endoperoxydes. Les endoperoxydes sont les seuls à n'être formés que par une attaque d'¹O₂ et non par d'autres radicaux libres ou par action enzymatique. Chez *Arabidopsis thaliana*, les caroténoïdes présents dans les centres réactionnels, tel que le β-carotène, sont beaucoup plus oxydés par l'¹O₂ que les xanthophylles des complexes antennaires, et présentent un turnover

plus rapide. Les caroténoïdes sont également oxydés en faible quantité par certaines enzymes, telles que les carotenoid cleavage dioxygenases ou la lipoxygenase.

Les produits de clivage des caroténoïdes par $^1\text{O}_2$ sont électrophiles et très réactifs (Havaux, 2014). Ils font partie des reactive electrophile species (RES). Ils réagissent facilement avec les atomes d'azote et de soufre des biomolécules, et principalement avec les fonctions thiols des protéines, activant ainsi des facteurs de transcription. Chez *A. thaliana*, le β -cyclocitral, produit par clivage du β -carotène, atteint le noyau et augmente l'expression des gènes contre le stress et des gènes du métabolisme, et diminue celle des gènes du développement. Il a également été observé que les apocaroténoïdes peuvent se lier au glutathion grâce à la glutathione-S-transferase, et ainsi être déplacés jusqu'au noyau (Havaux, 2014). De plus, Ledford et al. (Ledford et al., 2007) ont montré que $^1\text{O}_2$ augmente l'expression de la glutathione-S-transferase chez *Chlamydomonas reinhardtii*, et que la plupart des gènes induits par $^1\text{O}_2$ présentent un élément de réponse aux électrophiles dans leur promoteur.

Par ailleurs, on sait également que, chez *C. reinhardtii*, des précurseurs de chlorophylle dérivés du chloroplaste servent de molécules signal pour induire des protéines de choc thermique nucléaires lorsque les cellules sont exposées à une forte lumière (Kropat, Oster, Rüdiger, & Beck, 1997).

Etant donné ces observations chez *A. thaliana* et *C. reinhardtii*, il se pourrait que les produits de dégradation des chlorophylles chez *B. minutum* induisent la production de diatoxanthine et de dinoxanthine pour améliorer le cycle des xanthophylles.

En ce qui concerne les acides gras, $^1\text{O}_2$ produit par une exposition à 2000 μE dégrade plus les lipides (LH) que les ROS produites par 1h d'exposition à 500 μM MSB (Fig. 36). Cette observation rejoint celles réalisées sur les plantes supérieures, qui ont conclu que la peroxydation des lipides était principalement causée par $^1\text{O}_2$ et non par les radicaux libres ($^{\bullet}\text{OH}$) dans les tissus photosynthétiques (Farmer & Mueller, 2013). Les acides gras dégradés par nos traitements servent peut-être eux-aussi de molécules signal, et seraient principalement produits comme-suit : chaque $^1\text{O}_2$ qui n'est pas neutralisé par les caroténoïdes peut produire un lipide hydroperoxydé (LOOH). Au plus il y a de LOOH produits, au plus la probabilité d'une fragmentation des lipides augmente. En effet, les LOOH sont susceptibles de former des dimères ou des oligomères sous forme de glycérolipides, qui se fragmentent spontanément en 4 parties : un glycérolipide fragmenté ayant libéré une chaîne acyle (F_1), un 2^{ème} glycérolipide sous forme radicalaire, et un $^{\bullet}\text{OH}$. Ces deux derniers radicaux peuvent absorber des hydrogènes de LH, formant ainsi des lipides radicalaires L^{\bullet} , qui eux-mêmes réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxy (LOO^{\bullet}). Ces LOO^{\bullet} absorbent également des hydrogènes des LH, ce qui continue le cycle de peroxydation (Farmer & Mueller, 2013).

Le fragment F_1 le plus produit est le malondialdéhyde (MDA), mais beaucoup d'autres fragments peuvent être produits. Tous ces fragments sont des RES, et peuvent induire l'expression de gènes de survie. Cependant, on ne sait pas encore comment ces fragments lipidiques modifient l'expression de ces gènes : en activant/inactivant des enzymes, en étant reconnus comme des biomolécules endommagées ou par des récepteurs lipidiques, ou bien en diminuant le stock cellulaire de réducteurs. Chez *A. thaliana*, on sait que les gènes activés par les RES lipidiques sont liés à la détoxification et à la réponse au stress thermique. En effet, les gènes activés augmentent la production de glutathione S-transferase (GST), de cytochrome P450, d'UDP-glucosyl transferases, et de protéines chaperones, dont la protéine de choc thermique HSP101. Ces protéines chaperones permettent de protéger les protéines en évitant

qu'elles forment des liaisons avec les lipides oxydés. Par ailleurs, les RES lipidiques diminuent l'expression des gènes en rapport avec la division cellulaire (Farmer & Mueller, 2013).

Outre les caroténoïdes et les lipides, plusieurs autres modifications des biomolécules par les ROS peuvent également servir de signal pour améliorer la résistance des cellules (Apel & Hirt, 2004).

