

Mémoire

Auteur : Simon, Louis

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

Faculté : Faculté des Sciences

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


Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18927>

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.



Influence de la source d'azote sur la réponse au stress chez *Symbiodinium microadriaticum*

Mémoire réalisé dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie

Louis SIMON

« Conformément aux règles imposées à la rédaction, ce mémoire ne doit pas dépasser 50 pages, rédigées en Times 12 ou équivalent »

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier mes promoteurs, Jean-Christophe Plumier et Stéphane Roberty, pour leur accueil au sein de leur laboratoire et leur accompagnement tout au long de la réalisation de ce travail.

Merci également à Maud et Chloé pour leurs conseils et leur aide lors de certaines manipulations, ainsi que pour leur patience lorsque des explications s'imposaient.

Merci à Marie pour ton soutien et tes encouragements durant tout mon cursus, je n'y serais jamais arrivé sans toi.

Merci à mes parents ainsi qu'à Pierre et Sylvie pour leur aide lors de la relecture de ce travail.

Merci enfin à toutes les personnes qui ont, directement ou indirectement, participé à l'accomplissement de ce travail.

Résumé

La survie des coraux hermatypiques et la préservation des récifs qu'ils bâtissent repose sur un dialogue complexe entre le corail hôte et ses microalgues endosymbiotiques. Ce dialogue permet de maintenir l'équilibre symbiotique en régulant divers échanges entre les deux partenaires, mais il peut être facilement perturbé par des changements de paramètres environnementaux. Les activités anthropiques et les changements climatiques accélèrent la rupture de cet équilibre symbiotique, accentuant la fréquence et l'ampleur du phénomène de blanchissement corallien, notamment en influençant des facteurs tels que la température, l'exposition à la lumière et l'eutrophisation du milieu.

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'impact de la nature de la source d'azote sur la réponse aux stress thermiques et lumineux de la microalgue *Symbiodinium microadriaticum*. Pour ce faire, divers paramètres physiologiques ont été mesurés lors de l'exposition à des stress de divers échantillons suspendus dans trois milieux différents : un milieu sans aucune source d'azote, un milieu qui a pour seule source d'azote du nitrate et un milieu dont la seule source d'azote est de l'ammonium. Les résultats obtenus montrent des effets de ces milieux sur les capacités photosynthétiques et sur l'homéostasie redox des Symbiodiniaceae.

Abstract

The survival of hermatypic corals and the preservation of the reefs they construct depend on a complex dialogue between the host coral and its endosymbiotic microalgae. This dialogue helps to maintain the symbiotic balance by regulating various exchanges between the two partners, but it can be easily disrupted by changes in environmental parameters. Anthropogenic activities and climate change are accelerating the breakdown of this symbiotic balance, increasing the frequency and magnitude of coral bleaching events, particularly by influencing factors such as temperature, light exposure, and eutrophication of the environment.

The aim of this study was to investigate the impact of the type of nitrogen source on the response to thermal and light stress in the microalgae *Symbiodinium microadriaticum*. To do this, various physiological parameters were measured during exposure to stress in different samples suspended in three different media: one without any nitrogen source, one with nitrate as the sole nitrogen source, and one with ammonium as the sole nitrogen source. The results obtained show the effects of these media on the photosynthetic capabilities and redox homeostasis of Symbiodiniaceae.

Table des abréviations

ATP	Adénosine TriPhosphaste
CBASS	Coral Bleaching Automated Stress System
Ddx	Diadinoxanthine
DON	Azote organique dissous
DPS	État de dé-époxydation des xanthophylles
DTPA	Acide diéthylène triamine penta acétique
Dtx	Diatoxanthine
F_v/F_m	Rendement quantique photochimique maximum du photosystème II
GSH	Glutathion sous forme monomérique réduite
GS-SG	Glutathion sous forme dimérique oxydée
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF	Milieu sans azote
NO	Oxyde nitrique
NOS	Nitric Oxide Synthase
NPQ	Rendement d'extinction non photochimique
O₂^{•-}	Ion superoxyde
rETR	Taux de transport relatif des électrons au travers du photosystème II
RNS	Espèce réactive de l'azote
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
Rubisco	Ribulose diphosphate carboxylase/oxygénase
SOD	Superoxyde dismutase
ΦPSII	Rendement quantique photochimique maximum effectif du photosystème II

Table des figures

Figure 1 : Carte de répartition des récifs coralliens.....	2
Figure 2: Représentations des flux d'azote dans la symbiose corallienne.	5
Figure 3 : Schéma simplifié de la phase claire de la photosynthèse.	7
Figure 4 : Schéma des différentes réductions de l'oxygène menant à la productions des différentes espèces réactives d'oxygène	8
Figure 5 : Cycle du glutathion.....	9
Figure 6 : Blanchissement corallien.....	10
Figure 7 : Modélisation des flux métaboliques, ainsi que la réponse de la cellule hôte, en présence de deux Symbiotes différents, l'un homologue et l'autre hétérologue.....	12
Figure 8 : Etat de dé-époxydation des xanthophylles (DPS) en fonction de la température et de l'intensité lumineuse.	27
Figure 9 : Exemple des courbes de saturation des différents paramètres photosynthétiques calculés à partir des valeurs de fluorescence.....	28
Figure 10 : Rendement quantique photochimique maximal du PS II (F_v/F_m , pas d'unité) en fonction des différentes conditions de stress thermiques et lumineux.....	29
Figure 11 : Transport relatif d'électrons au travers du PS II ($rETR$, en $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).	31
Figure 12 : Paramètre d'extinction non photochimique (NPQ, pas d'unité) en fonction des conditions de stress thermiques et lumineux, mesuré à 570 μE	32
Figure 13 : Production de ROS intracellulaire évaluée au moyen des valeurs de fluorescence de la sonde H_2DCFDA incubée dans les cellules et mesurée après exposition aux différentes conditions de stress thermiques et lumineux.	33
Figure 14 : Production de NO intracellulaire évaluée au moyen des valeurs de fluorescence de la sonde DAF-FM incubée dans les cellules et mesurée après exposition aux différentes conditions de stress thermiques et lumineux.	34
Figure 15 : Concentrations en H_2O_2 extracellulaires moyennes (en μM) déterminées au moyen de la sonde Amplex™ Red (Invitrogen).	36

Table des tableaux

Tableau 1 : Représentations des différentes conditions expérimentales en fonction des conditions thermiques et lumineuses.....	17
Tableau 2 : Les différents paramètres photosynthétiques calculés et leur formule associée.	19
Tableau 3 : Séquence d'élution du système HPLC.....	23
Tableau 4 : Paramètres mesurés sur lesquels la durée de carence en azote a un effet significatif.	25
Tableau 5 : Contenu pigmentaire des cultures de <i>Symbiodinium microadriaticum</i> après les différentes conditions de stress.	26

Table des matières

1	Introduction.....	1
1.1	Récifs coralliens	1
1.1.1	Biologie et écologie	1
1.1.2	Symbiose et holobionte.....	2
1.2	Symbiose avec les Symbiodiniaceae.....	4
1.2.1	Cycle de l'azote	4
1.2.2	Photosynthèse	5
1.2.3	Stress oxydatif.....	7
1.3	Blanchissement corallien.....	10
1.3.1	Définition et mécanismes.....	10
1.3.2	Causes.....	11
2	Objectifs.....	15
3	Matériel et Méthode	16
3.1	Matériel biologique	16
3.1.1	Souche	16
3.1.2	Milieu de culture	16
3.1.3	Conditions de culture	16
3.2	Conditions d'expérimentation	17
3.3	Paramètres mesurés.....	18
3.3.1	Dosage des chlorophylles	18
3.3.2	Détermination de la concentration cellulaire.....	18
3.3.3	Mesures de l'activité photosynthétique	19
3.3.4	Dosage d'espèces réactives intracellulaires.....	20
3.3.5	Dosage du peroxyde d'hydrogène extracellulaire	21
3.3.6	Dosage du contenu pigmentaire	22
3.4	Analyses statistiques.....	24
4	Résultats	25
4.1	Activité photosynthétique et contenu pigmentaire	25
4.1.1	Contenu pigmentaire.....	25
4.1.2	Activité photosynthétique	27
4.2	Espèces réactives.....	32
5	Discussion	37

5.1	Influence des stress thermiques et lumineux sur les différents paramètres physiologiques mesurés	37
5.2	Influence de la nature de la source d'azote sur les différents paramètres physiologiques mesurés	41
6	Conclusions et perspectives	45
7	Références	46

1 Introduction

1.1 Récifs coralliens

1.1.1 Biologie et écologie

Les récifs coralliens sont les écosystèmes marins possédant la plus grande biodiversité. On peut y trouver des représentants de 32 des 34 embranchements animaux connus, et on estime qu'ils abritent entre 25 % et 30 % de la biodiversité marine, malgré le fait que leur superficie représente moins de 0,3 % de la surface des océans. Ce sont donc des lieux avec une grande importance écologique, mais également économique grâce aux revenus qu'ils génèrent au travers de la pêche, du tourisme, la production potentielle de molécules d'intérêt pharmaceutique, etc. (Moberg & Folke, 1999; Sheppard et al., 2018; van de Water et al., 2022).

Ces écosystèmes complexes sont formés de façon naturelle par des organismes appartenant à l'embranchement des cnidaires et à l'ordre des sclérouctiniens. Ces coraux bâtisseurs de récifs fabriquent leur propre substrat, un squelette calcaire externe formé par précipitation du carbonate de calcium sous forme d'aragonite (Sheppard et al., 2018).

Les récifs coralliens se trouvent dans des zones où les moyennes de températures de l'eau sont supérieures à 20°C. Leur plage de température optimale se situe entre 25 et 27°C. Cette température est essentielle pour la formation de leur structure calcaire. En effet, la solubilité du carbonate de calcium diminue à mesure que la température augmente. Ainsi, il se précipite plus facilement lorsque la température est élevée (Burton & Walter, 1987).

Comme les coraux hermatypiques vivent en symbiose avec des microalgues photosynthétiques, ils doivent s'établir dans des environnements où les conditions permettent de maintenir une relation symbiotique équilibrée mutuellement bénéfique et durable, et de répondre aux conditions nécessaires pour la réalisation de la photosynthèse par les algues. C'est pourquoi les récifs coralliens ne sont retrouvés que dans des environnements où les conditions sont relativement stables dans le temps, où la turbidité de l'eau n'est pas trop importante afin de permettre la photosynthèse. Les récifs sont donc localisés dans la zone intertropicale (Figure 1), entre 30° de latitude nord et 30° de latitude sud (Sheppard et al.,

2018). Afin d'assurer un bon accès à la lumière à leurs symbiotes, les coraux vivent généralement dans les 30 premiers mètres de profondeur, même s'ils sont capables de former des récifs mésophotiques, des récifs situés à une profondeur où il n'y a que peu de lumière. Dans ce cas, le manque de lumière est compensé par des apports conséquents de nutriments par des upwellings et des vagues internes (Ezzat et al., 2017).

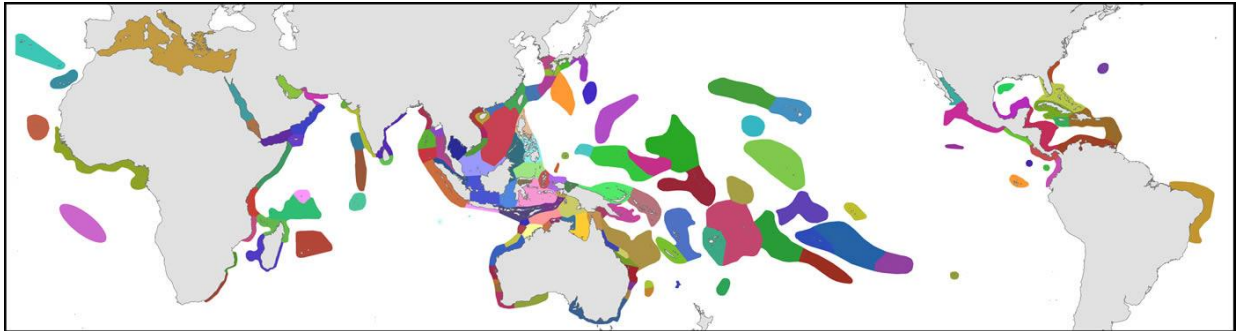


Figure 1 : Carte de répartition des récifs coralliens. Les couleurs correspondent aux différentes éco-régions qui ne seront pas détaillées ici (Veron et al., 2015)

1.1.2 Symbiose et holobionte

Les symbiotes les plus connus et les plus documentés sont les Symbiodiniaceae. C'est une famille de microalgues unicellulaires de la classe des Dinophyceae qui vivent dans les cellules du gastroderme de leur corail hôte, où elles sont présentes sous forme coccoïde et n'ont plus de flagelle (Sheppard et al., 2018).

Auparavant, les Symbiodiniaceae étaient regroupées en clades distincts sur base d'analyses génétiques d'ARNr et de gènes chloroplastiques. Cependant, cette classification a été récemment revue et elles sont maintenant définies en genres distincts (LaJeunesse et al., 2018), bien que l'on continue à utiliser les anciens clades par habitude ou par facilité.

Comme dit précédemment, les coraux vivent en symbiose avec des Symbiodiniaceae, mais également avec tout un microbiote composé de bactéries, de protistes, de champignons, d'archées mais aussi de virus, qui contribuent ensemble à l'homéostasie de ce que l'on appelle l'holobionte corallien (Bourne et al., 2016; Garrido et al., 2021; Peixoto et al., 2017; Thurber et al., 2017).

La mise en place d'une relation symbiotique nécessite un dialogue moléculaire complexe entre les différents partenaires afin de maintenir un équilibre entre les différents échanges entre l'hôte et ses symbiotes. Ce dialogue est facilement perturbé par les stress environnementaux et biologiques (Davy et al., 2012; Fransolet et al., 2012; Roberty & Plumier, 2022; Rosset et al., 2021).

La symbiose entre l'algue et l'hôte s'établit en plusieurs étapes. Au premier contact entre l'hôte et le symbiote, des protéines membranaires des cellules de l'hôte capables de reconnaître des motifs présents à la surface des cellules vont reconnaître certains schémas moléculaires associés au symbiote. Le symbiote va ensuite « infecter » l'hôte d'une manière similaire à un pathogène, c'est-à-dire que la rencontre entre l'algue et la membrane cellulaire de l'hôte va créer une vésicule de phagocytose pour faire entrer le potentiel symbiote dans le cytoplasme. L'hôte va alors effectuer un tri, gardant les symbiotes qui l'intéressent et se débarrassent des autres. Les symbiotes sélectionnés vont donc pouvoir se diviser et se propager à d'autres cellules de l'hôte. Hôte et symbiote vivront alors en équilibre fragile qui pourra être perturbé par différents stress, tels que des stress thermiques ou lumineux (Davy et al., 2012). La composition de l'holobionte peut varier en fonction des conditions environnementales afin de permettre au corail de s'adapter et de mieux résister aux stress (Ezzat et al., 2017; Matthews et al., 2017; Putnam, 2021; Suggett et al., 2017).

La symbiose entre corail et *Symbiodiniaceae* permet aux coraux de survivre et même de se développer dans des zones pauvres en nutriments grâce à des échanges entre ces deux partenaires. Les *Symbiodiniaceae* fournissent des produits de photosynthèse à l'hôte en utilisant de l'azote et du carbone captés dans la colonne d'eau (DIN et DIC), ainsi que des déchets métaboliques de l'hôte. De son côté, l'hôte fournit également une protection contre la prédation et une position stable dans la colonne d'eau pour les algues (Falkowski et al., 1984; Gibbin et al., 2020; Kopp et al., 2013; Krueger et al., 2018; Tremblay et al., 2012; Venn et al., 2008; Wang & Douglas, 1998; Yellowlees et al., 2008).

1.2 Symbiose avec les Symbiodiniaceae

1.2.1 Cycle de l'azote

L'azote est un élément essentiel pour la plupart des processus physiologiques. Il est majoritairement présent dans le milieu marin sous forme N_2 , qui n'est pas directement exploitable pour des cycles biologiques (Gruber, 2008). La fixation de cet azote est réalisée par des organismes procaryotes photoautotrophes, tels que des cyanobactéries, sous forme d'ammonium, qui sera ensuite converti en nitrate par nitrification. Environ 88% de l'azote biodisponible l'est sous forme NO_3^- et environ 11,6% l'est sous forme de DON (dissolved organic nitrogen), alors que moins de 0,3% de cet azote l'est sous forme NH_4^+ (Dagenais-Bellefeuille & Morse, 2013). Étant donné la nature des coraux hermatypiques, les polypes sont également capables d'acquérir des nutriments, et donc de l'azote, en se nourrissant de particules en suspension, telles que du plancton ou des excréments d'autres organismes.

Le nitrate assimilé par les *Symbiodiniaceae* doit être réduit en ammonium avant de pouvoir être utilisé pour les différents processus biologiques. Ceci se fait par l'intermédiaire des nitrate et nitrite réductases (Bouchard & Yamasaki, 2008) et consomme de l'énergie et des électrons provenant de la photosynthèse (Ezzat et al., 2016; F. Li et al., 2021).

Même si l'hôte et les dinoflagellés sont tous deux capables d'assimiler l'ammonium, il a été montré que le principal site d'assimilation est les symbiotes (Davy et al., 2012). Cette assimilation chez les *Symbiodiniaceae* se fait au moyen du cycle de la glutamine synthetase/glutamine 2-oxoglutarate amido tranferase (GS/GOGAT) dont les produits finaux seront le glutamate et la glutamine, qui pourront ensuite être utilisés pour la synthèse d'autres acides aminés (Roberts et al., 2001). Comme l'assimilation d'ammonium se fait par synthèse d'acides aminés (Figure 2), une source de carbone est nécessaire pour qu'elle puisse avoir lieu. C'est pourquoi une source de lumière est importante pour cette assimilation, car la fixation de carbone par la photosynthèse est nécessaire à l'assimilation et le stockage du NH_4^+ , des études ayant montré que l'ammonium non assimilé était relargué dans l'environnement (Muscatine & D'Elia, 1978; Wang & Douglas, 1998). La photosynthèse et l'assimilation d'azote sont donc deux mécanismes interdépendants (Gordillo et al., 2003; Zheng, 2009), certaines études sur

les plantes ayant même montré qu'ils s'entre-régulaient (Henley et al., 1991; Martino Rigano et al., 1986).

D'autres études ont montré que l'azote était un facteur limitant pour la photosynthèse des Symbiodiniaceae (Béraud et al., 2013; Ferrier-Pagès et al., 2000, 2010). Cependant, une augmentation de la disponibilité en azote augmente la prolifération des cellules algales et diminue le taux de photosynthèse par cellule car elles entrent en compétition pour l'accès au carbone (Dubinsky et al., 1990; Hoegh-Guldberg & Smith, 1989; Muscatine et al., 1989). Les coraux sont néanmoins capables de réguler cette prolifération algale en expulsant une partie de ses symbiotes afin de maintenir l'équilibre symbiotique (Davy et al., 2012).

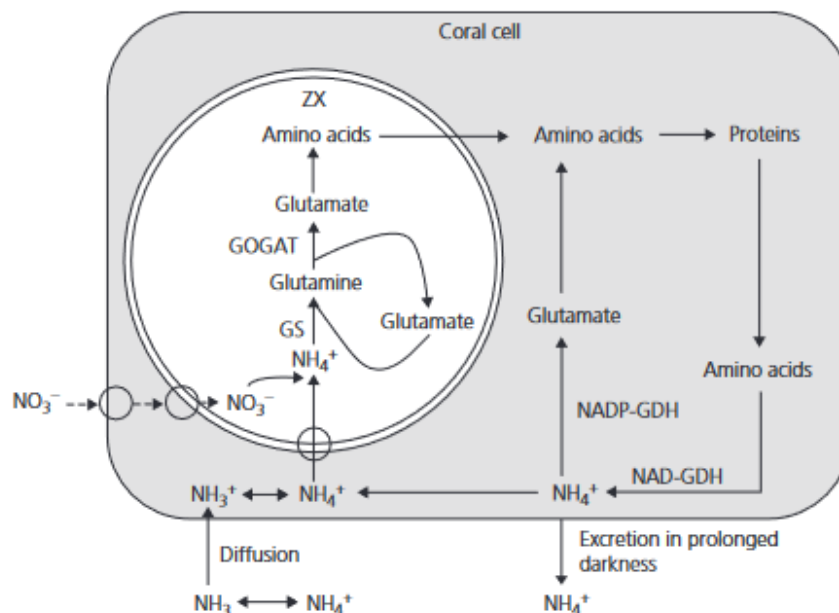


Figure 2: Représentations des flux d'azote dans la symbiose corallienne. ZX, zooxanthelle ; GDH, glutamate déshydrogénase. Modifié par Sheppard et al. à partir de Davies, P.S. (1992). *Endosymbiosis in marine cnidarians*. In: D.M. John, S.J. Hawkins and J.H. Price (eds), *Plant-Animal Interactions in the Marine Benthos*. Clarendon Press, pp. 511–40.

1.2.2 Photosynthèse

La photosynthèse se déroule chez les microalgues de manière relativement similaire aux plantes terrestres. Elle se déroule dans les chloroplastes lors des phases claire et sombre (ou cycle de Calvin-Benson-Bassham).

La phase claire se déroule au niveau des membranes des thylakoïdes (Figure 3). Elle comprend les réactions photochimiques qui permettent la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique (ATP et NADH/NADPH). Les pigments principalement utilisés par les *Symbiodiniaceae* pour capter l'énergie lumineuse sont la chlorophylle a , la chlorophylle c_2 et la péricidine, formant deux types d'antennes : un complexe protéique lié à la membrane des thylakoïdes et composé de chlorophylle a , chlorophylle c_2 et de péricidine (acpPC) et la protéine hydrosoluble péricidine-chlorophylle a (PCP) (Roth, 2014).

L'énergie captée par les antennes se transmet jusqu'au centre réactionnel des photosystèmes II et I, où la séparation des charges a lieu (perte d'électron). Les électrons sont ensuite véhiculés à travers la chaîne et sont transmis par l'intermédiaire du cytochrome b_6/f (*cytb₆f*) au photosystème I. Le centre réactionnel du photosystème II, une quinone, et celui du photosystème I, un agrégat fer-soufre, sont oxydés successivement pour transmettre l'énergie sous forme d'électrons aux accepteurs en aval de la chaîne de transport (Malone et al., 2019). Ils sont finalement transmis au NADP^+ par l'intermédiaire de la ferrédoxine. La réduction du NADP^+ en $\text{NADPH} + \text{H}^+$ est possible grâce à l'action de la NADP^+ réductase, qui va utiliser deux électrons transmis par la ferrédoxine ainsi que des protons présents dans le stroma. Les réductions successives des différents maillons de la chaîne de transport laissent le centre réactionnel du PSII sous forme oxydée. Ce dernier va donc retrouver son état initial en prenant des électrons aux molécules d'eau présentes dans le lumen, générant ainsi un phénomène de photolyse de l'eau. Les protons utilisés par la NADP^+ réductase sont présents grâce à l'action de l'ATP synthase, qui utilise le gradient chimique de protons créé lors de la photolyse de l'eau ainsi que par le transfert de protons depuis le stroma jusque dans le lumen via le pool de plastoquinones, pour générer de l'ATP (Falkowski & Raven, 2007; Schiphorst & Bassi, 2020).

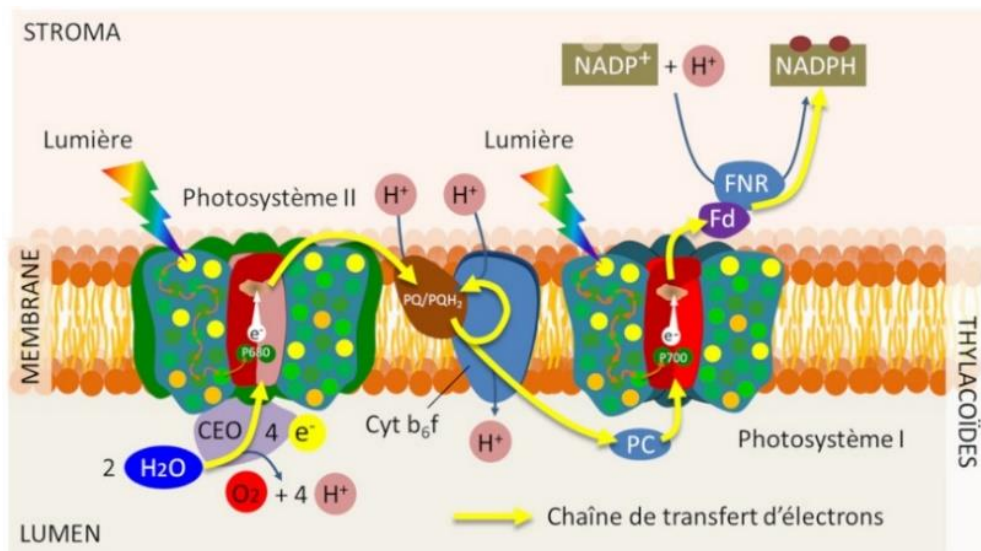


Figure 3 : Schéma simplifié de la phase claire de la photosynthèse. (Source : <https://www.encyclopedie-environnement.org>)

Le cycle de Clavin-Benson-Bassham, quant à lui, a lieu dans le stroma. Contrairement à la phase claire, il n'a pas besoin de lumière pour se dérouler. La phase sombre permet la synthèse de glucose à partir de dioxyde de carbone et de l'énergie produite par la phase claire (Schiphorst & Bassi, 2020). La fixation du carbone chez les dinoflagellés est catalysée par une ribulose diphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) de type II, contrairement aux autres eucaryotes photosynthétiques, et celle-ci a une affinité plus importante pour l'O₂ et une sensibilité accrue aux élévations de température (Lilley et al., 2010; Morse et al., 1995).

1.2.3 Stress oxydatif

Les différents mécanismes de respiration cellulaire et de photosynthèse génèrent des espèces réactives d'oxygène (ROS). Les cellules peuvent utiliser ces ROS comme messagers secondaires dans la transduction de signaux ou encore pour la régulation d'expression de gènes (Cimino et al., 1997; Ullah Khan & Wilson, 1995). Cependant, malgré leur utilité, leur caractère réactif peut causer des dommages aux lipides, aux protéines et même à l'ADN (Asada, 1987; Cadenas, 1989; Halliwell & Gutteridge, 2015).

Les ROS sont produits lors de la réduction univalente de l'oxygène, pouvant se produire jusqu'à quatre fois successives (Figure 4).

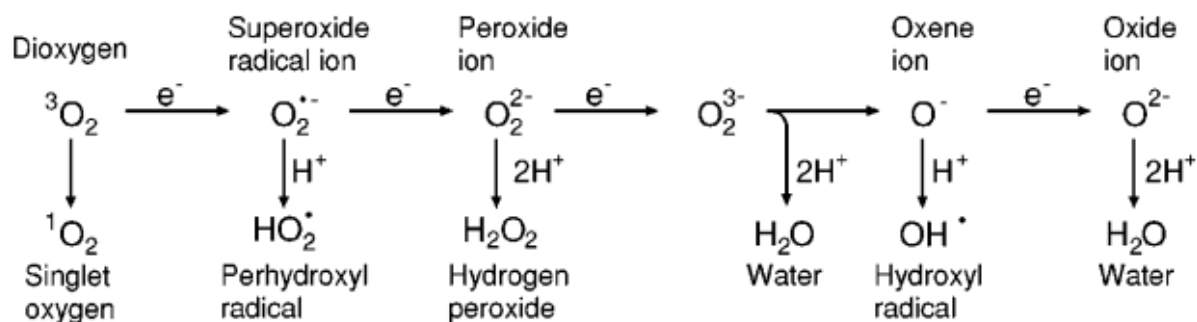


Figure 4 : Schéma des différentes réductions de l'oxygène menant à la productions des différentes espèces réactives d'oxygène (Apel & Hirt, 2004)

Le radical hydroxyle est la ROS la plus réactive, s'attaquant aux constituants cellulaires en oxydant les lipides membranaires ou en dénaturant les protéines ou les acides nucléiques. Elle est formée par réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition (Halliwell & Gutteridge, 2015; Lesser, 2006). Le peroxyde d'hydrogène, outre sa capacité à former des radicaux hydroxyles, peut également causer des dommages aux constituants cellulaires, allant même jusqu'à causer l'apoptose dans certains cas. Le fait que ce ROS ne soit pas chargé lui permet de diffuser facilement au travers des membranes (Halliwell & Gutteridge, 2015). Le H_2O_2 est notamment produit lors de la photorespiration, lors de l'oxydation des acides gras au niveau du peroxysome ou encore via la réaction de Mehler. Cette dernière permet, lorsque la chaîne photosynthétique est saturée, de dissiper l'énergie en réduisant l'eau en ion superoxyde qui sera rapidement converti en H_2O_2 par l'action de la superoxyde dismutase (SOD) avant d'être converti à son tour en eau par les enzymes du « Water-Water cycle » (Asada, 2000; Schiphorst & Bassi, 2020).

Etant donné les capacités des ROS à causer des dégâts, les deux partenaires de la symbiose ont dû mettre en place diverses adaptations afin de prévenir un stress oxydatif. Ce réseau antioxydant est composé à la fois d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Les antioxydants enzymatiques tels que la SOD, les catalases ou les peroxydases, ont une action combinée qui a pour but de convertir les ROS en H_2O_2 et en O_2 (Krämer et al., 2012; Lesser, 2006; Pey et al., 2017). Les antioxydants non enzymatiques, quant à eux, comprennent l'ascorbate, le glutathion, les tocophérols ou encore les caroténoïdes. Le cycle du glutathion (Figure 5) est couplé à celui de l'ascorbate pour former le cycle ascorbate-glutathion (water-water cycle). Le glutathion est un des antioxydants les plus importants, souvent utilisé comme

indicateur de stress oxydatif (Lesser, 2006). Les capacités antioxydantes du glutathion sont liées à sa capacité à subir des cycles d'oxydation-réduction qui captent l'énergie des ROS pour les convertir en eau.

Deux molécules de glutathion sous leur forme monomérique réduite (GSH) peuvent être oxydées par les ROS en créant un pont disulfure et former la forme oxydée dimérique (GS-SG). Les molécules de GS-SG vont ensuite être réduites en leur forme monomérique via l'action de la glutathion réductase qui va briser le pont disulfure en utilisant du NADPH (Karplus & Schulz, 1989; Lesser, 2006). Le glutathion est donc une molécule essentielle au maintien de l'homéostasie REDOX.

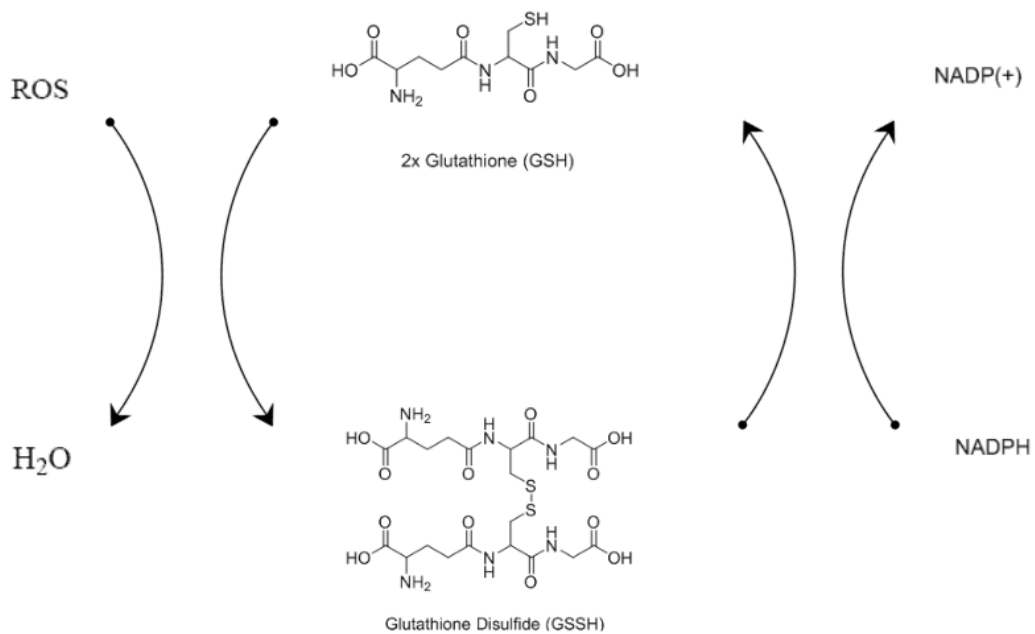


Figure 5 : Cycle du glutathion. (Source : illustration personnelle basée sur Karplus & Schulz (1989) et Lesser (2006))

1.3 Blanchissement corallien



Figure 6 : Blanchissement corallien (source : <https://mrmondialisation.org/blanchiment-du-corail-comment-un-phenomene-rare-est-devenu-la-norme/>)

1.3.1 Définition et mécanismes

Le blanchissement corallien (Figure 6) correspond à la perte des algues symbiotiques du corail, ce qui fait perdre sa couleur au corail et laisse apparaître son squelette calcaire blanc au travers de ses tissus transparents (Douglas, 2003; Hoegh-Guldberg, 1999; Suggett & Smith, 2011). C'est donc le résultat visible de la rupture de la symbiose corail-*Symbiodiniaceae*.

Comme mentionné précédemment, le maintien de relations symbiotiques repose sur un équilibre fragile. Ainsi, toute perturbation de cet équilibre est susceptible de faire pencher la balance en faveur d'un des deux acteurs de cette symbiose, ce qui perturbe le dialogue moléculaire et pousse l'hôte à se débarrasser de ses symbiotes, que ce soit en les expulsant ou en les digérant. Les coraux blanchis se voient désavantagés d'un point de vue physiologique et nutritionnel, ce qui a des impacts sur leur taux de croissance et de reproduction ainsi que sur la vulnérabilité aux maladies (McClanahan et al., 2018). De plus, il a été montré que la photosynthèse des *Symbiodiniaceae* avait un rôle dans la calcification du squelette grâce à

l'apport en énergie qu'elle fournit (Davy et al., 2012). La perte des symbiotes par le corail a donc un impact important sur la structure du récif.

1.3.2 Causes

Il a été maintes fois démontré que les facteurs environnementaux avaient un effet sur l'équilibre métabolique permettant le maintien de l'holobionte et qu'une perturbation de ces facteurs pouvait amener à la rupture de la symbiose, et donc au blanchissement (Suggett & Smith, 2020). Ces changements environnementaux vont de l'augmentation de la température ou de l'intensité lumineuse, à l'enrichissement du milieu (Eakin et al., 2019; Lapointe et al., 2019; Suggett & Smith, 2020).

Les observations de ces 30 dernières années ont permis de définir le paradigme central du blanchissement, selon lequel l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (ROS et RNS) causerait une cascade de signalisation qui résulterait en l'expulsion ou la digestion des algues symbiotiques par l'hôte (Cziesielski et al., 2019; Davy et al., 2012; Smith et al., 2005; Tchernov et al., 2011; Weis, 2008). Les stress thermiques ou la perturbation de l'homéostasie redox (Oxidative Theory of Bleaching) seraient donc des étapes critiques de l'effondrement de la symbiose (Baker et al., 2018; Lesser, 2011; Morris et al., 2019; Oakley & Davy, 2018; Rådecker et al., 2021; Szabó et al., 2020; Weis, 2008; Wooldridge, 2009).

L'intensité des événements de blanchissement en masse qui ponctuent le déclin des récifs ne cesse d'augmenter, et ils se produisent de plus en plus souvent à cause du réchauffement climatique (Suggett & Smith, 2020). Les changements rapides de la qualité de l'environnement des coraux par ce réchauffement ou par des activités anthropiques perturbent différents mécanismes cellulaires et influencent l'homéostasie de l'holobionte, ce qui peut résulter en une augmentation de ROS et donc provoquer le blanchissement (Cziesielski et al., 2019; Wang et al., 2019). Cependant, le corail-hôte garde une certaine capacité d'adaptation car il peut changer sa composition symbiotique afin de maintenir une homéostasie lorsque les conditions viennent à changer, car les différents symbiotes ne fournissent pas les mêmes avantages à l'hôte (Matthews et al., 2017, 2018; Suggett et al., 2017, voir Figure 7).

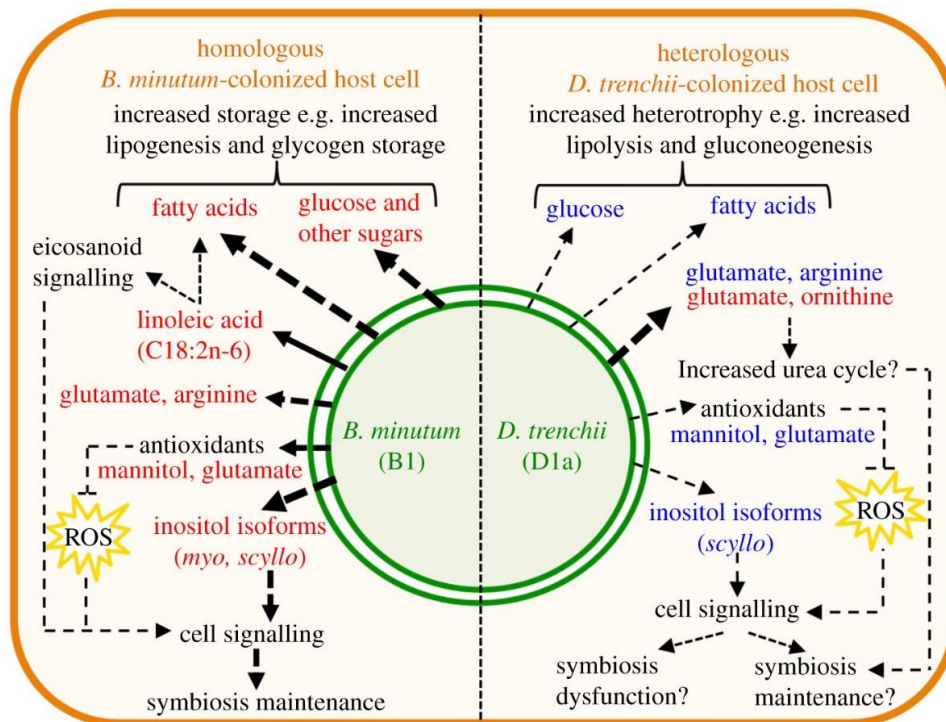


Figure 7 : Modélisation des flux métaboliques, ainsi que la réponse de la cellule hôte, en présence de deux Symbiotes différents, l'un homologue et l'autre hétérologue. L'épaisseur des flèches indique l'importance de l'activité des diverses voies, et les pointillés représentent les voies supposées. L'abondance relative des molécules est représentée par la couleur du texte, en bleu pour signifier une abondance relative importante et en rouge pour une abondance relative plus faible (Matthews et al., 2018)

Le blanchissement peut survenir non seulement lorsqu'un changement majeur se produit dans un facteur environnemental unique, mais aussi lorsque plusieurs modifications plus légères affectent différents facteurs environnementaux, poussant ainsi les holobiontes au-delà de leurs capacités physiologiques (Anthony et al., 2011; Putnam, 2021; Vega Thurber et al., 2014). L'interaction synergétique de plusieurs facteurs a également été démontrée comme influençant la sensibilité au stress en ayant des effets agonistes ou antagonistes (Suggett & Smith, 2020).