Les ROS sont connues pour agir sur des histidines kinases, des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), des phosphatases, des facteurs de transcription, des acides gras et des caroténoïdes. Les ROS modifient la conformation de certaines histidine kinases, ce qui augmente leur affinité pour certains promoteurs. Chez les plantes, ce sont plutôt les MAPK qui sont activées, et qui activent des cascades de phosphorylations. Chez *A. thaliana*, il a d'ailleurs été prouvé que le H₂O₂ active des MAPK, et que la surexpression de certaines d'entre elles augmente la tolérance au choc thermique, au froid, au stress salin et au stress oxydant (Apel & Hirt, 2004). Toujours chez *A. thaliana*, le H₂O₂ inactive une protéine tyrosine phosphatase (en réagissant avec les groupements thiols), qui elle-même inactive la MAPK6. Aucun facteur de transcription spécifique des ROS n'a encore été clairement identifié chez *A. thaliana*, mais un élément de réponse aux ROS, *as-1*, a été identifié dans les promoteurs des gènes up-régulés par les ROS. Les principaux gènes connus pour être up-régulés par les ROS concernent la détoxification, la fonction des organelles, et la protection des protéines (par les protéines chaperones entre autres), alors que les gènes down-régulés concernent plutôt la croissance. Le fait que les ROS induisent une résistance ou bien la mort cellulaire dépend de leur concentration, de leur lieu de production et donc des biomolécules qu'elles attaquent, et de leur nature étant donné que certaines ROS causent plus de dégâts que d'autres. Par exemple, le •OH pose plus de problèmes aux cellules car il est extrêmement réactif et il est difficile à neutraliser étant donné qu'il n'y a pas de défense enzymatique contre cette ROS.

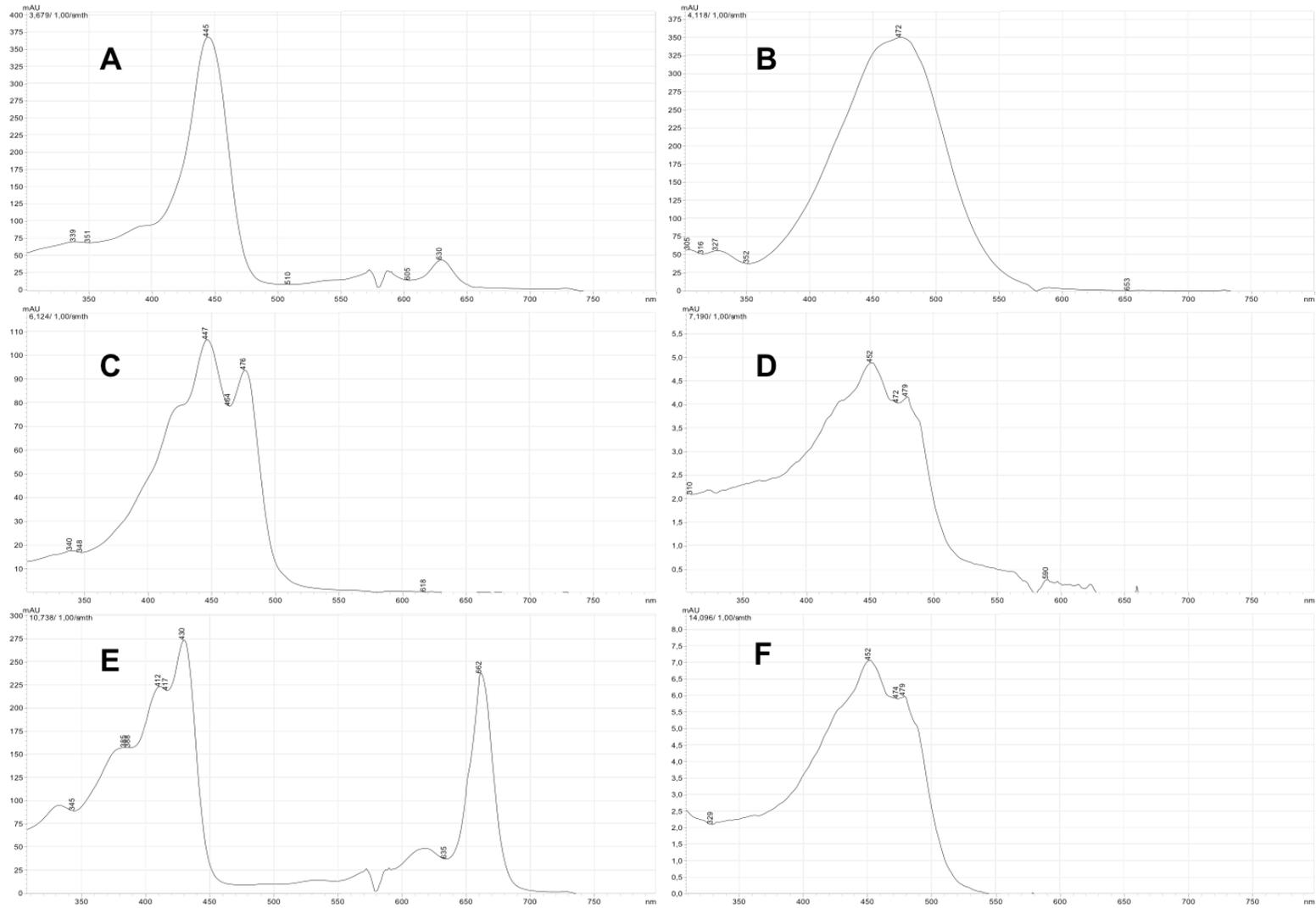
Afin d'essayer de déterminer quels signaux sont utilisés par les *B. minutum* pour mettre en place leur résistance suite à nos traitements de préconditionnement, il serait intéressant de réaliser des études supplémentaires par HPLC et GC sur des cellules préconditionnées.

Finalement, nos résultats permettent de conclure que la MSB et le DCMU pourront être utilisés afin de mieux comprendre les mécanismes d'un préconditionnement au stress oxydant, au moins chez les *B. minutum*, lors de futures expériences. Comprendre quelles défenses antioxydantes sont mises en place, et quels signaux les activent pourrait potentiellement servir à acclimater voire à adapter les algues symbiotiques des coraux.