Des études ont également suggéré que le blanchissement causé par une augmentation de température serait lié à une inhibition de la rubisco de type II contenue dans les Symbiodiniaceae (à l'inverse de celles de type I chez les plantes et les algues), ce qui résulterait en une inhibition de la chaîne de transfert d'électrons du cycle de Calvin-Benson-Bassham en empêchant la régénération du ribulose-1,5-biphosphate, l'accepteur de CO₂. Cette inhibition va empêcher l'utilisation de l'énergie produite durant la phase claire de la photosynthèse, saturant la chaîne de transport des électrons et « fermant » les centres réactionnels des

photosystèmes, ce qui va causer l'accumulation d'une grande quantité d'énergie dans l'appareil photosynthétique et, par conséquent, l'inhibition de celui-ci (Jones et al., 1998; Lilley et al., 2010; Szabó et al., 2017; Wooldridge, 2009). Cette énergie va alors être dissipée via la production de ROS ou alors par des mécanismes d'extinction non-photochimique (NPQ). Dans ces derniers est notamment repris le cycle des xanthophylles, mécanisme par lequel un pigment, la diadinoxanthine est convertie en un autre pigment, la diatoxanthine par dé-époxydation (Warner & Berry-Lowe, 2006). Cette transformation est effectuée par l'action de la diadinoxanthine-dé-époxydase, et dépend d'un gradient de proton au niveau des membranes des thylakoïdes. Afin de compléter le cycle, la diatoxanthine pourra être époxydée en diadinoxanthine via l'action de la diatoxanthine-époxydase (Goss & Latowski, 2020).

Lorsque les *Symbiodiniaceae* sont exposées à de fortes lumières et de hautes températures, l'équilibre entre les ROS produits et le réseau antioxydant est rompu, la chaîne de transport d'électrons est sursaturée et l'appareil photosynthétique est endommagé, notamment par inhibition de la protéine D1, qui est une des protéines formant le cœur du photosystème II, provoquant ou accélérant la photoinhibition (Lesser, 2006; Roberty et al., 2015; Takahashi et al., 2008). L'augmentation de la température augmente également la production de monoxyde d'azote par la nitrate réductase et la NO synthase (Bouchard & Yamasaki, 2008; Hawkins & Davy, 2012). Le NO peut réagir avec des ROS pour former des espèces réactives de l'azote (RNS) qui sont de puissants oxydants (Hawkins et al., 2013; Hawkins & Davy, 2013).

L'apport en nutriments influence également le blanchissement. Des études ont montré que, si la symbiose corallienne dépend d'un équilibre fragile entre les différents échanges de molécules et de nutriments entre l'hôte et le symbiote, une supplémentation en azote dans la colonne d'eau ou par voie hétérotrophe permet d'améliorer la résilience et la résistance aux stress provoquant le blanchissement. Cependant, certaines de ces études montrent également que l'effet bénéfique dépend de la concentration disponible, et que les concentrations trop élevées ont tendance à exacerber l'ampleur et la durée du blanchissement (Ferrier-Pagès et al., 2000; Morris et al., 2019; Wiedenmann et al., 2013).

En résumé, le blanchissement corallien peut être déclenché par une variété de causes, agissant soit individuellement soit en combinaison. Les changements importants dans les conditions environnementales liés aux phénomènes climatiques ont un impact considérable sur les récifs coralliens, en perturbant l'équilibre symbiotique et en favorisant la rupture de la symbiose, ce

qui entraîne le blanchissement. Parallèlement, plusieurs changements moins importants mais simultanés dans divers facteurs environnementaux peuvent également contribuer au blanchissement corallien, en poussant l'holobionte au-delà de ses limites physiologiques.

2 Objectifs

Avec les changements climatiques actuels, les récifs coralliens sont soumis à de plus en plus de périodes de stress thermique et lumineux. La distribution des principaux nutriments (azote, phosphore, etc.) est également modifiée. Ces changements ont un impact important sur l'équilibre symbiotique que les coraux maintiennent avec leurs *Symbiodiniaceae*, ce qui a tendance à augmenter le nombre et la durée des phénomènes de blanchissement.

Plusieurs études ont démontré qu'un apport en azote plus important permettait aux coraux de mieux résister au blanchissement. Cependant, l'enrichissement en azote modifie les capacités photosynthétiques et métaboliques des microalgues, pouvant dès lors causer des stress oxydants importants. Certaines études (e. g. (Burkepile et al., 2020; Dagenais-Bellefeuille & Morse, 2013) ont suggéré que la source d'azote (NO_3^- , NH_4^+) pourrait avoir un impact sur ces facteurs, notamment car le nitrate nécessite d'utiliser de l'énergie provenant de la photosynthèse (au détriment de la fixation du carbone) afin de le transformer en ammonium grâce aux nitrite et nitrate reductases avant de pouvoir être assimilé par la microalgue.

Étudier l'impact de l'apport en azote dans des conditions de stress pouvant provoquer le blanchissement des coraux sur les *Symbiodiniaceae* est donc une étape essentielle afin de comprendre les mécanismes impactant la sensibilité aux stress thermiques et lumineux chez les *Symbiodiniaceae*.

L'objectif de ce mémoire est donc d'évaluer l'influence de la source d'azote (absence, en présence de NO_3^- , en présence de NH_4^+) sur la sensibilité aux stress thermique et lumineux de *Symbiodinium microadriaticum*. Pour ce faire, plusieurs paramètres ont été mesurés au terme de stress thermiques et lumineux de courte durée. Il s'agit de mesures de paramètres caractérisant l'activité photosynthétique grâce à des techniques de fluorescence et à un dosage du contenu pigmentaire ainsi que du dosage des ROS et RNS produites pour évaluer l'homéostasie redox.

3 Matériel et Méthode

3.1 Matériel biologique

3.1.1 Souche

Les expériences de ce mémoire ont été effectuées sur une souche clonale de *Symbiodinium microadriaticum* isolée d'un corail hôte *Stylophora pistillata* prélevé en Mer Rouge (Eilat, Golfe d'Aqaba, Israël). Cette *Symbiodiniaceae* est un modèle microalgal dinoflagellé appartenant anciennement au clade A1 (Robison & Warner, 2006).

3.1.2 Milieu de culture

Les cultures de microalgues sont maintenues dans du milieu F/2 (Guillard & Ryther, 1962), obtenu à partir d'eau de mer artificielle stérilisée par autoclavage, d'une solution de phosphate monosodique, de solutions de métaux traces et de vitamines. Dans certains cas, des antibiotiques et antimycotiques ont pu être ajoutés afin de s'assurer de la stérilité du milieu de culture. L'eau de mer artificielle a été obtenue en mélangeant de l'eau désionisée et du sel marin « Probiotic Reef Salt » (Aquaforest®, Royaume-Uni) jusqu'à obtention d'une salinité de 34. À ce milieu F/2 standard est ajoutée 500 μM de NO_3^- sous la forme de NaNO_3 . Bien que le milieu F/2 contienne habituellement 880 μM de NO_3^- , une concentration de 500 μM a été choisie pour standardiser la concentration en azote entre les différents milieux utilisés lors des expérimentations.

3.1.3 Conditions de culture

Les cultures sont maintenues dans des erlenmeyers à chicanes de 500 mL à bouchons ventilés (Corning, Etats-Unis) maintenus stériles, dans un volume d'environ 150 mL afin d'optimiser la surface d'échanges gazeux. Elles sont placées dans une chambre de croissance I-36LLX

(Percival, Etats-Unis) à 26°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) et à une intensité lumineuse de 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sur un cycle lumineux de 12 heures. La lumière est produite grâce à des tubes fluorescents bleus Lumivie SM-T8, 25000 °K (Aquavie, France) et blancs GroLux T8, 18 W (Sylvania, Allemagne).

3.2 Conditions d'expérimentation

Comme ce mémoire porte sur l'influence de la source d'azote sur la réponse aux stress, trois milieux F/2 différents ont été utilisés : un milieu F/2 « NF » (Nitrogen Free) qui ne contient pas d'azote, un milieu F/2 « NO_3^- » contenant 500 μM de NaNO_3 , et un milieu F/2 « NH_4^+ » contenant 500 μM de NH_4Cl .

Avant les expériences, les cultures sont maintenues dans du milieu F/2 « NO_3^- ». Les volumes de cultures nécessaire pour chacune des expériences sont ensuite carencés en azote (milieu F/2 « NF ») pour une durée de 48 heures ou de 7 jours, avant d'être resuspendus dans chacun des trois milieux F/2 testés, et d'être placés durant 3 h dans des conditions de stress thermique et lumineux telles que renseignées dans le Tableau 1 ci-dessous. Pour chacune des expériences, des triplicats biologiques ont été réalisés.

Tableau 1 : Représentations des différentes conditions expérimentales en fonction des conditions thermiques et lumineuses.

		Intensité lumineuse ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)		
		0 (DK)	100±10 (ML)	400±20 (HL)
Température	26°C	Milieu F/2 NF Milieu F/2 NO_3^- Milieu F/2 NH_4^+	Milieu F/2 NF Milieu F/2 NO_3^- Milieu F/2 NH_4^+	Milieu F/2 NF Milieu F/2 NO_3^- Milieu F/2 NH_4^+
	33°C	Milieu F/2 NF Milieu F/2 NO_3^- Milieu F/2 NH_4^+	Milieu F/2 NF Milieu F/2 NO_3^- Milieu F/2 NH_4^+	Milieu F/2 NF Milieu F/2 NO_3^- Milieu F/2 NH_4^+

3.3 Paramètres mesurés

3.3.1 Dosage des chlorophylles

Avant chacune des expériences, le contenu en chlorophylles des cultures a été dosé afin de prélever un volume adéquat de celles-ci.

Pour ce faire, 2 mL des cultures sont prélevés et placés dans un tube à centrifuger de 2 mL et centrifugés durant 5 min à 10 000 x g. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu dans 1,5 mL de méthanol à -20°C ($\geq 99,8\%$, VWR, États-Unis), auquel on ajoutera 250 μL de billes de verre (710-1180 μm ; Sigma-Aldrich, États-Unis). Les cellules sont ensuite placées dans le Tissue Lyser II (Qiagen, Allemagne) afin de lyser les cellules à froid pendant 5 minutes à une fréquence de 30 Hz. Les extraits de lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 4°C durant 5 minutes à 20 000 x g et 1 mL du surnageant est prélevé et placé dans une cuvette pour spectrophotomètre en parallèle d'une cuvette contenant 1 mL de méthanol qui sert d'étalon. Ces cuvettes sont placées dans un spectrophotomètre UV-Vis 1800 (Shimadzu, Japon) et leurs absorbances à 632 nm et 665 nm sont mesurées. Les concentrations en chlorophylles peuvent être déterminées au moyen des équations spécifiques pour les dinophytes dans du méthanol (Ritchie, 2006).

3.3.2 Détermination de la concentration cellulaire

Afin de déterminer la concentration cellulaire des cultures, un volume défini de culture (entre 50 μL et 100 μL) est dilué dans 10 mL d'Isoton (9 g/L NaCl et formaldéhyde 0,5 % v/v) avant d'être analysé au Z2 Coulter Counter (Beckman Coulter, États-Unis), un compteur cellulaire électronique capable de compter les cellules en fonction de leur taille.

3.3.3 Mesures de l'activité photosynthétique

L'appareil d'imagerie SpeedZen (BeamBio / API, France) permet d'analyser l'évolution de la fluorescence des chlorophylles, à partir de laquelle plusieurs paramètres peuvent être calculés. Les paramètres mesurés dans le cadre de ce travail, présentés dans le Tableau 2 ci-dessous, sont les suivants :

- Le rendement quantique photochimique maximum du PSII (F_v/F_m)
- Le rendement quantique photochimique maximum effectif du PSII (Φ_{PSII})
- Le taux de transport relatif d'électrons au travers du PSII (rETR)
- Le rendement d'extinction non photochimique (NPQ)

Tableau 2 : Les différents paramètres photosynthétiques calculés et leur formule associée.

Paramètres photosynthétiques	
F_v/F_m	$(F_m - F_0)/F_m$
Φ_{PSII}	$(F_m - F')/F_m'$
rETR	$\Phi_{PSII} * (\text{Int. Lum.})$
NPQ	$(F_m - F_m')/F_m'$

F_m : Fluorescence maximale théorique de la chlorophylle mesurée

F_0 : Fluorescence minimale de la chlorophylle

F_m' : Fluorescence maximale effective de la chlorophylle

F : Fluorescence de la chlorophylle à l'état d'équilibre

À l'issue des périodes de carence, les échantillons concentrés à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chlorophylle sont centrifugés et resuspendus dans le milieu F/2 associé avant d'être répartis sur des microplaques 96 puits blanches à fond plat (Greiner Bio-One, Autriche). Ces plaques sont ensuite mises à incuber dans les différentes conditions de stress pendant 3 h. Après cette incubation, les plaques sont placées dans l'appareil d'imagerie, qui va établir une courbe de

saturation de la photosynthèse en soumettant les échantillons à sept paliers d'intensités lumineuse croissante d'une durée de 3 minutes chacun (0, 18, 40, 130, 230, 320 et 570 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La fluorescence est mesurée en soumettant les échantillons à un pulse saturant de lumière rouge à une intensité de 3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durant 200 ms.

3.3.4 Dosage d'espèces réactives intracellulaires

La production d'espèces réactives intracellulaires a été mesurée à l'aide des sondes fluorescentes H₂DCFDA et DAF-FM.

3.3.4.1 Dosage des espèces réactives par la sonde H₂DCFDA

La sonde H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate), est un indicateur perméant aux cellules qui permet de détecter les espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les cellules. En effet, la sonde H₂DCFDA fluoresce une fois oxydée en DCF (2',7'-dichlorofluorescéine) par les ROS.

À leur sortie de carence, les échantillons concentrés en chlorophylle à hauteur de 5 $\mu\text{g/mL}$ sont placés durant 30 min à incuber à l'obscurité après ajout de 25 μM de sonde, afin que les cellules puissent s'imprégner de la sonde. On centrifuge ensuite les cellules afin d'éliminer l'excédent de sonde et on les resuspend dans le milieu F/2 adéquat avant de les répartir sur une plaque 96 puits noire à fond plat (Greiner Bio-One, Autriche) à raison de 100 μL par puits. Les plaques sont placées sous un filtre Vanityfair (Lee Filters, Andover, Royaume-Uni) et incubées dans les différentes conditions de stress pendant 3h avant d'être analysées grâce à un spectrofluorimètre Synergy Mx (Biotek, États-Unis). La fluorescence de la sonde, dont la longueur d'onde d'excitation est 488 nm, est mesurée à 520 nm et est comparée à celles de témoins négatifs (cellules non marquées) qui ont été placés sur la microplaque maintenue à l'obscurité à 26°C.

3.3.4.2 Dosage de l'oxyde nitrique par la sonde DAF-FM diacetate

Le diacétate DAF-FM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate) est un indicateur perméant aux cellules et non fluorescente qui est utilisée pour détecter et doser de faibles concentrations d'oxyde nitrique (NO), avec lequel il réagit pour former un benzotriazole fluorescent.

Une solution stock de sonde concentrée à 5 mM est préparée en ajoutant 50 µg de DAF-FM déshydraté à 20 µL de DMSO (diméthylsulfoxyde). Une solution d'incubation avec une concentration en DAF-FM de 5 µM est ensuite préparée en diluant la solution stock dans du milieu F/2 « NF ».

Des échantillons de culture avec une concentration en chlorophylle de 5 µg/mL sont centrifugés et resuspendus dans la solution d'incubation préparée au préalable avant d'être placés à l'incubateur à 26°C et à l'obscurité pendant 1 h pour que la sonde imprègne les cellules. À l'issue de cette incubation, les échantillons sont centrifugés à 4500 x g pendant 5 min afin d'éliminer le surnageant et de pouvoir resuspendre le culot dans le milieu F/2 adéquat. Les échantillons sont ensuite répartis sur des microplaques 96 puits noires à fond plat (Greiner Bio-One, Autriche) avant d'être placés à l'incubateur sous un filtre Vanityfair (Lee Filters, Andover, Royaume-Uni) dans les différentes conditions de stress pendant 3 h. À la fin de cette incubation, la fluorescence de la sonde est mesurée au moyen d'un spectrofluorimètre Synergy MX (Biotek, États-Unis) et est de nouveau comparée à celle de témoins négatifs (cellules non marquées) placés au préalable sur la plaque à 26°C et à l'obscurité. Comme les maximas d'excitation et d'émission de la sonde DAF-FM sont 495/515 nm, la fluorescence est mesurée à 515 nm.

3.3.5 Dosage du peroxyde d'hydrogène extracellulaire

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) extracellulaire peut être dosé au moyen de la sonde Amplex™ Red (10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine ; Invitrogen). Cette sonde incolore est oxydée par une peroxydase en présence de H₂O₂ pour former de la résorufine (7-Hydroxy-3H-phénoxazin-

3-one), qui est une molécule fluorescente avec un pic d'excitation à 570 nm et un pic d'émission à 590 nm.

Pour cette analyse, 150 μM de DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) sont ajoutés aux différents milieux azotés utilisés avant l'expérimentation afin de chélater les métaux traces qui pourraient fausser les mesures.