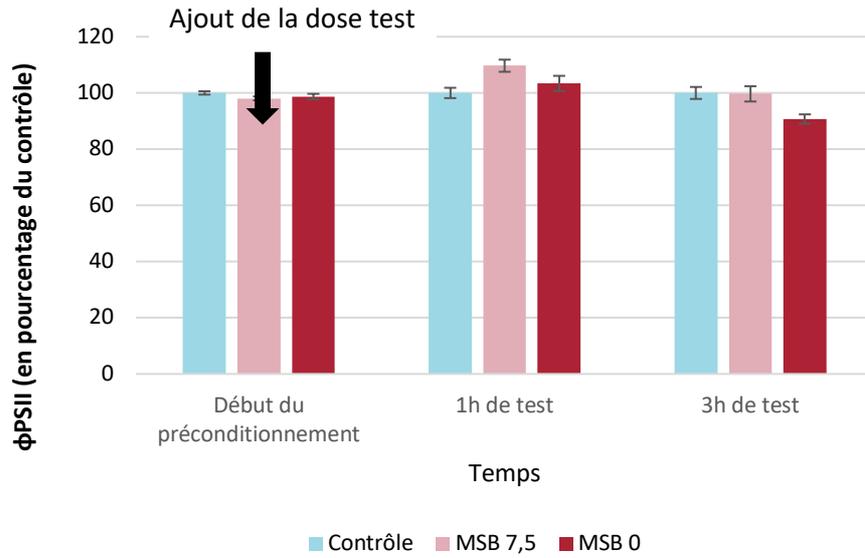
Chapitre 5 : Conclusion

Les résultats de nos études ont permis de montrer que les *B. minutum* peuvent être préconditionnées par une production directe de ROS suite à l'ajout de produits chimiques pro-oxydants. Le préconditionnement à la MSB semble être lié à une production supérieure de dinoxanthine. Dans ce cas, les *B. minutum* utiliseraient le cycle des xanthophylles comme défense antioxydante suite à la production d' $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/^{\bullet}OH$. Etant donné que la dinoxanthine ne change pas significativement après ajout de 1O_2 , cette xanthophylle pourrait servir de biomarqueur des $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/^{\bullet}OH$. Par ailleurs, nous avons pu identifier les pigments et les acides gras endommagés par les ROS. La MSB et le DCMU à 230 μE semblent endommager les chlorophylles et quelques acides gras insaturés, alors qu'une exposition à 1200 μE semble affecter de manière plus importante presque tous les acides gras. Il serait utile d'approfondir les connaissances sur ces dégâts lipidiques et pigmentaires afin de déterminer s'ils pourraient servir de molécules signal.

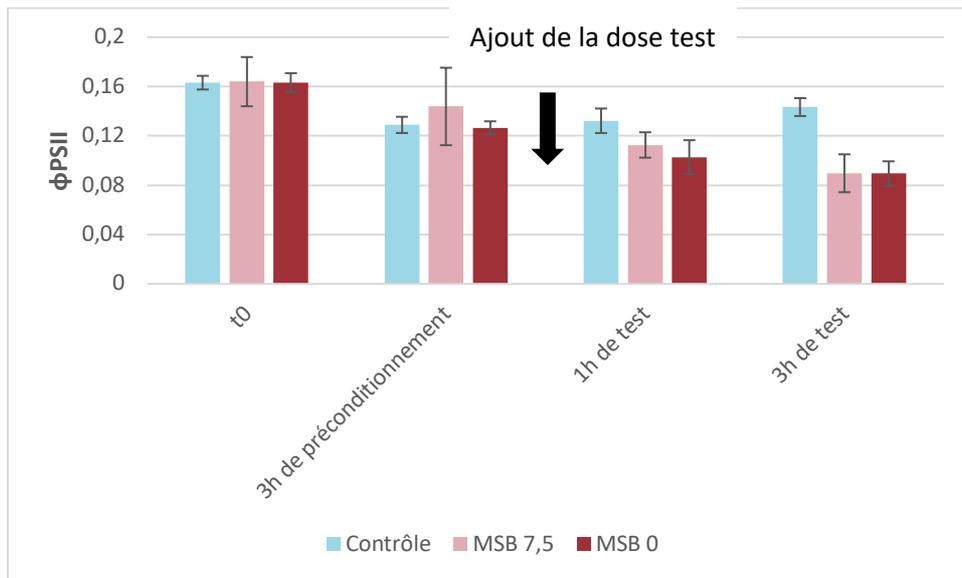
Annexes



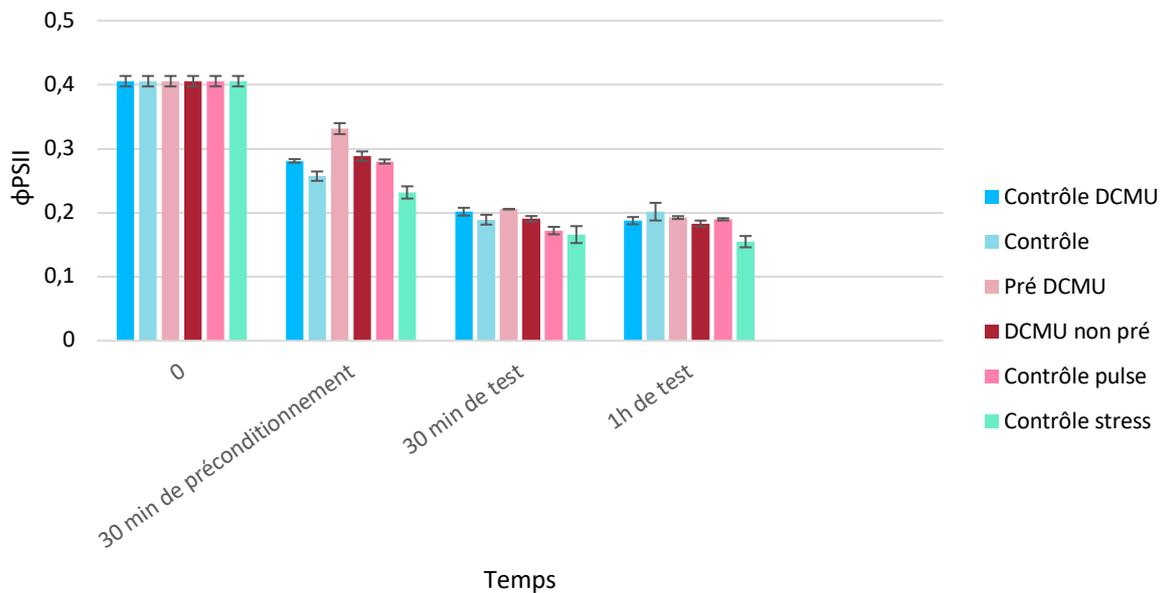
Annexe 1: Spectres d'absorption des pigments de *B. minutum*. **A** chlorophylle c2 ; **B** péridinine ; **C** diadinoxanthine ; **D** diatoxanthine ; **E** chlorophylle a ; **F** β-carotène