Une fois sortis de leur carence, les échantillons dont la concentration en chlorophylle est de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont centrifugés et resuspendus dans leur milieu F/2 associé. Un même volume de « Reaction Mix » composé de F/2 « NF », de 150 μM de DTPA, de 100 μM de sonde Amplex red et de 0,2 U mL^{-1} de HRP (peroxydase de raifort) est ajouté aux échantillons avant que ceux-ci ne soient incubés dans les différentes conditions de stress sous un filtre « Rose Pink » (Lee Filters, Andover, Royaume Uni) pour une période de 3 h. À l'issue de cette incubation, les échantillons sont centrifugés (10 000 x g, 5 min) et le surnageant est réparti sur une plaque 96 puits noire pour mesurer la fluorescence au spectrofluorimètre Synergy Mx (Biotek, États-Unis). La fluorescence est mesurée à 590 nm avec une longueur d'onde d'excitation de 540 nm.

Une courbe standard (de 0 à 20 μM d' H_2O_2) est réalisée en parallèle afin de déterminer les quantités d' H_2O_2 produites par les cellules dans les différentes conditions expérimentales.

3.3.6 Dosage du contenu pigmentaire

Le dosage du contenu pigmentaire a été effectué par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Pour ce faire, les échantillons de concentration en chlorophylle de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ont été placés en carence dans du milieu « NF » pendant une durée de 48 h ou 7 jours.

À l'issue de la carence, les échantillons sont centrifugés et resuspendus dans le milieu F/2 adéquat. Ensuite, 3 mL de ces suspensions d'algue sont répartis dans une plaque 12 puits transparente à fond plat (Greiner Bio-One, Autriche), avant d'être incubées durant 3h dans les différentes conditions lumineuses et thermiques étudiées. Une fois l'incubation terminée, 1,5 mL de chaque échantillon sont prélevés et placés dans des tubes Eppendorf de 2 mL et placés

immédiatement dans de l'azote liquide. Ils ont ensuite été conservés à -20°C dans l'attente de l'analyse par HPLC.

Pour préparer les échantillons pour l'analyse, ils sont d'abord décongelés. Un volume de 1 mL est prélevé pour être analysé, tandis que les 500 µL restants seront utilisés pour le comptage. Les échantillons à analyser sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 20 000 x g et le surnageant est éliminé. Les culots sont placés dans 1,5 mL de méthanol (≥ 99,8 %, VWR, États-Unis) auxquels 250 µL de billes de verre (710-1180 µm ; Sigma-Aldrich, États-Unis) sont ajoutés avant d'être vortexés au Tissue Lyser II (Qiagen, Allemagne) pendant 5 minutes à 30 Hz.

Les échantillons lysés sont ensuite centrifugés (10 min, 20 000 x g) et 1 mL du surnageant est prélevé et de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Les 600 µL supérieurs « purifiés » sont alors prélevés et placés dans des vials ambrés de 2 mL. Les flacons sont ensuite insérés dans le système HPLC « Shimadzu Prominence » (Shimadzu, Japon) qui comprend une unité de dégazage DGU-20A5R, un chromatographe en phase liquide LC-20AT, un échantillonneur automatique SIL-20AC, un four à colonne CTO-10AVSP et un détecteur à barrettes de diode SPD-M20A. La colonne utilisée est une colonne « Nova Pak » C18, 60Å, 4 µm, 3.9 mm X 150 mm, et elle a été éluée avec une phase mobile composée de 3 solvants selon la séquence d'élution présentée dans le Tableau 3 :

- Solvant A : 80% (v/v) méthanol et 20% acétate d'ammonium 0,5 M
- Solvant B : 90% (v/v) acétonitrile et 10% eau HPLC Grade
- Solvant C : 100% éthylacétate

Tableau 3 : Séquence d'élution du système HPLC.

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

Le volume d'injection des échantillons était de 70 µL et le chromatogramme d'absorbance a été enregistré à 430 nm. Les données ont été analysées avec le logiciel Labsolutions (Shimadzu, Japon) qui permet d'obtenir un chromatogramme d'absorbance selon les pigments qui pourra être comparé à celui de standards dont on connaît la concentration.

3.4 Analyses statistiques

Avant les analyses statistiques, les données ont été normalisées par rapport à la concentration en chlorophylle. Les données ont ensuite été traitées au moyen de scripts R sur le logiciel RStudio (Posit Software, PBC). Le logiciel d'intelligence artificielle ChatGPT (OpenAI, États-Unis) a été utilisé pour résoudre certaines erreurs de programmations sur R. Des analyses statistiques du type ANOVA à 4 facteurs ont été réalisées afin de comparer les moyennes des différents traitements appliqués, après avoir vérifié les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité. Lorsque des différences significatives étaient observées, un test de Tukey était réalisé avec le logiciel JMP 15 (SAS Institute Inc.) afin d'identifier les traitements qui diffèrent significativement et déterminer leur influence combinée sur les paramètres mesurés.

4 Résultats

Pour chacune des mesures, deux durées de carences en azote ont été testées afin de mesurer l'impact d'une carence à long terme sur les différents paramètres mesurés. Les mesures ont été effectuées après 48 heures et après 7 jours.

Un effet significatif de la durée de carence en azote sur certains paramètres a été mis en évidence par les analyses statistiques (Tableau 4). Cependant, pour plus de clarté au vu du grand nombre de résultats obtenus, seuls les résultats obtenus après une carence de 7 jours seront présentés dans le cadre de ce travail.

Tableau 4 : Paramètres mesurés sur lesquels la durée de carence en azote a un effet significatif. Les p-valeurs associées ont été obtenues au moyen d'un test statistique de type ANOVA.

Paramètre mesuré	p-valeur	Différence 48h-7 jours
Fv/Fm	$3,09 \cdot 10^{-13}$	$Fv/Fm_{48h} > Fv/Fm_{7j}$
Production de NO	$< 2 \cdot 10^{-16}$	Production de $NO_{48h} < \text{Production de } NO_{7j}$

4.1 Activité photosynthétique et contenu pigmentaire

4.1.1 Contenu pigmentaire

Les contenus en caroténoïdes et en chlorophylles ont été évalués à partir des données fournies par le système HPLC et standardisés par rapport à la concentration en chlorophylle α (Tableau 5). Pour des mesures de contenu pigmentaire, les données auraient pu être normalisées par rapport au comptage cellulaire. Cependant, les valeurs de comptage ont induit une trop grande variabilité lors de la normalisation, sûrement à cause d'erreurs de comptage causées par une incapacité de la machine à analyser les agrégats de cellules formés par les algues. C'est pour cette raison que les résultats ont été standardisés par rapport au contenu en Chl- α et pas par rapport au comptage.

Les analyses statistiques ont permis de mettre en évidence un effet significatif de la température et de la lumière sur les concentrations pigmentaires des échantillons. En effet, les concentrations en caroténoïdes et en chlorophylles sont en moyenne $\sim 30\%$ plus élevées après incubation à 33°C par rapport aux échantillons incubés à 26°C ($p_{\text{chlorophylles}} = 1,15 \cdot 10^{-5}$,

$p_{\text{caroténoïdes}} = 0,000393$), tandis que les échantillons qui ont été incubés à l'obscurité contiennent entre 15% et 20% de pigments en plus que ceux qui ont été exposés à de la lumière durant leur incubation ($p_{\text{Chlorophylles}} = 2 \cdot 10^{-8}$, $p_{\text{Caroténoïdes}} = 0,013$).

Les analyses statistiques sur de potentiels effets combinés des différents traitements n'ont montré aucunes différences significatives, que ce soit sur la concentration en chlorophylles ou celle en caroténoïdes.

Tableau 5 : Contenu pigmentaire des cultures de *Symbiodinium microadriaticum* après les différentes conditions de stress. Les moyennes \pm écarts-types sont celles des sommes des pigments standardisés par rapport à la chlorophylle-a pour chacun des réplicas biologiques. Les chlorophylles regroupent la chlorophylle-a et la chlorophylle-c2, tandis que les caroténoïdes regroupent la péricérinone, la diadinoxanthine, la diatoxanthine et le β -carotène.

Température	Lumière	Milieu	Moyenne \pm écart-type chlorophylles	Moyenne \pm écart-type caroténoïdes
26	DK	NF	1,04 \pm 0,30	1,49 \pm 0,48
		NO3	0,90 \pm 0,40	1,12 \pm 0,48
		NH4	0,87 \pm 0,45	1,11 \pm 0,49
	ML	NF	0,77 \pm 0,24	1,01 \pm 0,30
		NO3	0,75 \pm 0,23	0,98 \pm 0,30
		NH4	0,71 \pm 0,27	0,84 \pm 0,32
	HL	NF	0,71 \pm 0,29	1,03 \pm 0,45
		NO3	0,79 \pm 0,36	1,05 \pm 0,45
		NH4	0,68 \pm 0,31	0,86 \pm 0,39
33	DK	NF	1,60 \pm 0,06	1,77 \pm 0,31
		NO3	1,10 \pm 0,18	1,45 \pm 0,19
		NH4	1,16 \pm 0,04	1,58 \pm 0,10
	ML	NF	0,97 \pm 0,20	1,36 \pm 0,24
		NO3	1,11 \pm 0,12	1,52 \pm 0,07
		NH4	1,04 \pm 0,10	1,41 \pm 0,10
	HL	NF	1,05 \pm 0,09	1,56 \pm 0,14
		NO3	1,16 \pm 0,14	1,63 \pm 0,10
		NH4	1,04 \pm 0,07	1,43 \pm 0,11

L'état de dé-époxydation des xanthophylles (DPS, voir Figure 8 ci-dessous) correspond à un des mécanismes d'extinction non photochimique de l'énergie reçue par le photosystème II. Une augmentation de cet état est donc un bon indicateur de la capacité de la cellule à dissiper l'énergie en excès qui serait causée par l'exposition à des conditions de stress.

Le DPS a été calculé à partir des concentrations en diadinoxanthine (Ddx) et diatoxanthine (Dtx). L'intensité lumineuse et la nature du milieu influencent significativement cet état ($p_{\text{milieu}} = 0,022$, $p_{\text{lumière}} < 2 \cdot 10^{-16}$). L'état de dé-époxydation des xanthophylles est en moyenne $\sim 60\%$

moins élevé pour les échantillons incubés à l'obscurité par rapport à ceux maintenus à 100 μE ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), alors que celui des échantillons incubés à 400 μE est $\sim 70\%$ plus élevé que celui des échantillons incubés à 100 μE ($p < 2 \cdot 10^{-16}$). L'effet du milieu est quant à lui assez variable, allant de $< 5\%$ de différence à $\sim 60\%$ de différence, et ne présente pas de tendance particulière.

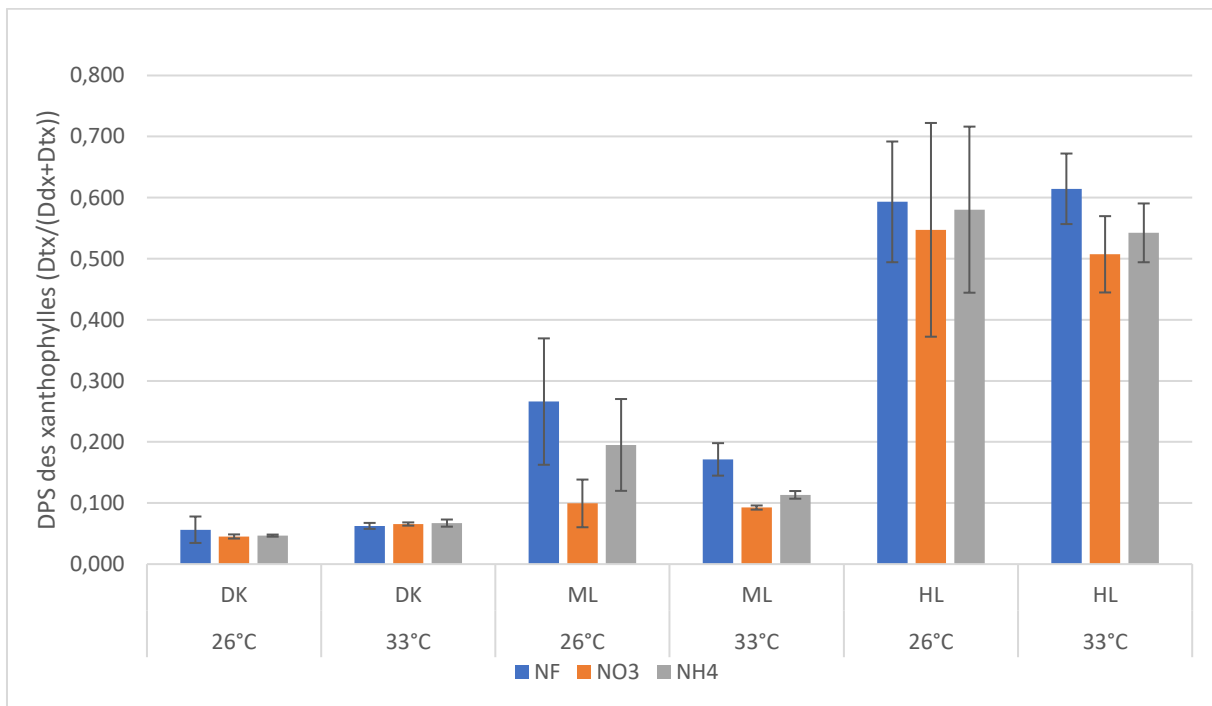
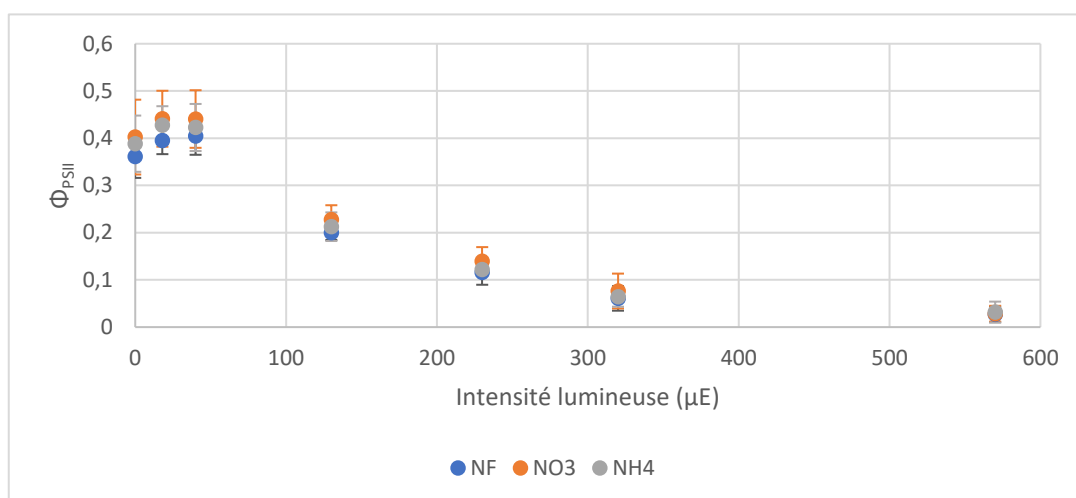


Figure 8 : Etat de dé-époxydation des xanthophylles (DPS) en fonction de la température et de l'intensité lumineuse. Les valeurs représentées sur le graphique correspondent aux moyennes \pm écarts-types des triplicas biologiques.

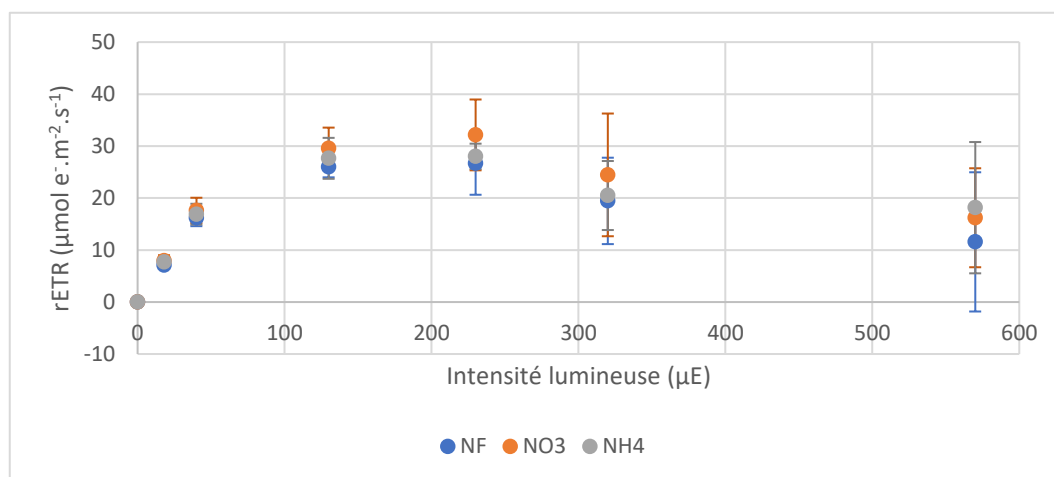
4.1.2 Activité photosynthétique

Ensuite, des courbes de saturation de la photosynthèse ont été réalisées sur les échantillons à la fin des traitements expérimentaux et différents paramètres caractérisant l'activité photosynthétique ont pu être calculés grâce aux valeurs de fluorescences mesurées par le fluorimètre. Des courbes basées sur les moyennes des triplicas ont pu être tracées afin de suivre l'évolution des paramètres d'intérêt en fonction de l'intensité lumineuse des paliers auxquels les échantillons ont été soumis durant les mesures (Figure 9).

A)



B)



C)

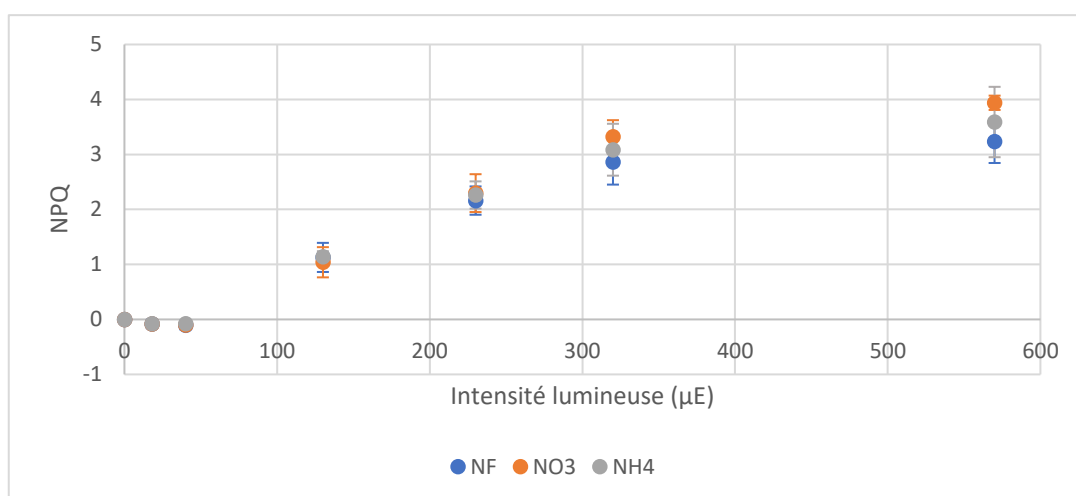


Figure 9 : Exemple des courbes de saturation des différents paramètres photosynthétiques calculés à partir des valeurs de fluorescence. Les points correspondent aux moyennes \pm écarts-types des valeurs obtenues pour chacun des triplicats biologiques. (A) Rendement quantique photochimique maximum du PSII (Φ_{PSII} , pas d'unité) en fonction de l'intensité lumineuse après 3h d'incubation à 26°C et 100 μE . (B) Taux de transport relatif des électrons au travers du PS II ($rETR$, en $\mu mol e^- \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) en fonction de l'intensité lumineuse après 3h d'incubation à 26°C et 100 μE . (C) Extinction non photochimique (NPQ, pas d'unité) en fonction de l'intensité lumineuse après incubation pendant 3h à 26°C et 100 μE .