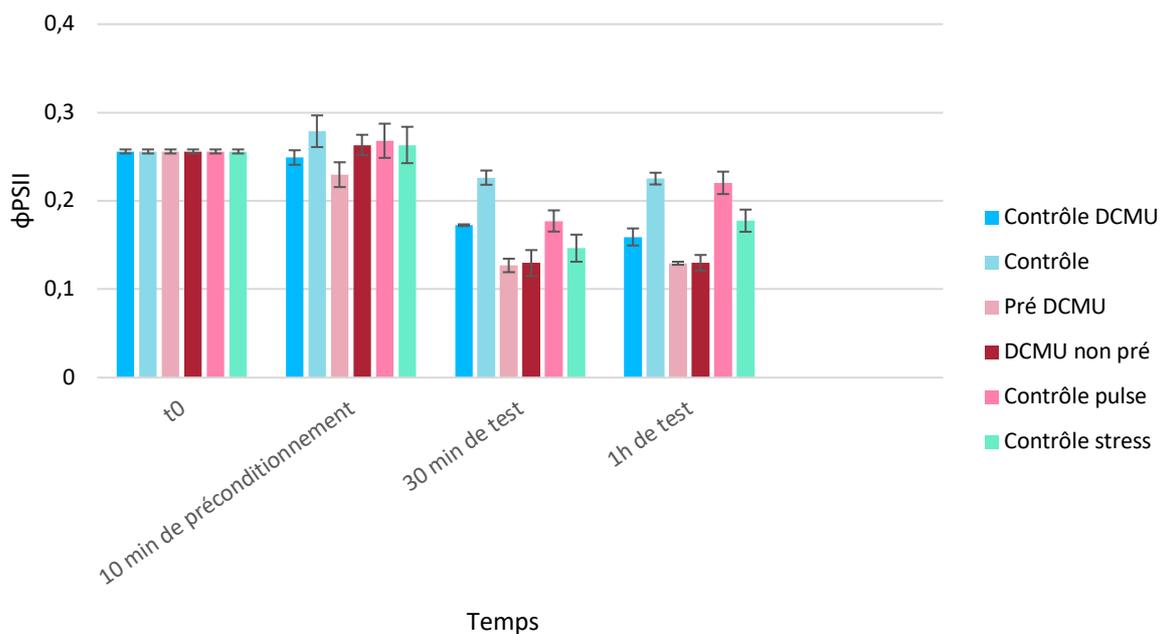
Annexe 2 : Préconditionnement de 2h à 7,5 μM dans des berlins de solutions algales concentrées à $3,3 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1} , et test à 500 μM ($n=3$). Le ΦPSII des cellules contrôles prend successivement les valeurs suivantes : 0,45, 0,30 et 0,28. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type



Annexe 3 : Synthèse de 2 expériences de préconditionnement de 3h à 7,5 μM MSB en erlenmeyers de 500 mL, testés à 500 μM . Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type



Annexe 4 : Effet sur la capacité photosynthétique d'un preconditionnement de 30 minutes à $0,078 \mu\text{M}$ de DCMU avec une exposition lumineuse de $230 \mu\text{E}$. Les différents traitements correspondent à ceux expliqués à la Fig. 20 du Matériel et Méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type



Annexe 5 : Effet sur le Φ_{PSII} d'une culture de *B. minutum* d'une exposition à $1200 \mu\text{E}$ après avoir été exposée à $1200 \mu\text{E}$ pendant 10 minutes 1h auparavant. Les différents traitements correspondent à ceux expliqués à la Fig. 20 du Matériel et Méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type

Bibliographie

- Adams, L. M., Cumbo, V. R., & Takabayashi, M. (2009). Exposure to sediment enhances primary acquisition of Symbiodinium by asymbiotic coral larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 377, 149–156. <https://doi.org/10.3354/meps07834>
- Alric, J. (2010). Cyclic electron flow around photosystem I in unicellular green algae. *Photosynthesis Research*, 106(1–2), 47–56. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9566-4>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 55, pp. 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 50, pp. 601–639.
- Asada, K., Allen, J., Foyer, C. H., & Matthijs, H. C. P. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419–1431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0703>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 31.
- Banaszak, A. T., & Trench, R. K. (1995). Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. I. Response of the algal symbionts in culture and in hospite. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 194(2), 213–232. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00072-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00072-0)
- Barbieri, M. A., Li, G., Colombo, M. I., & Stahl, P. D. (1994). Rab5, an early acting endosomal GTPase, supports in vitro endosome fusion without GTP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(29), 18720–18722.
- Bellantuono, A. J., Granados-Cifuentes, C., Miller, D. J., Hoegh-Guldberg, O., & Rodriguez-Lanetty, M. (2012). Coral thermal tolerance: tuning gene expression to resist thermal stress. *PloS One*, 7(11), e50685–e50685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050685>
- Biotek (2014) *An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells*. <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>
- Borges, A. A., Jiménez-Arias, D., Expósito-Rodríguez, M., Sandalio, L. M., & Pérez, J. A. (2014). Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5, p. 642. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00642>
- Brown, B. E., Ambarsari, I., Warner, M. E., Fitt, W. K., Dunne, R. P., Gibb, S. W., & Cummings, D. G. (1999). Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: Evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs*, 18(2), 99–105. <https://doi.org/10.1007/s003380050163>
- Buchanan, B. B., & Balmer, Y. (2005). Redox Regulation: A Broadening Horizon. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 187–220.
- Cardol, P., Forti, G., & Finazzi, G. (2011). Regulation of electron transport in microalgae. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(8), 912–918. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.004>