Le rapport F_v/F_m (Figure 10), qui correspond au rendement quantique photochimique maximal du photosystème II après être resté à l'obscurité, nous informe sur la capacité théorique maximale du photosystème II à convertir l'énergie des photons en flux d'électrons. Il est un bon indicateur de la photo-inhibition lorsque sa valeur diminue durablement. Les analyses statistiques montrent un effet significatif de l'intensité lumineuse à laquelle les échantillons ont été incubés sur le rapport F_v/F_m ($p = 1,81 \cdot 10^{-9}$). Les échantillons incubés à 400 μE ont un rendement photochimique moyen $\sim 25\%$ moins important que les échantillons incubés dans les deux autres conditions lumineuses ($p = 10^{-6}$).

Un effet combiné de l'intensité lumineuse et de la température d'incubation ($p = 5,46 \cdot 10^{-6}$) ainsi qu'un effet combiné de la température d'incubation et de la nature du milieu ($p = 0,028$) ont également été observés. Cependant, aucun effet combiné de ces trois paramètres n'a été mis en évidence par les analyses statistiques.

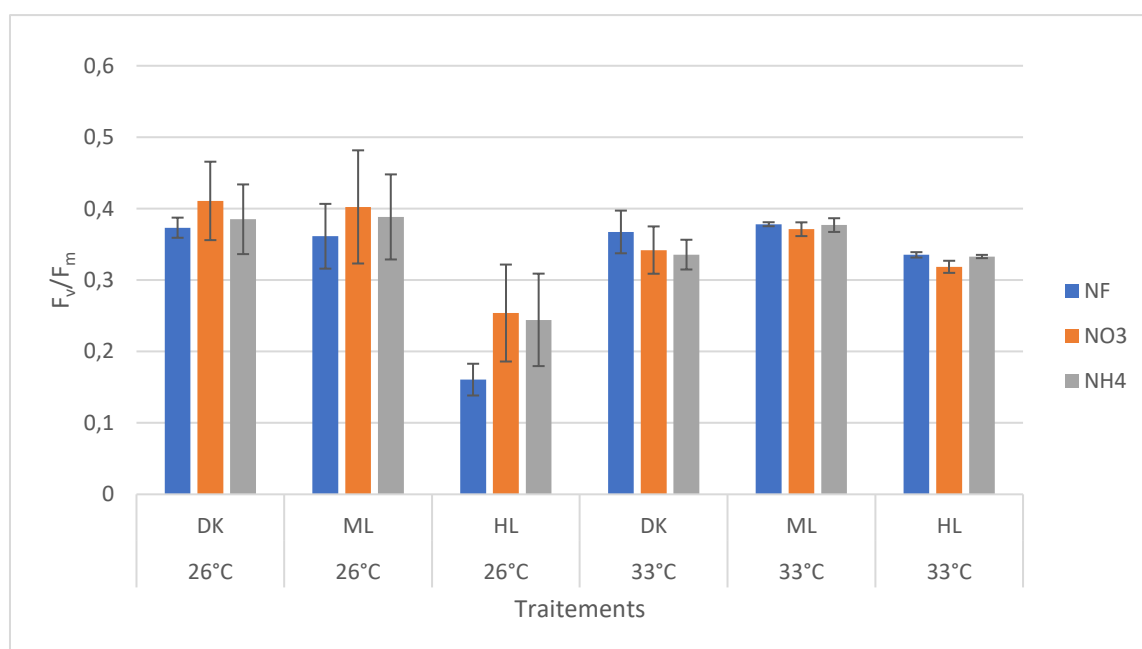


Figure 10 : Rendement quantique photochimique maximal du PS II (F_v/F_m , pas d'unité) en fonction des différentes conditions de stress thermique et lumineux. Les valeurs présentées sont celles des moyennes \pm écarts-types des triplicats biologiques.

Le transport relatif d'électrons à travers le photosystème II est maximal lors de l'exposition à 230 μE , soit le palier lumineux auquel la courbe de saturation de la photosynthèse atteint son maximum (Figure 9-B). Après de premières mesures (Figure 11-A), les échantillons ont été replacés en chambres d'incubations dans leurs conditions de stress thermique et lumineux

respectifs pendant 24 heures avant de mesurer à nouveau le rETR (Figure 11-B). Le but de cette deuxième mesure était de vérifier si la nature du milieu exerçait une influence sur les capacités d'acclimatation et sur la récupération des capacités photosynthétiques. Les mesures présentées sont celles sur le taux de transport d'électrons car c'est un bon indicateur des capacités photosynthétiques.

Les analyses statistiques des premières mesures montrent un effet significatif de la nature du milieu ($p = 0,0153$), de l'intensité lumineuse à laquelle les échantillons ont été incubés ($p = 1,61 \cdot 10^{-5}$) ainsi que de la température d'incubation ($p = 6,33 \cdot 10^{-13}$). En effet, les échantillons incubés à l'obscurité ont un rETR en moyenne ~25% moins élevé que ceux incubés à 100 μE ($p = 7,85 \cdot 10^{-4}$), tandis que les échantillons incubés à 400 μE ont un rETR en moyenne ~30% plus élevés que ceux incubés à 100 μE ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

Une diminution de ~30% en moyenne est également observée entre les échantillons incubés à 33°C par rapport à ceux incubés à 26°C. Aucun effet combiné des différents traitements n'a été mis en évidence.

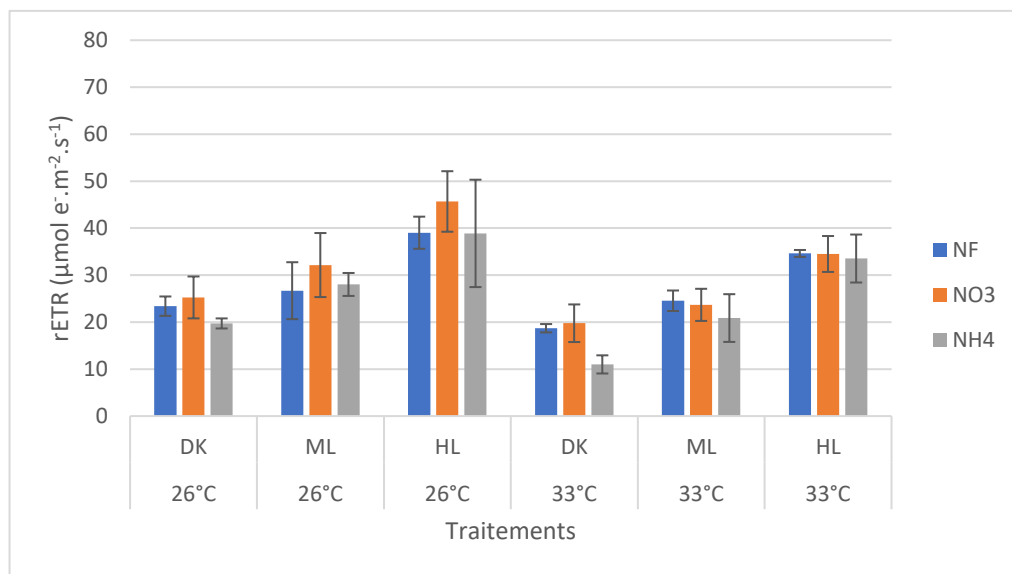
Pour les deuxièmes mesures, prises 24 heures après les premières, les analyses statistiques ont mis en évidence un effet de la nature du milieu azoté ($p = 8,43 \cdot 10^{-11}$), de la température d'incubation ($p = 0,005$) et de l'intensité lumineuse d'incubation ($2,88 \cdot 10^{-6}$). Les échantillons maintenus en milieu sans azote ont un rETR en moyenne ~35% moins élevé que ceux maintenus en milieu nitrate ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), alors que ceux maintenus en milieu ammonium ont un rETR en moyenne ~15% inférieur aux échantillons maintenus en milieu nitrate ($p = 0,0007$).

Pour l'effet de la température, les échantillons incubés à 33°C ont un rETR en moyenne 10% moins important que ceux incubés à 26°C.

Les effets de l'intensité lumineuse d'incubation sont plus consistants, avec une augmentation moyenne de ~12% entre chaque condition ($p_{\text{DK-ML}} = 1,5 \cdot 10^{-6}$; $p_{\text{ML-HL}} = 0,008$).

Un test t de Student pour échantillons appariés a été effectué afin de comparer les valeurs obtenues par les premières mesures et celles obtenues 24 heures après. Une augmentation moyenne du transport d'électrons de ~40% est observée lors des mesures effectuées un jour après les premières ($p = 2,2 \cdot 10^{-16}$).

A)



B)

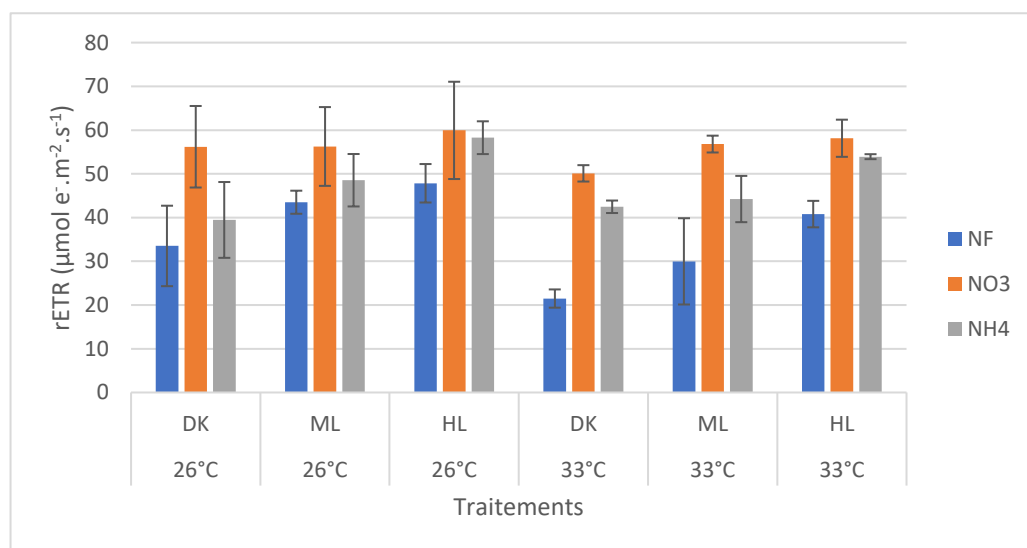


Figure 11 : Transport relatif d'électrons au travers du PS II (rETR, en $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A) Moyennes \pm écarts-types du rETR en fonction des différentes conditions de stress thermique et lumineux mesuré à $230 \mu\text{E}$. B) Moyennes \pm écarts-types du rETR mesurés sur les mêmes échantillons 24h après la première mesure, également à $230 \mu\text{E}$. Les moyennes sont celles des triplicats biologiques.

Des effets significatifs de la nature du milieu azoté ($p = 0,0358$), de la température d'incubation ($p = 1,5 \cdot 10^{-11}$) et de l'intensité lumineuse d'incubation ($p = 1,57 \cdot 10^{-5}$), ainsi qu'un effet combiné de la température et de l'intensité lumineuse d'incubation ($p = 2,03 \cdot 10^{-15}$) ont été observés sur le paramètre d'extinction non photochimique (Figure 12). Cependant, il semblerait que ces différences pourraient être causées par une erreur lors de la manipulation

ou de la prise de mesure par l'appareil d'imagerie SpeedZen pour les échantillons incubés à 400 μE et à 26°C.

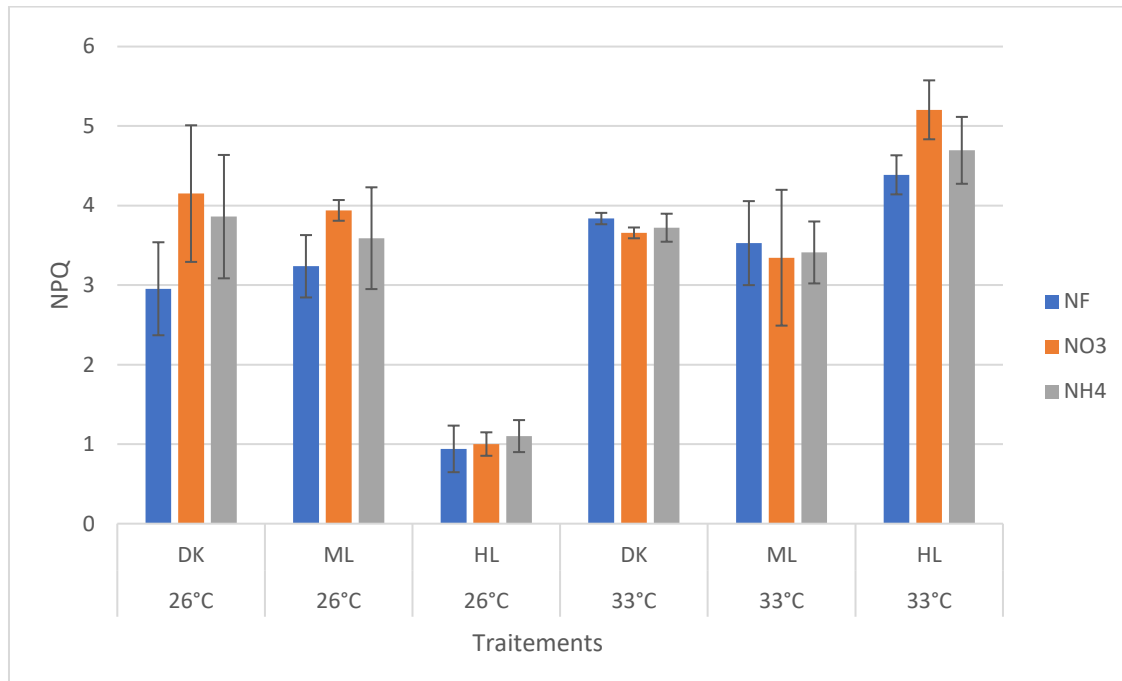


Figure 12 : Paramètre d'extinction non photochimique (NPQ, pas d'unité) en fonction des conditions de stress thermiques et lumineux, mesuré à 570 μE . Les valeurs présentées sont les moyennes \pm écarts-types des triplicats biologiques.

4.2 Espèces réactives

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est nécessaire pour les Symbiodiniaceae, mais un excès de ces molécules qui sont hautement réactives peut causer un stress oxydant chez les algues. Ce stress a lieu quand la production de ROS dépasse les capacités du réseau antioxydant de l'algue, et peut être lui-même causé par l'exposition à d'autres stress, tels qu'un stress thermique ou un stress lumineux.

La production de ROS intracellulaire a été évaluée au moyen de la sonde H₂DCFDA, qui interagit de manière non spécifique avec les espèces réactives, et au moyen de la sonde DAF-FM. Cette dernière ne permet pas de doser les espèces réactives de l'oxygène, mais réagit avec l'oxyde nitrique (NO). Le NO a la capacité de réagir avec l'ion superoxyde (O₂⁻) pour former du peroxy-nitrite, qui est une molécule hautement réactive à fort pouvoir oxydant.

L'émission de fluorescence par la sonde H₂DCFDA (Figure 13) est impactée significativement par la nature du milieu azoté ($p < 2 \cdot 10^{-16}$) et par l'intensité lumineuse d'incubation ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

Les échantillons maintenus en milieu sans azote émettent des valeurs de fluorescence moyennes ~40% moins élevés que ceux maintenus en milieu nitrate ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), tandis que les échantillons maintenus en milieu ammonium émettent des valeurs de fluorescence moyennes ~60% moins élevées que ceux maintenus en milieu nitrate ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

Bien que les échantillons incubés à 100 μ E et ceux incubés à 400 μ E ne diffèrent pas significativement entre eux, une diminution de la fluorescence moyenne de ~65% par rapport à celle émise par les échantillons incubés à la lumière est constatée pour les échantillons incubés à l'obscurité ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

Des effets combinés des différents traitements ont également été mesurés. On peut, par exemple, observer que la production de ROS pour les échantillons incubés à l'obscurité et à 33°C est plus de deux fois plus importante que celle des échantillons incubés à l'obscurité et à 26°C ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), et ce même si la température seule n'a pas d'impact significatif sur cette mesure ($p = 0,595$).

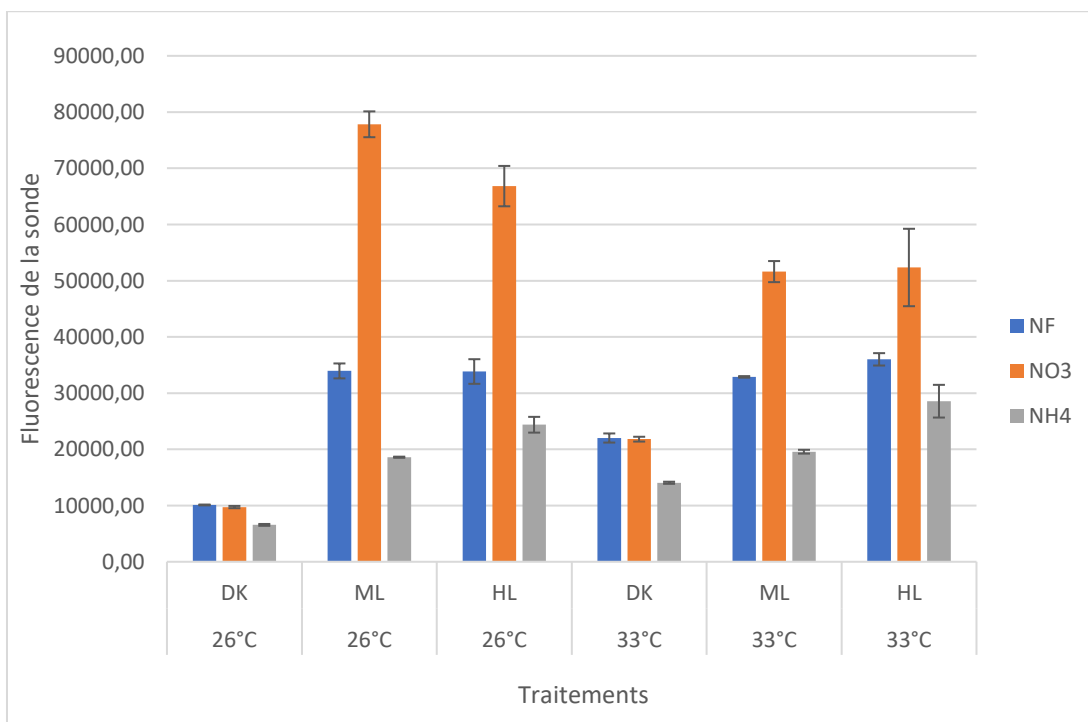


Figure 13 : Production de ROS intracellulaire évaluée au moyen des valeurs de fluorescence de la sonde H₂DCFDA incubée dans les cellules et mesurée après exposition aux différentes conditions de stress thermique et lumineux. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm écarts-types des triplicas biologiques

La fluorescence de la sonde intracellulaire DAF-FM (Figure 14) est influencée significativement par la nature du milieu azoté ($p = 4,98 \cdot 10^{-6}$), la température d'incubation ($p < 2 \cdot 10^{-16}$) et l'intensité lumineuse d'incubation ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), mais aussi par l'effet combiné de la température et de l'intensité lumineuse d'incubation ($p = 2,63 \cdot 10^{-7}$).