- Carlos, A. A., Baillie, B. K., Kawachi, M., & Maruyama, T. (1999). Phylogenetic position of Symbiodinium (Dinophyceae) isolates from tridacnids (Bivalvia), cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft coral (Anthozoa), and a free-living strain. *Journal of Phycology*, 35(5), 1054–1062. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3551054.x>
- Chakravarti, L. J., Beltran, V. H., & van Oppen, M. J. H. (2017). Rapid thermal adaptation in photosymbionts of reef-building corals. *Global Change Biology*, 23(11), 4675–4688. <https://doi.org/10.1111/gcb.13702>
- Chen, M.-C., Cheng, Y.-M., Sung, P.-J., Kuo, C.-E., & Fang, L.-S. (2003). Molecular identification of Rab7 (ApRab7) in *Aiptasia pulchella* and its exclusion from phagosomes harboring zooxanthellae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(3), 586–595. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01428-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01428-1)
- Chen, M.-C., Hong, M.-C., Huang, Y.-S., Liu, M.-C., Cheng, Y.-M., & Fang, L.-S. (2005). ApRab11, a cnidarian homologue of the recycling regulatory protein Rab11, is involved in the establishment and maintenance of the *Aiptasia*-Symbiodinium endosymbiosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(3), 1607–1616. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.133>
- Chitnis, P. R. (2001). Photosystem I: Function and physiology. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 52, pp. 593–626.
- Coffroth, M. A., Lewis, C. F., Santos, S. R., & Weaver, J. L. (2006). Environmental populations of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* can initiate symbioses with reef cnidarians. *Current Biology*, 16(23), R985–R987. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.049>
- Coffroth, M. A., & Santos, S. R. (2005). Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist*, 156(1), 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.02.004>
- Curien, G., Flori, S., Villanova, V., Magneschi, L., Giustini, C., Forti, G., ... Finazzi, G. (2016). The Water to Water Cycles in Microalgae. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1354–1363. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw048>
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330–335. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078204>
- Desalvo, M. K., Voolstra, C. R., Sunagawa, S., Schwarz, J. A., Stillman, J. H., Coffroth, M. A., ... Medina, M. (2008). Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular Ecology*, 17(17), 3952–3971. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03879.x>
- Downs, C. A., Fauth, J. E., Halas, J. C., Dustan, P., Bemiss, J., & Woodley, C. M. (2002). Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 533–543. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00907-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00907-3)
- Dunn, S. R., Schnitzler, C. E., & Weis, V. M. (2007). Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: Every which way you lose. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1629), 3079–3085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0711>
- Eberhard, S., Finazzi, G., & Wollman, F.-A. (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, Vol. 42, pp. 463–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452>

- Fabricius, K. E. (2005). Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 50(2), 125–146. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.028>
- Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., & McCloskey, L. (1993). Population control in symbiotic corals - Ammonium ions and organic materials maintain the density of zooxanthellae. *BioScience*, 43(9), 606–611. <https://doi.org/10.2307/1312147>
- Farmer, E. E., & Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 64, pp. 429–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120132>
- Ferro, Y., & Durrieu, C. (2014). *Impact des rejets urbains de temps de pluie sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques*.
- Fischer, B. B., Krieger-Liszkay, A., & Eggen, R. I. L. (2004). Photosensitizers neutral red (type I) and rose bengal (type II) cause light-dependent toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii* and induce the Gpxh gene via increased singlet oxygen formation. *Environmental Science and Technology*, 38(23), 6307–6313. <https://doi.org/10.1021/es049673y>
- Flores-Ramírez, L. A., & Liñán-Cabello, M. A. (2007). Relationships among thermal stress, bleaching and oxidative damage in the hermatypic coral, *Pocillopora capitata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 146(1-2 SPEC. ISS.), 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.09.008>
- Furla, P., Allemand, D., & Courtial, L. C. (2018). Coraux: les ingénieurs des océans sont menacés. Consulté le 12 août 2019. Encyclopédie de l'environnement. <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/coraux-ingenieurs-oceans-menaces/>
- Gates, R. D., Baghdasarian, G., & Muscatine, L. (1992). Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biological Bulletin*, 182(3), 324–332. <https://doi.org/10.2307/1542252>
- Goreau, T. F. (1964). Mass expulsion of zooxanthellae from Jamaican reef communities after hurricane flora. *Science*, 145(3630), 383–386. <https://doi.org/10.1126/science.145.3630.383>
- Gou, W., Sun, J., Li, X., Zhen, Y., Xin, Z., Yu, Z., & Lia, R. (2003). Phylogenetic analysis of a free-living strain of *Symbiodinium* isolated from Jiaozhou Bay, P.R. China. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(2), 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00242-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00242-9)
- Green, E. P. 1965, Ravilious, C., & Spalding, M. (2001). *World Atlas of Coral Reefs*. UNEP-WCMC.
- Halliwell, B. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. (Fifth edit; J. M. C. Gutteridge, Ed.). Oxford: Oxford : Oxford University Press.
- Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant Journal*, 79(4), 597–606. <https://doi.org/10.1111/tpj.12386>
- Hawkins, T. D., & Warner, M. E. (2017). Warm preconditioning protects against acute heat-induced respiratory dysfunction and delays bleaching in a symbiotic sea anemone. *Journal of Experimental Biology*, 220(6), 969–983. <https://doi.org/10.1242/jeb.150391>
- Haynes, D., Ralph, P., Prange, J., & Dennison, B. (2000). The Impact of the Herbicide Diuron on Photosynthesis in Three Species of Tropical Seagrass. *Marine Pollution Bulletin*, 41(7), 288–293. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00127-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00127-2)

- Hill, R., Larkum, A. W. D., Frankart, C., Kühl, M., & Ralph, P. J. (2004). Loss of functional photosystem ii reaction centres in zooxanthellae of corals exposed to bleaching conditions: Using fluorescence rise kinetics. *Photosynthesis Research*, *82*(1), 59–72. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000040444.41179.09>
- Hirose, M., Reimer, J. D., Hidaka, M., & Suda, S. (2008). Phylogenetic analyses of potentially free-living Symbiodinium spp. isolated from coral reef sand in Okinawa, Japan. *Marine Biology*, *155*(1), 105–112. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1011-2>
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S.-M., Qian, P., Xin, W., Li, H.-Y., ... Tran, L.-S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, *6*(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00420>
- Houlbrèque, F., & Ferrier-Pagès, C. (2009). Heterotrophy in tropical scleractinian corals. *Biological Reviews*, *84*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00058.x>
- Iglesias-Prieto, R., Matta, J. L., Robins, W. A., & Trench, R. K. (1992). Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate Symbiodinium microadriaticum in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(21), 10302–10305. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10302>
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 57, pp. 395–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>
- Johnson, X., Vandystadt, G., Bujaldon, S., Wollman, F. A., Dubois, R., Roussel, P., ... Béal, D. (2009). A new setup for in vivo fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynthesis Research*, *102*(1), 85–93. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9487-2>
- Jones, R. J., Hoegh-Guldberg, O., Larkum, A. W. D., & Schreiber, U. (1998). Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell and Environment*, *21*(12), 1219–1230. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00345.x>
- Jones, R. J., & Yellowlees, D. (1997). Regulation and control of intracellular algae (= zooxanthellae) in hard corals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *352*(1352), 457–468. <https://doi.org/10.1098/rstb.1997.0033>
- Knowlton, N. (2001). The future of coral reefs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(10), 5419–5425. <https://doi.org/10.1073/pnas.091092998>
- Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *56*(411), 337–346. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh237>
- Kropat, J., Oster, U., Rüdiger, W., & Beck, C. F. (1997). Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(25), 14168–14172. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14168>
- Lajeunesse, T. C., & Trench, R. K. (2000). Biogeography of two species of Symbiodinium (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Biological Bulletin*, *199*(2), 126–134. <https://doi.org/10.2307/1542872>
- LaJeunesse, T C, Thornhill, D. J., Cox, E. F., Stanton, F. G., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W. (2004). High diversity and host specificity observed among symbiotic dinoflagellates in reef coral communities from Hawaii. *Coral Reefs*, *23*(4), 596–603. <https://doi.org/10.1007/s00338-004-0428-4>

- LaJeunesse, Todd C, Parkinson, J. E., Gabrielson, P. W., Jeong, H. J., Reimer, J. D., Voolstra, C. R., & Santos, S. R. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, 28(16), 2570-2580.e6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.008>
- Laloi, C., Przybyla, D., & Apel, K. (2006). A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1719–1724. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj183>
- Latunde-Dada, Y. (2017). Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.019>
- Ledford, H. K., Chin, B. L., & Niyogi, K. K. (2007). Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6(6), 919–930. <https://doi.org/10.1128/EC.00207-06>
- Leggat, W., Badger, M. R., & Yellowlees, D. (1999). Evidence for an inorganic carbon-concentrating mechanism in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Plant Physiology*, 121(4), 1247–1255. <https://doi.org/10.1104/pp.121.4.1247>
- Leggat, W., Whitney, S., & Yellowlees, D. (2004). Is coral bleaching due to the instability of the zooxanthellae dark reactions? *Symbiosis*, 37(1–3), 137–153.
- Lesser, M. P. (2004). Experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1–2), 217–252. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.027>
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, Vol. 68, pp. 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Littman, R. A., van Oppen, M. J. H., & Willis, B. L. (2008). Methods for sampling free-living *Symbiodinium* (zooxanthellae) and their distribution and abundance at Lizard Island (Great Barrier Reef). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 364(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.06.034>
- Ludvíková, L., Friš, P., Heger, D., Šebej, P., Wirz, J., & Klán, P. (2016). Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: A comprehensive kinetic analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(24), 16266–16273. <https://doi.org/10.1039/c6cp01710j>
- Manning, M. M., & Gates, R. D. (2008). Diversity in populations of free-living *Symbiodinium* from a Caribbean and Pacific reef. *Limnology and Oceanography*, 53(5), 1853–1861. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.5.1853>
- Marlow, H. Q., & Martindale, M. Q. (2007). Embryonic development in two species of scleractinian coral embryos: *Symbiodinium* localization and mode of gastrulation. *Evolution and Development*, 9(4), 355–367. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2007.00173.x>
- McClanahan, T. R., Weil, E., Cortés, J., Baird, A. H., & Ateweberhan, M. (2009). *Consequences of Coral Bleaching for Sessile Reef Organisms* (Vol. 205; M. J. H. Oppen & J. M. Lough, Eds.). https://doi.org/10.1007/978-3-540-69775-6_8
- Méndez-Hurtado, J., López, R., Suárez, D., & Menéndez, M. I. (2012). Theoretical study of the oxidation of histidine by singlet oxygen. *Chemistry - A European Journal*, 18(27), 8437–8447. <https://doi.org/10.1002/chem.201103680>
- Middlebrook, R., Hoegh-Guldberg, O., & Leggat, W. (2008). The effect of thermal history on the susceptibility of reef-building corals to thermal stress. *Journal of Experimental Biology*, 211(7), 1050 LP – 1056. <https://doi.org/10.1242/jeb.013284>