La valeur de fluorescence émise par les échantillons maintenus en milieu NF est similaire à celle émise par les échantillons maintenus en milieu nitrate, tandis que celle émise par les échantillons maintenus en milieu ammonium est inférieure de $\sim 10\%$ ($p = 6,1 \cdot 10^{-6}$).

Les échantillons incubés à 26°C émettent une fluorescence $\sim 35\%$ moins importante que les échantillons incubés à 33°C ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

Une différence de fluorescence de $\sim 6\%$ est observée entre les échantillons incubés à l'obscurité et ceux incubés à 100 μE ($p = 0,041$), et une différence de fluorescence de $\sim 30\%$ est observée entre les échantillons incubés à 100 μE et ceux incubés à 400 μE ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

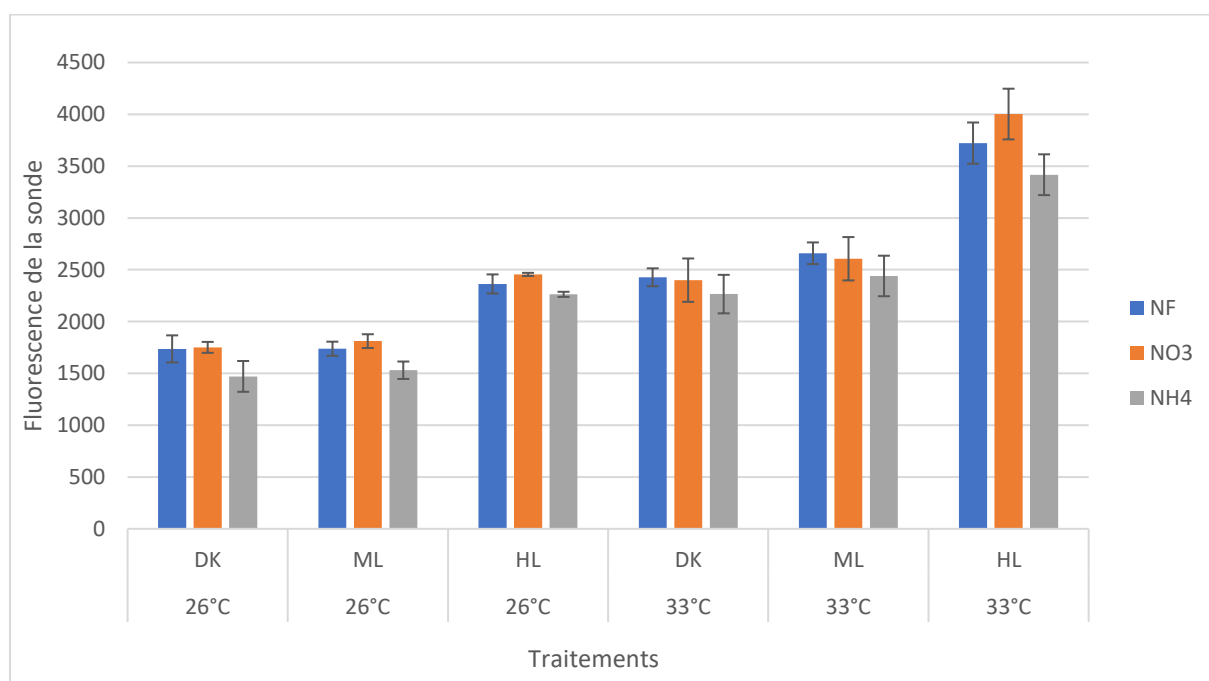


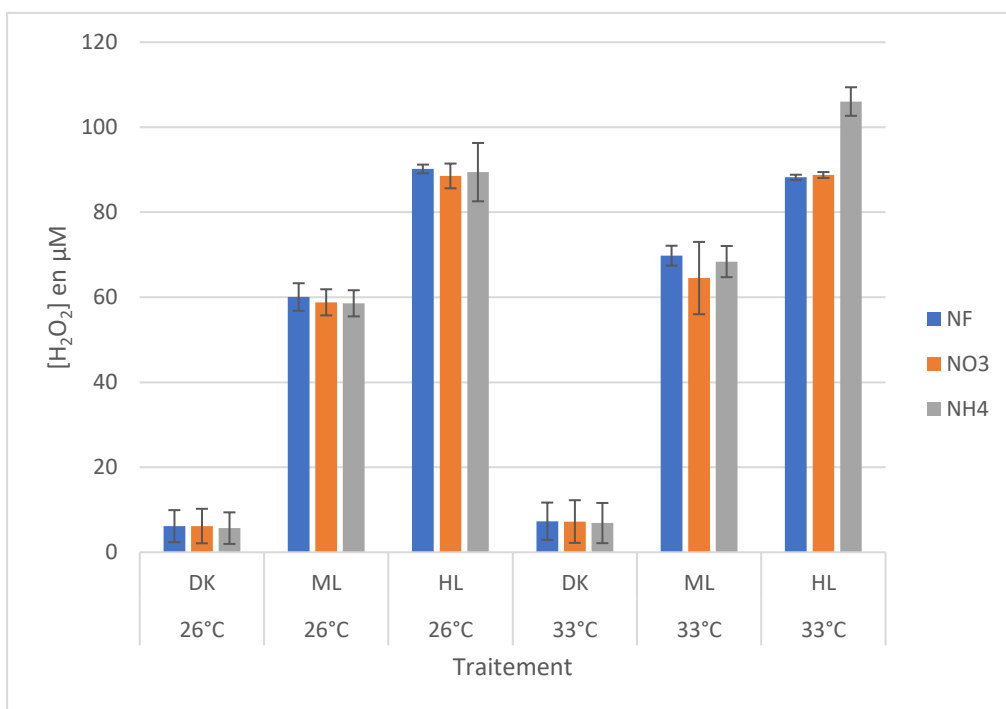
Figure 14 : Production de NO intracellulaire évaluée au moyen des valeurs de fluorescence de la sonde DAF-FM incubée dans les cellules et mesurée après exposition aux différentes conditions de stress thermiques et lumineux. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm écarts-types des triplicats biologiques.

Selon l'« Oxidative Theory of Bleaching », le blanchissement serait causé par une production extracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène par le symbiote dans la cellule hôte. La ROS la plus stable est le peroxyde d'hydrogène, et le fait que ce soit une molécule non chargée lui permet de diffuser facilement au travers des membranes. La production d' H_2O_2 extracellulaire (Figure 15-A), mesurée par fluorescence de la sonde Amplex Red, est influencée significativement pas la nature du milieu azoté ($p = 0,045$), par la température d'incubation ($p = 1,08 \cdot 10^{-4}$) et par l'intensité lumineuse d'incubation ($p < 2 \cdot 10^{-16}$). En effet, la concentration en H_2O_2 est environ 10 fois plus importante pour les échantillons incubée à $100 \mu\text{E}$ que pour ceux incubés à l'obscurité ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), et elle est en moyenne $\sim 6\%$ plus élevée pour les échantillons incubés à $400 \mu\text{E}$ ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

Des effets combinés des différentes conditions expérimentales ont également été mis en évidence par les analyses statistiques.

Cependant, les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons doivent être interprétés avec prudence. En effet, durant les mesures, il a été remarqué que la sonde émettait de la fluorescence, et ce en l'absence de cellules. Des mesures ont dès lors été effectuées sur de l'eau de mer stérile incubée dans les mêmes conditions de stress thermique et lumineux que les échantillons (Figure 15-B) pour vérifier que la fluorescence de la sonde mesurée était bien celle du peroxyde d'hydrogène émis par les cellules. Bien que l'analyse n'ait pas été réalisée sur des répliques biologiques, une production en H_2O_2 peut être observée en présence de lumière, et ce en l'absence de cellule.

A)



B)

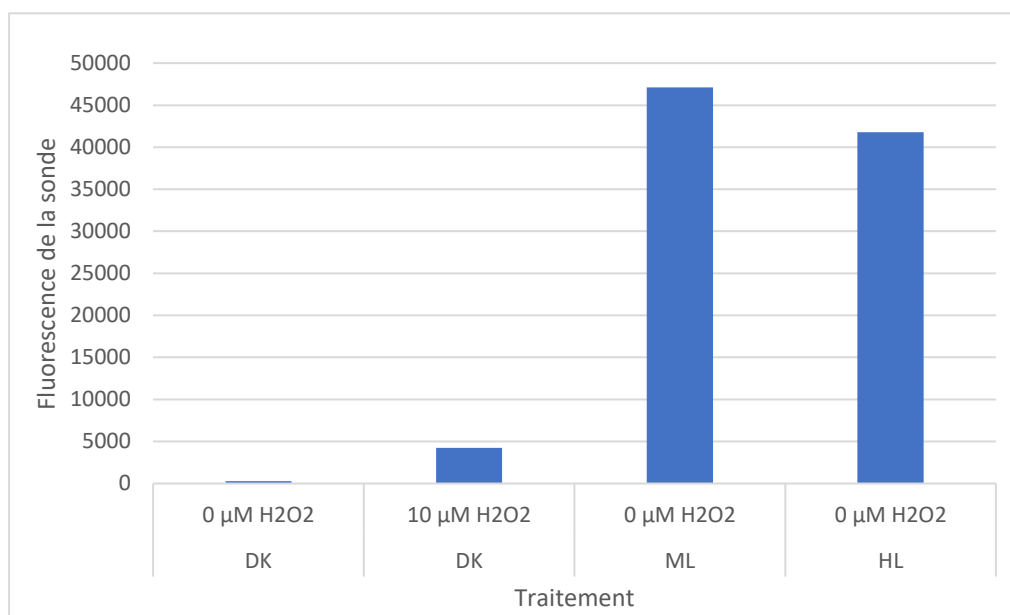


Figure 15 : Concentrations en H_2O_2 extracellulaires moyennes (en μM) déterminées au moyen de la sonde Amplex™ Red (Invitrogen). A) Concentrations moyennes \pm écarts-types mesurées sur les échantillons placés dans les différentes conditions de stress thermiques et lumineux. Les moyennes sont celles des triplicats biologiques. B) Fluorescence de la sonde mesurée dans de l'eau de mer stérile placée à l'incubateur dans les différentes conditions de stress thermiques et lumineux. Les concentrations indiquées correspondent à la quantité de peroxyde d'hydrogène ajoutée au début de la manipulation.

5 Discussion

Les récifs coralliens sont menacés par les changements climatiques provoqués en grande partie par l'activité humaine. Ces changements provoquent notamment une augmentation globale de la température des océans. Il est communément admis que l'augmentation de la température de l'eau est en lien avec une baisse des capacités physiologiques des coraux et de leurs microalgues endosymbiotiques. Des études montrent également que cette augmentation, associée à l'exposition à une intensité lumineuse élevée telle que celle que l'on retrouve dans la zone intertropicale, la zone de répartition des récifs coralliens, génèrent des stress pouvant causer le blanchissement (Hoegh-Guldberg et al., 2017; Krämer et al., 2012).

Le dialogue moléculaire sur lequel repose le succès de la symbiose entre le corail-hôte et ses Symbiodiniaceae dépend à la fois de diverses voies de signalisation et du maintien d'une relation trophique stable. Le métabolisme de l'azote a été démontré comme clé de voûte de cette relation trophique (Morris et al., 2019), et plusieurs études se sont intéressées à l'influence de la nature de la source d'azote sur la physiologie de l'holobionte corallien (Baker et al., 2018; Burkepile et al., 2020; Ezzat et al., 2015). C'est pourquoi s'intéresser à la fois aux conséquences de l'exposition à des stress thermiques et lumineux, ainsi qu'aux effets de la source d'azote sur la réponse à ces stress, est important afin de mieux comprendre les mécanismes du blanchissement.

Nos expérimentations ont permis de mettre en évidence des effets de stress de courte durée sur différents paramètres physiologiques de *S. microadriaticum*.

5.1 Influence des stress thermiques et lumineux sur les différents paramètres physiologiques mesurés

Plusieurs paramètres physiologiques de *S. microadriaticum* sont significativement impactés par l'intensité lumineuse et l'augmentation de température, en particulier l'activité photosynthétique.

On peut voir que le rapport F_v/F_m , qui traduit le rendement quantique maximal du photosystème II, diminue significativement lorsque les algues sont exposées aux plus fortes

intensités lumineuses (Figure 10). Ceci a déjà été mis en évidence dans plusieurs études portant sur différentes espèces de Symbiodiniaceae, appartenant à différents genres (e.g. Krämer et al., 2013; Krueger et al., 2014, 2015). La diminution du rapport F_v/F_m s'explique par une photoinhibition partielle des centres réactionnels des PSII. Cette stratégie vise à réduire l'efficacité photochimique lors de l'exposition à de fortes lumières dans le but de réduire la quantité d'énergie captée par les antennes collectrices, limitant ainsi la production de ROS liée à l'activité photosynthétique. L'énergie arrivant sur les antennes collectrices et ne pouvant plus être prise en charge par les centres réactionnels inhibés va donc être dissipée sous forme de chaleur par des voies tels que le cycle des xanthophylles. L'activité de ces mécanismes de dissipation de l'énergie peut être quantifiée au moyen du paramètre d'extinction non photochimique (Eberhard et al., 2008).

Les valeurs de NPQ (Figure 12) mesurées à 33°C montrent que l'extinction non photochimique est plus importante pour les échantillons incubés en condition de haute intensité lumineuse (HL) que pour les échantillons incubés dans les deux autres conditions lumineuses, ce qui correspond aux hypothèses sur le rendement quantique maximal du PSII. En effet, le rendement quantique maximum montre des signes de photoinhibition uniquement chez les algues incubées à haute intensité lumineuse, et c'est également chez ces celles-ci que l'extinction non photochimique est plus importante. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Roberty et al. (2015), et on pourrait imaginer que les mesures pour les échantillons incubés à 26°C, pour lesquels nous avons eu un problème lors de la mesure, donneraient des résultats similaires en se basant sur cette étude. Ces résultats sont effectivement attendus, avec la mise en place de diverses voies alternatives de dissipation de l'énergie en excès captée par le photosystème II.

La voie de dissipation de l'énergie à laquelle nous nous sommes intéressés durant ce travail est le cycle des xanthophylles. On peut observer que l'état de dé-époxydation des xanthophylles, correspondant au rapport entre la diadinoxanthine et la diatoxanthine, augmente avec l'intensité lumineuse (Figure 8). Comme il s'agit d'un des mécanismes mis en place afin de dissiper l'énergie en excès du photosystème II, une augmentation du DPS était attendue. Des études de Krämer et al. (2013), de Warner & Berry-Lowe (2006) et de Robison & Warner (2006) arrivent à des conclusions similaires après avoir effectué des expérimentations sur l'impact des stress lumineux et thermiques sur les Symbiodiniaceae.

Contre toute attente, le DPS des échantillons incubés à l'obscurité n'est pas nul. Des études ont montré qu'en effet, on pouvait toujours observer le cycle des xanthophylles lors d'une exposition prolongée à l'obscurité. Cela pourrait être causé par l'hydrolyse de l'ATP au niveau des chloroplastes, ce qui acidifierait le lumen. Étant donné que les dé-époxydases répondent à la présence d'un gradient de protons, cette acidification pourrait causer des réactions de dé-époxydation durant les périodes d'obscurité (Fernández-Marín et al., 2021).

Lorsqu'on observe le contenu pigmentaire (Tableau 5), on peut observer une augmentation de la proportion de caroténoïdes pour les échantillons incubés à 33°C par rapport aux échantillons incubés à 26°C. Comme les concentrations ont été standardisées par rapport au contenu en chlorophylle *a*, les valeurs observées traduisent le rapport entre les concentrations en caroténoïdes et la concentration en Chl-*a*. Une étude de Krämer et al. (2012) explique que les Symbiodiniaceae peuvent moduler la composition pigmentaire de leurs photosystèmes, en diminuant le nombre de pigments photosynthétiques et en augmentant leur pool de xanthophylles par exemple, afin de limiter l'impact des stress. L'augmentation de la proportion de caroténoïdes peut résulter soit d'une diminution de la concentration en chlorophylles, soit par une augmentation de la concentration en caroténoïdes. Dans le premier cas, la diminution des chlorophylles pourrait être causée par une perte ou une dégradation des antennes collectrices, ce qui entraînerait une inhibition des capacités photosynthétiques. Cette inhibition pourrait expliquer la diminution du transport relatif d'électrons (rETR) observée à 33°C par rapport aux échantillons incubés à 26°C (Figure 11-A). Dans le deuxième cas, l'augmentation de la concentration en caroténoïdes pourrait être un mécanisme de photoprotection. Les xanthophylles jouent un rôle dans les voies de dissipation de l'énergie en excès reçue par le photosystème II, donc l'augmentation de la taille du pool de xanthophylle pourrait augmenter la quantité d'énergie pouvant être dissipée de cette manière. Des études ont également démontré que les cellules produisent une plus grande quantité de caroténoïdes lorsqu'elles sont exposées à un stress thermique, ce qui pourrait être expliqué par le fait qu'ils joueraient un rôle dans la stabilisation de la membrane des thylakoïdes lors de stress environnementaux. Ce maintien de la membrane est dû aux capacités antioxydantes des caroténoïdes, qui réagissent avec certaines ROS, empêchant ainsi la peroxydation des lipides insaturés contenus dans les membranes (Havaux et al., 1996; Havaux & Niyogi, 1999; Krueger et al., 2014; Takano, 2016).

Contrairement au rendement photochimique du photosystème II (F_v/F_m), le taux relatif de transport des électrons (rETR) augmente avec la lumière (Figure 11-A). Alors que le rapport F_v/F_m représente le nombre de centre réactionnels du PSII qui sont dans un état activable (ou ouvert), le rETR représente le « débit » d'électrons qui passent au travers des PSII. Le cycle de Calvin s'acclimate à l'intensité lumineuse plus élevée et se déroule plus rapidement grâce à une uprégulation de l'activité des enzymes qui composent le cycle. Le taux de renouvellement du $NADP^+$ augmente et la disponibilité des accepteurs d'électrons est donc accrue en aval de la chaîne de transport de la phase claire (Leegood, 1990; Wirtz et al., 1982). Le fait que le rETR soit moins élevé pour les échantillons incubés à 33°C correspond aux résultats obtenus par Roberty et al. (2015), et pourrait s'expliquer par l'inhibition de la Rubisco à température élevée (Lilley et al., 2010). La baisse du taux de transport d'électrons pourrait aussi être causée par l'inhibition des mécanismes de réparation de la protéine D1 lors de l'exposition à des températures supérieures à 30°C, tel que suggéré par Takahashi et al. (2009).

On peut en effet constater que les productions de ROS (Figure 13) et de NO (Figure 14) augmentent avec l'intensité lumineuse, mais également avec la température, et ces résultats ont déjà été observés dans diverses études (Bouchard & Yamasaki, 2008; Jury et al., 2022; Suggett et al., 2008). Hawkins & Davy (2012) ont suggéré que la production d'oxyde nitrique pourrait en réalité être lié à un mécanisme de photoinhibition et de photoprotection de certaines Symbiodiniaceae photosynthétiques. Le NO serait capable de réguler les réactions de photophosphorylation dans les chloroplastes et d'inhiber le transport d'électrons au travers du PSII (Takahashi & Yamasaki, 2002). L'augmentation de la production de NO avec la température concorde aussi avec les observations de Jury et al. (2022), qui ont démontré qu'une augmentation de température augmente la synthèse d'oxyde nitrique par l'activité de la NOS (Nitric Oxide Synthase).

On peut apercevoir des différences importantes au niveau de la production de peroxyde d'hydrogène extracellulaire aux différentes intensités lumineuses d'incubation (Figure 15-A). Ces résultats étaient attendus, car le H_2O_2 est notamment produit par la réaction de Mehler qui réduit l' O_2 en $O_2^{\bullet-}$ lors de l'exposition à de fortes intensités lumineuses (Roberty et al., 2014, 2015; Szabó et al., 2020; Tchernov et al., 2004). De plus, des études ayant utilisé la sonde Amplex Red ont obtenu des résultats correspondant à ceux obtenus lors de nos expérimentations (Roberty et al., 2015; Suggett et al., 2008). Cependant, ces résultats doivent

être interprétés avec précaution car nous avons observé une production de peroxyde d'hydrogène dans de l'eau de mer stérile exposée aux mêmes conditions lumineuses, en l'absence de cellule (blanc) (Figure 15-B). Cette production était d'ailleurs 8 à 10 fois plus élevée que le contrôle positif (eau de mer stérile + H₂O₂ 10 µM) à l'obscurité. Des études ont, qui plus est, démontré que l'exposition d'eau pure à une source d'énergie électrique ou lumineuse provoquait la réduction de l'oxygène en ROS (Das et al., 2023; Hou et al., 2020; Sun et al., 2020). En outre, les concentrations en H₂O₂ mesurées dans l'eau seule sont légèrement plus élevées que celles mesurées en présence de cellules, ce qui soutient cette hypothèse. En effet, les cellules auraient absorbé une partie du rayonnement lumineux et auraient donc limité la production de peroxyde d'hydrogène par réduction photocatalytique.

5.2 Influence de la nature de la source d'azote sur les différents paramètres physiologiques mesurés

Les productions de ROS (Figure 13) et de NO (Figure 14) intracellulaires sont influencées par la nature du milieu azoté. On peut voir que, dans tous les cas étudiés, la production de ces molécules est moins importante pour les échantillons supplémentés en ammonium par rapport à ceux supplémentés en nitrate. Ceci peut s'expliquer par le fait que, pour pouvoir être utilisé par la cellule, le nitrate doit d'abord être réduit en nitrite et puis en ammonium. Ces réactions de réductions sont catalysées par les nitrate et nitrite réductases, et l'interaction de l'oxygène avec les intermédiaires de réaction peut amener à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Ferrer-Sueta & Radi, 2009). Les nitrate et nitrite réductases sont également impliquées dans la production d'oxyde nitrique (Bouchard & Yamasaki, 2008).

La nature du milieu a également une influence sur le taux de transport relatif d'électrons. On peut observer que le rETR (Figure 11-A) est plus important pour les échantillons incubés en milieu riche en nitrate que pour ceux incubés en milieu riche en ammonium et en milieu carencé en azote. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la réduction du nitrate en ammonium est un procédé qui consomme des électrons de la photosynthèse et du NADPH, qui est l'accepteur final de la chaîne de transport d'électrons (Dagenais-Bellefeuille & Morse, 2013; Ezzat et al., 2015). Cela pourrait également être dû au fait que le nitrate permet une meilleure intégration du carbone et de l'azote dans des protéines (Taguchi & Kinzie Iii, 2001),

augmentant donc la réparation des protéines endommagées lors de l'activité photosynthétique.

Des mesures ont été effectuées sur les capacités photosynthétiques du PSII 24 heures après les mesures initiales afin d'évaluer la résilience des algues aux stress qui leur ont été imposés. Ces mesures ont été inspirées par des études utilisant le système CBASS (Coral Bleaching Automated Stress System), qui permet de mesurer différents paramètres après exposition à un stress thermique de courte durée suivi d'une diminution progressive de la température jusqu'à revenir à la température ambiante (Evensen et al., 2023).

L'augmentation du rETR après une seconde incubation (Figure 11-B) nous permet de déduire plusieurs choses. Tout d'abord, cette augmentation traduit des capacités de récupération des algues après exposition à des changements environnementaux relativement courts. Les dommages qui auraient été causés à l'appareil photosynthétique par les différents facteurs de stress ne sont donc pas irréversibles. Des études ont suggéré que les Symbiodiniaceae ont la capacité de moduler la composition pigmentaire de leurs appareils photosynthétiques, notamment via la perte d'une partie des antennes acpPC pour diminuer la quantité d'énergie captée et transmise aux photosystèmes (Krämer et al., 2012, 2013).

Cette résilience des algues à des stress courts a également permis de mettre en évidence les différences entre la nature des différentes sources d'azote sur la récupération des capacités photosynthétiques de l'algue. Les échantillons supplémentés en azote ont une augmentation de leur taux de transport d'électrons beaucoup plus importante que les échantillons en milieu NF, même si ces derniers voient quand même leur rETR augmenter par rapport aux premières mesures. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par T. Li et al. (2021), qui ont remarqué que la carence en azote provoquait une baisse des capacités photosynthétiques des Symbiodiniaceae. Au sein des échantillons exposés à une source externe d'azote, ceux ayant été traités avec du nitrate semblent avoir un taux de transport d'électrons plus important que ceux traités avec de l'ammonium, ce qui pourrait de nouveau être expliqué par le fait que la réduction du nitrate en ammonium nécessite l'utilisation de NADPH et d'électrons provenant de la photosynthèse (Dagenais-Bellefeuille & Morse, 2013; Ezzat et al., 2015). La différence entre les premières mesures et celles effectuées 24 heures après pourrait être causée par le fait que l'algue n'aurait peut-être pas le temps d'assimiler l'azote de manière efficace lors de l'exposition à un stress court, et qu'elle réagirait comme si elle était toujours dans un état

carencé. Effectivement, certaines recherches scientifiques suggèrent que, en cas de stress de courte durée, la majorité de l'azote qui pénètre dans les cellules algales serait principalement stockée plutôt qu'utilisée immédiatement (Dagenais-Bellefeuille & Morse, 2013). L'effet du traitement en azote sur la réponse au stress direct, et non sur la récupération lors du retour dans des conditions d'incubation standard, ne serait alors visible que si les algues restaient exposées plus longtemps aux différentes conditions.

Depuis longtemps, les avantages et désavantages de la nature de la source d'azote sont discutés. Dans la plupart des cas, le nitrate est critiqué car il augmenterait l'ampleur du blanchissement et diminuerait la production nette du corail lors de l'exposition à des stress (Baker et al., 2018; Burkepile et al., 2020; Fernandes De Barros Marangoni et al., 2020). L'ammonium quant à lui, améliorerait la fixation du carbone et les échanges avec l'hôte et augmenterait la résistance thermique et le métabolisme du corail en lui permettant d'augmenter sa concentration en pigments photoprotecteurs, lui permettant ainsi de maintenir une activité photosynthétique lors de l'exposition à un stress (Béraud et al., 2013; Ezzat et al., 2015). Ces avantages ne sont cependant possibles que lors d'une exposition courte à de légères concentrations en ammonium, car ce dernier deviendrait toxique au-delà d'un certain seuil (Ezzat et al., 2015; Taguchi & Kinzie Iii, 2001). Le nitrate, lui, reste important pour les algues car il permet de réguler différents processus physiologiques en agissant comme un « zeitgeber » (Dagenais-Bellefeuille & Morse, 2013). Il augmente également la croissance des Symbiodiniaceae et maximise l'intégration de l'azote et du carbone dans des protéines, tandis que l'ammonium favorise plutôt la synthèse de composés intermédiaires et augmente la taille des cellules plutôt que leur multiplication (Fuchinoue et al., 2012; Taguchi & Kinzie Iii, 2001).

Les expériences effectuées dans le cadre de ce travail ont montré que la nature de la source d'azote avait un impact différent selon le paramètre mesuré. En effet, bien que les échantillons supplémentés en ammonium montrent une production de ROS moins importante, ce sont les échantillons en milieu nitrate qui ont montré une augmentation plus importante de leur taux relatif de transport d'électrons. Il faut cependant noter que la plupart de ces études ont été effectuées sur des coraux symbiotiques, tandis que nos mesures ont été effectuées sur des cultures d'algues isolées.

Le fait que si peu de paramètres soient influencés par la durée de carence suggère des capacités d'acclimatation à diverses concentrations d'azote, tel que suggéré par Dagenais-Bellefeuille & Morse (2013).

6 Conclusions et perspectives

La nature du milieu azoté a démontré des effets significatifs sur certains paramètres physiologiques lors de l'exposition à différents stress thermiques et lumineux. Bien que l'ammonium soit considéré comme étant plus avantageux pour les Symbiodiniaceae, le nitrate permet d'augmenter la croissance et la synthèse de protéines, et nos résultats ont montré que le nitrate permettait également d'augmenter les capacités photosynthétiques. Cependant les avantages du nitrate viennent avec une production accrue de ROS. Des mesures complémentaires sur l'activité antioxydante et des dommages causés par un stress oxydant sont nécessaires afin de confirmer si l'augmentation des ROS à la suite d'une exposition au nitrate est suffisante pour placer les microalgues dans un état de stress oxydant. Le fait que certains paramètres n'ont pas été influencés pourrait être lié à la courte durée d'incubation dans les différents milieux azotés, qui n'a pas permis aux algues d'assimiler efficacement et d'utiliser l'azote pour réagir aux différents stress. De nouvelles analyses complémentaires afin de mesurer les mêmes paramètres après une incubation plus longue dans les différents milieux azotés, similaires à celles effectuées dans ce travail pour l'activité photosynthétique sont également nécessaires afin de comprendre comment les différentes sources d'azote affectent la physiologie des Symbiodiniaceae et leur réponse à l'exposition à différents stress.

7 Références

- Anthony, K. R. N., Maynard, J. A., Diaz-Pulido, G., Mumby, P. J., Marshall, P. A., Cao, L., & Hoegh-Guldberg, O. (2011). Ocean acidification and warming will lower coral reef resilience : CO2 AND CORAL REEF RESILIENCE. *Global Change Biology*, 17(5), 1798-1808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02364.x>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES : Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Asada, K. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photo-inhibition*, 227-287.
- Asada, K. (2000). The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419-1431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0703>
- Baker, D. M., Freeman, C. J., Wong, J. C. Y., Fogel, M. L., & Knowlton, N. (2018). Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. *The ISME Journal*, 12(3), 921-930. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0046-8>
- Béraud, E., Gevaert, F., Rottier, C., & Ferrier-Pagès, C. (2013). The response of the scleractinian coral *Turbinaria reniformis* to thermal stress depends on the nitrogen status of the coral holobiont. *Journal of Experimental Biology*, jeb.085183. <https://doi.org/10.1242/jeb.085183>
- Bouchard, J. N., & Yamasaki, H. (2008). Heat Stress Stimulates Nitric Oxide Production in *Symbiodinium microadriaticum* : A Possible Linkage between Nitric Oxide and the Coral Bleaching Phenomenon. *Plant and Cell Physiology*, 49(4), 641-652. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn037>
- Bourne, D. G., Morrow, K. M., & Webster, N. S. (2016). Insights into the Coral Microbiome : Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 317-340. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095440>
- Burkepile, D. E., Shantz, A. A., Adam, T. C., Munsterman, K. S., Speare, K. E., Ladd, M. C., Rice, M. M., Ezzat, L., McIlroy, S., Wong, J. C. Y., Baker, D. M., Brooks, A. J., Schmitt, R. J., & Holbrook, S. J. (2020). Nitrogen Identity Drives Differential Impacts of Nutrients on Coral Bleaching and Mortality. *Ecosystems*, 23(4), 798-811. <https://doi.org/10.1007/s10021-019-00433-2>
- Burton, E. A., & Walter, L. M. (1987). Relative precipitation rates of aragonite and Mg calcite from seawater : Temperature or carbonate ion control? *Geology*, 15(2), 111. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1987\)15<111:RPROAA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1987)15<111:RPROAA>2.0.CO;2)
- Cadenas, E. (1989). BIOCHEMISTRY OF OXYGEN TOXICITY. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 79-110. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455>
- Cimino, F., Esposito, F., Ammendola, R., & Russo, T. (1997). Gene Regulation by Reactive Oxygen Species. In *Current Topics in Cellular Regulation* (Vol. 35, p. 123-148). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2137\(97\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2137(97)80005-2)
- Cziesielski, M. J., Schmidt-Roach, S., & Aranda, M. (2019). The past, present, and future of coral heat stress studies. *Ecology and Evolution*, 9(17), 10055-10066. <https://doi.org/10.1002/ece3.5576>

- Dagenais-Bellefeuille, S., & Morse, D. (2013). Putting the N in dinoflagellates. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00369>
- Das, P., Roeser, J., & Thomas, A. (2023). Solar Light Driven H₂ O₂ Production and Selective Oxidations Using a Covalent Organic Framework Photocatalyst Prepared by a Multicomponent Reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 62(29), e202304349. <https://doi.org/10.1002/anie.202304349>
- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 229-261. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>
- Douglas, A. E. (2003). Coral bleaching—how and why? *Marine Pollution Bulletin*, 46(4), 385-392. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00037-7)
- Dubinsky, Z., Stambler, N., Ben-Zion, M., McCloskey, L. R., Muscatine, L., & Falkowski, P. G. (1990). The effect of external nutrient resources on the optical properties and photosynthetic efficiency of *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*, 239(1295), 231-246. <https://doi.org/10.1098/rspb.1990.0015>
- Eakin, C. M., Sweatman, H. P. A., & Brainard, R. E. (2019). The 2014–2017 global-scale coral bleaching event : Insights and impacts. *Coral Reefs*, 38(4), 539-545. <https://doi.org/10.1007/s00338-019-01844-2>
- Eberhard, S., Finazzi, G., & Wollman, F.-A. (2008). The Dynamics of Photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 463-515. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452>
- Evensen, N. R., Parker, K. E., Oliver, T. A., Palumbi, S. R., Logan, C. A., Ryan, J. S., Klepac, C. N., Perna, G., Warner, M. E., Voolstra, C. R., & Barshis, D. J. (2023). The Coral Bleaching Automated Stress System (CBASS) : A low-cost, portable system for standardized empirical assessments of coral thermal limits. *Limnology and Oceanography: Methods*, 21(7), 421-434. <https://doi.org/10.1002/lom3.10555>
- Ezzat, L., Fine, M., Maguer, J.-F., Grover, R., & Ferrier-Pagès, C. (2017). Carbon and Nitrogen Acquisition in Shallow and Deep Holobionts of the Scleractinian Coral *S. pistillata*. *Frontiers in Marine Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00102>
- Ezzat, L., Maguer, J.-F., Grover, R., & Ferrier-Pagès, C. (2015). New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral–dinoflagellate symbiosis under NH₄⁺ and NO₃⁻ supply. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1812), 20150610. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0610>
- Ezzat, L., Towle, E., Irisson, J.-O., Langdon, C., & Ferrier-Pagès, C. (2016). The relationship between heterotrophic feeding and inorganic nutrient availability in the scleractinian coral *T. reniformis* under a short-term temperature increase : Heterotrophy and inorganic nutrient effects in corals. *Limnology and Oceanography*, 61(1), 89-102. <https://doi.org/10.1002/lno.10200>
- Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., & Porter, J. W. (1984). Light and the Bioenergetics of a Symbiotic Coral. *BioScience*, 34(11), 705-709. <https://doi.org/10.2307/1309663>
- Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2007). *Aquatic photosynthesis* (2nd ed). Princeton University Press.
- Fernandes De Barros Marangoni, L., Ferrier-Pagès, C., Rottier, C., Bianchini, A., & Grover, R. (2020). Unravelling the different causes of nitrate and ammonium effects on coral bleaching. *Scientific Reports*, 10(1), 11975. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68916-0>

- Fernández-Marín, B., Roach, T., Verhoeven, A., & García-Plazaola, J. I. (2021). Shedding light on the dark side of xanthophyll cycles. *New Phytologist*, 230(4), 1336-1344. <https://doi.org/10.1111/nph.17191>
- Ferrer-Sueta, G., & Radi, R. (2009). Chemical Biology of Peroxynitrite : Kinetics, Diffusion, and Radicals. *ACS Chemical Biology*, 4(3), 161-177. <https://doi.org/10.1021/cb800279q>
- Ferrier-Pagès, C., Gattuso, J.-P., Dallot, S., & Jaubert, J. (2000). Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*, 19(2), 103-113. <https://doi.org/10.1007/s003380000078>
- Ferrier-Pagès, C., Rottier, C., Beraud, E., & Levy, O. (2010). Experimental assessment of the feeding effort of three scleractinian coral species during a thermal stress : Effect on the rates of photosynthesis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 390(2), 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.05.007>
- Francolet, D., Roberty, S., & Plumier, J.-C. (2012). Establishment of endosymbiosis : The case of cnidarians and Symbiodinium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 420-421, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.015>
- Fuchinoue, Y., Katayama, T., Obata, M., Murata, A., Kinzie, R., & Taguchi, S. (2012). Growth, biochemical properties, and chlorophyll fluorescence of symbiotic and free-living dinoflagellates in response to ammonium enrichment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 438, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.10.001>
- Garrido, A. G., Machado, L. F., Zilberberg, C., & Leite, D. C. D. A. (2021). Insights into 'Symbiodiniaceae phycosphere' in a coral holobiont. *Symbiosis*, 83(1), 25-39. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00735-3>
- Gibbin, E., Banc-Prandi, G., Fine, M., Comment, A., & Meibom, A. (2020). A method to disentangle and quantify host anabolic turnover in photosymbiotic holobionts with subcellular resolution. *Communications Biology*, 3(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0742-6>
- Gordillo, F. J. L., Jimenez, C., Figueroa, F. L., & Niell, F. X. (2003). Influence of elevated CO₂ and nitrogen supply on the carbon assimilation performance and cell composition of the unicellular alga *Dunaliella viridis*. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 513-518. <https://doi.org/10.1046/j.1399-3054.2003.00192.x>
- Goss, R., & Latowski, D. (2020). Lipid Dependence of Xanthophyll Cycling in Higher Plants and Algae. *Frontiers in Plant Science*, 11, 455. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00455>
- Gruber, N. (2008). *The Marine Nitrogen Cycle : Overview and Challenges*.
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). STUDIES OF MARINE PLANKTONIC DIATOMS : I. CYCLOTELLA NANA HUSTEDT, AND DETONULA CONFERVACEA (CLEVE) GRAN. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (Fifth edition). Oxford University Press.
- Havaux, M., & Niyogi, K. K. (1999). The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8762-8767. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8762>