- Moberg, F., & Folke, C. (1999). Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*, 29(2), 215–233. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(99\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(99)00009-9)
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 52, pp. 561–591.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 58, pp. 459–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- Møller, I. M., & Kristensen, B. K. (2004). Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3(8), 730–735. <https://doi.org/10.1039/b315561g>
- Mondialisation, M. (2018). Blanchissement du corail: comment un phénomène rare est devenu la norme.
- Müller, P., Li, X.-P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(6), 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.11.019>
- Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. 57(1), 521–565. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350>
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S. I., Inaba, M., Yokota, A., & Murata, N. (2001). Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO Journal*, 20(20), 5587–5594. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.20.5587>
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 50, pp. 333–359.
- Noctor, G., Dutilleul, C., De Paepe, R., & Foyer, C. H. (2004). Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 49–57. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh021>
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: Implications for cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 47, pp. 143–183. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122>
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 552–565. <https://doi.org/10.1038/nrm1150>
- Ort, D. R., & Baker, N. R. (2002). A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00259-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00259-5)
- Parkinson, J. E., Tivey, T. R., Mandelare, P. E., Adpressa, D. A., Loesgen, S., & Weis, V. M. (2018). Subtle Differences in Symbiont Cell Surface Glycan Profiles Do Not Explain Species-Specific Colonization Rates in a Model Cnidarian-Algal Symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 842. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00842>
- Peng, S.-E., Wang, Y.-B., Wang, L.-H., Chen, W.-N. U., Lu, C.-Y., Fang, L.-S., & Chen, C.-S. (2010). Proteomic analysis of symbiosome membranes in cnidaria - Dinoflagellate endosymbiosis. *Proteomics*, 10(5), 1002–1016. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900595>

- Perez, S., & Weis, V. (2006). Nitric oxide and cnidarian bleaching: An eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 209(14), 2804–2810. <https://doi.org/10.1242/jeb.02309>
- Pochon, X., Stat, M., Takabayashi, M., Chasqui, L., Chauka, L. J., Logan, D. D. K., & Gates, R. D. (2010). Comparison of endosymbiotic and free-living Symbiodinium (dinophyceae) diversity in a hawaiian reef environment. *Journal of Phycology*, 46(1), 53–65. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00797.x>
- Porto, I., Granados, C., Restrepo, J. C., & Sánchez, J. A. (2008). Macroalgal-associated dinoflagellates belonging to the genus Symbiodinium in caribbean reefs. *PLoS ONE*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002160>
- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., & Jackson, R. (2012). La photosynthèse. In *Campbell Biologie* (9th ed., pp. 207–232). San Francisco: Pearson Education, Inc.
- Roberty, S., Fransolet, D., Cardol, P., Plumier, J.-C., & Franck, F. (2015). Imbalance between oxygen photoreduction and antioxidant capacities in Symbiodinium cells exposed to combined heat and high light stress. *Coral Reefs*, 34(4), 1063–1073. <https://doi.org/10.1007/s00338-015-1328-5>
- Roberty, S., Furla, P., & Plumier, J.-C. (2016). Differential antioxidant response between two Symbiodinium species from contrasting environments. *Plant Cell and Environment*, 39(12), 2713–2724. <https://doi.org/10.1111/pce.12825>
- Rodriguez, R., & Redman, R. (2005). Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3175–3176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500367102>
- Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A., & Jara, J. (1997). Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388(6639), 265–269. <https://doi.org/10.1038/40843>
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigar, J., Vega, J. M., Vilchez, C., & León, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 20(4), 249–253. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00065-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00065-0)
- Salido, G. M. (2007). Oxidative stress, intracellular calcium signals and apoptotic processes. In *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca²⁺ Homeostasi* (pp. 1–16). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9873-4_1
- Santos, S. R. (Auburn U. (2009). Photo gallery of Professor Scott R. Santos Lab (Auburn University). Retrieved from <http://webhome.auburn.edu/~santosr/>
- Sheppard, C. R. C., Davy, S. K., & Pilling, G. M. (2009). The Biology of Coral Reefs. In *The Biology of Coral Reefs*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198566359.001.0001>
- Six, C. (UPMS S. universités). (n.d.). *La photosynthèse oxygénique* (Sorbonne universités). [http://web11.sb-roscoff.fr/download/fr2424/enseignement/lbm/LBM2/2011/S4/BIOP/UE BIOP - Poly Photosynth%^E8se.pdf](http://web11.sb-roscoff.fr/download/fr2424/enseignement/lbm/LBM2/2011/S4/BIOP/UE%20BIOP%20-%20Poly%20Photosynth%C3%A8se.pdf)
- Smith, D. J., Suggett, D. J., & Baker, N. R. (2005). Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biology*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2003.00895.x>
- Smith, G. J., & Muscatine, L. (1999). Cell cycle of symbiotic dinoflagellates: Variation in phase-duration with anemone nutritional status and macronutrient supply in the *Aiptasia pulchella*-*Symbiodinium pulchrum* symbiosis. *Marine Biology*, 134(3),