- Havaux, M., Tardy, F., Ravenel, J., Chanu, D., & Parot, P. (1996). Thylakoid membrane stability to heat stress studied by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves : Influence of the xanthophyll content. *Plant, Cell and Environment*, *19*(12), 1359-1368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00014.x>
- Hawkins, T. D., Bradley, B. J., & Davy, S. K. (2013). Nitric oxide mediates coral bleaching through an apoptotic-like cell death pathway : Evidence from a model sea anemone-dinoflagellate symbiosis. *The FASEB Journal*, *27*(12), 4790-4798. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235051>
- Hawkins, T. D., & Davy, S. K. (2012). Nitric Oxide Production and Tolerance Differ Among Symbiodinium Types Exposed to Heat Stress. *Plant and Cell Physiology*, *53*(11), 1889-1898. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs127>
- Hawkins, T. D., & Davy, S. K. (2013). Nitric oxide and coral bleaching : Is peroxynitrite generation required for symbiosis collapse? *Journal of Experimental Biology*, jeb.087510. <https://doi.org/10.1242/jeb.087510>
- Henley, W. J., Levavasseur, G., Franklin, L. A., Osmond, C. B., & Ramus, J. (1991). Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability. *Planta*, *184*(2), 235-243. <https://doi.org/10.1007/BF00197952>
- Hoegh-Guldberg, O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research*. <https://doi.org/10.1071/MF99078>
- Hoegh-Guldberg, O., Poloczanska, E. S., Skirving, W., & Dove, S. (2017). Coral Reef Ecosystems under Climate Change and Ocean Acidification. *Frontiers in Marine Science*, *4*, 158. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00158>
- Hoegh-Guldberg, O., & Smith, G. (1989). Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*. *Marine Ecology Progress Series*, *57*, 173-186. <https://doi.org/10.3354/meps057173>
- Hou, H., Zeng, X., & Zhang, X. (2020). Production of Hydrogen Peroxide by Photocatalytic Processes. *Angewandte Chemie International Edition*, *59*(40), 17356-17376. <https://doi.org/10.1002/anie.201911609>
- 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>
- Jury, C. P., Boeing, B. M., Trapido-Rosenthal, H., Gates, R. D., & Toonen, R. J. (2022). Nitric oxide production rather than oxidative stress and cell death is associated with the onset of coral bleaching in *Pocillopora acuta*. *PeerJ*, *10*, e13321. <https://doi.org/10.7717/peerj.13321>
- Karplus, P. A., & Schulz, G. E. (1989). Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme : Substrate crystal structures at 2Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *210*(1), 163-180. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90298-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90298-2)
- Kopp, C., Pernice, M., Domart-Coulon, I., Djediat, C., Spangenberg, J. E., Alexander, D. T. L., Hignette, M., Meziane, T., & Meibom, A. (2013). Highly Dynamic Cellular-Level Response of Symbiotic Coral to a Sudden Increase in Environmental Nitrogen. *MBio*, *4*(3), e00052-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00052-13>

- Krämer, W. E., Caamaño-Ricken, I., Richter, C., & Bischof, K. (2012). Dynamic Regulation of Photoprotection Determines Thermal Tolerance of Two Phylotypes of Symbiodinium Clade A at Two Photon Fluence Rates : Photochemistry and Photobiology. *Photochemistry and Photobiology*, *88*(2), 398-413. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01048.x>
- Krämer, W. E., Schrameyer, V., Hill, R., Ralph, P. J., & Bischof, K. (2013). PSII activity and pigment dynamics of Symbiodinium in two Indo-Pacific corals exposed to short-term high-light stress. *Marine Biology*, *160*(3), 563-577. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2113-4>
- Krueger, T., Becker, S., Pontasch, S., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., Leggat, W., Fisher, P. L., & Davy, S. K. (2014). Antioxidant plasticity and thermal sensitivity in four types of *Symbiodinium* sp. *Journal of Phycology*, *50*(6), 1035-1047. <https://doi.org/10.1111/jpy.12232>
- Krueger, T., Bodin, J., Horwitz, N., Loussert-Fonta, C., Sakr, A., Escrig, S., Fine, M., & Meibom, A. (2018). Temperature and feeding induce tissue level changes in autotrophic and heterotrophic nutrient allocation in the coral symbiosis – A NanoSIMS study. *Scientific Reports*, *8*(1), 12710. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31094-1>
- Krueger, T., Hawkins, T. D., Becker, S., Pontasch, S., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., Leggat, W., Fisher, P. L., & Davy, S. K. (2015). Differential coral bleaching—Contrasting the activity and response of enzymatic antioxidants in symbiotic partners under thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *190*, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.08.012>
- Lajeunesse, T. 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/10.1016/j.cub.2018.07.008>
- Lapointe, B. E., Brewton, R. A., Herren, L. W., Porter, J. W., & Hu, C. (2019). Nitrogen enrichment, altered stoichiometry, and coral reef decline at Looe Key, Florida Keys, USA : A 3-decade study. *Marine Biology*, *166*(8), 108. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3538-9>
- Leegood, R. C. (1990). Enzymes of the Calvin Cycle. In *Methods in Plant Biochemistry* (Vol. 3, p. 15-37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-461013-2.50009-5>
- Lesser, M. P. (2006). OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS : Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, *68*(1), 253-278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Lesser, M. P. (2011). Coral Bleaching : Causes and Mechanisms. In Z. Dubinsky & N. Stambler (Éds.), *Coral Reefs : An Ecosystem in Transition* (p. 405-419). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4_23
- Li, F., Ni, H., Yan, W., Xie, Y., Liu, X., Tan, X., Zhang, L., & Zhang, S.-H. (2021). Overexpression of an aquaporin protein from *Aspergillus glaucus* confers salt tolerance in transgenic soybean. *Transgenic Research*, *30*(6), 727-737. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00280-9>
- Li, T., Chen, X., & Lin, S. (2021). Physiological and transcriptomic responses to N-deficiency and ammonium : Nitrate shift in *Fugacium kawagutii* (Symbiodiniaceae). *Science of The Total Environment*, *753*, 141906. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141906>
- Lilley, R. McC., Ralph, P. J., & Larkum, A. W. D. (2010). The determination of activity of the enzyme Rubisco in cell extracts of the dinoflagellate alga *Symbiodinium* sp. by manganese chemiluminescence

and its response to short-term thermal stress of the alga : Measuring Rubisco in Symbiodinium by Mn²⁺ chemiluminescence. *Plant, Cell & Environment*, 33(6), 995-1004.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02121.x>

Malone, L. A., Qian, P., Mayneord, G. E., Hitchcock, A., Farmer, D. A., Thompson, R. F., Swainsbury, D. J. K., Ranson, N. A., Hunter, C. N., & Johnson, M. P. (2019). Cryo-EM structure of the spinach cytochrome b6 f complex at 3.6 Å resolution. *Nature*, 575(7783), 535-539.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1746-6>

Martino Rigano, V., Vona, V., Martino, C., & Rigano, C. (1986). Effect of darkness and CO₂ starvation on NH₄⁺ and NO₃⁻ assimilation in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Physiologia Plantarum*, 68(1), 34-38. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb06592.x>

Matthews, J. L., Crowder, C. M., Oakley, C. A., Lutz, A., Roessner, U., Meyer, E., Grossman, A. R., Weis, V. M., & Davy, S. K. (2017). Optimal nutrient exchange and immune responses operate in partner specificity in the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(50), 13194-13199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710733114>

Matthews, J. L., Oakley, C. A., Lutz, A., Hillyer, K. E., Roessner, U., Grossman, A. R., Weis, V. M., & Davy, S. K. (2018). Partner switching and metabolic flux in a model cnidarian–dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1892), 20182336.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2336>

McClanahan, T. R., Weil, E., Cortés, J., Baird, A. H., & Ateweberhan, M. (2018). Consequences of Coral Bleaching for Sessile Reef Organisms. In M. J. H. Van Oppen & J. M. Lough (Éds.), *Coral Bleaching* (Vol. 205, p. 121-138). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69775-6_8

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)

Morris, L. A., Voolstra, C. R., Quigley, K. M., Bourne, D. G., & Bay, L. K. (2019). Nutrient Availability and Metabolism Affect the Stability of Coral–Symbiodiniaceae Symbioses. *Trends in Microbiology*, 27(8), 678-689. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.004>

Morse, D., Salois, P., Markovic, P., & Hastings, J. W. (1995). A Nuclear-Encoded Form II RuBisCO in Dinoflagellates. *Science*, 268(5217), 1622-1624. <https://doi.org/10.1126/science.7777861>

Muscatine, L., & D'Elia, C. F. (1978). The uptake, retention, and release of ammonium by reef corals 1 : Ammonium uptake by corals. *Limnology and Oceanography*, 23(4), 725-734.
<https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.4.0725>

Muscatine, L., Porter, J. W., & Kaplan, I. R. (1989). Resource partitioning by reef corals as determined from stable isotope composition : I. ¹³C of zooxanthellae and animal tissue vs depth. *Marine Biology*, 100(2), 185-193. <https://doi.org/10.1007/BF00391957>

Oakley, C. A., & Davy, S. K. (2018). Cell Biology of Coral Bleaching. In M. J. H. Van Oppen & J. M. Lough (Éds.), *Coral Bleaching* (Vol. 233, p. 189-211). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-75393-5_8

Peixoto, R. S., Rosado, P. M., Leite, D. C. D. A., Rosado, A. S., & Bourne, D. G. (2017). Beneficial Microorganisms for Corals (BMC) : Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00341>

- Pey, A., Zamoum, T., Christen, R., Merle, P.-L., & Furla, P. (2017). Characterization of glutathione peroxidase diversity in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Biochimie*, *132*, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.016>
- Putnam, H. M. (2021). Avenues of reef-building coral acclimatization in response to rapid environmental change. *Journal of Experimental Biology*, *224*(Suppl_1), jeb239319. <https://doi.org/10.1242/jeb.239319>
- Rädecker, N., Pogoreutz, C., Gegner, H. M., Cárdenas, A., Roth, F., Bougoure, J., Guagliardo, P., Wild, C., Pernice, M., Raina, J.-B., Meibom, A., & Voolstra, C. R. (2021). Heat stress destabilizes symbiotic nutrient cycling in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(5), e2022653118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022653118>
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynthesis Research*, *89*(1), 27-41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Roberts, J. M., Fixter, L. M., & Davies, P. S. (2001). Ammonium metabolism in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Hydrobiologia*, *461*(1/3), 25-35. <https://doi.org/10.1023/A:1012752828587>
- Roberty, S., Bailleul, B., Berne, N., Franck, F., & Cardol, P. (2014). PSI Mehler reaction is the main alternative photosynthetic electron pathway in *Symbiodinium* sp., symbiotic dinoflagellates of cnidarians. *New Phytologist*, *204*(1), 81-91. <https://doi.org/10.1111/nph.12903>
- 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., & Plumier, J.-C. (2022). Bleaching physiology : Who's the 'weakest link' — host vs. symbiont? *Emerging Topics in Life Sciences*, *6*(1), 17-32. <https://doi.org/10.1042/ETLS20210228>
- Robison, J. D., & Warner, M. E. (2006). DIFFERENTIAL IMPACTS OF PHOTOACCLIMATION AND THERMAL STRESS ON THE PHOTOBIOLOGY OF FOUR DIFFERENT PHYLOTYPES OF SYMBIODINIUM (PYRRHOPHYTA)1. *Journal of Phycology*, *42*(3), 568-579. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00232.x>
- Rosset, S. L., Oakley, C. A., Ferrier-Pagès, C., Suggett, D. J., Weis, V. M., & Davy, S. K. (2021). The Molecular Language of the Cnidarian–Dinoflagellate Symbiosis. *Trends in Microbiology*, *29*(4), 320-333. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.08.005>
- Roth, M. S. (2014). The engine of the reef : Photobiology of the coral's "algal symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00422>
- Schiphorst, C., & Bassi, R. (2020). Chlorophyll-Xanthophyll Antenna Complexes : In Between Light Harvesting and Energy Dissipation. In A. W. D. Larkum, A. R. Grossman, & J. A. Raven (Éds.), *Photosynthesis in Algae : Biochemical and Physiological Mechanisms* (Vol. 45, p. 27-55). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33397-3_3
- Sheppard, C., Davy, S., Pilling, G., & Graham, N. (2018). *The Biology of Coral Reefs* (Vol. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198787341.001.0001>

- 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>
- Suggett, D. J., & Smith, D. J. (2011). Interpreting the sign of coral bleaching as friend vs. foe : INTERPRETING THE SIGN OF CORAL BLEACHING. *Global Change Biology*, *17*(1), 45-55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02155.x>
- Suggett, D. J., & Smith, D. J. (2020). Coral bleaching patterns are the outcome of complex biological and environmental networking. *Global Change Biology*, *26*(1), 68-79. <https://doi.org/10.1111/gcb.14871>
- Suggett, D. J., Warner, M. E., & Leggat, W. (2017). Symbiotic Dinoflagellate Functional Diversity Mediates Coral Survival under Ecological Crisis. *Trends in Ecology & Evolution*, *32*(10), 735-745. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.07.013>
- 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 TOLERANCES¹. *Journal of Phycology*, *44*(4), 948-956. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00537.x>
- Sun, Y., Han, L., & Strasser, P. (2020). A comparative perspective of electrochemical and photochemical approaches for catalytic H₂O₂ production. *Chemical Society Reviews*, *49*(18), 6605-6631. <https://doi.org/10.1039/D0CS00458H>
- Szabó, M., Larkum, A. W. D., Suggett, D. J., Vass, I., Sass, L., Osmond, B., Zavafer, A., Ralph, P. J., & Chow, W. S. (2017). Non-intrusive Assessment of Photosystem II and Photosystem I in Whole Coral Tissues. *Frontiers in Marine Science*, *4*, 269. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00269>
- Szabó, M., Larkum, A. W. D., & Vass, I. (2020). A Review : The Role of Reactive Oxygen Species in Mass Coral Bleaching. In A. W. D. Larkum, A. R. Grossman, & J. A. Raven (Éds.), *Photosynthesis in Algae : Biochemical and Physiological Mechanisms* (Vol. 45, p. 459-488). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33397-3_17
- Taguchi, S., & Kinzie Iii, R. A. (2001). Growth of zooxanthellae in culture with two nitrogen sources. *Marine Biology*, *138*(1), 149-155. <https://doi.org/10.1007/s002270000435>
- Takahashi, S., Whitney, S., Itoh, S., Maruyama, T., & Badger, M. (2008). Heat stress causes inhibition of the *de novo* synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(11), 4203-4208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708554105>
- 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*, *106*(9), 3237-3242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808363106>
- Takahashi, S., & Yamasaki, H. (2002). Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters*, *512*(1-3), 145-148. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02244-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02244-5)
- Takano, H. (2016). The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in nonphototrophic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *80*(7), 1264-1273. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1156478>
- Tchernov, D., Gorbunov, M. Y., De Vargas, C., Narayan Yadav, S., Milligan, 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*, 101(37), 13531-13535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402907101>
- Tchernov, D., Kvitt, H., Haramaty, L., Bibby, T. S., Gorbunov, M. Y., Rosenfeld, H., & Falkowski, P. G. (2011). Apoptosis and the selective survival of host animals following thermal bleaching in zooxanthellate corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(24), 9905-9909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106924108>
- Thurber, R. V., Payet, J. P., Thurber, A. R., & Correa, A. M. S. (2017). Virus–host interactions and their roles in coral reef health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 15(4), 205-216. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.176>
- Tremblay, P., Grover, R., Maguer, J. F., Legendre, L., & Ferrier-Pagès, C. (2012). Autotrophic carbon budget in coral tissue : A new ¹³C-based model of photosynthate translocation. *Journal of Experimental Biology*, 215(8), 1384-1393. <https://doi.org/10.1242/jeb.065201>
- Ullah Khan, A., & Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & Biology*, 2(7), 437-445. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90259-7](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90259-7)
- van de Water, J. A., Tignat-Perrier, R., Allemand, D., & Ferrier-Pagès, C. (2022). Coral holobionts and biotechnology : From Blue Economy to coral reef conservation. *Current Opinion in Biotechnology*, 74, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.013>
- Vega Thurber, R. L., Burkepile, D. E., Fuchs, C., Shantz, A. A., McMinds, R., & Zaneveld, J. R. (2014). Chronic nutrient enrichment increases prevalence and severity of coral disease and bleaching. *Global Change Biology*, 20(2), 544-554. <https://doi.org/10.1111/gcb.12450>
- Venn, A. A., Loram, J. E., & Douglas, A. E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1069-1080. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm328>
- Veron, J., Stafford-Smith, M., DeVantier, L., & Turak, E. (2015). Overview of distribution patterns of zooxanthellate Scleractinia. *Frontiers in Marine Science*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00081>
- Wang, J.-T., & Douglas, A. E. (1998). Nitrogen Recycling or Nitrogen Conservation in an Alga–Invertebrate Symbiosis? *Journal of Experimental Biology*, 201(16), 2445-2453. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.16.2445>
- Wang, J.-T., Wang, Y.-T., Keshavmurthy, S., Meng, P.-J., & Chen, C. A. (2019). The coral *Platygyra verweyi* exhibits local adaptation to long-term thermal stress through host-specific physiological and enzymatic response. *Scientific Reports*, 9(1), 13492. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49594-z>
- 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/10.1016/j.jembe.2006.07.011>
- 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>
- Wiedenmann, J., D'Angelo, C., Smith, E. G., Hunt, A. N., Legiret, F.-E., Postle, A. D., & Achterberg, E. P. (2013). Nutrient enrichment can increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change*, 3(2), 160-164. <https://doi.org/10.1038/nclimate1661>

Wirtz, W., Stitt, M., & Heldt, H. W. (1982). Light activation of calvin cycle enzymes as measured in pea leaves. *FEBS Letters*, 142(2), 223-226. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80139-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80139-7)

Wooldridge, S. A. (2009). A new conceptual model for the warm-water breakdown of the coral—Algae endosymbiosis. *Marine and Freshwater Research*, 60(6), 483. <https://doi.org/10.1071/MF08251>

Yellowlees, D., Rees, T. A. V., & Leggat, W. (2008). Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, Cell & Environment*, 31(5), 679-694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01802.x>

Zheng, Z.-L. (2009). Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(7), 584-591. <https://doi.org/10.4161/psb.4.7.8540>