- 405–418. <https://doi.org/10.1007/s002270050557>
- Stat, M., Carter, D., & Hoegh-Guldberg, O. (2006). The evolutionary history of Symbiodinium and scleractinian hosts-Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8(1), 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2006.04.001>
- Steen, R. G., & Muscatine, L. (1987). Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *The Biological Bulletin*, 172(2), 246–263. <https://doi.org/10.2307/1541797>
- Suggett, D. J., Warner, M. E., Smith, D. J., Davey, P., Hennige, S., & Baker, N. R. (2008). Photosynthesis and production of hydrogen peroxide by Symbiodinium (Pyrrhophyta) phylotypes with different thermal tolerances. *Journal of Phycology*, 44(4), 948–956. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00537.x>
- Takahashi, S., & Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*, 13(4), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.005>
- Takahashi, S., Nakamura, T., Sakamizu, M., Van Woesik, R., & Yamasaki, H. (2004). Repair Machinery of Symbiotic Photosynthesis as the Primary Target of Heat Stress for Reef-Building Corals. *Plant and Cell Physiology*, 45(2), 251–255. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch028>
- Takahashi, S., Whitney, S. M., & Badger, M. R. (2009). Different thermal sensitivity of the repair of photodamaged photosynthetic machinery in cultured Symbiodinium species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3237–3242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808363106>
- Takahashi, S., Yoshioka-Nishimura, M., Nanba, D., & Badger, M. R. (2013). Thermal acclimation of the symbiotic alga Symbiodinium spp. alleviates photobleaching under heat stress. *Plant Physiology*, 161(1), 477–485. <https://doi.org/10.1104/pp.112.207480>
- Tchernov, D., Gorbunov, M. Y., De Vargas, C., Yadav, S. N., Milligant, A. J., Häggblom, M., & Falkowski, P. G. (2004). Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), 13531–13535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402907101>
- Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14(4), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.008>
- Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoerberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., ... Mueller, M. J. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*, 148(2), 960–968. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125690>
- Turina, P., Samoray, D., & Gräber, P. (2003). H⁺/ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by CF₀F₁-liposomes. *EMBO Journal*, 22(3), 418–426. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg073>
- Wakefield, T. S., & Kempf, S. C. (2001). Development of host- and symbiont-specific monoclonal antibodies and confirmation of the origin of the symbiosome membrane in a cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Biological Bulletin*, 200(2), 127–143. <https://doi.org/10.2307/1543306>
- Warner, M. E., & Berry-Lowe, S. (2006). Differential xanthophyll cycling and photochemical activity in symbiotic dinoflagellates in multiple locations of three species of Caribbean

- coral. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 339(1), 86–95.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.07.011>
- Warner, M. E., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W. (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 8007–8012.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8007>
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: Stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 211(19), 3059–3066.
<https://doi.org/10.1242/jeb.009597>
- Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., & Leegood, R. C. (2000). Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1517–1529.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0712>
- Wollman, F.-A. (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO Journal*, 20(14), 3623–3630.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3623>
- Yellowlees, D., Rees, T. A. V., & Leggat, W. (2008). Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, Cell and Environment*, 31(5), 679–694.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01802.x>
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 107–117. <https://doi.org/10.1038/35052055>

Résumé

Mécanismes d'acclimatation aux espèces réactives de l'oxygène chez les Symbiodiniaceae de coraux scléactiniaires

Mémoire réalisé par Maud MICHA, sous la tutelle du professeur Jean-Christophe Plumier (promoteur) et du docteur Stéphane Roberty (co-promoteur), laboratoire de physiologie animale

Année académique 2018-2019

Les récifs coralliens sont actuellement menacés par le réchauffement climatique alors qu'ils abritent des écosystèmes complexes et une biodiversité importante qui leur sont inféodés. Cependant, plusieurs études ont montré que les coraux et leurs algues symbiotiques (Symbiodiniaceae) pouvaient être préconditionnés, voire s'adapter, à une augmentation de la température. Or, une augmentation de la température est associée, entre autres, à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les organismes photosynthétiques.

Un des buts de ce mémoire était de déterminer si les *B. minutum* de souche SSB01, initialement extraites d'anémones de l'espèce *Exaiptasia pallida*, pouvaient être préconditionnées par une production directe de ROS après ajout de MSB ou de DCMU, ces composés étant connus pour produire de l' $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/^{\bullet}OH$ et de l' 1O_2 respectivement. Le préconditionnement a été évalué par la capacité photosynthétique effective ($\Phi PSII$) des algues. Il s'est avéré qu'une première exposition à de la MSB, à du DCMU sous une intensité lumineuse de 230 μE , et même à une intensité lumineuse de 1200 μE sans ajout de DCMU pouvaient amoindrir la perte de capacité photosynthétique effective lors d'un stress subsequent.

La MSB et le DCMU pourront être utilisés lors de futures expériences pour améliorer les connaissances sur les mécanismes du préconditionnement à un stress oxydant chez les *B. minutum*, qu'il s'agisse des signaux intracellulaires ou des défenses antioxydantes mises en place.

Par la suite, des analyses HPLC et GC-MS ont été réalisées afin d'analyser l'effet de la MSB, du DCMU, et d'une intensité lumineuse élevée sur les pigments et les acides gras des *B. minutum*. La MSB et le DCMU ont endommagé principalement les chlorophylles et quelques acides gras, alors qu'une intensité lumineuse élevée endommageait presque tous les acides gras. Il se pourrait que ces pigments et ces lipides endommagés aient servi de messagers pour induire le préconditionnement, mais de plus amples analyses nécessitent d'être faites afin de pouvoir confirmer cette hypothèse.

De plus, les analyses HPLC et GC-MS ont montré que de la dinoxanthine était produite après ajout de MSB, ce qui signifie que les *B. minutum* utilisent le cycle des xanthophylles comme moyen de défense antioxydante suite à l'ajout de ce produit chimique. Cette production n'a pas été observée avec le DCMU ou les 1200 μE . Il se pourrait donc que l'augmentation de la dinoxanthine soit utilisée comme biomarqueur de la production d' $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/^{\bullet}OH$, même si d'autres analyses sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.